

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra Fyziologie živočichů**

# **Vliv hluboké hypotermie na endokrinní funkci tukové tkáně**

**Jana Drápalová**



**Vedoucí diplomové práce: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.**

**Praha 2009**



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením Prof. MUDr. Martina Haluzíka, DrSc.



### **Poděkování:**

Považuji za svou milou povinnost poděkovat svému školiteli Prof. MUDr. Martinu Haluzíkovi, DrSc. za to, že mi umožnil podílet se na zajímavém projektu a za odborné vedení při sepisování této práce. Mé díky patří také Mgr. Markétě Bártlové za přátelskou a trpělivou pomoc při získávání dat a cenné podněty při zpracovávání diplomové práce. A celému kolektivu laboratoře za užitečné rady. Doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc. děkuji za podporu na fakultě.



## **Abstrakt:**

**Úvod a cíle:** Hluboká hypotermie je lékařská metoda užívaná v celé řadě především kardiologických operací. Tuková tkáň je jedním z hlavních endokrinních orgánů, a proto její endokrinní produkce významně ovlivňuje stav pacienta. Cílem této studie bylo zjistit vliv hluboké hypotermie na expresi některých proteinů v tukové tkáni, který zatím není v odborné literatuře popsán.

**Materiál a metody:** Deseti pacientům, kteří podstoupili plánovanou operaci plicní hypertenze, byly odebrány vzorky subkutánní a viscerální tukové tkáně a to na začátku hypotermie, na konci hypotermie a na konci operace. Metodou real-time PCR byly stanoveny relativní genové exprese některých adipocytokinů (BCL-2, GLUT1, GPX1, HIF1- $\alpha$ , IL-6, IRS1, MCP1, MIF, MT3, TNF- $\alpha$ ) z celkového tuku a izolovaných adipocytů.

**Výsledky:** Na konci operace se oproti začátku i konci hypotermie významně zvýšila genová exprese GLUT1 (celkový subkutánní tuk), HIF1- $\alpha$  (celkový tuk subkutánní i viscerální) a IL-6 a MCP-1 (ve všech tkáních). Genová exprese TNF- $\alpha$  v celkovém subkutánním tuku se signifikantně zvýšila na konci operace oproti začátku hypotermie. Genová exprese MIF, BCL-2, MT3, GPX1 a IRS1 se nelišila mezi jednotlivými odběry. Nebyl zjištěn rozdíl celkové exprese jednotlivých adipocytokinů v závislosti na typu tukové tkáně.

**Závěr:** Z našich výsledků vyplývá, že hluboká hypotermie potlačuje vznik zánětlivé odpovědi a následky anoxické fáze operace.

**Klíčová slova:** hluboká hypotermie, tuková tkáň, adipocytokiny, hypoxie, prozánětlivé cytokiny, IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP1, HIF1- $\alpha$ , GLUT1



# The influence of deep hypothermia on the endocrine function of adipose tissue

## Abstract:

**Introduction and aims:** Deep hypothermia is a medical method used in a variety of cardiological operations. Adipose tissue is one of the main endocrine organs and therefore its endocrine function significantly influences the state of a patient. The aim of this study was to explore the influence of deep hypothermia on the expression of selected proteins in adipose tissue, which has yet to be described in scientific literature.

**Material and methods:** Samples of subcutaneous and visceral fat were taken from 10 patients, who underwent planned surgery for pulmonary hypertension. The samples were taken at the beginning and the end of hypothermia, and at the end of the operation, respectively. Real-time PCR method was used to determine relative gene expression of selected adipocytokines (BCL-2, GLUT1, GPX1, HIF1- $\alpha$ , IL-6, IRS1, MCP1, MIF, MT3, TNF- $\alpha$ ) from total fat and isolated adipocytes.

**Results:** Gene expression of GLUT1 (total subcutaneous fat), HIF1- $\alpha$  (total subcutaneous and visceral fat) and IL-6 a MCP-1 (in all tissues) at the end of the operation was significantly higher compared to the gene expression at the beginning and end of hypothermia. Gene expression of TNF- $\alpha$  in total subcutaneous fat increased significantly at the end of the operation compared to the beginning of hypothermia. Gene expressions of MIF, BCL-2, MT3, GPX1 and IRS1 did not differ between the samples. No differences between relative expressions of respective adipocytokines were found between subcutaneous and visceral adipose tissue depots.

**Conclusion:** Our results show that deep hypothermia suppresses the development of inflammatory response and consequences of anoxic period during surgery.

**Key words:** deep hypothermia, adipose tissue, adipocytokines, hypoxia, anti-inflammable cytokines, IL-6, TNF- $\alpha$ , MCP1, HIF1- $\alpha$ , GLUT1



# Obsah

1. Úvod.....	10
2. Přehled literatury.....	11
2.1. Tuková tkáň.....	11
2.1.1. Složení tukové tkáně.....	11
2.1.2. Endokrinní funkce.....	11
2.1.3. Typy tukové tkáně.....	13
2.2. Hypotermie.....	14
2.2.1. Definice hypotermie a její základní dělení.....	14
2.2.2. Praktické využití léčebné hypotermie.....	14
2.2.3. Vliv hypotermie na organizmus.....	15
2.3. Hypoxie.....	17
2.4. Zkoumané geny.....	18
2.4.1. BCL-2.....	18
2.4.2. GLUT1.....	19
2.4.3. GPX1.....	20
2.4.4. HIF1- $\alpha$ .....	21
2.4.5. IL-6.....	22
2.4.6. IRS1.....	24
2.4.7. MCP1.....	25
2.4.8. MIF.....	26
2.4.9. MT3.....	27
2.4.10. TNF- $\alpha$ .....	28
3. Cíl práce.....	30
4. Materiál a metody.....	31
4.1. Popis operace, odebrání vzorků.....	31
4.2. Uchování tukové tkáně a izolace adipocytů.....	33
4.2.1. Chemikálie a materiál.....	33
4.2.1.1. Chemikálie.....	33
4.2.1.2. Materiál.....	34
4.2.2. Postup.....	34
4.2.2.1. Uchování celkové tukové tkáně.....	34
4.2.2.2. Izolace adipocytů z celkové tukové tkáně.....	34
4.3. Izolace celkové RNA.....	35
4.3.1. Princip.....	35
4.3.2. Chemikálie a materiál.....	36
4.3.2.1. Chemikálie.....	36
4.3.2.2. Materiál.....	36
4.3.3. Postup.....	37
4.3.3.1. Homogenizace tkání.....	37



4.3.3.2. Izolace celkové RNA na MagNA Pure Compact.....	38
4.3.3.3. Změření koncentrace celkové vyizolované RNA na spektrofotometru.....	38
4.3.3.4. Elektroforetické ověření integrity celkové vyizolované RNA.....	38
4.4. Reverzní transkripce.....	39
4.4.1. Princip.....	39
4.4.2. Chemikálie a materiál.....	40
4.4.2.1. Chemikálie.....	40
4.4.2.2. Materiál.....	40
4.4.3. Postup.....	41
4.5. Real-time PCR.....	42
4.5.1. Princip.....	42
4.5.2. Chemikálie a materiál.....	43
4.5.2.1. Chemikálie.....	43
4.5.2.2. Materiál.....	44
4.5.3. Postup.....	44
4.5.3.1. Výběr vhodné endogenní kontroly.....	45
4.6. Statistické vyhodnocení výsledků.....	45
5. Výsledky.....	46
5.1. Izolace celkové RNA.....	46
5.1.1. Spektrofotometrie.....	46
5.1.2. Gelová elektroforéza.....	46
5.2. Výběr vhodné endogenní kontroly pro Real-time PCR.....	46
5.3. Výsledky stanovení genových expresí a sérových hladin sledovaných adipokinů.....	47
5.3.1. BCL-2.....	48
5.3.2. GLUT1.....	49
5.3.3. GPX1.....	50
5.3.4. HIF1- $\alpha$ .....	51
5.3.5. IL-6.....	52
5.3.6. IRS1.....	55
5.3.7. MCP1.....	56
5.3.8. MIF.....	57
5.3.9. MT3.....	58
5.3.10. TNF- $\alpha$ .....	59
5.3.11. Sérové hladiny dalších adipokinů.....	61
6. Diskuze.....	65
7. Závěrečné shrnutí.....	70
8. Seznam použité literatury.....	71



## Seznam zkratek

ACTH	Adrenokortikotropní hormon
B2M	Beta-2-mikroglobulin
BAX	BCL-2-asociovaný X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BMI	Index tělesné hmotnosti (body mass index)
CCL2	Chemokin (C-C motif) ligand 2
CCR2, 4	Receptor pro chemokin (C-C motif) 2, 4
CDU	Jednotka trávení kolagenu (Collagen digestion units)
CNS	Centrální nervový systém
CO <sub>2</sub>	Oxid uhličitý
CPB	Kardiopulmonální bypass
CRP	C-reaktivní protein
CTEPH	Chronická trombembolická plicní hypertenze (Chronic thromboembolic pulmonary hypertension)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FIH	Faktor inhibující HIF1- $\alpha$
GLUT1, 4	Glukózový transportér 1, 4
GPX1	Glutathion peroxidáza 1
HIF1- $\alpha$ , $\beta$	Hypoxii indukující faktor 1, podjednotka $\alpha$ , $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IGF-1	Inzulínu podobný růstový faktor 1 (Insulin like growth factor-1)
IL	Interleukin
IL-6R $\alpha$ , $\beta$	Receptor pro interleukin 6 typ $\alpha$ , $\beta$
IRS1	Inzulín receptor substrát 1
JAK	Janus kináza
LPL	Lipoproteinová lipáza



LRP10	Protein 10 příbuzný receptorům pro lipoproteiny o nízké hustotě (Low density lipoprotein receptor-related protein 10)
MAC	Mitochondriální apoptózu indukující membránový kanál
MAPK	Mitogenem aktivovaná protein kináza (Mitogen-activated protein kinase)
MCP1	Monocyty přitahující protein 1 (Monocyte chemoattractant protein 1)
MIF	Faktor inhibující migraci makrofágů (Macrophage inhibitory factor)
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MT3	Metallothionein 3
NFκB	Nukleární faktor kappa B
PAI-1	Inhibitor aktivátoru plazminogenu 1 (Plasminogen activator inhibitor-1)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PCT	Prokalcitonin
PHD	Proteiny hydroxylující prolinovou oblast
PI3K	Fosfatidylinositol trifosfát-3-kináza
ROS	Kyslíkové radikály (Reactive oxygen species)
SEM	Střední chyba průměru (Standart error mean)
SH2	Doména 2 homologní s genem Src
sIL-2R	Solubilní receptor pro interleukin 2
SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
STAT	Transduktor signálu a aktivátor transkripce (Signal transducers and activator of tanscription protein)
sTNFR1, 2	Solubilní receptor pro tumor nekrotizující faktor $\alpha$ , typ 1,2 (Soluble tumor necrosis factor receptor type 1, 2)
TACE	TNF- $\alpha$ konvergující enzym
TNF- $\alpha$	Tumor nekrotizující faktor $\alpha$ (Tumor necrosis factor $\alpha$ )
usCRP	Ultra senzitivní C-reaktivní protein
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor (Vascular endothelial growth factor)
VHL	von Hippel-Lindau protein



# 1. Úvod

Za normálních okolností je lidská teplota regulována v poměrně úzkém fyziologickém rozmezí. Hluboká hypotermie je stav organismu, který, není-li kontrolován, může mít pro člověka fatální následky. Je ovšem doložena řada případů, kdy náhodné vystavení hluboké hypotermii, například v ledové vodě, naopak vedlo k záchraně života, především díky částečnému potlačení následků mozkové ischemie způsobené nedostatkem kyslíku. Objevení pozitivních účinků hypotermie na lidský organismus vedlo ke vzrůstajícímu zájmu o tuto problematiku. Takzvaná léčebná hypotermie začala být v praxi používána při různých náročných operacích vyžadujících krátkodobou zástavu krevního oběhu. V praxi je tohoto postupu dnes již standardně využíváno na jednotkách intenzivní péče u pacientů po kardiopulmonální resuscitaci.

V odborné literatuře bylo již hypotermii a jejímu vlivu na organismus věnováno nepřehledné množství studií. Ovšem ty se zabývají především vlivem hypotermie na mozek a srdce, ostatní orgány jsou poměrně opomíjeny. Lze říci, že vliv hluboké hypotermie na jeden z hlavních endokrinních orgánů – tukovou tkáň, je v současné době zcela neprozkoumaný.

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na zjištění vlivu hluboké hypotermie na genovou expresi některých významných proteinů exprimovaných tukovou tkání.



## **2. Přehled literatury**

### **2.1. Tuková tkáň**

#### **2.1.1. Složení tukové tkáně**

Existují dva základní typy tukové tkáně – bílá a hnědá. Hnědá tuková tkáň se u lidí vyskytuje ve větší míře pouze u novorozenců, u dospělých je její výskyt prakticky zanedbatelný. Proto bude v této práci dále rozebírána již jen bílá tuková tkáň.

Tuková tkáň je komplexní orgán složený především ze samotných tukových buněk – adipocytů. Ve významné míře jsou tu ovšem zastoupeny i endoteliální a imunokompetentní buňky, nervová vlákna a fibroblastům podobné preadipocyty (Frayn et al., 2003; Chaldakov et al., 2003).

Jedná se o silně prokrvenou tkáň. V klidu jí protéká za minutu 3 ml krve na 100 g tkáně, kdežto na stejnou hmotnost kosterního svalu v klidu připadá jen poloviční průtok (Hauner et al., 1989). Tuková tkáň je inervována sympatickým nervovým systémem, který je jedním z významných regulátorů jejího metabolického stavu (Frayn et al., 2003).

#### **2.1.2. Endokrinní funkce**

Dříve byla tuková tkáň považována za orgán sloužící pouze jako zásobárna energie pro organismus. V roce 1987 navrhl Siiteri, že by mohla mít i endokrinní funkci, ovšem v souvislosti se steroidními hormony. Definitivní potvrzení tukové tkáně jako endokrinního orgánu přišlo v letech 1993 a 1994, kdy byla prokázána produkce TNF- $\alpha$  tukovou tkání a byl identifikován a charakterizován hormon leptin (Hotamisligil et al., 1993; Zhang et al., 1994; Kershaw a Flier, 2004). Studie na myších modelech pak ukázaly, že tuková tkáň je endokrinní orgán produkující mnoho proteinů nezbytných pro normální fyziologickou homeostázi organismu (Rajala a Scherer, 2003). Důležitost řady z těchto hormonů byla později potvrzena i klinickými studiemi u lidí.

Tuková tkáň vylučuje celou řadu bioaktivních peptidů označovaných souhrnným názvem adipokiny nebo také adipocytokiny. Jedná se jak o klasické cytokiny, tak látky cytokinům strukturálně podobné (Frayn et al., 2003). Adipocytokiny mohou mít jak lokální (autokrinní a parakrinní), tak systémovou (endokrinní) funkci (Kershaw a Flier, 2004). Přesný vliv na organismus není ještě u mnoha z nich přesně určen. Přesto je jasné, že společně tvoří



komunikační síť s ostatními orgány a tkáněmi lidského těla. Ovlivňují například kosterní svalstvo, nadledviny, mozek a sympatický nervový systém a účastní se řízení příjmu potravy a energetické rovnováhy, inzulínové sensitivity, angiogeneze, krevního tlaku, metabolismu lipidů a hemostázy (Ronti et al., 2006).

Adipocytokiny jsou uvolňovány nejen hlavní složkou tukové tkáně, tedy adipocyty, ale významný podíl na produkci adipocytokinů mají i neadipocytární složky (Fain et al., 2004). U většiny z nich ale zatím není znám přesný poměr mezi produkcí adipocyty a neadipocytární složkou tukové tkáně (Coppack, 2001). Jejich produkce se liší i mezi jednotlivými vývojovými stadii buněk, například preadipocyty produkují méně TNF- $\alpha$ , než zralé tukové buňky (Frayn et al., 2003).

Jak již bylo řečeno, adipocytokinů již byla objevena celá řada a stále jsou objevovány další. Jedná se například o leptin, rezistin, vistafin, TNF- $\alpha$ , interleukiny (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10), MCP1, komplementové proteiny (adipsin, komplementový faktor B, adiponektin), MIF, PAI-1 a mnoho dalších.

Produkce adipocytokinů byla zkoumána i u kriticky nemocných pacientů. Křemen et al. ve své práci z roku 2006 zjišťovali změnu exprese v subkutánním a viscerálním tuku a změnu sérových hladin prozánětlivých adipocytokinů během přibližně 4 hodiny trvající kardiologické operace. Zjistili nárůst sérových hladin IL-6 43x 12hodin po operaci, nárůst MCP-1 6x už na konci operace, menší píky TNF- $\alpha$  a leptinu 6 a 12 hodin po operaci. Sérová hladina rezistinu vzrostla za 24 hodin od operace 4krát a v adiponektinu nebyly zjištěny žádné změny. Změna exprese sledovaných cytokinů byla mnohem rychlejší než změna sérových hladin – k signifikantní změně došlo již během operace, tedy během 4 hodin. Exprese mRNA TNF- $\alpha$  a CD45 výrazně stouply v subkutánním tuku. Exprese IL-6, rezistinu a MCP-1 mRNA signifikantně vzrostly během operace v obou tukových tkáních. V expresi leptinu a adiponektinu nedošlo během operace k významné změně. Závěr této studie tedy byl, že jak subkutánní, tak viscerální tuková tkáň jsou zdrojem prozánětlivých cytokinů u pacientů při kardiologické operaci a to může přispívat k rozvoji pooperační inzulínové rezistence (Křemen et al., 2006).

Tukové tkáni a látkám jí produkovaným byla v poslední době věnována velká pozornost, protože velká řada adipocytokinů se podílí na vzniku chorob postihujících stále větší část populace. Jedná se jak o samotnou obezitu, tak i o inzulínovou rezistenci, diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémii a arteriální hypertenzi. Druhým extrémem pak může být onemocnění mentální anorexii, které je spojeno s výrazným úbytkem tukové tkáně.



### 2.1.3. Typy tukové tkáně

Tuková tkáň se v závislosti na svém umístění výrazně liší. Nejvýznamnějšími, a tudíž i nejvíce popsanými typy tukové tkáně, jsou viscerální (útrobní) a subkutánní (podkožní). Endokrinní hormony vylučované viscerálním tukem jsou uvolňovány do portálního systému a tudíž mají přímý přístup do jater a z toho plynoucí vliv na metabolismus tuků a glukózy. Oproti tomu subkutánní tuk uvolňuje látky do systémového oběhu a jeho úloha není tolik prozkoumána. Viscerální adipocyty vykazují nejvyšší metabolickou aktivitu (Frayn et al., 2003).

Jednotlivé typy tukové tkáně vykazují rozdílný poměr produkce adipocytokinů. Například IL-6 a PAI-1 jsou více uvolňovány viscerálním, zatímco leptin subkutánním tukem. Zároveň se také liší v expresi receptorů, což ovlivňuje jejich schopnost reagovat na aferentní signály (Kershaw a Flier, 2004). To vysvětluje rozdílnou odpověď jednotlivých typů tukové tkáně na některé cytokiny (Coppack, 2001).

Množství odlišností zjištěných mezi jednotlivými typy tukové tkáně vede k názoru, že tuková tkáň je ve skutečnosti souborem několika podobných, ale funkčně značně odlišných endokrinních orgánů.



## **2.2. Hypotermie**

### **2.2.1. Definice hypotermie a její základní dělení**

Teplota jádra u člověka je za normálního stavu udržována v rozmezí 36,5 – 37,5 °C. Z toho přímo vyplývá definice hypotermie jako stav organismu, při kterém teplota jádra klesne pod 36,5 °C.

Podle míry poklesu teploty se rozlišují tři základní typy hypotermie:

- mírná – většinou se udává rozmezí 35-32 °C
- střední – 32-28 °C
- hluboká – pokles tělesné teploty pod 28 °C

Dále existují dva typy hypotermie, lišící se samotnou příčinou vzniku:

- náhodná hypotermie – nastává při dlouhodobém vystavení organismu teplotě nižší, než je jeho termoneutrální zóna nebo pokud stav organismu neumožňuje dostatečné zapojení termoregulačních mechanismů. Tento typ hypotermie představuje častou komplikaci operativních zákroků, případně nastává při nehodách jako je tonutí ve studené vodě nebo zavalení lavinou.
- uměle navozená hypotermie – lékařská metoda, při které je pacient cíleně ochlazován a zároveň je podáním medikamentů zabráněno zapojení termoregulačních mechanismů, především svalovému třesu, a z toho plynoucímu vyčerpání ATP a navození šoku organismu.

### **2.2.2. Praktické využití léčebné hypotermie**

Terapeutické využití hypotermie je zmíněno již v nejstarším medicínském textu na světě, v takzvaném papyru Edwina Smithse starém okolo 3500 let (Hildebrand et al., 2004). Podchlazení organismu, často pouze lokální, bylo používáno jako forma anestézie.

Léčebná hypotermie je v praxi při kardiochirurgických operacích běžně používána od 50tých let (Solař, 2004). Zde se již jedná o využití hluboké hypotermie, která je používána při operacích, u kterých je nutná zástava krevního oběhu.



### 2.2.3. Vliv hypotermie na organizmus

Snížení tělesné teploty o 10 °C vede podle van Hoffova pravidla k snížení rychlosti enzymatických reakcí o polovinu. Na poklesu rychlosti metabolismu se podílí také pokles fluidity lipidických membrán (Zachariassen, 1991). S tím je spojen menší nárok tkání na kyslík (Marohn a Marohn, 1994). Zároveň také klesá produkce CO<sub>2</sub>, k tomuto jevu ovšem dochází pravděpodobně jen u střední a hluboké hypotermie (Pudimat a Lennon, 1994). Hypotermie také posouvá oxyhemoglobinovou disociační křivku a tedy snižuje dostupnost kyslíku pro tkáně (Garcia a Gantt, 1994). Také je zhoršena cirkulace krve, protože krevní viskozita roste o 2 % na každý 1 °C snížení teploty tělesného jádra (Hildebrand et al., 2004 podle Fischer et al., 1987). Z tohoto důvodu při hypotermii hrozí vznik hypoxie i přes snížené nároky tkání na kyslík.

Pokles tělesné teploty vede ke změně rozpustnosti krevních plynů a s tím související změně acidobazické rovnováhy (Solař, 2004). Je narušena funkce membránové Na-K pumpy, to vede ke snížené intracelulární koncentraci draslíku (Marohn a Marohn, 1994). Hypotermie dále vede k poklesu uvolňování inzulínu a zároveň snížení periferní utilizace substrátu, což má za následek vzrůst glykémie (Solař, 2004; Garcia a Gantt, 1994).

Nepříznivým efektem hypotermie je prodloužení krvácení, protože přímo inhibuje koagulační kaskádu. Zde jsou narušeny hned tři hlavní mechanismy: funkce krevních destiček, enzymatická funkce srážlivého faktoru i fibrinolytická aktivita (Sessler, 2001).

Hypotermie má vliv na imunologickou reakci organismu, protože tlumí zánětlivou reakci. Množství leukocytů jejím vlivem klesá až o 80 % (Garcia a Gantt, 1994). U pacientů s teplotou jádra pod 34,5 °C klesá množství periferních lymfocytů a je potlačena aktivita NK buněk (Saito et al., 2001). Beilin et al. ve své práci z roku 1998 zjistili při velmi mírné hypotermii 24 hodin od operace nižší hladinu IL-1 a IL-2 oproti normotermní skupině. U IL-6 a TNF- $\alpha$  ovšem žádný rozdíl nezaznamenali (Beilin et al., 1998). Nesignifikantní nárůst hladiny IL-6 především druhý pooperační den a signifikantní nárůst hladiny TNF- $\alpha$  již během operace byl zjištěn u hypotermní oproti normotermní skupině pacientů při operaci srdce s použitím mimotělního oběhu (Slavík, 1998).

Mnoho studií se zabývalo vlivem hypotermie na mozek. Hlavním zjištěním bylo, že při mozkové ischemii dochází vlivem hypotermie k významnému snížení uvolňování dopaminu (a to až o 60 %) a až k úplnému zastavení uvolňování glutamátu, oproti ischemii za normotermních podmínek. Nárůst koncentrace volných mastných kyselin ale ovlivněn není



(Busto et al., 1989). Mnoho studií potvrdilo skutečnost, že hypotermie snižuje potřebu kyslíku v mozku a tím představuje ochranu před vznikem ischemie (Bernard et al., 2002). V roce 1994 zjistili Lei et al., že mírná hypotermie má pro mozek ještě další důležitý ochranný vliv – zvyšuje obsah redukovaného glutathionu a aktivitu superoxid dismutázy a glutathion peroxidázy. Tím účinně snižuje negativní vznik volných kyslíkových radikálů (Lei et al., 1994; Globus et al., 1995).

Dlouho se předpokládalo, že mírná hypotermie by mohla mít nepříznivý efekt na srdeční činnost, to ovšem nebylo prokázáno (Bernard et al., 2002). Prokazatelně se ale zvyšuje aktivita sympatiku, plazmatická koncentrace katecholaminů a adrenálních steroidů (Garcia a Gantt, 1994). To má kromě výrazné vazokonstrikce za následek tachykardii a 4-5ti násobné zvýšení srdečního výdeje (Hildebrand et al., 2004). Vliv hypotermie byl pozorován i u kosterních svalů. Například v roce 1989 dokázali Heier et al., že mírná hypotermie vede ke snížení síly kontrakce adductor pollicis o 10-15 % na 1 °C (Heier et al., 1989).

Překvapivě v literatuře chybí studie o vlivu hluboké hypotermie na tukovou tkáň. Například internetová databáze PubMed nalezne při zadání termínů "adipose tissue" a "deep hypothermia" pouze 8 článků a žádný z nich se netýká přímo této problematiky.



## 2.3. Hypoxie

Hypoxie je obecně stav organismu, při kterém dochází ke snížení koncentrace kyslíku ve tkáních. Příčinou může být buď přímo nízká koncentrace kyslíku ve vdechovaném vzduchu nebo poškození transportu kyslíku do tkání. V souvislosti s hypotermií se jedná o druhý případ. Při poklesu tělesné teploty dochází k posunu oxyhemoglobinové disociační křivky (Garcia a Gantt, 1994) a zároveň klesá rychlost cirkulace krve (Hildebrand et al., 2004), takže se do tkání celkově dostává menší množství kyslíku.

Organismus se s hypoxií snaží vyrovnat a co nejrychleji obnovit původní úroveň okysličení. To je zajištěno rychlými změnami v hematopoeze, dýchání a kardiovaskulárním systému (Smith et al., 2008). S tím je samozřejmě také spojena změna exprese některých genů. Zatím není zcela jasné, o které geny se jedná (Wang et al., 2007).

Hlavním markerem hypoxie je HIF1- $\alpha$ , který je při snížené koncentraci exprimován všemi typy buněk (více viz. kapitola 2.4.4.). Přítomnost HIF1- $\alpha$  vede v buňce k iniciaci genové transkripce širokého spektra genů vedoucích k adaptaci organismu na hypoxii a ochraně před ní. V tukové tkáni tak například stoupá exprese celé řady adipokinů jako jsou MT3, GLUT1, IL-6, leptin, MIF nebo VEGF. Exprese GPX-1 naopak klesá a zdá se, že například TNF- $\alpha$  a MCP-1 nejsou hypoxií nijak ovlivněny (Wang et al., 2007; Wang et al., 2008).

Hypoxie má na organismus mnoho různých vlivů. Inhibuje diferenciaci zárodečných buněk, včetně přeměny preadipocytů na zralé adipocyty (Lin et al., 2006).



## 2.4. Zkoumané geny

### 2.4.1. BCL-2

BCL-2 (B-cell lymphoma 2) je protein lokalizovaný na vnější mitochondriální membráně, endoplazmatickém retikulu a jaderné membráně. Poprvé byl zjištěn na chromozomální translokaci t (14; 18), která vedle sebe staví chromozom 18 a těžký řetězec imunoglobulinu na chromozomu 14 a nachází se až u 60 % pacientů s lidským folikulárním lymfomem (Hockenbery et al., 1991, Zamzami et al., 1998).

Patří do široké rodiny BCL-2-podobných proteinů, které se zásadně podílejí na regulaci buněčné smrti a to jak pro- tak antiapoptoticky. Samotný BCL-2 pak spolu s dalšími členy BCL-2 rodiny jako jsou Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 a A1/B1 podporuje přežívání buněk a jejich nedostatečná exprese vede k degeneraci tkání (Hinds et al., 2003). Mechanismus antiapoptotického vlivu BCL-2 je založen především na regulaci aktivace mitochondriálního apoptozu-indukujícího membránového kanálu (MAC). Ten vytváří specifické póry pro intramembránové proteiny jako je cytochrom c a umožňuje jim průchod z buňky ven do cytosolu (Kinnally a Antonsson, 2007). Tím je nastartována kaskáda vedoucí k programované buněčné smrti. Exprese BCL-2 pak dále funguje jako prevence proti všem změnám ve fyziologii buňky spojeným s apoptózou. Jsou to například změny mitochondrií, aktivace kaspáz a nukleáz, redistribuce iontů a oxidační změny v buněčném redox potenciálu (Zamzami et al., 1998). BCL-2 také zlepšuje přežití buňky v podmínkách hladovění a stimuluje ochranu antioxidanty. Blokuje produkci kyslíkových radikálů, které hrají roli v apoptických a nekrotických procesech (Longo et al., 1997). Některé členy BCL-2 rodiny mají funkci potenciálních onkogenů či tumor-supresorových genů. Ovšem samotný BCL-2 má jen malý transformující potenciál (Zamzami et al., 1998). Při mutaci BCL-2 dochází k redukci tělesné hmotnosti a délky života (Nakayama et al., 1994).

BCL-2 je normálně exprimován ve zralých T a B lymfocytech, ale i v dalších dlouhožijících buňkách jako jsou neurony, kmenové buňky ve střevu a kůži, nezralých prekurzorech erytrocytů, myelocytech, trombocytech (Hockenbery et al., 1991) a adipocytech (Gullicksen et al., 2003).

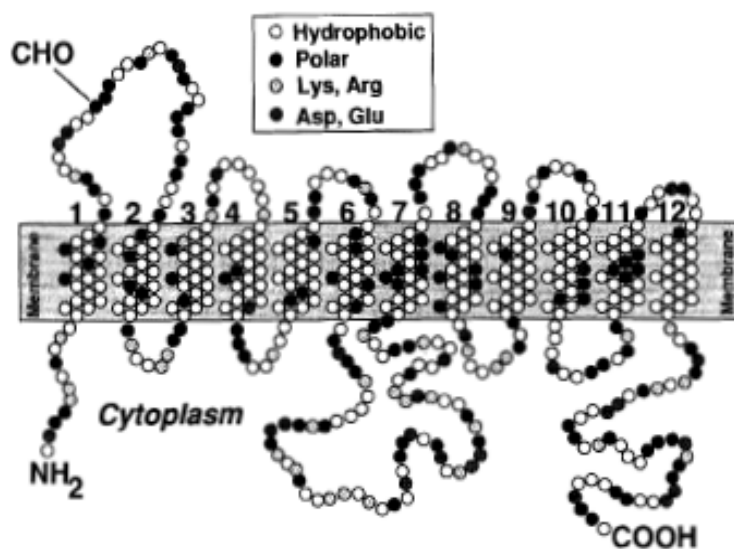
Gullicksen et al. v roce 2003 ukázali, že podávání leptinu může mít vliv na množství cytosolického BCL-2 v tukové tkáni. Přitom je ovšem také ovlivněna exprese proapoptického proteinu BAX (BCL-2-asociovaný X protein), který je BCL-2 blízce příbuzný. Vliv leptinu



na tukovou tkáň z různých míst organismu (retroperitoneální, epikardiální a z oblasti třísel) se přitom lišil. Exprese BCL-2 nejvíce vzrostla po čtyřdenním podávání leptinu v epikardiálním tuku, to také bylo spojeno s nejmenším poklesem váhy. Naopak v tuku z oblasti třísel došlo jen k malému vzrůstu hladin BCL-2 a k velkému vzrůstu BAX, což mělo za následek větší úbytek tukové hmoty. Mitochondriální poměr BCL-2/BAX vzrostl ve všech zkoumaných typech tukové tkáně. 21 dnů po podání leptinu pak hladina BCL-2 ve všech sledovaných typech tuku ještě vzrostla, což by ukazovalo na prevenci organismu proti ztrátě buněk při obnově tkáně (Gullicksen et al., 2003).

## 2.4.2. GLUT1

Glukózový transportér 1 (GLUT1) patří mezi na  $\text{Na}^+$  nezávislé glukózové transportéry. Je kódován genem SLC2A1 a je typický 12 transmembránovými doménami, které tvoří pór umožňující přístup glukózy do buňky. Jedná se o usnadněnou difuzi využívající difuzního gradientu glukózy přes plazmatickou membránu. Je exprimován především v mozku, včetně hematoencefalické bariéry, a červených krvinkách. Nižší exprese byla zaznamenána také ve svalech, játrech a tukové tkáni (Wood a Trayhurn, 2003).



Obr. 1: Topologie GLUT1 (Mueckler, 1994)

Na expresi GLUT1 má vliv mnoho faktorů, pozitivně jej ovlivňují například thyroideální hormony, TNF- $\alpha$ , inzulin a mnoho dalších. Hladina krevní glukózy negativně koreluje s expresí GLUT1, čímž je zajištěn relativně konstantní tok glukózy do buňky (Mueckler, 1994).



GLUT1 je v adipocytech zodpovědný za základní glukózový transport mezi krví, extracelulární kapalinou a cytoplazmou (Mueckler, 1994). GLUT1 je neustále přítomen v plazmatické membráně a tím zajišťuje konstantní přísun nízké hladiny glukózy, která je potřebná pro základní funkce buňky (Mueckler, 1994). Na rozdíl od druhého glutamátového receptoru exprimovaného na adipocytech (GLUT4), nestoupá jeho transportní funkce vlivem inzulínu (Kahn, 1994). Wood et al. v roce 2007 zjistili, že exprese GLUT1 v lidských adipocytech je zvýšena hypoxií a to je provázáno zvýšeným příjmem glukózy (Wood et al., 2007).

### **2.4.3. GPX1**

Glutathion peroxidáza 1 (GPX1) byla objevena v roce 1957 Millssem jako enzym chránící červené krvinky proti hemolýze způsobené volnými kyslíkovými radikály. Principem byla katalýza oxidace redukováného glutathionu pomocí hydrogen peroxidu (Mills, 1957).

GPX1 je klíčový antioxidační enzym většiny buněk. Jeho specifickým redukčním substrátem je glutathion, díky kterému dokáže metabolizovat hydrogen peroxidy na vodu, lipidové peroxidy na příslušné alkoholy. Tím inhibuje jimi indukovanou apoptózu (Blankenberg et al., 2003). Zvýšená aktivita GPX1 může vést k vyčerpání zásob buněčného redukováného glutathionu, což vede k inhibici dalších biochemických drah (Arthur, 2000).

GPX1 má zásadní roli v modulaci ROS (reactive oxygen species) – volných kyslíkových radikálů a z toho plynoucí aktivaci transkripčních faktorů. Proto aktivace GPX1 díky mastným kyselinám může být důležitá v redox regulaci transkripčních faktorů v buňce (Arthur, 2000).

Bylo zjištěno, že GPX1 přes redukcí c-Src kinázové aktivity negativně reguluje transkripční faktor NFκB (Fan et al., 2003). Ten je lokalizován v jádře, aktivován stresem a díky vlivu na expresi adipokinů přispívá k inzulinové rezistenci. Právě inaktivace GPX1 by mohla být příčinou aktivace NFκB a následující stresové odpovědi u obézních. Obezita je stav mírného perzistentního zánětu, který vede ke zvýšenému oxidativnímu stresu. Oxidační podmínky vedou k produkci reaktivních aldehydů, které by mohly mít za následek alkylaci aktivního selenocysteinového místa GPX1 a tím k jeho deaktivaci (Grimsrud et al., 2007).

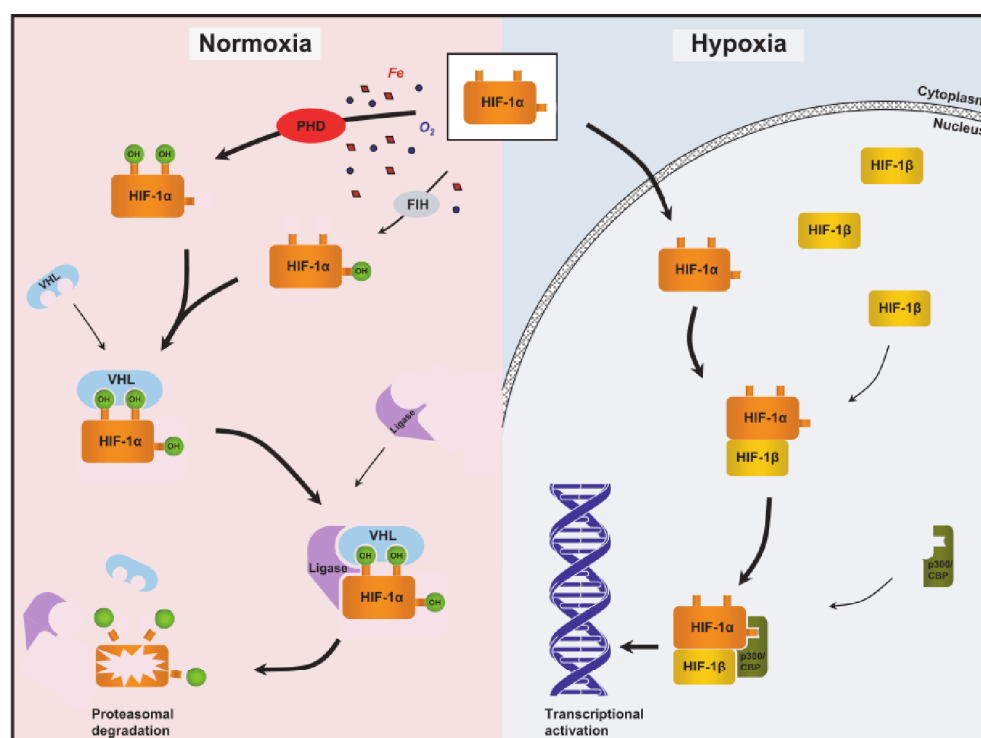
Wang et al. ve své studii z roku 2008 zjistili snížení hladiny exprese GPX1 mRNA při 24 hodinovém vystavení adipocytů hypoxii (1 % O<sub>2</sub>) (Wang et al., 2008).



#### 2.4.4. HIF1- $\alpha$

Hypoxii indukující faktor 1 s  $\alpha$  podjednotkou (HIF1- $\alpha$ ) je transkripční faktor nacházející se v buňkách za podmínek snížené koncentrace kyslíku ve tkáních, tedy při hypoxii, a to ve všech typech buněk v organismu. Je hlavním spouštěčem na hypoxii citlivých drah v adipocytech a jeho exprese se výrazně nemění při přeměně preadipocytů na zralé adipocyty (Lin et al., 2006). Za expresi HIF1- $\alpha$  jsou v tukové tkáni zodpovědné především stromavaskulární buňky (Wang et al., 2007).

HIF1 je heterodimerní helix-loop-helix transkripční faktor skládající se z kyslíkem regulované HIF1- $\alpha$  podjednotky a na kyslíku nezávislé HIF1- $\beta$  podjednotky. Za normoxických podmínek je HIF1- $\alpha$  podjednotka hydroxylována. Pomocí E3 ubiquitin ligázového komplexu, konkrétně jeho součásti – von Hippel-Lindau proteinu, je pak HIF1- $\alpha$  nasměrován do proteazomu, kde je degradován (Maxwell, 2005; Yu et al., 2001; Wang et al., 1995).



Obr. 2: Schéma aktivace a degradace HIF1- $\alpha$  v závislosti na kyslíku (Smith et al., 2008)

FIH – faktor inhibující HIF1- $\alpha$ , PHD – proteiny hydroxylojící prolinovou oblast, VHL – von Hippel-Lindau protein

Hypoxie vyvolává v buňce zvýšení hladiny mitochondriálního ROS, to vede k aktivaci fosfatidylinositol trifosfát-3 kinázy (PI3K) a následné stabilizaci HIF1- $\alpha$ . HIF1- $\alpha$  tedy již není



hydroxylován a odbouráván a tudíž dochází k jeho akumulaci v buňce a translokaci do jádra. Zde dimerizuje s HIF1- $\beta$  a tím iniciuje genovou transkripci (viz Obr. 2) (Chandel et al., 2000; Lin et al., 2006).

HIF vazebné geny kódují proteiny zprostředkovávající adaptivní odpověď organismu na nedostatek kyslíku. Jedná se o stovky genů, ať už přímo nebo nepřímo regulovaných HIF, které jsou zahrnuty ve funkčních drahách jako je angiogeneze, apoptóza, metabolismus nebo regulace vazomotoriky (Semenza, 2000). Je to například gen pro lidský erythropoetin, vaskulární endoteliální růstový faktor, glykolytické enzymy nebo glukózové transportéry GLUT1 a 3 (Semenza, 2000; Wang et al., 1995).

Z funkce HIF1- $\alpha$  vyplývá, že míru jeho exprese je možné považovat za ideální molekulární marker pro zjištění hypoxie v tkáni. Například Canello et al. v roce 2005 zjistili, že u pacientů s morbidní obezitou je pozorována zvýšená exprese HIF1- $\alpha$ , která klesá po snížení hmotnosti (Canello et al., 2005). Z toho je tedy možné vyvodit závěr, že jedním z vlivů obezity na tukovou tkáň je vznik mírné hypoxie, která pak vede ke vzniku mírného zá-  
nětu.

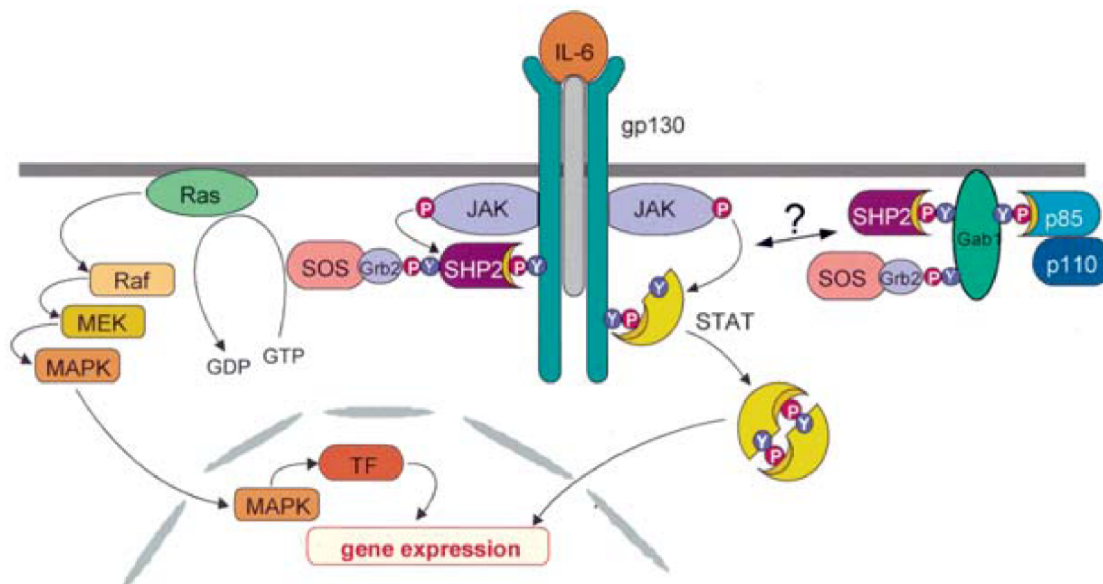
## **2.4.5. IL-6**

Interleukin-6 (IL-6) je cytokin se širokým polem působnosti, které zahrnuje jak prozánětlivé (např. aktivace a diferenciací T a B-buněk, indukce uvolňování proteinů akutní fáze hepatocyty), tak protizánětlivé reakce jako je vliv na snížení exprese prozánětlivých cytokinů (Jones et al., 2001; Xing et al., 1998). Podílí se na buněčných signálních drahách, které vedou k procesům proliferace, diferenciací, ale i apoptózy. Je produkován celou řadou buněčných typů, jako jsou endoteliální, svalové, většina imunitních buněk, adipocyty,  $\beta$ -buňky, hepatocyty, mikrogliální buňky, astrocyty, fibroblasty a mnoho dalších (Kristiansen a Mandrup-Poulsen, 2005; Fried et al., 1998).

Patří do rodiny cytokinů charakteristické čtyřmi  $\alpha$ -helixovými jednotkami. Váže se na komplex membránově vázaných glykoproteinů skládající se ze dvou receptorových podjednotek. Jedná se o IL-6R $\alpha$  (označován také jako gp80, CD126), který je exprimován pouze na hepatocytech, leukocytech a adrenokortikoidních buňkách hypofýzy, ale nemá signální úlohu. Vyskytuje se jak v membránově vázané, tak v nejméně dvou solubilních formách. Oproti tomu druhá podjednotka – gp130 (IL-6R $\beta$ , CD130) není buněčně specifická a je vždy vázaná na membránu. Po navázání ligandu je gp130 fosforylována a asociuje s JAK kinázou, čímž aktivuje JAK/STAT transkripční dráhu. Po asociaci JAK kinázy s SH2 dochází



také k aktivaci druhé významné transkripční dráhy – MAPK kaskády (Jones et al., 2001; Kristiansen a Mandrup-Poulsen, 2005; Heinrich et al., 1998). Tyto dráhy pak mimo jiné vedou k diferenciaci a proliferaci T- a B-buněk, stimulaci produkce ACTH hypofýzou a vyvolání horečky (Heinrich et al., 1998).



Obr. 3: Aktivace JAK/STAT dráhy a MAP kinázové kaskády pomocí IL-6R (Heinrich et al., 2003)

Jedná se o hormon mimo jiné uvolňovaný i z tukové tkáně. Syntéza IL-6 z tukové tkáně do systémového oběhu je závislá na denní době s nárůstem ve večerních hodinách. Subkutánní tuková tkáň produkuje 15 – 35 % systémového IL-6 (Mohamed-Ali et al., 1997). Jeho podání do krevního oběhu vyvolává potlačení chuti k jídlu, proto je zkoumán i jeho možný vliv na anorexii (Coppack, 2001). IL-6 působí v mozku v centrech důležitých pro energetickou regulaci a výdej, proto jeho nízká produkce v CNS může být naopak jedním z mechanismů přispívajících k rozvoji obezity a inzulínové rezistence (Kristiansen a Mandrup-Poulsen, 2005). Receptor pro IL-6 je homologní s receptorem pro leptin na hypothalamu. To dává IL-6 teoretickou možnost ovlivňovat uvolňování leptinu a tím ovlivňovat energetickou rovnováhu změnou v příjmu potravy, fyzické aktivity a termogeneze. IL-6 má i vliv na glukózovou toleranci díky regulaci dalšího adipokinu – visfatinu (Mohamed-Ali et al., 1997).

Podobně jako TNF- $\alpha$  a leptin, snižuje i IL-6 aktivitu lipoproteinové lipázy (LPL) v tukové tkáni, což může mít za následek lokální regulaci metabolismu (Fried et al., 1998). Vzhledem k tomu, že je IL-6 významně exprimován i makrofágy, jejichž množství významně stoupá při



obezitě, roste i hladina IL-6 což by potenciálně mohl být jeden z faktorů přispívajících k nárůstu obezity.

Produkce IL-6 se liší v závislosti na umístění tukové tkáně. Fried et al. ve své studii z roku 1998 zjistili, že omentální tuková tkáň exprimuje třikrát víc IL-6 než subkutánní tuková tkáň. Produkce přímo adipocyty z těchto tkání pak byla jen asi 10 % celkové produkce IL-6 (Fried et al., 1998). Fain et al. ve své studii z roku 2004 naměřili dokonce jen 4 % podíl z celkové produkce IL-6 adipocyty v subkutánní i viscerální tukové tkáni.

Koncentrace IL-6 koreluje s koncentrací c-reaktivního proteinu (CRP), jednoho z proteinů akutní fáze zánětlivé reakce (Coppack, 2001).

Při vystavení organismu hypotermii dochází k poklesu exprese IL-6 (Hildebrand et al., 2004).

#### **2.4.6. IRS1**

Inzulín receptor substrát 1 (IRS1) je protein esenciální pro intracelulární signalizaci mezi inzulínovým receptorem (IR) a IGF-1 receptorem (insulin like growth factor-1), které hrají hlavní úlohu v udržování základních funkcí buňky jako je růst, přežití a metabolismus. Zdá se, že IRS1 má hlavní roli v kosterním svalstvu (Sesti et al., 2001), ale vyskytuje se mimo jiné i v bílé tukové tkáni a podílí se na regulaci sekrece inzulínu v B-buňkách pankreatu.

IRS1 působí jako takzvaný docking protein mezi inzulínovým receptorem a komplexem intracelulárních signálních molekul s SH2 (Src homology 2) doménou (Sesti et al., 2001). Vazbou SH2 domény IRS1 na IR nebo IGF-1R dojde k aktivaci tyrosin kinázové aktivity receptoru, která vede k fosforylaci IRS1 v tyrosinové oblasti. IRS1 se následně váže na fosfatidylinositol trifosfát-3-kinázu (PI3K) a tím ji aktivuje. PI3K začne produkovat fosfatidylinositol trifosfáty a to na membráně aktivuje efektorové kinázy jako je antiapoptická Akt, glykogen synthásovou kinázu a translokaci GLUT4 z cytoplazmy do plazmatické membrány. Aktivace SH2 proteinů tedy ve výsledku vede k regulaci intracelulárních drah řídících buněčnou diferenciaci, růst, přežití a metabolismus (Kang et al., 2007; Jiang a Zhang, 2005; Sesti et al., 2001).

Diferenciace lidských preadipocytů na zralé adipocyty je doprovázena desetinásobným zvýšením exprese IRS1. To je spojeno s rozvojem plného fenotypu lidského adipocytu včetně zvýšení kapacity pro inzulínem stimulovaný transport glukózy a zvýšené exprese GLUT4 (Pederson a Rondinone, 2000). Snížená hladina IRS1 byla zaznamenána jak u morbidně



obézních (Goodyer et al., 1995), tak u pacientů s diabetes mellitus 2. typu (Rondinone et al., 1997), tedy u dvou typických skupin trpících inzulínovou rezistencí. K vysvětlení tohoto jevu přispívá zjištění Arakiho et al. z roku 1994, že exprese IRS1 v adipocytární kultuře je snížena po podání inzulínu díky snížení posttranslačních hladin zkrácením poločasu životnosti proteinu IRS1 (Araki et al., 1994).

Kang et al. ve své studii z roku 2007 zjistili, že při krátkodobém vystavení buněk hypoxii dojde k potlačení aktivit Akt kinázy. To ovšem nevede k apoptóze, jak by se dalo předpokládat, ale pouze k zastavení inhibice kaspáz, které tím pádem degradují IRS1. Po návratu k normoxii je hladina IRS1 rychle obnovena (Kang et al., 2007).

#### **2.4.7. MCP1**

Monocyty přitahující protein 1 (MCP1) bývá také někdy označován jako chemokin (C-C motif) ligand 2 (CCL2). Jedná se o malý cytokin patřící do C-C rodiny chemokinů. Je hlavním faktorem zodpovědným za přitahování monocytů, T-buněk (Carr et al., 1994) a bazofilů (Bischoff et al., 1992) do místa poškození tkáně nebo infekce. Vliv MCP1 na leukocyty je zprostředkován pomocí receptoru CCR2, v menší míře i CCR4. To jsou membránové receptory spojené s GTP-proteiny, specifické právě pro monocyty, bazofily a T-lymfocyty (Baggiolini, 1998).

Prozánětlivé cytokiny a chemokiny jako jsou IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 nebo IL-8 zvyšují sekreci MCP1. IL-6 má také potenciační vliv na MCP1, ovšem pouze za přítomnosti vysoké hladiny svého solubilního receptoru IL-6R $\alpha$  (Bruun et al., 2005). Naopak protizánětlivé cytokiny (IL-10), kortikosteroidy (Bruun et al., 2005) nebo adiponektin (Sell et al., 2006) jeho expresi tlumí.

Velká pozornost byla věnována expresi MCP1 v tukové tkáni především u obézních jedinců. Obezita bývá označována jako stav chronického subklinického zánětu. S tím souvisí výrazné zvýšení množství makrofágů, především v subkutánním tuku (Cancello et al., 2005). To může být způsobeno zvýšenou expresí MCP1 tukovou tkání, která vede ke vstupu monocytů do tkáně a k jejich postupné přeměně na makrofágy. MCP1 má navíc angiogenní efekt, takže se přímo podílí na přestavbě a expanzi tukové tkáně (Sell et al., 2006).

Za expresi MCP1 je zodpovědná především neadipocytární složka tukové tkáně (Dahlman et al., 2005; Bruun et al., 2005). Sartipy a Loskutoff ve své studii z roku 2003 zkoumali podíl exprese různými orgány na plazmatické hladině MCP1 u obézních myší. Zjistili, že exprese



MCP1 tukem je 10-100 krát vyšší než exprese játry, ledvinami a plicemi. To by znamenalo, že tuková tkáň je u obézních jedinců hlavním zdrojem MCP1 (Sartipy a Loskutoff, 2003). Ovšem Dahlman et al. (2005) nezaznamenali nárůst plazmatické sekrece MCP1 u obézních pacientů, ovšem přímo v tukové tkáni ano. Jejich závěrem, na rozdíl od předešlé studie, tedy bylo, že MCP1 sekretovaný tukovou tkání působí jen jako lokální faktor (Dahlman et al., 2005). V literatuře ale není dostupná žádná další studie, která by tento rozpor objasnila.

#### **2.4.8. MIF**

Faktor inhibující migraci makrofágů (MIF, macrophage inhibitory factor) je cytokin sekretovaný při poranění, sepsi nebo jiných zánětlivých stavech organismu.

Studie na dobrovolnících ukázaly, že za normálních podmínek cirkuluje v krvi v koncentraci příliš nízké na vyvolání fyziologické odpovědi organismu. Pokud ovšem dojde ke stresu nebo systémovému zánětu, začne být uvolňován hypofýzou a to stejným typem buněk, které uvolňují adrenokortikotropní hormon (ACTH) (Bucala, 1996). To působí jako paradox, protože ACTH je mediátor stimulující adrenální produkci glukokortikoidů, tedy důležitých protizánětlivých hormonů. Calandra et al. v roce 1995 zjistili, že nízká hladina glukokortikoidů přímo potencuje expresi MIF makrofágy a tím dochází k potlačení případného protizánětlivého vlivu glukokortikoidů. Při vysoké koncentraci glukokortikoidů je sekrece MIF naopak zastavena (Calandra et al., 1995).

Významnou roli hraje také periferní exprese MIF. Hlavní podíl zde mají imunitní buňky, tedy samotné makrofágy a T-buňky. V menší míře je MIF exprimován i neimunitními buňkami jako jsou neuronální, jaterní, vaskulární endoteliální buňky, endocyty a adipocyty (Skurk et al., 2005). I zde se jedná mimo jiné o reakci na fyziologickou koncentraci glukokortikoidů (Bucala, 1996).

Sekretovaný MIF se váže na receptor CD74, který je exprimován především na makrofázích, lymfocytech, dendritických a endoteliálních buňkách. To vede ke stimulaci prozánětlivých cytokinů (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 a IL-8), makrofágového prozánětlivého proteinu 2, cyklooxygenázy 2, NO a produktů dráhy kyseliny arachidonové (Larson a Horak, 2006). MIF vyvolává sekreci TNF- $\alpha$  makrofágy a zároveň TNF- $\alpha$  indukuje sekreci MIF. MIF a TNF- $\alpha$  tedy díky vzájemné potenciaci aktivují kritickou prozánětlivou odpověď organismu (Calandra et al., 1994). MIF také přímo prodlužuje životnost makrofágů, protože je chrání před apoptózou a tím udržuje zánětlivý proces po delší dobu (Skurk et al., 2005).



Skurk et al. v roce 2005 zaznamenali spontánní produkci MIF preadipocyty, která rostla s diferenciací na zralé adipocyty. Zároveň odhalili korelaci produkce MIF s BMI a nenašli rozdíl v koncentraci v subkutánní a omentální tukové tkáni (Skurk et al., 2005). Již dříve, tedy v roce 1999, zaznamenali Sakaue et al. nižší koncentraci MIF mRNA u obézních pacientů s inzulínovou rezistencí. Exprese MIF v adipocytech roste při stimulaci glukózou a inzulínem a zároveň MIF přímo zvyšuje sekreci inzulínu z  $\beta$ -buněk pankreatu (Sakaue et al., 1999). MIF tedy zjevně hraje významnou roli i v metabolismu glukózy.

Exprese a uvolňování MIF z adipocytů je v hypoxických podmínkách zvýšena (Wang et al., 2007).

#### **2.4.9. MT3**

Metallothionein 3 (MT3) je zástupce rodiny intracelulárních proteinů vázajících kovy, především zinek, měď a kadmium. Tyto proteiny jsou typické vysokým obsahem cysteinu a nízkou molekulární hmotností. Jejich transkripce je aktivována buď přítomností zinku nebo vnějším stresem způsobeným například přetížením buňky toxickými kovy nebo změnou redox potenciálu (Coyle et al., 2002; Murphy et al., 2008).

MT3 byl dlouhou dobu považován za striktně specifický pro mozek, kde zastává neuroprotektivní roli, především jako ochrana před cytotoxickým efektem ROS (You et al., 2002). Jeho mRNA byla postupně prokázána i v dalších tkáních jako je srdce, žaludek, ledviny, reprodukční orgány (Coyle et al., 2002) a také v bílé tukové tkáni (Wang et al., 2008). Studie na těchto tkáních postupně ukazují, že i zde hraje stejnou úlohu jako v mozku, tedy především slouží jako antioxidant, ale podílí se i na dalších procesech, jako je buněčná proliferace, neoplazie nebo apoptóza (Murphy et al., 2008).

U rychle proliferujících buněk roste exprese MT3 a to jak v jádře, tak v cytoplazmě. MT3 se zde pravděpodobně podílí na ochraně DNA před oxidativním poškozením a zároveň reguluje přísun zinku, který je nutný pro některé enzymy a transkripční faktory (Moffatt a Denizeau, 1997).

Wang et al. v roce 2008 zjistili, že exprese MT3 v lidských adipocytech je výrazně zvýšena v reakci na hypoxii. V jejich studii, při které byly k detekci genové exprese použity specifické TaqMan sondy, bylo zjištěno zvýšení exprese MT3 při 4 hodinovém vystavení adipocytů 1 % O<sub>2</sub> 121krát. Po 24 hodinovém vystavení hypoxii dokonce 1600 krát. K významnému nárůstu hladiny MT3 došlo už po 45-60 minutách vystavení hypoxii. Vyšší exprese MT3 byla



zjištěna v omentálním než subkutánním tuku (Wang et al., 2008). Z těchto výsledků se zdá, že MT3 by se v lidské tukové tkáni mohl významně podílet na ochraně před následky hypoxie. Bohužel princip jeho účinku zatím není objasněn. Ovšem Wang et al. dále ukázali, že k nárůstu MT3 dochází i po podání látek stabilizujících HIF1- $\alpha$ , tedy vyvolávajících tzv. chemickou hypoxii. Signální dráhy HIF1- $\alpha$  jsou tedy přímo zahrnuty v transkripční aktivaci MT3 v lidských adipocytech (Wang et al., 2008).

#### **2.4.10. TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) byl objeven před více než 30ti lety jako endotoxinem stimulovaný cytokin vykazující výraznou cytotoxicitu pro nádorové buňky. Jedná se o důležitý mediátor akutní zánětlivé odpovědi a podílí se i na metabolismu lipidů a regulaci funkce adipocytů. Jedná se například o stimulaci lipolýzy díky zvýšení exprese hormonsenzitivní lipázy, inhibici lipoproteinové lipázy, indukci diferenciaci adipocytů a apoptózy a indukci inzulinové rezistence (Sewter et al., 1999). Jeho vliv na vznik akutního zánětu je dán jak zvyšováním exprese prozánětlivých cytokinů, chemokinů a superoxidových aniontů, tak zvýšením endoteliální permeability a adheze pro zánětlivé buňky (Pryhuber et al., 2000). TNF- $\alpha$  je exprimován především monocyty a makrofágy, ale například i lymfatickými buňkami, fibroblasty, neuronálními a endoteliálními buňkami a v neposlední řadě i adipocyty (Sewter et al., 1999; Wajant et al., 2003).

TNF- $\alpha$  je buňkami sekretován jako membránově vázaný prekurzor, který je posléze proteolyticky rozštěpen matrixovou metalloproteinázou (TNF- $\alpha$  konvergující enzym, TACE) za vzniku solubilní formy (Gearing et al., 1994). Obě formy TNF- $\alpha$  mohou v tukové tkáni interagovat se dvěma receptory – TNF-R1 (u lidí označovaný také jako gp60 nebo TNFR60) a TNF-R2 (gp80, TNFR80). V celém těle je ale známo více než 20 receptorů, se kterými může TNF- $\alpha$  interagovat a 19 různých ligandů schopných se vázat na TNF receptory. TNF-R1 je konstitutivně exprimován ve většině tkání. Přes transkripční faktor NF $\kappa$ B a proteinové kinázy JNK zprostředkovává apoptózu a je zásadní pro stimulaci lipolýzy. Exprese TNF-R2 je přísně regulována a striktně specifická pro imunitní buňky. Úlohou TNF-R2 je indukce MAP kinázových drah vedoucích k diferenciaci a pohybu imunitních buněk (Coppack, 2001; Wajant et al., 2003).

TNF- $\alpha$  je v tukové tkáni exprimován především stromavaskulárními buňkami, méně již buněčnou matrix. Adipocyty se podílejí pouze minimálně, méně než z 10 % (Fain et al., 2004). Produkce TNF- $\alpha$  roste s velikostí adipocytu což vede k iniciaci změn zodpovědných



za snížení jeho velikosti nebo dokonce apoptózu. Navíc TNF- $\alpha$  má zásadní vliv na diferenciaci preadipocytů, takže je zodpovědný za kontrolu množství tukových buněk v tkáni (Coppack, 2001). Na rozdíl od IL-6 není TNF- $\alpha$  uvolňován tukovou tkání do systémového oběhu (Mohamed-Ali et al., 1997), jedná se tedy pouze o lokální faktor. TNF- $\alpha$  zvyšuje produkci leptinu a IL-6 mRNA v tuku. Spolu s IL-6 inhibuje lipoproteinovou lipázu a navíc stimuluje hormon senzitivní lipázu. Snižuje inzulinem-stimulovaný příjem glukózy ovlivněním GLUT4, snížením autofosforylace IR a zvýšením fosforylace IRS1, což má celkově za následek inzulinovou rezistenci (Coppack, 2001). Hlavním stimulatorem produkce TNF- $\alpha$  v lidské tukové tkáni i izolovaných adipocytech jsou stejně jako v monocytech a makrofázích lipopolysacharidy (Sewter et al., 1999).

Hube et al. v roce 1999 dokázali, že exprese receptorů pro TNF- $\alpha$  v tuku je 2-3krát vyšší u obézních než u hubených jedinců. Přitom exprese TNF-R1 pozitivně koreluje s BMI a velikostí tukových buněk, zatímco TNF-R2 a TNF- $\alpha$  mRNA pozitivně korelují se sérovou hladinou inzulinu a triglyceridů (Hube et al., 1999). Oproti tomu Sewter et al. (1999) nezjistili žádnou korelaci mezi uvolňováním TNF- $\alpha$  a BMI ani žádný vliv inzulinu.

Při vystavení organismu hypotermii dochází stejně jako u IL-6 k poklesu exprese TNF- $\alpha$  (Hildebrand et al., 2004).



### 3. Cíl práce

- zjistit, jaký vliv má hluboká hypotermie na genovou expresi vybraných adipokinů v bílé tukové tkáni.
- určit, zda má hluboká hypotermie vliv na vznik nadměrné lokální zánětlivé reakce v tukové tkáni a zda se nějak podílí na ochraně buněk před apoptózou a oxidativním stresem a určit její vliv na metabolismus glukózy. Rozhodnout, zda vlivem hypotermie dojde v tukové tkáni díky snížení průtoku krve k indukci hypoxie nebo naopak zda hypotermie díky snížení nároků tkání na kyslík nepotlačí vliv anoxické fáze.
- porovnat, zda se liší genová exprese v závislosti na uložení tukové tkáně (subkutánní a viscerální).
- porovnat genovou expresi v celkové tukové tkáni a izolovaných adipocytech.



## 4. Materiál a metody

### 4.1. Popis operace, odebrání vzorků

Do studie, ze které vychází má diplomová práce, bylo zahrnuto celkem 10 pacientů, kteří podstoupili plánovanou operaci plicní hypertenze. Z toho 8 mužů a 2 ženy po menopauze (průměrný věk  $62 \pm 4$  let, průměrný BMI  $25,8 \pm 1,5$  kg/m<sup>2</sup>). Před vstupem do studie všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválena etickou komisí 1. Lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Plicní hypertenze je zvýšení tlaku měřeného v arteria pulmonalis nad fyziologické meze (25/10 mmHg). Etiologicky se jedná buď o tzv. primární plicní hypertenzi či plicní hypertenzi vzniklou na podkladě chronicky se opakujících embolizací do plicnice. Proto bývá někdy používáno označení CTEPH (chronic tromboembolic pulmonary hypertension). U pacientů dominuje dušnost, hypoxie, únavnost a další známky nízkého srdečního výdeje. Vlastní operační výkon by měl být velmi rozvážně indikován, ne každé postižení lze odoperovat s dobrým efektem (zejména ne tehdy, jsou-li postiženy periferní větve a. pulmonalis). Vlastní operační výkon probíhá v celkové anestézii.

Před uvedením do celkové anestézie byli pacienti zajištěni kanylací arterie (a. radialis a a. femoralis) k invazivnímu měření krevního tlaku, dále centrálním žilním katétrem a plicnicovým (Swan-Ganzovým) katétrem k měření tlaků v pravostranných oddílech a arteria pulmonalis. První fází operace byla příprava operačního pole, otevření hrudníku (sternotomie) a zavedení kanyl pro mimotělní oběh (žilní přes ouško pravé síně a arteriální do vzestupné aorty). Po uchycení aorty byla infuzí kardioplegického roztoku St. Thomas (chlorid sodný, chlorid draselný, hexahydrát chloridu hořečnatého, dihydrát chloridu vápenatého) navozena srdeční zástava. Byl použit standardní protokol aprotininu (Gordox, Gedeon Richter, Hungary) s 2 mil. jednotek před kardiopulmonálním bypassem (CPB) a 2 mil. jednotek do "pump prime" a 0,5 mil. jednotek každou hodinu během operace až do návratu pacienta na jednotku intenzivní péče. Po napojení na přístroj pro mimotělní oběh (cca 1 hodina po zahájení operace) začala fáze zchlazení pacienta do hluboké hypotermie ( $15,2 - 17,3$  °C). Toto bylo provedeno vlastním přístrojem pro mimotělní oběh. Ke zrychlení procesu byl podáván lék Milrinon (Corotrop), který vede k vazodilataci a zrychluje výměnu tepla. Po dosažení teploty 25 °C byla provedena lokální ochrana mozku zabalením pacientovy hlavy do ledových obkladů a podáním protikřečových léků (Thiopental, Epanutin), v některých případech i antiedematozních

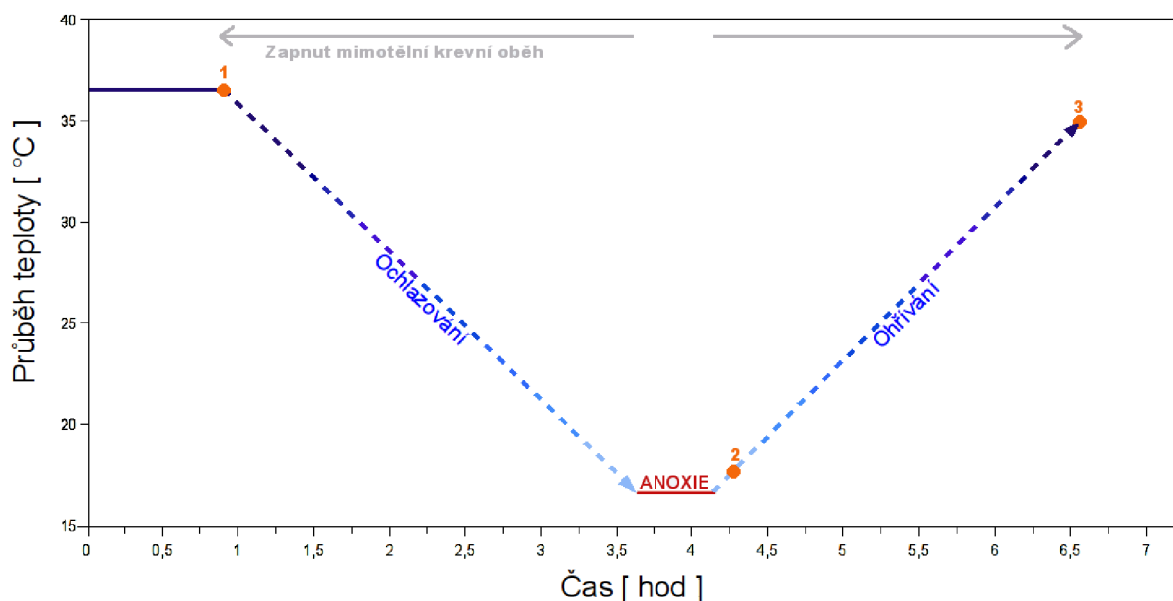


léků (kortikoidy – SoluMedrol). Celá fáze chlazení trvala dle velikosti povrchu pacienta, ve většině případů 1-3 hodiny. Po dosažení cílové teploty byla provedena vlastní endarterektomie plicnice (odstranění zesílené vnitřní části tepny – intimy, která je příčinou zúžení a tudíž vzestupu tlaků v arteria pulmonalis), zvláště její pravé a levé větve. Pro obě větve je třeba naprosto bezkrevné prostředí, proto je nutno zastavit oběh krve, tedy zastavit přístroj pro mimotělní oběh. Toto je důvodem, proč se operace provádí v hluboké hypotermii, která minimalizuje metabolické procesy a energetické nároky organismu při vystavení anoxické fázi. Úroveň metabolických procesů byla monitorována měřením saturace žilní krve na výstupu z mozku (jugulární bulbus). V ideálním případě se hodnoty téměř rovnaly hodnotám saturace v krvi arteriální, tudíž mozek minimálně spotřebovával kyslík. Monitorace úrovně aktivity mozkových buněk byla zajištěna pomocí tzv. bispektrální analýzy, což je zjednodušeně číselné vyjádření EEG aktivity. Po vlastní endarterektomii následovala fáze ohřívání pacienta, která trvala 2-3 hodiny (stejně jako u chlazení byla i doba ohřevu závislá na tělesném povrchu) a poté byl pacient odpojen od mimotělního oběhu, při kterém bylo některým pacientům nutno podat vasopresorické a ionotropní léky (noradrenalin, dobutamin). Následovala kontrola zdrojů krvácení, ve většině případů bylo nutno korigovat koagulační poruchu podáváním krevních derivátů (mražená plazma) a někdy byla potřeba také korekce anémie (podání koncentrátů erytrocytů). Posledním krokem byla sutura rány po jednotlivých vrstvách. Pacienti byli průměrně po 6-8 hodinách výkonu přeloženi na pooperační JIP, kde byli při nekomplikovaném průběhu extubováni a odpojeni od umělé plicní ventilace 1.-2. pooperační den.

V průběhu operace byla pacientům odebírána subkutánní a viscerální (z epikardia) tuková tkáň. První odběr byl proveden na začátku hypotermie (0,45-1,5 hod po začátku anestézie, těsně po otevření hrudníku), 2. odběr na konci hypotermie (4-5 hod po začátku anestézie) a poslední odběr na konci operace (7-8,5 hodiny po anestézii, tzn. cca 2 hodiny po ukončení hypotermie). Mezi odběry 1 a 2 tedy byli pacienti vystaveni hluboké hypotermii a mezi odběry 2 a 3 pak byli pacienti zahříváni na normální tělesnou teplotu.

Zároveň byly pacientům pomocí arteriálního katétru ve stehně odebírány vzorky krve a to před operací, těsně po začátku operace (po sternotomii), po skončení hypotermie, po separaci od CPB a 12, 18, 24, 36 a 48 hod po začátku operace. Krev byla odebírána do zkumavek Vacutainer a okamžitě centrifugována 15 min při 5000 ot./min. V získaných vzorcích byly později změřeny koncentrace IL-6, IL-8, sIL-2R, sTNFR1, usCRP a PCT.





Obr. 4: Schéma odběrů tukové tkáně během operace: 1. odběr na začátku hypotermie (1hod od začátku operace, těsně po sternotomii), 2. odběr na konci hypotermie (cca 10min po skončení anoxie), 3. odběr na konci operace. Červeně je označena anoxická fáze.

## 4.2. Uchování tukové tkáně a izolace adipocytů

### 4.2.1. Chemikálie a materiál

#### 4.2.1.1. Chemikálie

- Stabilizační roztok RNeasy (Qiagen, Německo)
- KRBHA médium (118,5 mM NaCl; 4,75 mM KCl; 2,70 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,19 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,09 mM MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O; 25 mM NaHCO<sub>3</sub>; 5 mM glukóza) (připraveno v lékárně)
- BSA – hovězí albumin (Sigma-Aldrich, USA)
- Kolagenáza VIII z *Clostridium histolyticum*, (Sigma-Aldrich, USA); ≥125 CDU/mg; enzym třídy 34.24.3.
- Alconox (1 %) (Sigma-Aldrich, USA)
- 70 % etanol (Penta, ČR)
- β – merkaptioetanol (1 %) (Sigma-Aldrich, USA)
- Destilovaná voda



#### **4.2.1.2. Materiál**

- Zkumavky
- Kovové nůžky a pinzeta
- Skleněné kádinky
- Vodní lázeň s třepačkou
- Sítko
- Pasteurova pipeta
- Centrifuga Jouan BR4 (Jouan Technology for life, Winchester, VA, USA)
- Latexové rukavice (powder-free) (Aurelia, USA)

#### **4.2.2. Postup**

##### **4.2.2.1. Uchování celkové tukové tkáně**

Dva přibližně 100 mg vzorky tukové tkáně byly bezprostředně po odebrání umístěny do sterilních 1,5 ml zkumavek s 1 ml RNA lateru a následně zmrazeny a do dalšího zpracování byly skladovány v -80 °C.

##### **4.2.2.2. Izolace adipocytů z celkové tukové tkáně**

1. Z odebrané tukové tkáně bylo odstříženo přibližně 1-1,5 g a tento podíl byl urychleně vložen do zkumavky s 5 ml KRBHA (předem vytemperováno na 37 °C). Krátce před použitím byl do KRBHA média přidán 1 g BSA (hovězí albumin)/30 ml roztoku.
2. Tkáň byla nastříhána na malé kousky (nástroje byly omývány ve: 1, 1 % Alcanox+70 % etanol v poměru 1: 1; 2, 70 % etanol; 3, 50 ml destilované vody s 50 µl β – merkaptoetanolu), které byly vloženy do zkumavky s KRBHA médiem s kolagenázou (15 mg/5 ml KRBHA, opět předem vytemperováno na 37 °C).
3. Následně bylo inkubováno 25-40 min ve vodní lázni s třepačkou (37 °C/120 kmitů/min)
4. Natrávená tkáň byla přes jemné sítko přefiltrována do čisté 15 ml zkumavky. Nerozrušené části tkáně zachycené na sítku (stromavaskulární frakce) byly odebrány do 1,5 ml eppendorfovy zkumavky a zamrazeny na -80 °C.

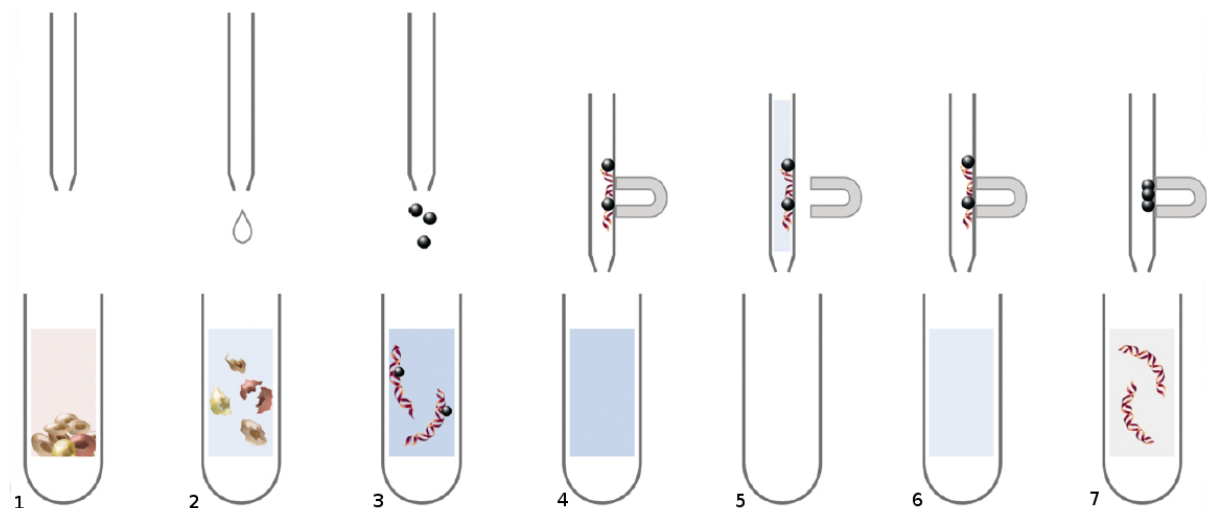


5. Filtrát byl zcentrifugován 30 s při 900 ot./min.
6. Roztok pod vrstvou adipocytů byl opatrně odsát pomocí pasteurovy pipety a k adipocytům byly přidány 3 ml KRBHA média.
7. Po opakované centrifugaci 30 s 900 ot./min byly adipocyty ještě dvakrát promyty KRBHA médiem. Část média byla odsáta tak, aby ve zkumavce zbylo cca 400-500  $\mu$ l suspenze adipocytů v KRBHA médiu.
8. Ze vzorků byla ihned izolována celková RNA, případně byly do dalšího zpracování zamrazeny na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 4.3. Izolace celkové RNA

#### 4.3.1. Princip

Izolace RNA byla provedena pomocí automatického izolátoru MagNA Pure Compact (Roche, Německo), s použitím MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Roche, Německo). Tato izolace je založena na využití technologie magnetických skleněných kuliček, které jsou přímo součástí kitu. Princip metody je detailněji popsán na obrázku 5.



Obr. 5: Izolace RNA na MagNA Pure (Kirchgesser et al., 2003)

1, Vzorky jsou nejdříve rozrušeny pomocí homogenizátoru MagNA Lyser s použitím speciálního lyzačního pufru obsahujícího chaotropní soli.

2, V samotném izolátoru jsou pak vzorky lyzovány inkubací v lyzačním pufru obsahujícím Proteinázu K a chaotropní soli.

3, Nukleové kyseliny jsou vázány na povrch magnetických kuliček. DNA je degradována inkubací s DNázou.

4-6, Substance nenavázané na magnetické kuličky (proteiny, zbytky buněk, inhibitory PCR) jsou ze vzorku odstraněny několikanásobným promýváním.

7, Výsledná čistá RNA je uvolněna z magnetických kuliček.



### **4.3.2. Chemikálie a materiál**

#### **4.3.2.1. Chemikálie**

- Alconox (1 %) (Sigma – Aldrich, USA)
- Etanol (70 % a 96 %) (Penta, ČR)
- $\beta$  – merkptoetanol (1 %) (Sigma-Aldrich, USA)
- Prášková agaróza (Sigma-Aldrich, USA)
- TBE pufr (5x ředěný, pH 8,3) (Sigma-Aldrich, USA)
- 1 % roztok etidium bromidu (Sigma-Aldrich, USA)
- Nanášecí barva (6x Loading Dye Solution, Fermentas Life Science, Litva)
- MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit (Roche, Německo); složení: DNáza, lyzační roztok – Tissue Lysis Buffer, zkumavky s víčky, špičky, kazeta pro reakci obsahující suspenzi magnetických kuliček, proteináza K, lyzační pufr, promývací pufr I a II, vazebný pufr
- Destilovaná voda
- Deionizovaná voda (ddH<sub>2</sub>O)

#### **4.3.2.2. Materiál**

- Skleněné kádinky
- Váhy (Adam Equipment Co. Ltd., Milton Keynes, U. K.)
- Kovové nůžky a pinzeta
- Mrazicí blok se stojanem na zkumavky
- Sterilní mikrozskumavky s kulatým dnem (2,0 ml)
- Sterilní špičky s filtrem (Gilson, USA)
- Pipeta Pipetman® Ultra (Gilson, USA)
- Keramické kuličky (MagNA Lyser Green Beads, Roche, Německo)
- Homogenizátor MagNA Lyser (Roche, Německo)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf AG, Německo)
- Automatický izolátor MagNA Pure Compact (Roche, Německo)



- Spektrofotometr (BioPhotometer, Eppendorf AG, Německo)
- Mikrozkušavky
- Stojánek na mikrozkušavky
- Sterilní jednorázové kyvety
- Mikrovlnná trouba
- Elektroforetická vana s hřebínkem (Bio-Rad, USA)
- Zdroj gelové elektroforézy (Bio-Rad, USA)
- UV transiluminátor s černou komorou a kamerou (Gene Genius Bioimaging System a GeneSnap a GeneTools software (Syngene, UK) + PC
- Latexové rukavice (powder-free) (Aurelia, USA)

### **4.3.3. Postup**

#### **4.3.3.1. Homogenizace tkání**

1. Do 2 ml mikrozkušavek s kulatým dnem byly nasypány keramické kuličky (vždy rozděleny do 2 zkumavek) a napipetováno 0,5 ml lyzačního roztoku. Poté byly zkumavky umístěny do vychlazeného stojanu.
2. Nástroje pro manipulaci se vzorkem (pinzeta, nůžky) byly očištěny postupně v roztoku 1 %alconoxu (Alconox + destilovaná voda) a 70 % etanolu (1: 1), v roztoku 70 % etanolu a v roztoku 1 %  $\beta$ -merkaptóetanolu a ddH<sub>2</sub>O (1: 1). Toto čištění bylo opakováno po každé manipulaci s tkání.
3. Vzorky tukové tkáně byly rozmrazeny a byl z nich odstřížen 70-90 mg kousek tkáně, který byl vložen do předem zvážené zkumavky s lyzačním roztokem, zvážen a uložen do chladicího stojanu.
4. Vzorky byly homogenizovány na automatickém homogenizátoru MagNa Lyser 10 s při 5500 ot./min, poté byly chvíli chlazeny v chladicím stojanu a centrifugovány 2 min při 13400 ot./min. Před izolací RNA byly vzorky krátce inkubovány při laboratorní teplotě.



#### **4.3.3.2. Izolace celkové RNA na MagNA Pure Compact**

1. Přístroj byl zapnut a byl vyjmut stojan na cartridge. Jednotlivé cartridge byly vyndány z obalu, důkladně rozklepány, aby se všechny magnetické kuličky dostaly na dno jamek a po načtení vloženy do přístroje. Do stojanu byly vloženy špičky a zkumavky.
2. Do řady zkumavek interní kontroly (označeno IC) bylo napipetováno 20  $\mu$ l DNÁzy. Do řady zkumavek označené S bylo napipetováno 400  $\mu$ l vzorku. Vzorek byl nabírán až ze dna zkumavky mezi kuličkami, aby nebyla omylem nabrána i vrstva tuku na povrchu. Stojan se zkumavkami byl vložen do přístroje MagNA Pure Compact a ten spuštěn na program RNA\_Tissue\_V3\_1.
3. Po doběhnutí programu byly zkumavky se vzorky zavíčkované a uloženy do lednice, po odebrání objemu potřebného pro elektroforézu a spektrofotometrii (viz následující body) byly vzorky do dalšího zpracování zamraženy na -80 °C. Přístroj byl vyčištěn, dekontaminován a připraven pro další použití.

#### **4.3.3.3. Změření koncentrace celkové vyizolované RNA na spektrofotometru**

1. Spektrofotometr byl zkalibrován pro blank (dd H<sub>2</sub>O).
2. Do 0,5 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 5  $\mu$ l RNA a 60  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Směs byla jemně promíchána.
3. Zředěný roztok RNA byl z mikrozkušavky přepipetován do sterilní jednorázové kyvety. Spektrofotometrem byla změřena absorbance při 260 nm a 280 nm, z těchto hodnot byla vypočítána koncentrace RNA (ředění x OD<sub>260</sub> x 40 mg/ml) a poměr  $R = A_{260/280}$ , sloužící jako měřítko čistoty vzorku.

#### **4.3.3.4. Elektroforetické ověření integrity celkové vyizolované RNA**

1. Bylo odváženo 0,35 g práškové agarózy, vsypáno do sterilní kádinky a přidáno 35 ml TBE pufu. Opakovaným varem v mikrovlnné troubě došlo k rozpuštění prášku.
2. Po zchladnutí roztoku na cca 60 °C bylo ke směsi přidáno 5  $\mu$ l 1 % roztoku etidium bromidu, promícháno a roztok byl nalit do vaničky s hřebínkem.



3. Cca po 20 min byl ze ztuhlého gelu opatrně vyndán hřebínek a gel s vaničkou byl přenesen do elektroforetické vany, umístěn jamkami směrem k záporné elektrodě a zalit po rysku TBE pufrem.
4. Do zkumavek bylo napipetováno 5  $\mu$ l nanášecí barvy (zvyšuje molekulovou hmotnost roztoku RNA) a 5  $\mu$ l RNA příslušných vzorků a promícháno špičkou. 9  $\mu$ l směsi bylo opatrně napipetováno do jamek na gelu.
5. Elektroforetická vana byla přikryta víkem napojeným na zdroj. Ten byl nastaven na 82 V (400 mA) po dobu 40 min.
6. Bezprostředně po skončení elektroforézy byl gel opatrně vyndán a vložen do plastového sáčku. Pomocí transiluminátoru byl gel vyfocen v UV záření. Díky tomuto zobrazení se zvýraznil etidium bromid vázaný na molekuly rRNA, v případě kontaminace pak na dvoušroubovice DNA.

## **4.4. Reverzní transkripce**

### **4.4.1. Princip**

Cílem této metody je získání cDNA ze vzorku mRNA pomocí níže popsaného kitu a postupu. Přepis cDNA podle mRNA je uskutečněn reverzní transkriptázou, jako primery slouží oligo (dT)<sub>18</sub> nebo jiné oligonukleotidy, které zajistí transkripci pouze mRNA s 3'-poly(A) koncem. Ta tvoří jen 1-2 % z celkové RNA, proto je pro výsledek zásadní specifita primerů.

Na poly(A) konce specificky nasedají primery. Na ně nasedá reverzní transkriptáza, která z volných nukleotidů začne tvořit řetězec DNA komplementární k templátové RNA. Na konci celé reakce je vysokou teplotou zcela denaturována molekula RNA, tím se rozpadá hybrid RNA/DNA a v roztoku zůstávají jen jednovláknové molekuly DNA.

Pro dosažení optimálního výsledku reakce je zásadní zamezit možné kontaminaci vzorku. Proto je nutná práce v aseptickém prostředí (laminární box), v rukavicích, se sterilními roztoky a materiálem. RNA nesmí být vystavena opakovanému rozmrazování, veškerá manipulace s ní tedy musí probíhat na ledu. Dále je nutné se vyhnout inhibitorům reverzní transkriptázy a celkově látkám omezujícím účinnost reverzní transkripce jako je SDS, EDTA, guanidinové sole, fosfát, pyrofosfát, polyaminy, alkohol, fenol a další. RNA by neměla být kontaminována proteiny a DNA.



#### 4.4.2. Chemikálie a materiál

##### 4.4.2.1. Chemikálie

- RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas Life Science, Litva) složený z komponentů:
  - roztok RevertAid™ M-MuLV reverzní transkriptázy (200 jednotek/μl) v zásobním pufru: 50 mM Tris-HCl (pH 8,3); 0,1 M NaCl; 1 mM EDTA; 5 mM DTT; 0,1 % Triton®X-100 a 50 % glycerol (jedna jednotka RevertAid™ M-MuLV RT inkorporuje 1 nanomol dTMP do polynukleotidového řetězce během 10 min v 37 °C)
  - roztok RiboLock™ inhibitor ribonukleáz (20jednotek/μl) v zásobním pufru: 20 mM HEPES-NaOH (pH 7,5); 50 mM NaCl; 8 mM DTT; 0,5 mM ELUGENT® detergent a 50 % glycerol (jedna jednotka RiboLock™ inhibitoru ribonukleáz inhibuje aktivitu 5 ng RNázy A z 50-ti procent)
  - 5x reakční pufr: 250 mM Tris-HCl (pH 8,3 při 25 °C); 250 mM KCl; 20 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM DTT
  - 10 mM dNTP Mix: vodný roztok dGTP, dATP, dTTP, dCTP (každý v koncentraci 10 mM)
  - Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer: 0,5 μg/μl (15A<sub>260</sub> jednotek/ml) vodný roztok
  - DEPC-ošetřená voda: Milli-Q® deionizovaná voda ošetřená DEPC

##### 4.4.2.2. Materiál

- Laminární box (Jouan Technology for life, Winchester, VA, USA)
- Ledový bloček (pro 0,2 ml mikrozkušavky)
- Stojánky
- Sterilní špičky s filtrem (Gilson, USA)
- Pipeta Pipetman® Ultra (Gilson, USA)
- Vortex (MSE Minishaker, Ika-Works, Wilmington, USA)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf AG, Německo)
- Sterilní mikrozkušavky (0,2 ml a 0,5 ml)



- 2 suché bloky (temperované na 70 °C a 37 °C) (Major Science, Taiwan)
- Termocycler (Bio-Rad, USA)
- Latexové rukavice (powder-free) (Aurelia, USA)

#### 4.4.3. Postup

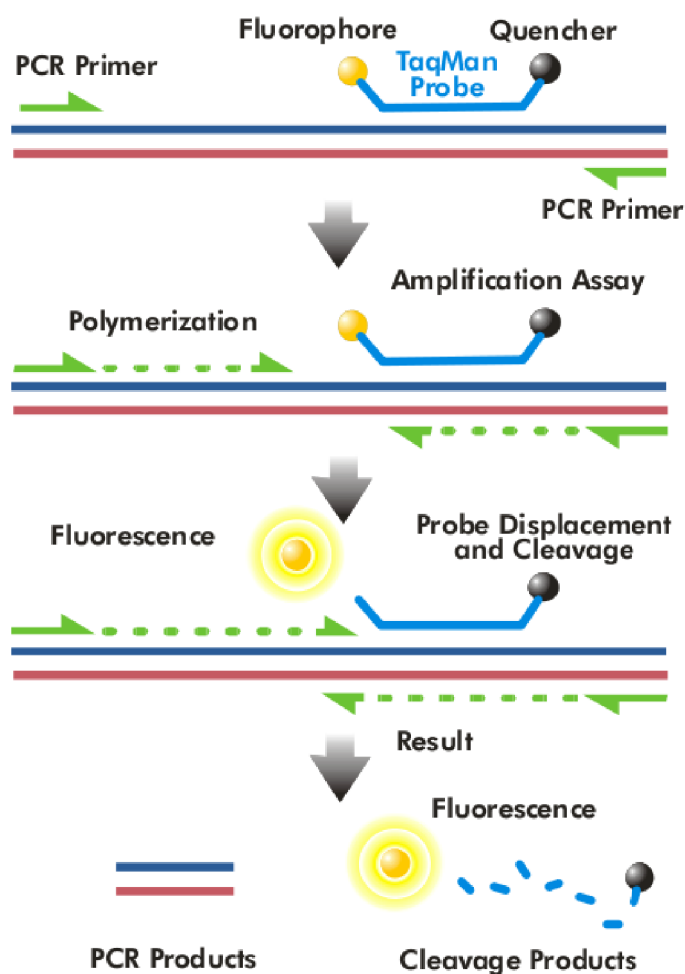
1. Vzorky byly umístěny do ledového bločku a spolu s ostatním potřebným materiálem a chemikáliemi byly přeneseny do předem dekontaminovaného laminárního boxu.
2. Do 0,2 ml mikrozkušavek umístěných na ledovém bločku bylo napipetováno po 1,5 µl oligo (dT)<sub>18</sub> primerů, předem vypočítaný objem vzorku odpovídající 0,3 µg celkové RNA a doplněno DEPC –ošetřenou vodou na celkový objem 18 µl. Směs byla protřepána, krátce stočena a inkubována na suchém bloku 5 minut při 70 °C a poté opět umístěna na ledový bloček.
3. Dle počtu vzorků byl na ledovém bločku smíchán premix v poměru 6 µl reakčního pufru, 1,5 µl inhibitoru RNáz a 3 µl směsi dNTP Mixu.
4. Ke každému vzorku bylo připipetováno 10,5 µl premixu, směs byla protřepána, krátce stočena a inkubována na suchém bloku 5 minut při 37 °C a poté opět umístěna na ledový bloček.
5. Ke každému vzorku bylo připipetováno 1,5 µl RevertAid™ M-MuLV reverzní transkriptázy.
6. Zkušavky byly přemístěny do termocykleru, na kterém byl spuštěn program pro reverzní transkripci (42 °C – 60 minut, zastavení reakce při 70 °C – 10 minut a poté pokles teploty na 4 °C do vyjmutí mikrozkušavek z termocykleru).
7. Roztok cDNA byl do dalšího zpracování uchováván při -20 °C.



## 4.5. Real-time PCR

### 4.5.1. Princip

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (Real-time PCR) umožňuje pomocí průběžné detekce fluorescence určit relativní míru genové exprese daných genů. Jedná se o relativní kvantifikaci, protože výsledná hodnota udává rozdíl v expresi zkoumaného genu a endogenní kontroly. Její podstatou je amplifikace určitého specifického úseku molekuly DNA a jeho identifikace pomocí fluorescenčních sond.



Obr. 6: Princip funkce TaqMan<sup>®</sup> sondy (*Introduction to Quantitative PCR*, 2004)

TaqMan sondy jsou oligonukleotidy značené na 5'konci fluoroforem (reporter) emitujícím záření o krátké vlnové délce a na 3'konci tlumičem (quencher) emitujícím záření o delší vlnové délce (viz Obr. 6). Fluorofor předává energii tlumiči a tím je jeho záření potlačeno. Sonda specificky nasedá spolu s primery na komplementární sekvenci vzdálenou od 3'konce



primeru. Řetězec je postupně prodlužován, v okamžiku kdy dosáhne místa, kde je navázána sonda, dojde k uvolnění několika vodíkových můstků vázajících sondu. Je aktivována exonukleásová podjednotka DNA polymerázy, která začne štěpit sondu mezi reporterem a quencherem. Fragmenty sondy jsou odstraňovány z cílové sekvence a polymerace nového vlákna pokračuje. Fluorofor se při rozpadu sondy dostává z vlivu tlumiče, takže začne emitovat záření, které je zaznamenáno jako fluorescenční signál, záření tlumiče naopak ustane (Pavlík a Pavlíková, 2004). Díky tomu, že je nárůst fluorescenčního signálu zaznamenán pouze v případě, že se sonda specificky naváže na komplementární cílovou sekvenci genu, je míra fluorescence přímo úměrná množství vzniklého produktu PCR. Pro dosažení správných výsledků je proto nezbytné použití vhodně navržených primerů a sond a zachování stejné vstupní koncentrace cDNA pro všechny vzorky.

## **4.5.2. Chemikálie a materiál**

### **4.5.2.1. Chemikálie**

- Zředěný roztok cDNA (300 µg/ml) – cca 0,72 µg cDNA/reakce
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, NO AmpErase® UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) – 2x koncentrovaný:
  - AmpliTaq Gold® DNA Polymeráza s 5'-3' nukleázovou aktivitou
  - dNTP (deoxyATP, deoxyGTP, deoxyCTP a deoxyTTP)
  - Pasivní referenční fluorescenční barva (ROX)
  - Optimalizované složky pufru
- PCR voda (Nuclease-Free Water, Promega, Madison, USA)
- TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 20x koncentrovaná:
  - 2 genově specifické neznačené PCR primery (každý s koncentrací 900 nM)
  - Genově specifická fluorescenčně značená sonda – FAM™ dye-labeled TaqMan® MGB probe (koncentrace 250 nM)
  - ID sond: Hs99999018\_m1 (BCL-2); Hs00892681\_m1 (GLUT1); Hs00829989\_gH (GPX1); Hs00936370\_m1 (HIF1-α); Hs00985639\_m1 (IL-6); Hs00178563\_m1 (IRS1); Hs00234140\_m1 (MCP1); Hs00236988\_g1 (MIF); Hs00359394\_g1 (MT3);



Hs00174128\_m1 (TNF- $\alpha$ ); Hs99999907\_m1 (B2M); Hs00204094\_m1 (LRP10);  
Hs99999901\_s1 (18S)

#### 4.5.2.2. Materiál

- Sterilní polypropylenové mikrozkušavky
- Sterilní špičky s filtrem (Gilson, USA)
- Pipeta Pipetman<sup>®</sup> Ultra (Gilson, USA)
- Optická reakční destička (MicroAmp<sup>™</sup> Optical 96-Well Reaction Plate) + optický adhezivní film (MicroAmp<sup>™</sup> Optical Adhesive Film) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Vortex (MSE Minishaker, Ika-Works, Wilmington, USA)
- Mikrocentrifuga (Eppendorf AG, Německo)
- Centrifuga Jouan BR4 s adaptérem (Jouan Technology for life, Winchester, VA, USA)
- Přístroj ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) + PC
- Latexové jednorázové rukavice (powder-free) (Aurelia, USA)

#### 4.5.3. Postup

Každý gen byl v každém vzorku amplifikován v dubletu, takže pro jeden vzorek bylo potřeba 24 reakcí (2x BCL-2, 2x GLUT1, 2x GPX1, 2x HIF1- $\alpha$ , 2x IL-6, 2x IRS1, 2x MCP1, 2x MIF, 2x MT3, 2x TNF- $\alpha$ , 2x B2M, 2x LRP10):

1. Pro každý gen (cílovou sekvenci daného genu) byl ve sterilních 2,0 ml mikrozkušavkách připraven premix pro daný počet vzorků a to smícháním 10  $\mu$ l PCR Master Mixu, 1  $\mu$ l příslušné sondy a 6,6  $\mu$ l PCR vody.
2. Vzorky s roztokem cDNA byly rozmrazeny a 5 krát zředěny PCR vodou (ke 30  $\mu$ l roztoku bylo přidáno 150  $\mu$ l PCR vody).
3. Premix byl zvortexován a podle plánu napipetován po 20  $\mu$ l do jamek na optické destičce.
4. Roztok cDNA byl krátce zvortexován a podle plánu připipetován po 2,4  $\mu$ l do jamek s premixem.



5. Hrdla jamek byla přelepena optickým adhezivním filmem, destička byla umístěna na vortex se speciálním nástavcem a směs lehce roztřepána, následně v centrifuze se speciálním nástavcem krátce stočena.
6. Optická destička byla umístěna do přístroje ABI PRISM 7500 s nastaveným teplotním profilem:
  - 95 °C po 10 min – denaturace dsDNA a aktivace DNA polymerázy
  - 45 cyklů: 15 s 95 °C (denaturace dsDNA) a 1 min 60 °C (nasednutí primerů spolu se sondou na ssDNA a prodlužování nového řetězce DNA)
7. 7500 Sequence Detection Software určil průměrnou hodnotu  $\Delta C_T$  a průměrnou chybu mezi dublety a pomocí vzorce:  $2^{-\Delta(Ct \text{ adipocytokinu} - Ct \text{ endogenní kontroly})}$  byla spočítána relativní genová exprese určitého genu v daném vzorku oproti vybrané endogenní kontrole.

#### **4.5.3.1. Výběr vhodné endogenní kontroly**

Každý gen byl v každém vzorku amplifikován v dubletu, takže pro jeden vzorek bylo potřeba 6 reakcí (2x B2M, 2x LRP10, 2x 18S). Byl použit výše popsáný postup.

#### **4.6. Statistické vyhodnocení výsledků**

Pro zhodnocení genové stability a z toho plynoucí výběr vhodné endogenní kontroly byl použit program G-Norm.

Výsledky pro relativní genové exprese byly vyhodnocovány pomocí programu SigmaStat Software (Jandel Scientific, USA) a vyjádřeny jako průměr  $\pm$  standardní chyba průměru (SEM). Pro porovnání změn v genových expresích na začátku operace a na začátku a konci hypotermie byla použita One Way RM ANOVA. Pro zjištění rozdílu v genových expresích pro subkutánní a viscerální tukovou tkáň byla použita One Way ANOVA spolu s nepárovým t-testem. Ke sledování změn sérových hladin během operace byla použita One Way RM ANOVA spolu s párovým t-testem. Za signifikantně významné byly považovány výsledky s hodnotou pravděpodobnosti  $p < 0,05$ .

Pro vytvoření grafů byl použit program SigmaPlot Software (Jandel Scientific, USA).



## 5. Výsledky

### 5.1. Izolace celkové RNA

Celkem 120 vzorků – 60 vzorků adipocytů a 60 vzorků celkového tuku.

#### 5.1.1. Spektrofotometrie

- Průměrný výtěžek RNA byl  $51,57 \pm 3,244 \text{ } \mu\text{g/ml}$  ( $43,902 \pm 2,063 \text{ } \mu\text{g/ml}$  pro adipocyty,  $59,238 \pm 6,016 \text{ } \mu\text{g/ml}$  pro celkovou tukovou tkáň).
- Čistota daná poměrem  $A_{260/280}$  byla  $1,649 \pm 0,0189$  ( $1,704 \pm 0,0128$  pro adipocyty,  $1,595 \pm 0,0344$  pro celkovou tukovou tkáň).

#### 5.1.2. Gelová elektroforéza

- Na obrázku 7 je vyfocen elektroforetický gel s viditelnými proužky 18S a 28S. Nedošlo k narušení integrity RNA. Není zde patrné nežádoucí znečištění DNA. Jednotlivé proužky jsou viditelné jen slabě kvůli nízké koncentraci vyizolované RNA.



*Obr. 7: Gelová elektroforéza*

### 5.2. Výběr vhodné endogenní kontroly pro Real-time PCR

Nejmenší genovou stabilitu vykazovala 18S, proto byly jako endogenní kontroly vybrány B2M (beta-2-mikroglobulin) a LRP10 (low density lipoprotein receptor-related protein 10).



### 5.3. Výsledky stanovení genových expresí a sérových hladin sledovaných adipokínů

Kromě výsledků stanovení genových expresí jednotlivých genů (vztažených k endogenní kontrole B2M) uvádím grafy pro sérové hladiny některých adipocytokínů. Na stanovení těchto hodnot jsem se osobně nepodílela, přesto jsem se je rozhodla do své práce zařadit, protože mohou pomoci vytvořit komplexnější představu o vlivu hluboké hypotermie na endokrinní funkci tukové tkáně.

U žádného ze sledovaných genů nebyl zjištěn rozdíl v celkové expresi mezi subkutánním a viscerálním tukem a to ani pro adipocyty ani pro celkovou tukovou tkáň.

U některých genů byl zjištěn signifikantní rozdíl v hodnotách genové exprese v adipocytech a celkové tukové tkáni (viz. Tab. 1). Genová exprese MT3 a TNF- $\alpha$  nemohla být porovnána, protože v adipocytech nebyla exprese mRNA pro tyto geny dostatečně detekovatelná. Výsledky relativní exprese mRNA v adipocytech pro MT3 a TNF- $\alpha$  proto nejsou relevantní.

*Tab. 1: Porovnání relativní genové exprese v adipocytech a celkovém tuku subkutánním (A) a viscerální (B). Hodnoty genové exprese celkovým tukem jsou zde vyjádřeny jako násobek genové exprese adipocytů pro jednotlivé geny a odběry (ZH – začátek hypotermie, KH – konec hypotermie, KO – konec operace). Hodnoty jsou vztaženy k endogenní kontrole B2M. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl exprese celkovým tukem a adipocyty.*

A,	BCL2	GLUT1	GPX1	HIF1- $\alpha$	IL-6	IRS1	MCP-1	MIF
ZH	0,132*	0,414	0,051*	0,749	0,037*	0,113*	0,329	0,155*
KH	0,113*	0,344*	0,033*	0,843	0,117	0,093*	0,869	0,082*
KO	0,094*	0,363	0,027*	0,896	0,294*	0,108*	0,721	0,088*

B,	BCL2	GLUT1	GPX1	HIF1- $\alpha$	IL-6	IRS1	MCP-1	MIF
ZH	0,173*	0,519	0,052*	0,824	0,047*	0,103*	0,213	0,106*
KH	0,133*	0,374	0,026*	0,939	0,065*	0,103*	1,085	0,108*
KO	0,095*	0,351	0,014*	1,237	0,330	0,104*	1,220	0,060*



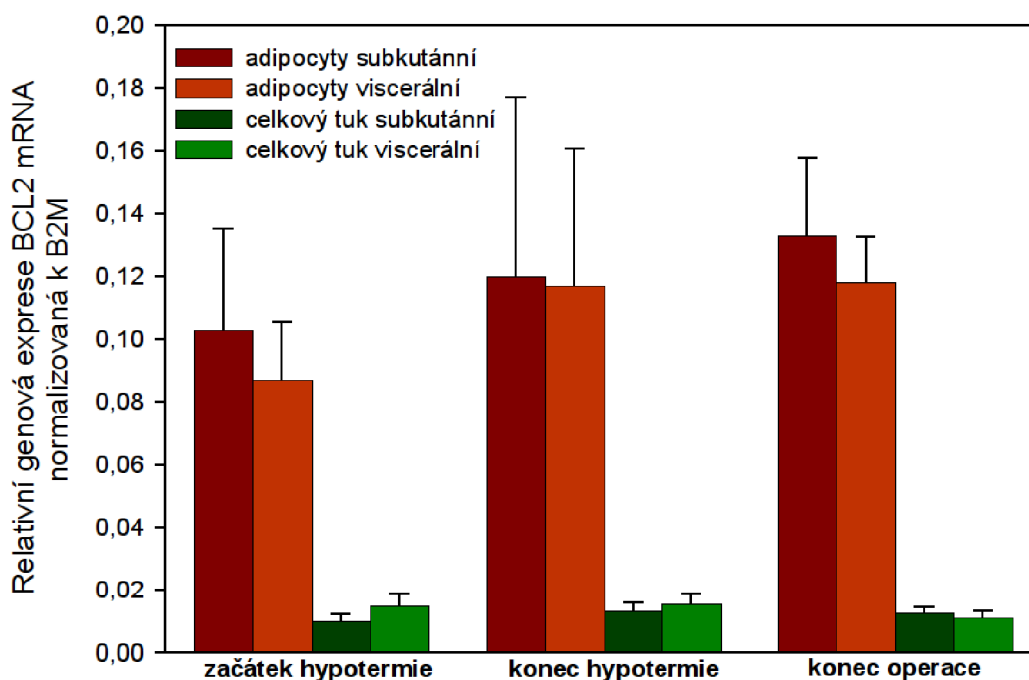
### 5.3.1. BCL-2

V genové expresi BCL-2 mRNA nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly.

Tab. 2: Porovnání relativní genové exprese BCL-2 mRNA vztažené k endogenní kontrole B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek průměrné hodnoty genové exprese BCL-2 mRNA vždy pro první odběr, tedy na začátku hypotermie.

BCL-2	začátek hypotermie	konec hypotermie	konec operace
subkutánní adipocyty	1	0,74	1,29
viscerální adipocyty	1	1,34	1,35
celkový tuk subkutánní	1	1	0,92
celkový tuk viscerální	1	1,03	0,74

Genová exprese BCL2



Obr. 8: Graf znázorňuje rozdíly v relativních genových expresích BCL-2 mRNA mezi začátkem hypotermie, koncem hypotermie a koncem operace, pro adipocyty i celkový tuk. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM. Jedná se o relativní hodnoty vztažené k B2M.

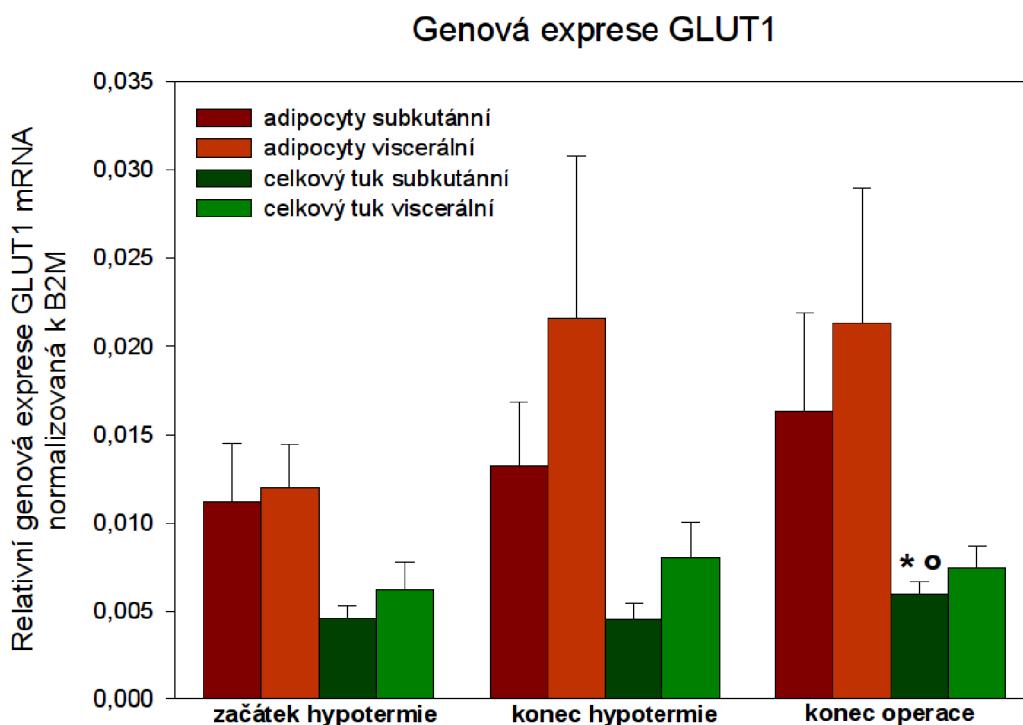


### 5.3.2. GLUT1

V genové expresi GLUT1 mRNA byla zjištěna statisticky signifikantní změna v celkovém subkutánním tuku. Došlo zde k významnému nárůstu GLUT1 mRNA na konci operace oproti začátku hypotermie a konci hypotermie.

Tab. 3: Porovnání relativní genové exprese GLUT1 mRNA vztažené k endogenní kontrole B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek průměrné hodnoty genové exprese GLUT1 mRNA vždy pro první odběr, tedy na začátku hypotermie. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a hodnoty pro začátek hypotermie. ° značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a hodnoty pro konec hypotermie.

GLUT1	začátek hypotermie	konec hypotermie	konec operace
subkutánní adipocyty	1	1,19	1,46
viscerální adipocyty	1	1,80	1,77
celkový tuk subkutánní	1	0,98	1,28 * °
celkový tuk viscerální	1	1,30	1,20



Obr. 9: Graf znázorňuje rozdíly v relativních genových expresích GLUT1 mRNA mezi začátkem hypotermie, koncem hypotermie a koncem operace, pro adipocyty i celkový tuk. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl oproti začátku hypotermie. ° značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl oproti konci hypotermie pro danou tkáň. Jedná se o relativní hodnoty vztažené k B2M.

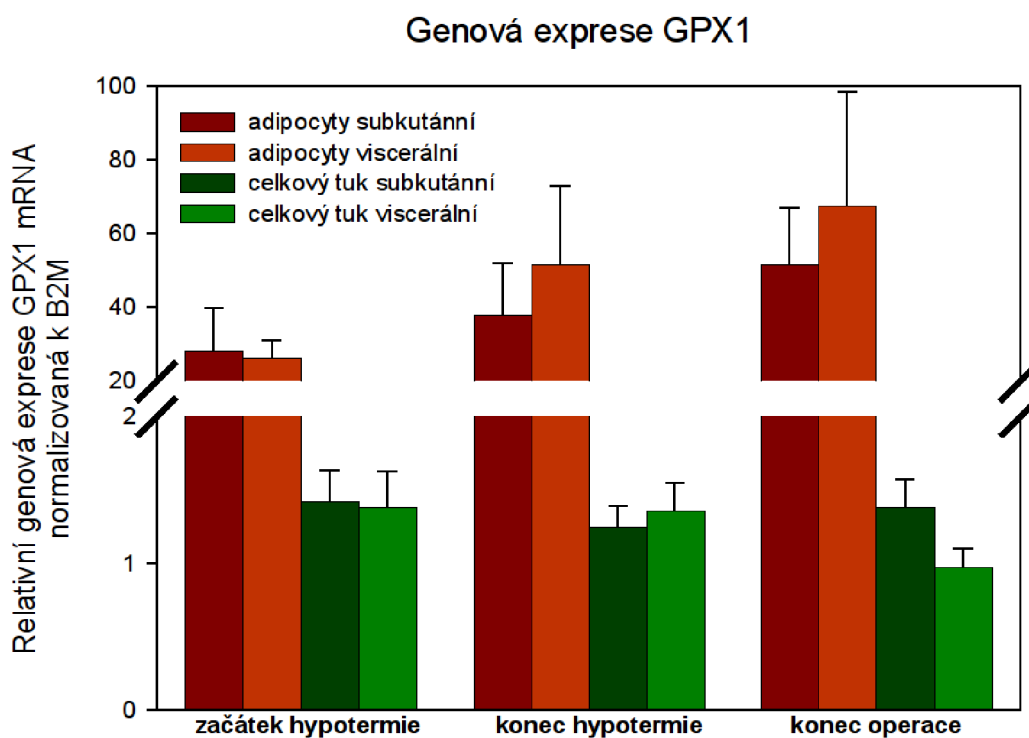


### 5.3.3. GPX1

V genové expresi GPX1 mRNA nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly.

Tab. 4: Porovnání relativní genové exprese GPX1 mRNA vztažené k endogenní kontrole B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek průměrné hodnoty genové exprese GPX1 mRNA vždy pro první odběr, tedy na začátku hypotermie.

GPX1	začátek hypotermie	konec hypotermie	konec operace
subkutánní adipocyty	1	1,35	1,84
viscerální adipocyty	1	1,95	2,56
celkový tuk subkutánní	1	0,88	0,97
celkový tuk viscerální	1	0,99	0,71



Obr. 10: Graf znázorňuje rozdíly v relativních genových expresích GPX1 mRNA mezi začátkem hypotermie, koncem hypotermie a koncem operace, pro adipocyty i celkový tuk. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM. Jedná se o relativní hodnoty vztažené k B2M.

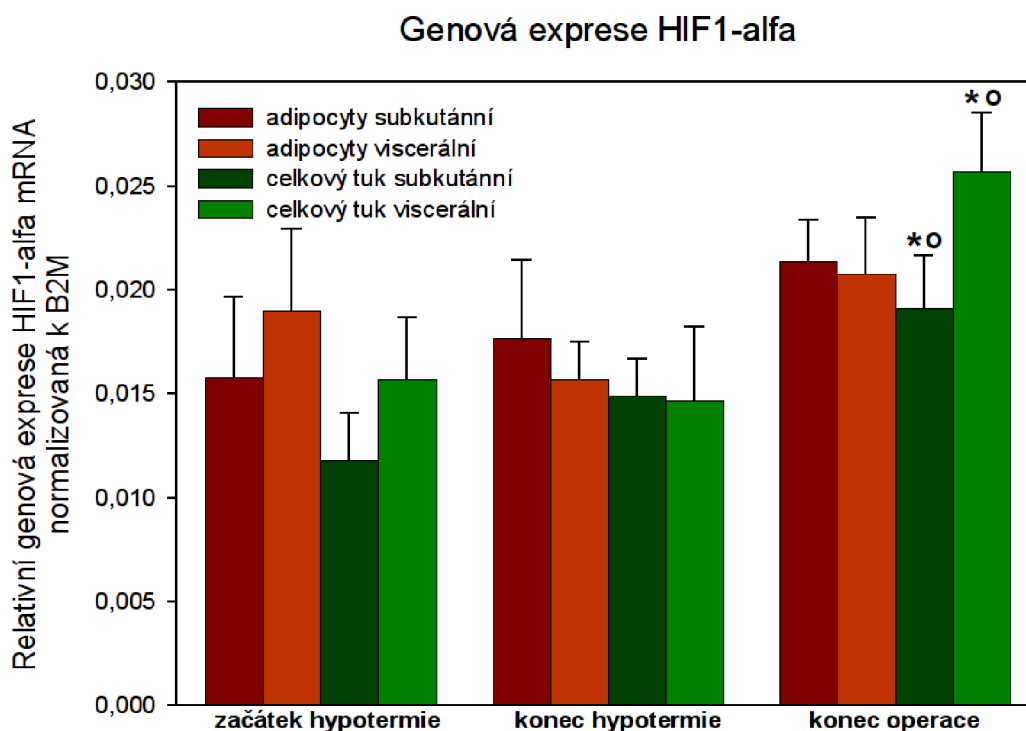


### 5.3.4. HIF1- $\alpha$

V genové expresi HIF1- $\alpha$  mRNA byla zjištěna statisticky signifikantní změna v celkovém tuku a to subkutánním i viscerálním. Došlo zde k statisticky signifikantnímu nárůstu HIF1- $\alpha$  mRNA na konci operace oproti začátku hypotermie a konci hypotermie. U subkutánních ani viscerálních adipocytů nebyl nárůst dostatečně průkazný.

Tab. 5: Porovnání relativní genové exprese HIF1- $\alpha$  mRNA vztažené k endogenní kontrole B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek průměrné hodnoty genové exprese HIF1- $\alpha$  mRNA vždy pro první odběr; tedy na začátku hypotermie. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a hodnoty pro začátek hypotermie. ° značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a hodnoty pro konec hypotermie.

HIF1- $\alpha$	začátek hypotermie	konec hypotermie	konec operace
subkutánní adipocyty	1	1,12	1,35
viscerální adipocyty	1	0,83	1,09
celkový tuk subkutánní	1	1,26	1,62 * °
celkový tuk viscerální	1	0,94	1,64 * °



Obr. 11: Graf znázorňuje rozdíly v relativních genových expresích HIF1- $\alpha$  mRNA mezi začátkem hypotermie, koncem hypotermie a koncem operace, pro adipocyty i celkový tuk. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl oproti začátku hypotermie. ° značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl oproti konci hypotermie pro danou tkáň. Jedná se o relativní hodnoty vztažené k B2M.



### 5.3.5. IL-6

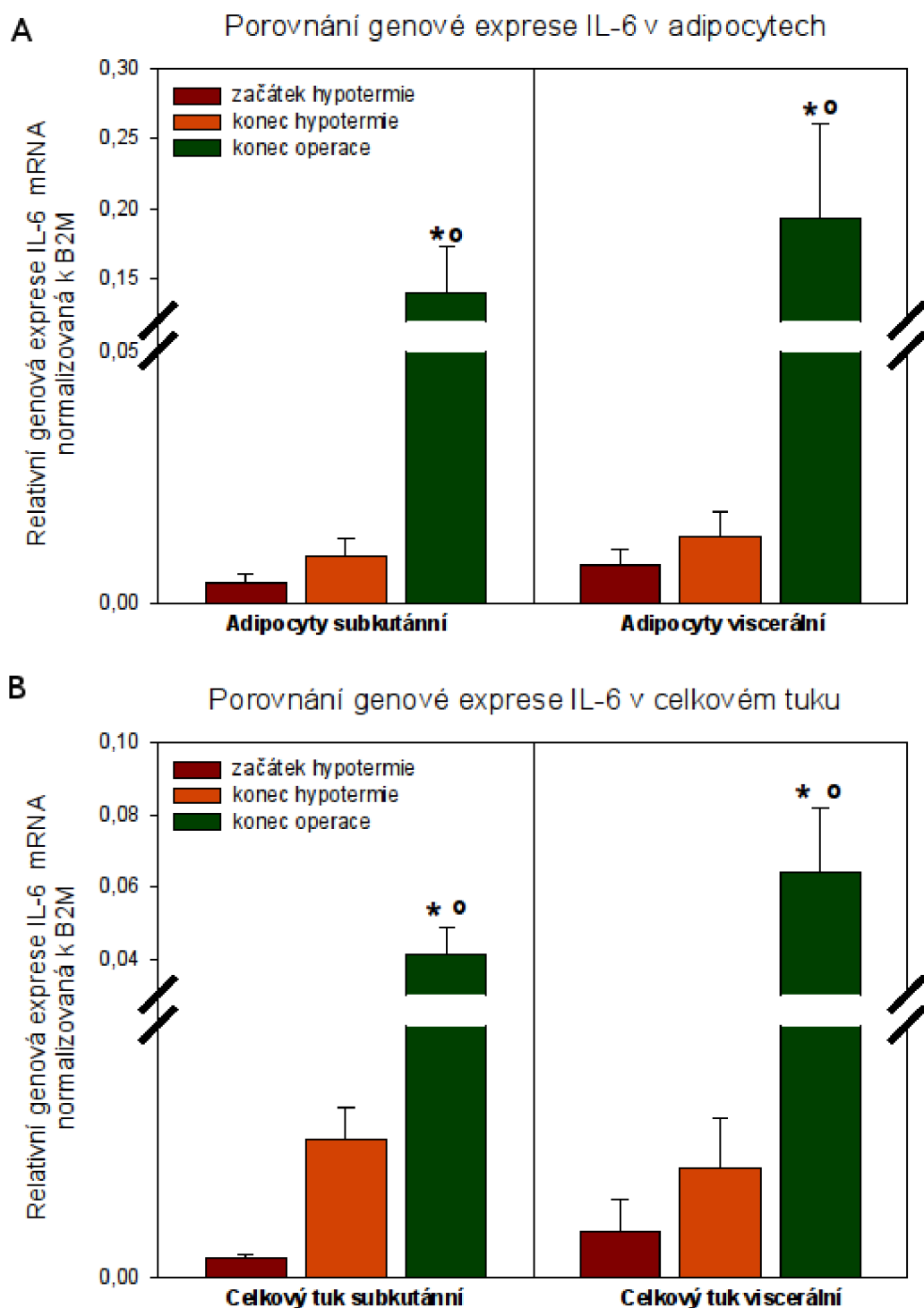
V genové expresi IL-6 mRNA byla zjištěna statisticky signifikantní změna u všech sledovaných tkání, tedy jak v subkutánním a viscerálním celkovém tuku, tak i v subkutánních a viscerálních adipocytech. Došlo zde k statisticky signifikantnímu nárůstu IL-6 mRNA na konci operace oproti začátku hypotermie a konci hypotermie.

Hladina IL-6 v séru vykazovala během prvních 4 hodin operace, tedy v době vystavení hluboké hypotermii, tendenci k poklesu. 12 hodin po začátku operace došlo k signifikantnímu nárůstu (viz Obr. 13).

*Tab. 6: Porovnání relativní genové exprese IL-6 mRNA vztažené k endogenní kontrole B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek průměrné hodnoty genové exprese IL-6 mRNA vždy pro první odběr, tedy na začátku hypotermie. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a hodnoty pro začátek hypotermie. ° značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a hodnoty pro konec hypotermie.*

IL-6	začátek hypotermie	konec hypotermie	konec operace
subkutánní adipocyty	1	2,31	34,52 *°
viscerální adipocyty	1	1,75	25,46 *°
celkový tuk subkutánní	1	7,29	272,98 *°
celkový tuk viscerální	1	2,43	178,10 *°

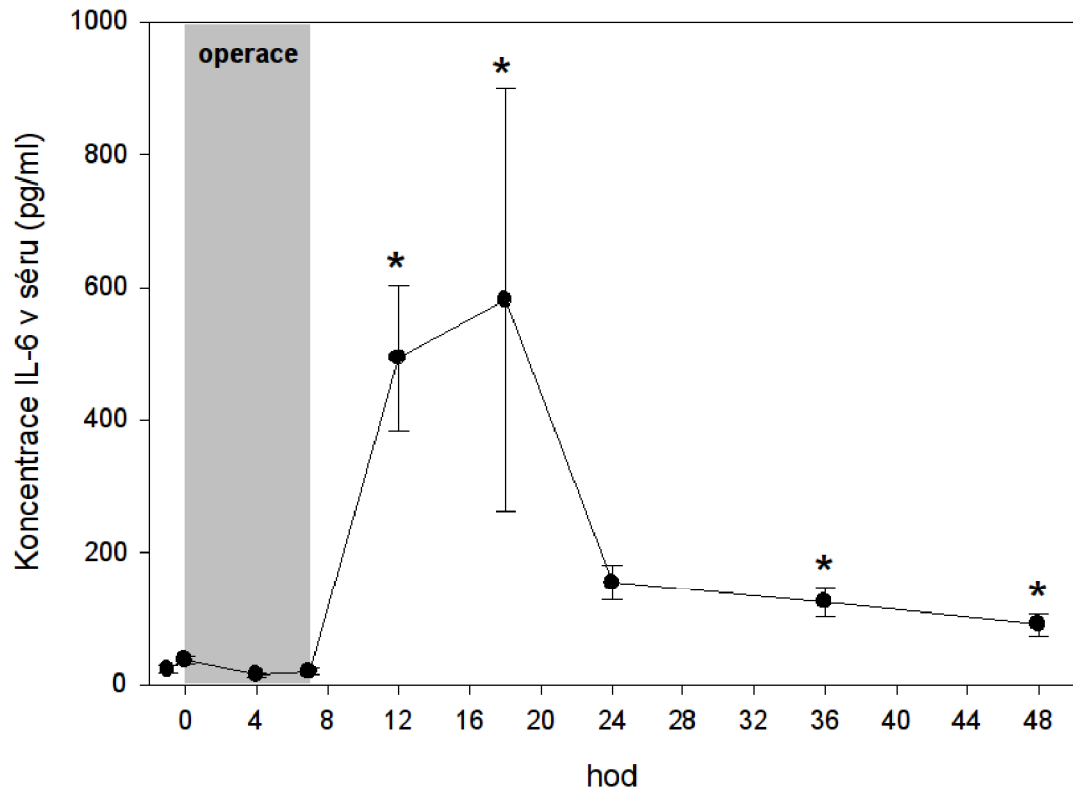




Obr. 12: Graf znázorňuje rozdíly v relativních genových expresích IL-6 mRNA mezi začátkem hypotermie, koncem hypotermie a koncem operace v adipocytech (A) a celkovém tuku (B). Hodnoty jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl oproti začátku hypotermie. ° značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl oproti konci hypotermie pro danou tkáň. Jedná se o relativní hodnoty vztažené k B2M.



## Sérové hladiny IL-6



Obr. 13: Průběh sérových hladin IL-6 od bazálního stavu před začátkem operace po 48 hod od začátku operace. Hodnoty byly určeny pro čas -1 hod (před začátkem operace), 0 hod (začátek operace – těsně po sternotomii), 4 hod (konec hypotermie), 7 hod (konec operace) a 12, 18, 24, 36 a 48 hod od začátku operace. Hodnoty zde byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a bazální hodnoty. Pro stanovení byla použita ELISA (Immunotech, Paris, France).

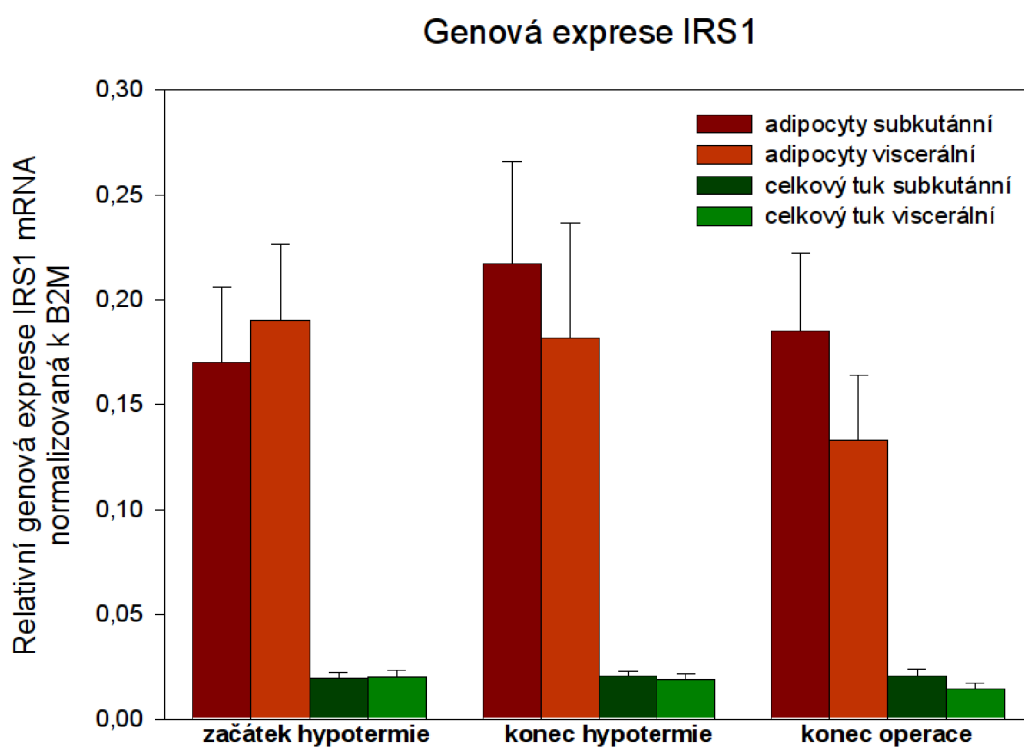


### 5.3.6. IRS1

V genové expresi IRS1 mRNA nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly.

Tab. 7: Porovnání relativní genové exprese IRS1 mRNA vztažené k endogenní kontrole B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek průměrné hodnoty genové exprese IRS1 mRNA vždy pro první odběr, tedy na začátku hypotermie.

IRS1	začátek hypotermie	konec hypotermie	konec operace
subkutánní adipocyty	1	1,28	1,09
viscerální adipocyty	1	0,96	0,70
celkový tuk subkutánní	1	1,06	1,04
celkový tuk viscerální	1	0,96	0,71



Obr. 14: Graf znázorňuje rozdíly v relativních genových expresích IRS1 mRNA mezi začátkem hypotermie, koncem hypotermie a koncem operace, pro adipocyty i celkový tuk. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM. Jedná se o relativní hodnoty vztažené k B2M.



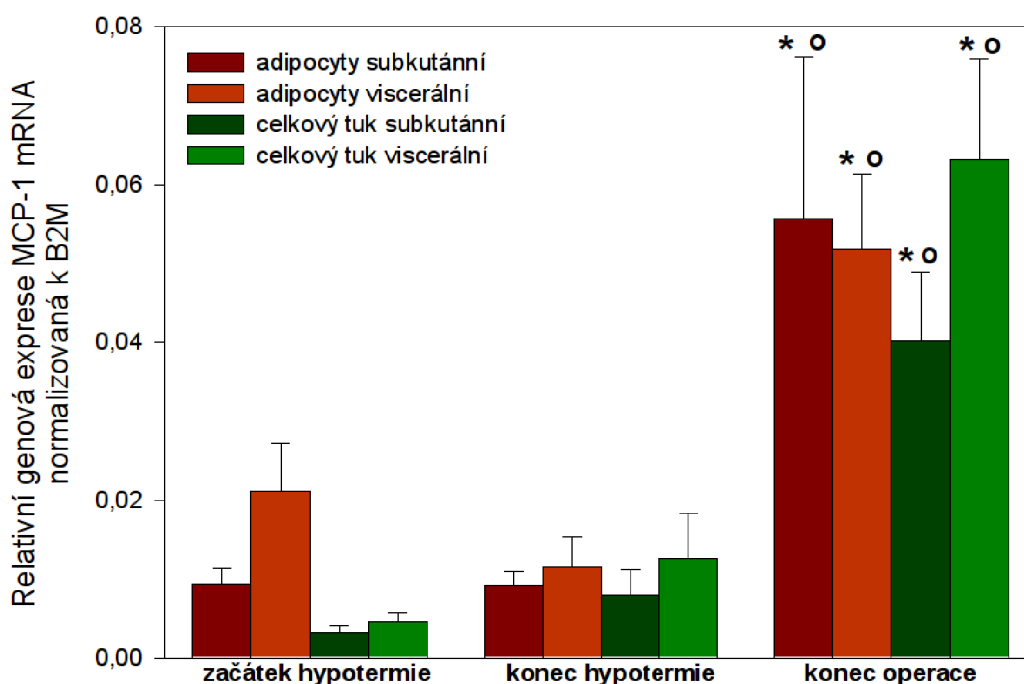
### 5.3.7. MCP1

V genové expresi MCP1 mRNA byla zjištěna statisticky signifikantní změna u všech sledovaných tkání, tedy jak v subkutánním a viscerálním celkovém tuku, tak i v subkutánních a viscerálních adipocytech. Došlo zde k statisticky signifikantnímu nárůstu MCP1 mRNA na konci operace oproti začátku hypotermie a konci hypotermie.

Tab. 8: Porovnání relativní genové exprese MCP1 mRNA vztažené k endogenní kontrole B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek průměrné hodnoty genové exprese MCP1 mRNA vždy pro první odběr, tedy na začátku hypotermie. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a hodnoty pro začátek hypotermie. ° značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a hodnoty pro konec hypotermie.

MCP1	začátek hypotermie	konec hypotermie	konec operace
subkutánní adipocyty	1	0,98	5,92 *°
viscerální adipocyty	1	0,55	2,44 *°
celkový tuk subkutánní	1	2,59	12,98 *°
celkový tuk viscerální	1	2,79	14,00 *°

#### Genová exprese MCP-1



Obr. 15: Graf znázorňuje rozdíly v relativních genových expresích MCP-1 mRNA mezi začátkem hypotermie, koncem hypotermie a koncem operace, pro adipocyty i celkový tuk. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl oproti začátku hypotermie. ° značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl oproti konci hypotermie pro danou tkáň. Jedná se o relativní hodnoty vztažené k B2M.

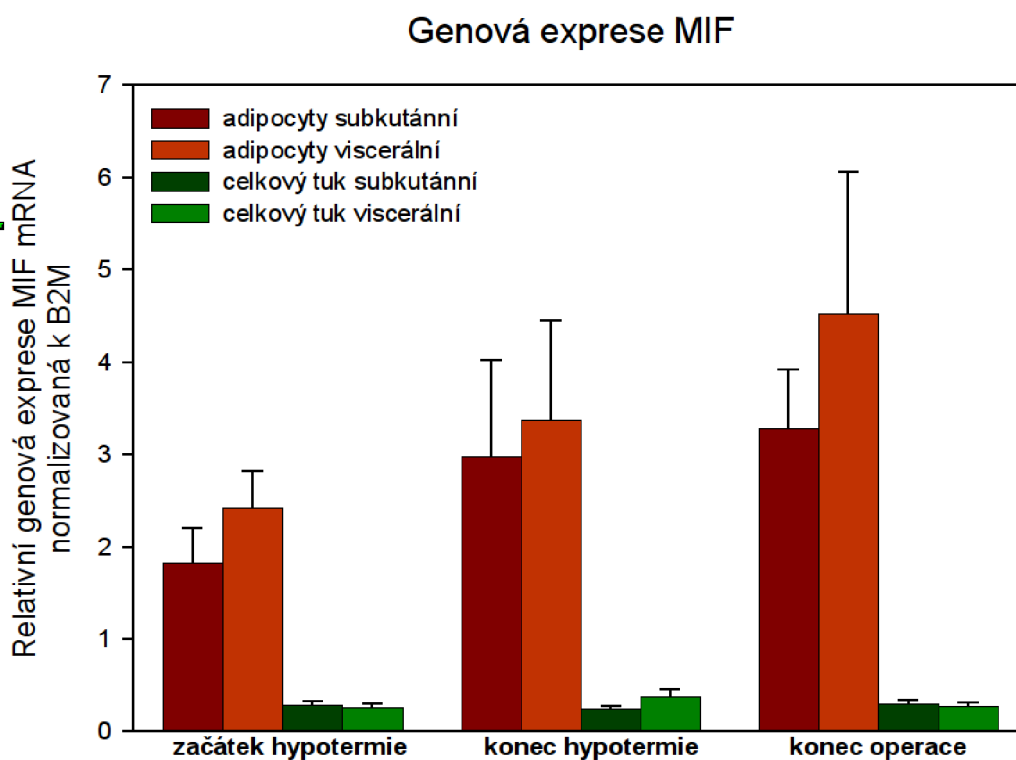


### 5.3.8. MIF

V genové expresi MIF mRNA nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly.

Tab. 9: Porovnání relativní genové exprese MIF mRNA vztažené k endogenní kontrole B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek průměrné hodnoty genové exprese MIF mRNA vždy pro první odběr, tedy na začátku hypotermie.

MIF	začátek hypotermie	konec hypotermie	konec operace
subkutánní adipocyty	1	1,63	1,80
viscerální adipocyty	1	1,39	1,87
celkový tuk subkutánní	1	0,86	1,01
celkový tuk viscerální	1	1,41	1,05



Obr. 16: Graf znázorňuje rozdíly v relativních genových expresích MIF mRNA mezi začátkem hypotermie, koncem hypotermie a koncem operace, pro adipocyty i celkový tuk. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM. Jedná se o relativní hodnoty vztažené k B2M.

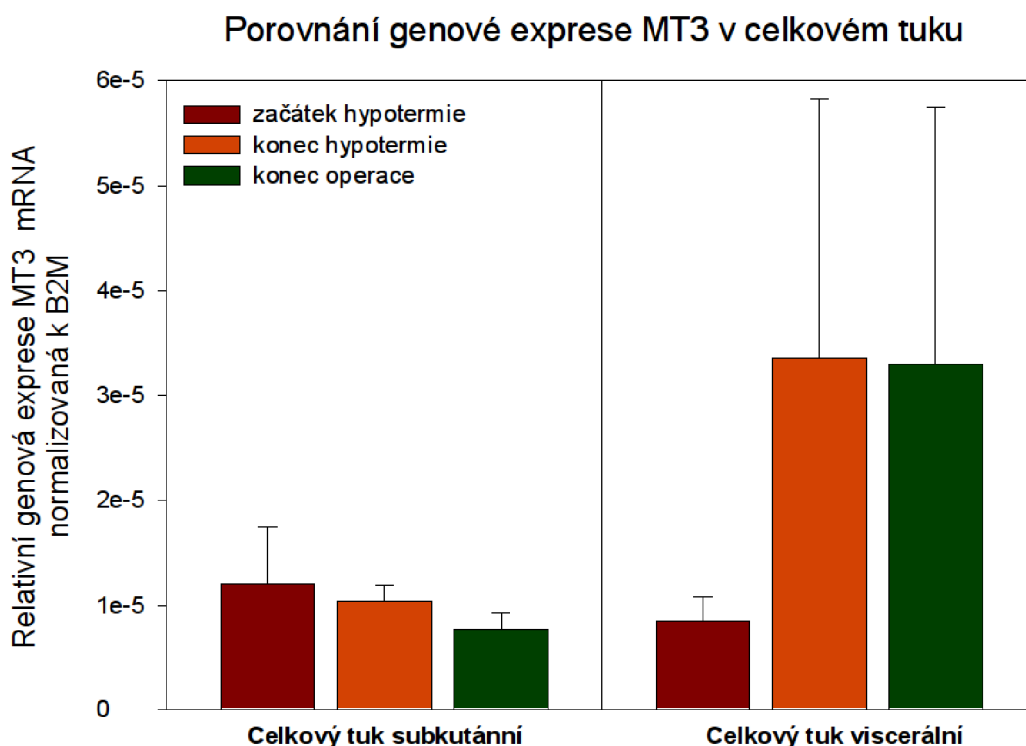


### 5.3.9. MT3

V genové expresi MT3 mRNA nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly. Údaje pro subkutánní ani viscerální adipocyty nejsou uváděny, protože ve většině adipocytárních vzorků nebyla MT3 mRNA detekována, a proto by se jednalo o příliš malý soubor.

*Tab. 10: Porovnání relativní genové exprese MT3 mRNA vztažené k endogenní kontrole B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek průměrné hodnoty genové exprese MT3 mRNA vždy pro první odběr, tedy na začátku hypotermie*

MT3	začátek hypotermie	konec hypotermie	konec operace
celkový tuk subkutánní	1	0,86	0,64
celkový tuk viscerální	1	3,95	3,88



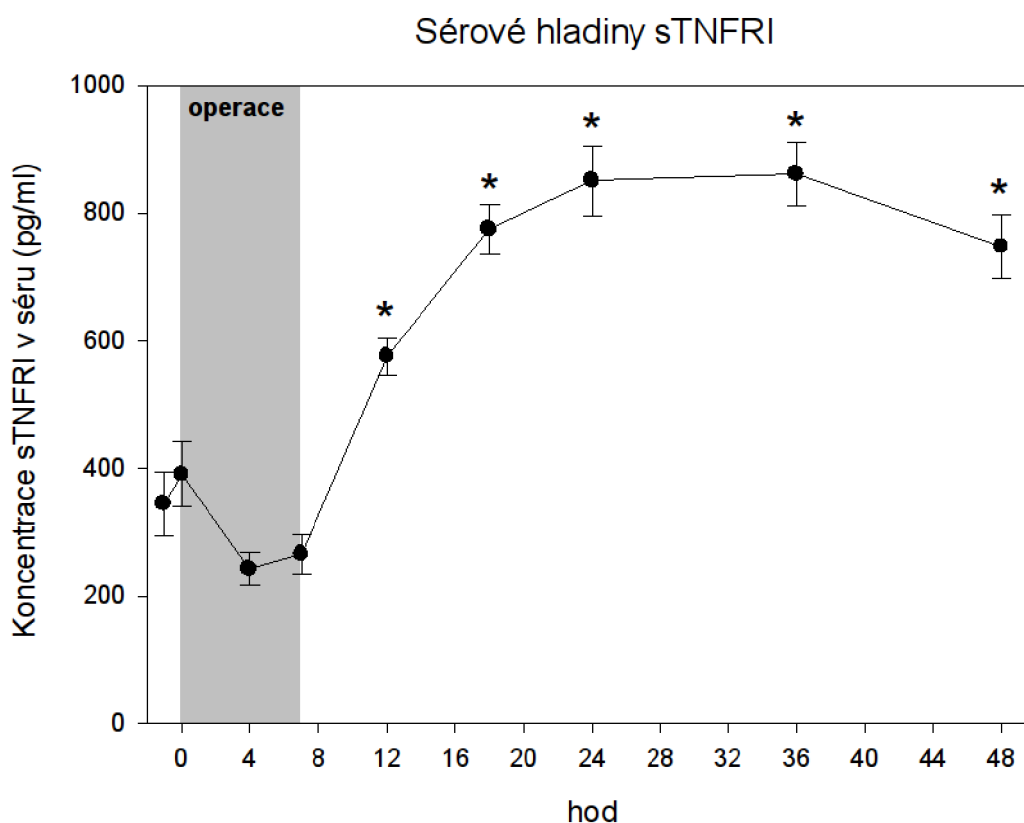
*Obr. 17: Graf znázorňuje rozdíly v relativních genových expresích MT3 mRNA mezi začátkem hypotermie, koncem hypotermie a koncem operace v celkovém tuku. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM. Jedná se o relativní hodnoty vztažené k B2M.*



### 5.3.10. TNF- $\alpha$

V genové expresi TNF- $\alpha$  mRNA byla zjištěna statisticky signifikantní změna v celkovém viscerálním tuku. Došlo zde k významnému nárůstu TNF- $\alpha$  mRNA na konci operace oproti začátku hypotermie. Údaje pro subkutánní ani viscerální adipocyty nejsou uváděny, protože ve většině adipocytárních vzorků nebyla TNF- $\alpha$  mRNA detekována, a proto by se jednalo o příliš malý soubor.

Hladina solubilního receptoru pro TNF typu 1 (sTNFR1) v séru vykazovala tendenci k poklesu během prvních 4 hodin operace, tedy v době vystavení hluboké hypotermii. 12 hodin po začátku operace došlo k signifikantnímu nárůstu (viz Obr. 18).

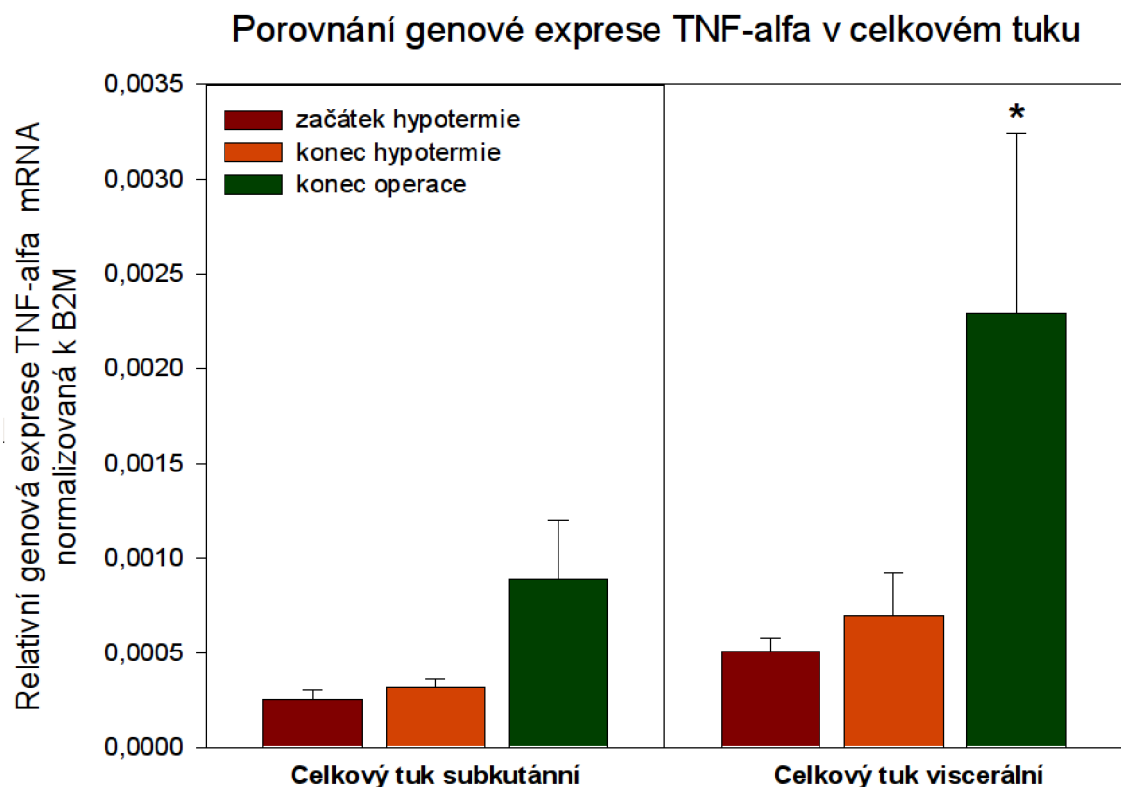


Obr. 18: Průběh sérových hladin solubilního receptoru pro TNF typu 1 (sTNFR1) od bazálního stavu před začátkem operace po 48 hod od začátku operace. Hodnoty byly určeny pro čas -1 hod (před začátkem operace), 0 hod (začátek operace – těsně po sternotomii), 4 hod (konec hypotermie), 7 hod (konec operace) a 12, 18, 24, 36 a 48 hod od začátku operace. Hodnoty zde byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a bazální hodnoty. Pro stanovení byla použita ELISA (Immunotech, Paris, France).



Tab. 11: Porovnání relativní genové exprese *TNF- $\alpha$*  mRNA vztažené k endogenní kontrole B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobek průměrné hodnoty genové exprese *TNF- $\alpha$*  mRNA vždy pro první odběr, tedy na začátku hypotermie. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a hodnoty pro začátek hypotermie.

TNF- $\alpha$	začátek hypotermie	konec hypotermie	konec operace
celkový tuk subkutánní	1	1,26	3,56
celkový tuk viscerální	1	1,38	4,56 *

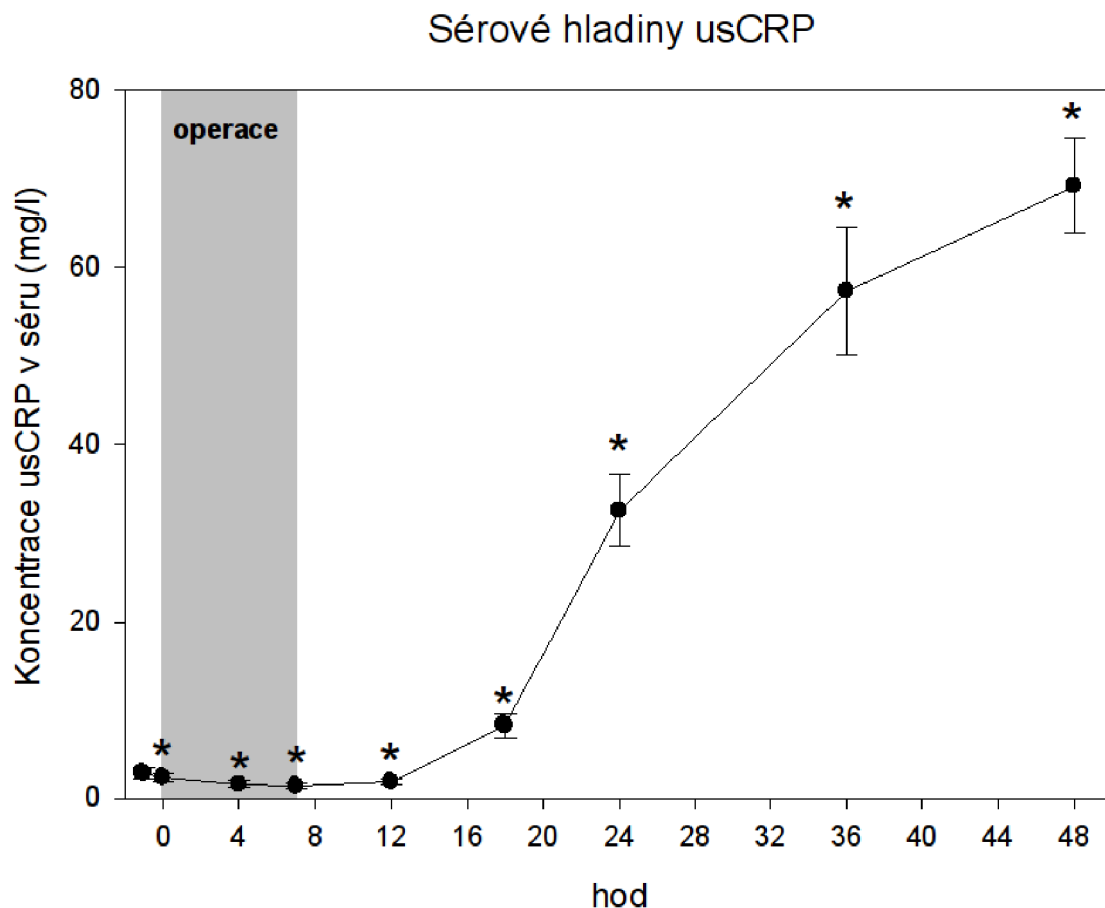


Obr. 19: Graf znázorňuje rozdíly v relativních genových expresích *TNF- $\alpha$*  mRNA mezi začátkem hypotermie, koncem hypotermie a koncem operace v celkovém tuku. Hodnoty jsou vyneseny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl oproti začátku hypotermie pro danou tkáň. Jedná se o relativní hodnoty vztažené k B2M.



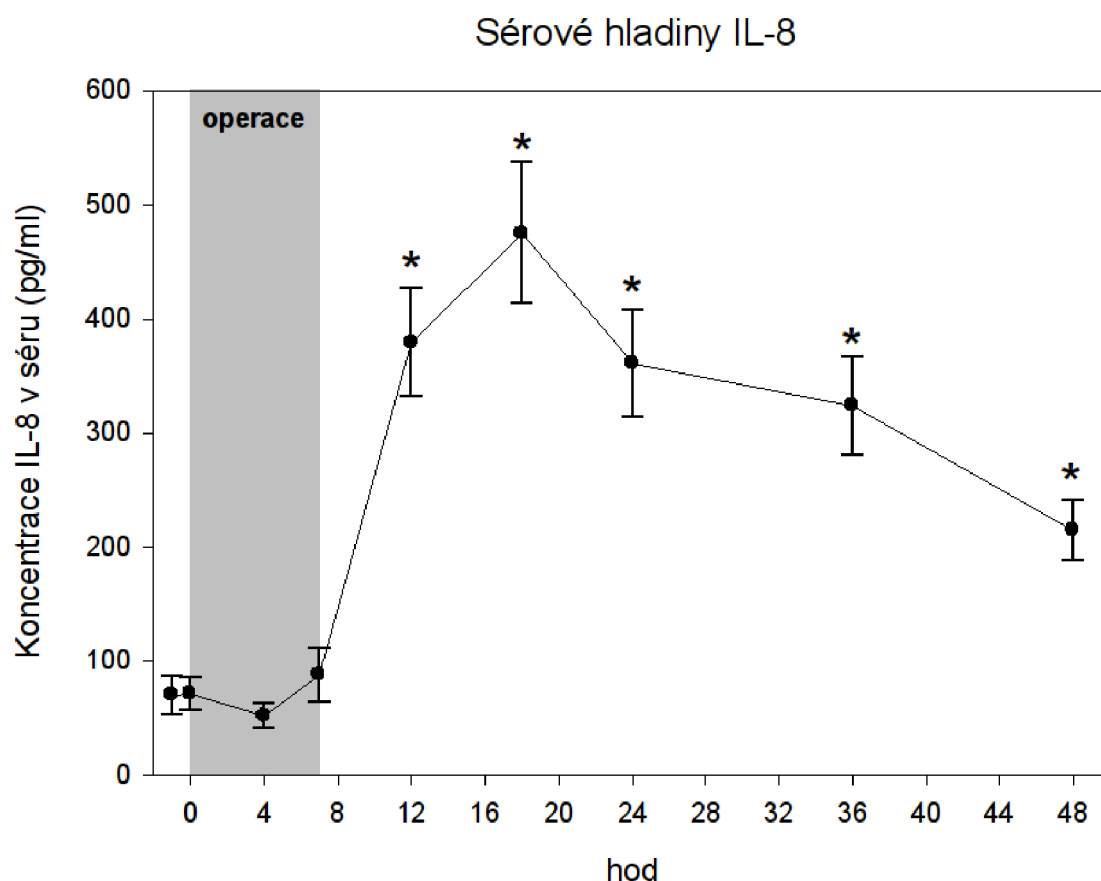
### 5.3.11. Sérové hladiny dalších adipokinů

Sérové hladiny usCRP (ultra sensitivní C-reaktivní protein), PCT (prokalcitonin), IL-8 (interleukin 8) i sIL-2R (solubilní receptor pro interleukin 2) vykazují mírný pokles během prvních 4 hodin operace, tedy v době vystavení hluboké hypotermii. Po skončení operace došlo u všech těchto adipokinů k signifikantnímu nárůstu sérových hladin (viz Obr. 20 – 23).



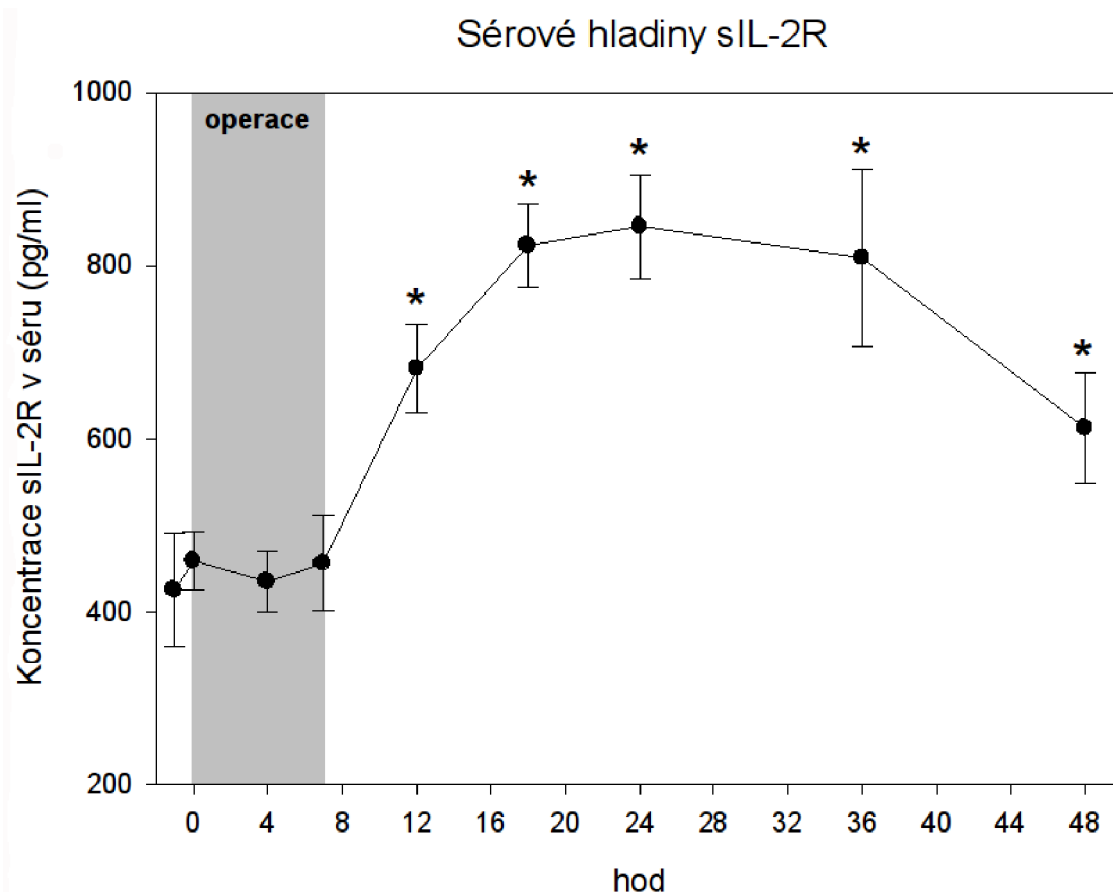
Obr. 20: Průběh sérových hladin usCRP od bazálního stavu před začátkem operace po 48 hod od začátku operace. Hodnoty byly určeny pro čas -1 hod (před začátkem operace), 0 hod (začátek operace – těsně po sternotomii), 4 hod (konec hypotermie), 7 hod (konec operace) a 12, 18, 24, 36 a 48 hod od začátku operace. Hodnoty zde byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a bazální hodnoty. Pro stanovení byla použita Kryptor – TRACE technology (ultrasensitive analysis, BRAHMS, Henningsdorf, Germany).





Obr. 21: Průběh sérových hladin IL-8 od bazálního stavu před začátkem operace po 48 hod od začátku operace. Hodnoty byly určeny pro čas -1 hod (před začátkem operace), 0 hod (začátek operace – těsně po sternotomii), 4 hod (konec hypotermie), 7 hod (konec operace) a 12, 18, 24, 36 a 48 hod od začátku operace. Hodnoty zde byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a bazální hodnoty. Pro stanovení byla použita ELISA (Immunotech, Paris, France).

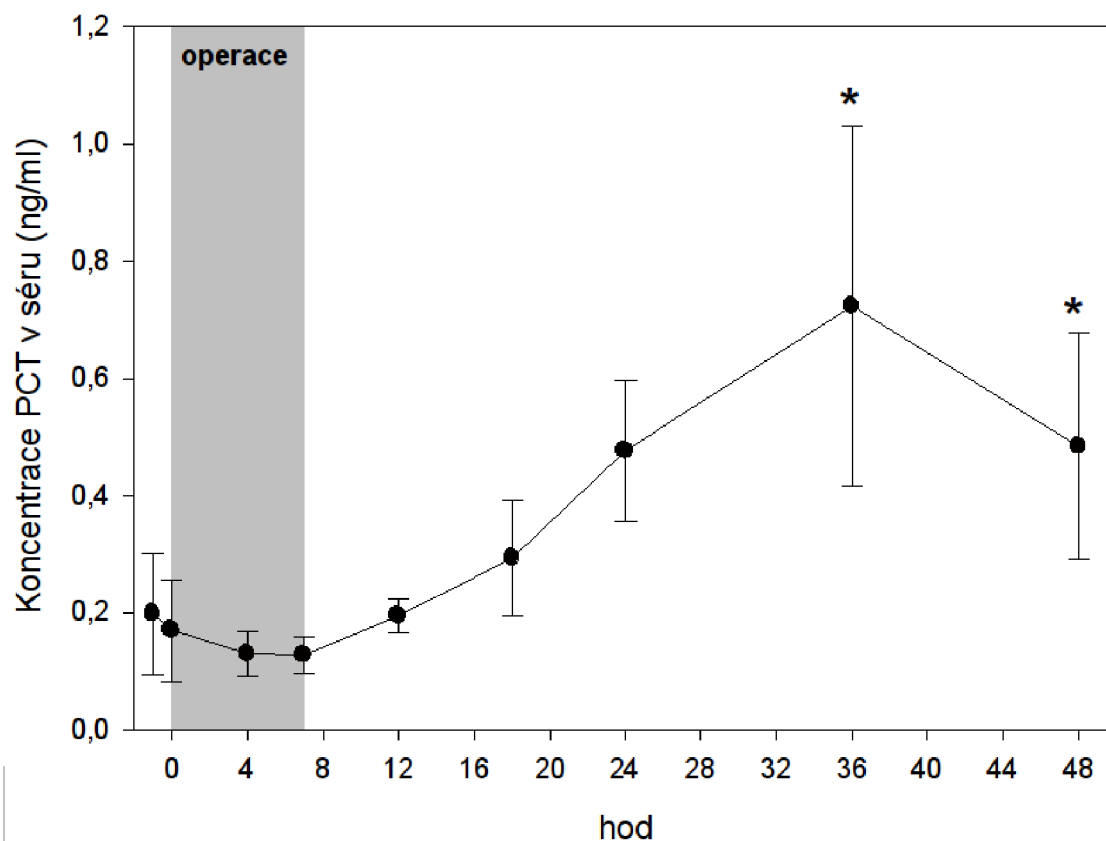




Obr. 22: Průběh sérových hladin solubilního receptoru pro IL-2 od bazálního stavu před začátkem operace po 48 hod od začátku operace. Hodnoty byly určeny pro čas -1 hod (před začátkem operace), 0 hod (začátek operace – těsně po sternotomii), 4 hod (konec hypotermie), 7 hod (konec operace) a 12, 18, 24, 36 a 48 hod od začátku operace. Hodnoty zde byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a bazální hodnoty. Pro stanovení byla použita ELISA (Immunotech, Paris, France).



## Sérové hladiny PCT



Obr. 23: Průběh sérových hladin PCT od bazálního stavu před začátkem operace po 48 hod od začátku operace. Hodnoty byly určeny pro čas -1 hod (před začátkem operace), 0 hod (začátek operace – těsně po sternotomii), 4 hod (konec hypotermie), 7 hod (konec operace) a 12, 18, 24, 36 a 48 hod od začátku operace. Hodnoty zde byly vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM. \* značí hodnotu pravděpodobnosti  $p < 0,05$  pro rozdíl hodnoty označeného odběru a bazální hodnoty. Pro stanovení byla použita Kryptor – TRACE technology (ultrasensitive analysis, BRAHMS, Henningsdorf, Germany).



## 6. Diskuze

Tuková tkáň je významný endokrinní orgán produkující celou řadu bioaktivních peptidů, které jsou souhrnně označovány jako adipokiny, případně adipocytokiny. Ve své práci jsem se snažila zjistit vliv hluboké hypotermie na genovou expresi některých z nich. Hluboká hypotermie je v souvislosti s možným vlivem na endokrinní funkci tukové tkáně dosud zcela opomíjena. Přitom je u pacientů hypotermie navozována v celé řadě operací, při kterých je nutná dočasná zástava krevního oběhu. V mírné hypotermii jsou navíc na jednotkách intenzivní péče standardně udržováni pacienti po kardiopulmonální resuscitaci.

Operace představuje pro organismus velký stresový podnět, který vede k rychlému navození systémové zánětlivé odpovědi. Změna v expresi prozánětlivých adipocytokinů je velmi rychlá. Například Křemen et al. v roce 2006 ukázali, že již na konci čtyři hodiny trvající operace dochází k významnému nárůstu exprese IL-6 a dalších cytokinů (Křemen et al., 2006). Proto jsem se v naší studii mimo jiné zaměřila na zjištění změn v expresi prozánětlivých adipocytokinů způsobených hlubokou hypotermií. Nejvýraznější rozdíly v genové expresi byly zjištěny u IL-6 (Tab. 6). Nezávisle na lokalizaci tukové tkáně došlo jak v adipocytech, tak v celkovém tuku k významnému nárůstu genové exprese na konci operace oproti začátku i konci hypotermie. Genová exprese na začátku a konci hypotermie se přitom významně nelišila. V celkovém viscerálním tuku se genová exprese na konci operace zvýšila přibližně 180x, v subkutánním tuku byla exprese zvýšena dokonce více než 270x oproti začátku hypotermie. V genové expresi IL-6 adipocyty byl oproti celkovému tuku zjištěn výrazně menší nárůst a to bez ohledu na umístění. V subkutánních adipocytech byla exprese na konci operace oproti začátku hypotermie zvýšena 35x a ve viscerálních jen 25x. Genová exprese byla vyšší v adipocytech než v celkovém tuku bez ohledu na uložení tukové tkáně (Tab. 1). To je ovšem v rozporu s některými dřívějšími studiemi, které zjistily, že adipocyty se na celkové produkci IL-6 v tukové tkáni podílejí jen asi z 5-10 % a to jak v subkutánní, tak ve viscerální tukové tkáni (Fried et al., 1998, Fain et al., 2004). Tento rozpor by mohl být způsoben metodikou izolace adipocytů. Během tohoto procesu by teoreticky mohlo dojít k nárůstu exprese některých proteinů. Proto je možné předpokládat, že i rozdíly v expresi adipocyty a celkovým tukem pro ostatní adipokiny nemusí být vždy jednoznačně směřodatné. Ovšem je nutné zdůraznit, že vzhledem k tomu, že byly všechny vzorky adipocytů izolovány stejným způsobem, nemohlo dojít k ovlivnění rozdílů v genové expresi mezi jednotlivými odběry.



Stejný trend jako v genové expresi, tedy potlačení nárůstu během vystavení hluboké hypotermii, byl zjištěn i v sérových hladinách IL-6 (Obr. 12). Ovšem nárůst byl potlačen celou dobu operace a výrazný vzestup sérové hladiny byl zaznamenán teprve 12 hod po začátku operace. Ve studii Křemen et al. z roku 2006, kde byly zjišťovány sérové hladiny některých adipocytokinů při kardiologické operaci, tedy při přinejmenším podobně náročném zákroku jako podstoupili pacienti v naší studii, došlo k signifikantnímu nárůstu sérové hladiny IL-6 již na konci čtyři hodiny trvající operace (Křemen et al., 2006). Podle práce Mohamed-Ali et al. z roku 1997 se tuková tkáň, především subkutánní, významně podílí na systémové produkci IL-6 (Mohamed-Ali et al., 1997). Proto můžeme i ze sérových hladin vyvozovat závěr, že vlivem hluboké hypotermie došlo k utlumení prozánětlivé reakce v tukové tkáni.

Podobně jako u IL-6, došlo i v genové expresi MCP-1 k významnému nárůstu na konci operace oproti začátku i konci hypotermie a to jak v adipocytech, tak v celkovém tuku bez ohledu na místo původu (Tab. 8). Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v produkci adipocyty a celkovou tkání, ale nárůst v celkovém subkutánním tuku byl oproti adipocytům dvojnásobný a v celkovém viscerálním tuku dokonce téměř šestinásobný, což by ukazovalo na menší význam adipocytů v expresi MCP-1. To odpovídá výsledkům prací Dahlmana et al. a Bruuna et al., obě z roku 2005 (Dahlman et al., 2005, Bruun et al., 2005).

U TNF- $\alpha$  (Tab. 11) došlo k signifikantnímu nárůstu genové exprese v celkovém viscerálním tuku pouze mezi začátkem hypotermie a koncem operace, takže ani tady nedošlo k nárůstu exprese v počátcích operace, kdy byl pacient vystaven hypotermii, ovšem nárůst na konci operace nebyl tak výrazný jako u IL-6. V subkutánním tuku byl pozorován silný trend k nárůstu genové exprese TNF- $\alpha$  na konci operace. Vzhledem k tomu, že ve významné části vzorků adipocytů nebyl TNF- $\alpha$  detekován, nebylo možné zjistit význam jeho genové exprese adipocyty oproti celkovému tuku. Podle studie Faina et al. z roku 2004 by tento podíl měl být zanedbatelný (méně než 10 %) (Fain et al., 2004). To by také mohl být důvod, proč se nám jej v adipocytech nepodařilo dostatečně detekovat. Sérové hladiny solubilního receptoru pro TNF- $\alpha$  stejně jako u IL-6 ukázaly významný nárůst hladiny sTNFRI až 12 hod po začátku operace, během samotné operace, a především její hypotermní fáze, pak naopak trend k poklesu (Obr. 18). Qing et al. v roce 2001 zjistili, že poškození srdce, plic a ledvin signifikantně koreluje s hladinou TNF- $\alpha$  na konci CPB (Qing et al., 2001). Vzhledem k tomu, že hluboká hypotermie tuto hladinu snižuje, má i protektivní efekt na orgány. Tuková tkáň ovšem nemá významný podíl na sérových koncentracích TNF- $\alpha$  (Mohamed-Ali et al., 1997).



U posledního z námi zkoumaných prozánětlivých cytokinů, MIF (Tab. 9), jsme nezaznamenali žádnou statisticky významnou změnu mezi jednotlivými odběry. V subkutánní i viscerální tukové tkáni byla jeho produkce významnější přímo adipocyty než celkovou tukovou tkání. To odpovídá poznatkům Skurka et al. z roku 2005, kteří nezjistili rozdíl v produkci subkutánní a viscerální tukovou tkání. MIF je v tukové tkáni produkován především imunitními buňkami, které jsou přitahovány do místa zánětu. Z tohoto důvodu je možné, že jeho produkce významně stoupá až po delší době od stresového podnětu, a proto nebyl v naší studii zaznamenán.

Kromě IL-6 a sTNF-R1 jsme zjišťovali vliv hypotermie na sérové hladiny dalších zánětlivých markerů a to přímo proteinů akutní zánětlivé odpovědi (CRP, prokalcitonin), prozánětlivého chemokinu IL-8 a solubilního receptoru pro prozánětlivý cytokin IL-2 (sIL-2R) (Obr.20-23). Sérové koncentrace všech těchto látek nejenže se 4 hodiny po začátku operace neměnily, ale měly dokonce tendenci k poklesu. Vzhledem k tomu, že se jedná o časovou periodu, během které byli pacienti vystaveni hluboké hypotermii, dokazuje to, že hluboká hypotermie potlačuje vznik zánětlivé odpovědi organismu.

Při porovnání našich výsledků se studií Křemen et al. z roku 2006, kde došlo k nárůstu exprese mRNA pro TNF- $\alpha$ , IL-6 i MCP-1 již na konci 4 hodinové operace, tedy v době odpovídající odběru na konci hypotermie (Křemen et al., 2006), jasně vyplývá, že hluboká hypotermie má během operace významný vliv na potlačení vzniku zánětu v tukové tkáni. Tento závěr podporují i hodnoty sérových hladin námi zjišťovaných proteinů. Protože některé prozánětlivé adipokiny mohou působit i systémově, vedou výsledky naší studie k závěru, že hluboká hypotermie působí na organismus jako účinná ochrana před zánětlivou reakcí.

Během vystavení pacientů hluboké hypotermii a anoxické fázi nedošlo k významnému nárůstu HIF1- $\alpha$  (Tab. 5). V subkutánním tuku i adipocytech byla jeho exprese dokonce mírně snížena. Ani v expresi MT3 nebyl zaznamenán nárůst (Tab. 10). To by podle studie Wanga et al. z roku 2008, kteří při 4 hodinovém vystavení tukové tkáně hypoxii zaznamenali až stonásobné zvýšení exprese znamenalo, že vlivem hluboké hypotermie nejenže nedochází ke vzniku hypoxie, ale má dokonce vliv na potlačení exprese proteinů způsobené anoxickou fází. Ve zmiňované studii došlo k významnému nárůstu exprese MT3 po 45-60 minutách (Wang et al., 2008). V naší studii byli pacienti vystaveni anoxické fázi v průměru  $35,3 \pm 2,43$  min a tuková tkáň jim byla odebrána cca 10 min po skončení anoxické fáze. Během této doby by se již na základě výše uvedené práce dala, v případě hypoxie, předpokládat signifikantně zvýšená exprese MT3. Fakt, že k jeho významnému nárůstu nedošlo ani



na konci operace ukazuje, že hluboká hypotermie významně potlačila hypoxické důsledky anoxické fáze.

K signifikantně významné změně genové exprese došlo u GLUT1 v celkovém subkutánním tuku. I u tohoto genu byla hodnota genové exprese vyšší na konci operace oproti hodnotám na začátku a konci hypotermie. Exprese na konci hypotermie se od exprese na začátku hypotermie nelišila (Tab. 3). Dřívější studie uvádějí, že vlivem hypotermie dochází k celkovému zpomalení metabolismu a díky snížení periferních spotřeb substrátu také ke vzrůstu glykémie (Solař, 2004, Garcia a Gantt, 1994). Zvýšení exprese na konci operace by mohlo být adaptací buněk na dlouhodobé vystavení nižší koncentraci živin v organismu mechanismem zvýšení utilizace glukózy. Ačkoliv není GLUT1 hlavním glukózovým transportérem v tukové tkáni, je možné na základě jeho exprese předpokládat, že podobný mechanismus platí i pro GLUT4. Podle práce Wood et al. z roku 2007 stoupá exprese GLUT1 při hypoxii (Wood et al., 2007). To koreluje s výsledky pro HIF1- $\alpha$  a MT3, tedy že hluboká hypotermie nevyvolává v tukové tkáni hypoxii.

V genové expresi IRS1, dalšího genu podílejícího se na kontrole metabolismu glukózy (Tab. 7) nebyla zjištěna žádná statisticky významná změna. Vyšší genovou expresi vykazovaly adipocyty oproti celkovému tuku bez ohledu na místo původu tukové tkáně.

V genové expresi antiapoptického genu BCL-2 (Tab. 2) nebyla zjištěna žádná statisticky významná změna, zdá se tedy, že hluboká hypotermie nemá vliv na zvýšení ochrany buněk v tukové tkáni před apoptózou. Významně vyšší expresi vykazovaly adipocyty oproti celkovému tuku a to jak v subkutánní, tak ve viscerální tukové tkáni.

Stejně tak se nám nepodařilo zjistit žádnou změnu v ochraně buněk před oxidačním stresem. GPX1, jeden z klíčových antioxidantů, nevykázal změnu v genové expresi vlivem hypotermie (Tab. 4). Zajímavým zjištěním bylo, že zatímco se genová exprese v adipocytech působením hypotermie mírně zvýšila, v celkovém tuku naopak poklesla, tyto změny ovšem nebyly signifikantní.

Při srovnávání subkutánní a viscerální tukové tkáně nebyl zjištěn rozdíl v celkové expresi žádného ze sledovaných genů a to ani v adipocytech ani v celkovém tuku. V naší studii jsme neprokázali vliv lokalizace tukové tkáně na její produkci cytokinů. Tento jev může být způsoben aktuálním stavem organismu, celkovou premedikací a jinými faktory přidruženými k operačnímu zákroku. Pacienti zařazení do studie nebyli obézní, na rozdíl od práce Faina et al. z roku 2004, který rozdíl v genové expresi adipokinů, v závislosti na umístění tukové tkáně,



stanovoval u morbidně obézních pacientů (Fain et al., 2004). Dalším faktorem, který mohl ovlivnit srovnání, je samotná hluboká hypotermie, jejímž vlivem mohlo dojít k utlumení genové exprese v subkutánní i viscerální tukové tkáni na stejnou hladinu.



## 7. Závěrečné shrnutí

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na velmi málo prozkoumané téma vlivu hluboké hypotermie na endokrinní funkci tukové tkáně a to u pacientů, kteří podstoupili operaci plicní hypertenze s dočasnou zástavou tělního oběhu. Pomocí metody Real-time PCR jsem zjišťovala změnu v genové expresi některých adipocytokinů způsobenou vystavením organismu během operace krátkodobé hluboké hypotermii. Pro širší pohled na danou problematiku jsem dále porovnávala změny v sérových hladinách některých adipocytokinů. Také jsem se zaměřila na vliv uložení tukové tkáně na genovou expresi.

Snažila jsem se obsáhnout co nejširší pole vlivu hypotermie na tukovou tkáň, proto jsem zkoumala exprese prozánětlivých faktorů (TNF $\alpha$ , IL-6, MCP-1 a MIF) a antiapoptického markeru (BCL-2), významného antioxidantu (GPX1) a genů ovlivňujících transport glukózy do buněk (GLUT1, IRS1). Jedním z předpokládaných důsledků hypotermie a anoxické fáze během operace byl vznik hypoxie, proto jsem zkoumala také genovou expresi HIF1- $\alpha$  a MT3.

Z mých výsledků vyplývá, že hluboká hypotermie významně potlačuje zánětlivou odpověď tukové tkáně a celého organismu na stresový podnět, který představuje operace. Také vede k potlačení následků anoxické fáze. Nemá ale vliv na antioxidační ochranu buněk ani na potlačení apoptózy. Zdá se, že subkutánní a viscerální tuková tkáň se nijak neliší v expresi adipocytokinů.



## Seznam použité literatury

- Araki E, Kahn CR, Shichiri M. (1994) Characterization of the IRS-1 (insulin receptor substrate-1) gene and its promoter. *Nippon Rinsho* 52(10): 2659-2664.
- Arthur JR. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1825–1835.
- Baggiolini M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *NATURE*. 392(6676): 565-568.
- Beilin B, Shavit Y, Razumovsky J, Wolloch Y, Zeidel A, Bessler H. (1998) Effects of mild perioperative hypothermia on cellular immune responses. *Anesthesiology*. 89: 1133-1140.
- Bernard SA, Gray TW, Buis MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. (2002) Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N. Engl. J. Med.* 346: 557-63.
- Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, Dahinden CA. (1992) Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J. Exp. Med.* 175(5): 1271-1275.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ; AtheroGene Investigators. (2003) Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 349(17): 1605-1613.
- Bruun JM, Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(4): 2282-2289.
- Bucala R. (1996) MIF rediscovered: cytokine, pituitary hormone, and glucocorticoid-induced regulator of the immune response. *FASEB J.* 10(14): 1607-1613.
- Busto R, Globus MY-T, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. (1989) Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke*. 20: 904-910.
- Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. (1994) The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.* 179(6): 1895-902.
- Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R. (1995) MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*. 377(6544): 68-71.
- Cancello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. (2005) Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 54(8): 2277-86.



- Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. (1994) Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(9): 3652-3656.
- Coppack SW. (2001) Pro-inflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* 60: 349-356.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. *Cel. Mo. Life. Sci.* 59(4): 627-647.
- Dahlman I, Kaaman M, Olsson T, Tan GD, Bickerton AS, Wåhlén K, Andersson J, Nordström EA, Blomqvist L, Sjögren A, Forsgren M, Attersand A, Arner P. (2005) A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(10): 5834-5840.
- Fain JN, Madan AK, Lloyd Hiler M, Cheema P, Bahouth SW. (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 145: 2273–2282.
- Fan C, Li Q, Ross D, Engelhardt JF. (2003) Tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha activates NF kappa B through a redox-regulated and c-Src-dependent mechanism following hypoxia/reoxygenation. *J. Biol. Chem.* 278(3): 2072-2080.
- Fischer RB, Souba W, Ford EG. (1987) Temperature-associated injuries and syndromes. (ed) *Trauma.Old Tappan, Appleton/Lange, Mattox KL.*: 354–363.
- Frayn KN, Karpel F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. (2003) Integrative physiology of human adipose tissue. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27: 875–888.
- Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(3): 847-50.
- Garcia MA, Gantt RM. (1994) Intraoperative hypothermia - Physiologic implications and prevention. *Problems in Anesthesia.* 1: 44-53.
- Gearing A, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL, Leber TM, Mangan M, Miller K, Nayee P, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood LM & Woolley K. (1994) Processing of tumor necrosis factor- $\alpha$  precursor by metallo-proteinases. *Nature.* 370: 555-557.
- Globus MY-T, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD. (1995) Glutamate Release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *J. Neurochem.* 65: 1704-1711.
- Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. (1995) Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects.. *J. Clin. Invest.* 95(5): 2195-2204.



- Grimsrud PA, Picklo MJ Sr, Griffin TJ, Bernlohr DA. (2007) Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol. Cell. Proteomics*. 6(4): 624–637.
- Gullicksen PS, Hausman DB, Dean RG, Hartzell DL, Baile CA. (2003) Adipose tissue cellularity and apoptosis after intracerebroventricular injections of leptin and 21 days of recovery in rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27(3): 302–312.
- Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. (1989) Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in achemically defined medium. *J. Clin. Invest.* 84: 1663–1670.
- Heier T, Caldwell JE, Sessler DI, Kitts JB, Miller RD. (1989) The relationship between adductor pollicis twitch tension and core, skin, and muscle temperature during nitrous oxide-isoflurane anesthesia in humans. *Anesthesiology*. 71(3): 381-384.
- Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 334(2): 297-314.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F.. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374(1): 1–20.
- Hildebrand F, Giannoudis PV, Griensven M van, Chawda M, Pape H-CH. (2004) Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 11. *Labor Aktuell*. 3: 10-13.
- Hildebrand F, Giannoudis PV, Griensven M van, Chawda M, Pape H-CH. (2004) Pathophysiologic changes and effects of hypothermia on outcome in elective surgery and trauma patients. *Am. J. Surg.* 187: 363–371.
- Hinds MG, Lackmann M, Skea GL, Harrison PJ, Huang DC, Day CL. (2003) The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J.* 22(7): 1497-1507.
- Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. (1991) BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88(16): 6961-6965.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 259(5091): 87-91.
- Hube F, Birgel M, Lee YM, Hauner H. (1999) Expression pattern of tumour necrosis factor receptors in subcutaneous and omental human adipose tissue: role of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur. J. Clin. Invest.* 29(8): 672-678.
- Chaldakov GN, Stankulov IS, Hristova M, Ghenev PI. (2003) Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr. Pharm. Des.* 9(12): 1023-1031.



- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J. Biol. Chem.* 275(33): 25130-25138.
- Jiang G, Zhang BB. (2005) Modulation of insulin signalling by insulin sensitizers. *Biochem. Soc. Trans.* 33(2): 358–361.
- Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. (2001) The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J.* 15(1): 43–58.
- Kahn BB. (1994) Dietary regulation of glucose transporter gene expression: tissue specific effects in adipose cells and muscle. *J. Nutr.* 124(8): 1289S-1295S.
- Kang SG, Brown AL, Chung JH. (2007) Oxygen tension regulates the stability of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) through caspase-mediated cleavage. *J. Biol. Chem.* 282(9): 6090–6097.
- Kershaw EE, Flier JF. (2004) Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(6): 2548–2556.
- Kinnally KW, Antonsson B. (2007) A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis.* 12: 857–868.
- Kirchgesser M, Schlagenhauer R, Kirchner B, Adem Ch, Malmberg W, Tgetgel A, Huber I, Nieswandt V, Walter T. (2003) The new MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kits – Fast and flexible fully automated sample preparation. *Biochemica.* 4: 12-14.
- Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. (2005) Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes.* 54: S114-124.
- Křemen J, Dolinková M, Krajíčková J, Bláha J, Anderlová K, Lacinová Z, Haluzíková D, Bošanská L, Vokurka M, Svačina S, Haluzík M. (2006) 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(11): 4620-4627.
- Larson DF, Horak K. (2006) Macrophage migration inhibitory factor: controller of systemic inflammation. *Crit. Care.* 10(2): 138-140.
- Lei B, Tan X, Cai H, Xu Q, Guo Q.. (1994) Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. *Stroke.* 25(1): 147-152.
- Lin Q, Lee YJ, Yun Z. (2006) Differentiation arrest by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 281(41): 30678-30683.
- Longo VD, Ellerby LM, Bredesen DE, Valentine JS, Gralla EB. (1997) Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J. Cell. Biol.* 137(7): 1581–1588.



- Marohn MR, Marohn ML. (1994) Hypothermia - General concepts and consideration in the intensive care unit. *Problems in Anesthesia*. 8(1): 23-43.
- Maxwell PH. (2005) Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp. Physiol.* 90(6): 791-797.
- Mills GC. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229: 189-197.
- Moffatt P, Denizeau F. (1997) Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug. Metab. Rev.* 29: 261-307.
- Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW. (1997) Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- $\alpha$ , in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(12): 4196-4200.
- Mueckler M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219: 713-725.
- Murphy BJ, Kimura T, Sato BG, Shi Y, Andrews GK. (2008) Metallothionein Induction by Hypoxia Involves Cooperative Interactions between Metal-Responsive Transcription Factor-1 and Hypoxia-Inducible Transcription Factor-1A. *Mol. Cancer. Res.* 6(3): 483-490.
- Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Sawa H, Loh DY. (1994) Targeted disruption of Bcl-2a $\beta$  in mice: Occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91(9): 3700-3704.
- Pederson T, Rondinone CM. (2000) Regulation of proteins involved in insulin signaling pathways in differentiating human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276(1): 162-168.
- Pryhuber GS, O'Brien DP, Baggs R, Phipps R, Huyck H, Sanz I, Nahm MH. (2000) Ablation of tumor necrosis factor receptor type I (p55) alters oxygen-induced lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278(5): L1082-L1090.
- Pudimat PA, Lennon PF. (1994) Deliberate hypothermia. *Problems in anesthesia*. 8(1): 84-98.
- Qing M, Vazquez-Jimenez JF, Klosterhalfen B, Sigler M, Schumacher K, Duchateau J, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC. (2001) Influence of temperature during cardiopulmonary bypass on leukocyte activation, cytokine balance, and post-operative organ damage. *Shock*. 15(5): 372-377.
- Rajala MW, Scherer PE. (2003) The adipocyte—At the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*. 144(9): 3765-3773.
- Rondinone CM, Wang LM, Lonnroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U. (1997) Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(8): 4171-4175.



- Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. (2006) The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin. Endocrinol.* 64: 355–365.
- Saito T, Otsuka A, Kurashima A, Watanabe M, Aoki S, Harada A. (2001) Study of lymphocyte and NK cell activity during mild hypothermia therapy. *No Shinkei Geka.* 29(7): 633-639.
- Sakaue S, Nishihira J, Hirokawa J, Yoshimura H, Honda T, Aoki K, Tagami S, Kawakami Y. (1999) Regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression by glucose and insulin in adipocytes in vitro. *Mol. Med.* 5(6): 361-371.
- Sartipy P, Loskutoff DJ. (2003) Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *PNAS.* 12: 7265–7270.
- Sell H, Dietze-Schroeder D, Kaiser U, Eckel J. (2006) Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle. *Endocrinology.* 147(5): 2458-2467.
- Semenza GL. (2000) HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* 14: 1983-1991.
- Sessler DI. (2001) Complications and treatment of mild hypothermia. *Anesthesiology.* 95: 531–543.
- Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. (2001) Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J.* 15(12): 2099–2111.
- Sewter CP, Digby JE, Blows F, Prins J, O'Rahilly S.. (1999) Regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  release from human adipose tissue in vitro. *J. Endocrinol.* 163(1): 33-38.
- Skurk T, Herder C, Kräfft I, Müller-Scholze S, Hauner H, Kolb H. (2005) Production and release of macrophage migration inhibitory factor from human adipocytes. *Endocrinology.* 146(3): 1006-1011.
- Slavík J. (1998) Vedení mimotělního oběhu v normotermii a hypotermii. *Iga MZ ČR.*
- Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ. (2008) The human side of hypoxia-inducible factor. *Br. J. Haematol.* 141(3): 325-34.
- Solař M.. (2004) Léčebná hypotermie u nemocných po srdeční zástavě. *Interv. Akut. Kardiol.* 3: 192-195.
- Stratagene. (2004) Introduction to Quantitative PCR - Methods and Application Guide.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10(1): 45–65.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(12): 5510-5514.



- Wang B, Wood IS, Trayhurn P. (2007) Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers. Arch.* 455(3): 479-492.
- Wang B, Wood IS, Trayhurn P. (2008) PCR arrays identify metallothionein-3 as a highly hypoxia-inducible gene in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368(1): 88-93.
- Wood IS, Trayhurn P. (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.* 89(1): 3-9.
- Wood IS, Wang B, Lorente-Cebrián S, Trayhurn P. (2007) Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-d-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361: 468-473.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. (1998) IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 101(2): 311-320.
- You HJ, Lee KJ, Jeong HG. (2002) Overexpression of human metallothionein-III prevents hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human fibroblasts. *FEBS Lett.* 521(1-3): 175-179.
- Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. (2001) HIF-1 $\alpha$  binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(17): 9630-9635.
- Zachariassen KE. (1991) Hypothermia and cellular physiology. *Arctic. Med. Res.* 50;6: 13.
- Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. (1998) Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene.* 16: 2265-2282.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505): 425-432.