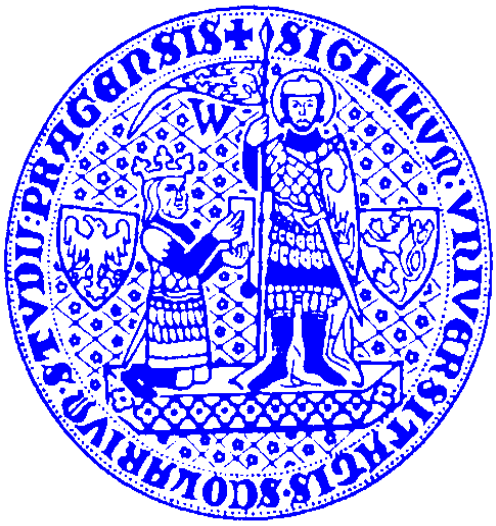


Cytokiny a adipocytokiny u chirurgických pacientů: role tukové tkáně

Cytokines and adipocytokines in surgically ill patients: the role of fat tissue

MUDr. Vladimír Teplan
Chirurgická klinika FNKV a 3. LF UK

Disertační práce
Praha, 2014

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: MUDr. Vladimír Teplan

Název disertační práce:

Cytokiny a adipocytokiny u chirurgických pacientů: role tukové tkáně

Cytokines and adipocytokines in surgically ill patients: the role of fat tissue

Studijní program: Biomedicína
Studijní obor: Experimentální chirurgie
Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.
Školitel: Prof. MUDr. Robert Gürlich, CSc.
Rok obhajoby: 2014

Klíčová slova: cytokiny, adipocytokiny, operace, tuková tkáň

Key words: cytokines, adipocytokines, surgery, fat tissue

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci vypracoval samostatně a použil výhradně uvedené citované parametry, literaturu a další odborné zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby má disertační práce byla používána ke studijním účelům.

Prohlašuji, že odevzdaná tištěná verze disertační práce a verze elektronická, nahraná do Studijního informačního systému SIS 3.LF UK, jsou totožné.

V Praze dne 11.3.2014 MUDr.Vladimír Teplan

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří svou pomocí přispěli ke vzniku předkládané disertační práce. Je to zejména školitel mého doktorandského studia Prof. MUDr. Robert Gürlich, CSc., přednosta Chirurgické kliniky FNKV a 3.LF UK, za cenné rady a odborné vedení. Dále je to Prof. MUDr. Michal Anděl, DrSc., děkan 3.LF, který vedl začátek mého studia PhD a podílel se na tématu a směřování práce.

Metabolickému oddělení Kliniky nefrologie IKEM, jmenovitě vrchní laborantce paní Mileně Štollové za pomoc při zpracování laboratorních vzorků, v napojení na grantový projekt a VZ IKEM, které bylo započato v době působení prof. Gürlicha v IKEM.

Výzkumné laboratoři Revmatologického ústavu VFN za stanovení visfatinu, především prof. MUDr. L. Šenoltovi, PhD a Ing. H. Hulejové.

Dále prof. MUDr. J. Rackovi, DrSc., přednostovi Ústavu biochemie a hematologie LF UK v Plzni za stanovení asymetrického dimetylargininu.

Prof. MUDr. V. Teplanovi, DrSc., zástupci přednosty KNTC IKEM za pomoc při metodice a hodnocení výsledků.

Své rodině za časový prostor a pochopení pro přípravu a dokončení předkládané práce.

OBSAH

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE **2**
PROHLÁŠENÍ. **3**
PODĚKOVÁNÍ **4**
OBSAH. **5**
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK. **7**
I. ÚVOD **9**
II. HYPOTÉZY A CÍLE **10**
III. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTACE **11**
IV. TUKOVÁ TKÁŇ **12**
V. CYTOKINY **12**
Vlastnosti cytokinů **13**
Receptory pro cytokiny. **14**
Klasifikace cytokinů. **16**
- Zánětlivé cytokiny **16**
- Hematopoetické cytokiny **17**
- Interferony **17**
- Lymfokiny **17**
- Monokiny **17**
- Chemokiny **17**
- Další cytokiny **18**
Terapeutické využití cytokinů **18**
- Systémová zánětlivá odpověď organismu **19**
- Hojení ran **19**
- Nádorové buňky **20**
- *Adoptivní imunoterapie* **21**
- Glomerulonefritida **21**
- Transplantace krvetvorných buněk **22**
Cytokiny v kontextu zánětlivé odpovědi **22**

Cytokinová síť **25**
Cytokiny a syntéza proteinů akutní fáze **26**
- CRP **27**
- ADMA **27**
VI. PUBLIKACE Č. 1 ..... **27**
VII. PUBLIKACE Č. 2 ..... **34**
VIII. PUBLIKACE Č. 3 ..... **50**
IX. PUBLIKACE Č. 4 ..... **54**
X. PUBLIKACE Č. 5 ..... **65**
XI. ZÁVĚR **70**
XII. SOUHRN **71**
XIII. SUMMARY **71**
XIV. LITERATURA **72**
XV. PŘÍLOHY **79**

Seznam použitých zkratek

ACTH - adrenokortikotropní hormon
ADH - antidiuretický hormon
ADMA - asymetrický dimetylarginin
APP - proteiny akutní fáze
APR - reakce akutní fáze
BMI - body mass index
DM - diabetes mellitus
CARS - syndrom kompenzatorní zánětlivé odpovědi (compensatory antiinflammatory response)
CD - povrchové molekuly leukocytů (cluster of differentation)
CRH - kortikotropin uvolňující hormon
CRP - C reaktivní protein
CSF - faktor stimulující kolonie
CyA - Cyklosporin A
DDAH - dimetylarginin dimetylaminohydroláza
EGF - epidermální růstový faktor
ELISA - enzymaticky vázaná imunoanalýza (enzyme-linked immunoassay)
EPO - erytropoetin
FGF - růstový faktor fibroblastů
GCP - granulocyty chemoatrahující protein
G-CSF - faktor stimulující kolonie granulocytů
GF - růstový faktor
GM-CSF - faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
HLA - hlavní histokompatibilní systém (human leukocyte antigen)
HPA osa - hypothalamo-pituito-adrenální osa
ICAM - molekula mezibuněčné adhese (intercellular adhesion molecule)
ICE - interleukin-1 konvertující enzym
IGF - růstový faktor podobný inzulinu (inzulin-like growth factor)
IFN - interferon
IL - interleukin
IL-1ra - receptorový antagonista interleukinu
LAK - zabíječské lymfocyty aktivované lymfokiny (lymphokine activated killers)
LIF - faktor inhibující leukemii
LIRS - syndrom lokální zánětlivé odpovědi (local inflammatory response syndrom)
MARS - syndrom smíšené antagonistické odpovědi
MCAF - chemotaktický a aktivační faktor makrofágů
M-CSF - faktor stimulující kolonie makrofágů
MHC - hlavní histokompatibilní komplex
MODS - syndom multiorgánové dysfunkce (multiorgan dysfunction syndrome)
MOF - multiorgánové selhání (multiorgane failure)
NAD - nikotinamid adenin dinukleotid
NGF - nervový růstový faktor
NK - přirození zabíječi (natural killers, subpopulace lymfocytů)
NO - oxid dusnatý
NOS - syntáza oxidu dusnatého
OSM - onkostatin M
PAF - faktor aktivující destičky

PAI - inhibitor aktivátoru plazminogenu
PBEF - faktor zvyšující kolonie pre-B buněk (pre-B cell colony-enhancing factor-visfatin)
PCT - prokalcitonin
PDGF - destičkový růstový faktor
PF - faktor destiček
PG - prostaglandin
PGE2 - prostaglandin E2
RNA - ribonukleová kyselina
SCF - faktor kmenových buněk (stem cell factor)
SDMA - symetrický dimetylarginin
SIRS - syndrom systémové zánětlivé odpovědi (systemic inflammatory response syndrome)
Tcr - T buněčný receptor (T-cell receptor)
TGF - transformující růstový faktor
TIL - lymfocyty infiltrující nádor (tumor infiltrating lymphocytes)
TNF - tumor nekrotizující faktor
TNFR - receptor TNF
TPO - trombopoetin
VEGF - vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

I. Úvod:

Předkládaná disertační práce má formu souhrnu pěti publikací, zabývajících se problematikou ***cytokinů a adipocytokinů u chirurgických pacientů a zejména vlivu tukové tkáně.*** Tématicky ji lze rozdělit na dvě části. První část popisuje cytokinovou odpověď organismu u operovaných pacientů po elektivním abdominálním výkonu a souvisí s ní první dvě publikace.

Druhá část se věnuje problematice pacientů po transplantaci ledviny se zaměřením na metabolické a nutriční důsledky a cytokinovou expresi.

Publikace č.1 popisuje zvýšenou prozánětlivou produkci u obézních pacientů s chronickou renální insuficiencí po elektivní laparoskopické cholecystektomii v porovnání dvou skupin rozdělených hodnotou BMI.

Publikace č.2 se věnuje novému proinflamačnímu markeru brzké zánětlivé odpovědi – visfatinu, u pacientů po resekci tlustého střeva pro adenokarcinom s ohledem na zastoupení tukové tkáně.

Publikace č.3 se věnuje zvýšené prozánětlivé expresi u obézních pacientů po transplantaci neovlivněnou předchozím typem dialýzy.

Publikace č.4 se zaměřuje na brzký pohybový režim po transplantaci ledviny a ovlivnění hladiny ADMA a cytokinové exprese.

Publikace č.5 popisuje nutriční důsledky transplantace ledviny a nebezpečí potransplantační obezity.

Disertační práce je výsledkem spolupráce těchto pracovišť:

- Chirurgické kliniky 3.LF UK a FNKV
- Kliniky nefrologie Transplantcentra IKEM
- Revmatologického ústavu 1.LF UK a VFN
- Ústavu biochemie a hematologie LF UK v Plzni

II. Hypotézy a cíle:

V posledních letech se objevily studie ukazující na významný vliv cytokinů a adipocytokinů na pooperační průběh u chirurgických pacientů. U obézních nemocných, v závislosti na přítomnosti viscerální tukové tkáně, byla pozorována větší zánětlivá odpověď s horší prognózou na pooperační hojení.

Cílem disertace bylo ukázat, zda a jak viscerální tuková tkáň ovlivňuje expresi proinflamačních cytokinů, zda lze tento stav časně diagnostikovat a event. léčebně ovlivnit. Modelem pro naši studii byl chirurgický pacient po elektivním abdominálním výkonu. Vzhledem k dlouhodobé spolupráci s Metabolickým oddělením Kliniky nefrologie IKEM jsme pooperační průběh sledovali i u pacientů po transplantaci ledviny, a to i s ohledem na možnost časné mobilizace a nutrice.

V českém písemnictví byly publikovány studie vztahující se k časné diagnostice a predikci výsledků pooperačního stresu u chirurgických nemocných (Gürlich R et al., Rozhledy v chirurgii 2000, Maruna P et al., Sborník lékařský 2002).
Tyty nálezy byly vztaženy i k vlivu obezity a visfatinu (Fukuhara A et al., Science 2005, Luis DA et al., Surgery for obesity and related disease 2011).

Bylo ukázáno, že prognózu nemocných a pooperační cytokinový stres významně ovlivňuje rozsah viscerální tukové tkáně – u obézních nemocných byl pooperační stres i exprimace cytokinů a adipocytokinů signifikantně větší. Z tohoto aspektu lze srovnávat i role nového adipocytokinu visfatinu, který by mohl být markerem časných prozánětlivých změn.
Zásadní roli hraje však poměr mezi pro- a proti-inflamačními cytokiny a není vždy rozhodující pouze vzestup jednotlivých parametrů.

III. Seznam publikací, které jsou podkladem disertace

Teplan V Jr, Vyhnánek F, Gürlich R, Haluzík M, Racek J, Vyhnánková I, Štollová M, Teplan V.
Increased proinflammatory cytokine production in adipose tissue of obese patients with chronic kidney disease.
Wien Klin Wochenschr. 2010 Aug;122(15-16):466-73**. IF 0.780/2010**

Teplan V Jr, Šenolt L, Hulejová H, Teplan V, Štollová M, Gürlich R.
Dynamics of serum visfatin level after abdominal surgery: a new pro-inflammatory marker in the early diagnosis?
Cas Lek Cesk. 2013;152(5):226-32.

Teplan V Jr, Šenolt L, Hulejová H, Teplan V, Štollová M, Gürlich R.
Early changes in serum visfatin after abdominal surgery: a new pro-inflammatory marker in diagnosis?
Biomedical Papers **IF 0.99/2014**
Rozšířená práce se zaměřením na visfatin, přijata k tisku. Přiložena v akceptované tiskové verzi

Teplan V, Malý J, Gürlich R, **Teplan V Jr**, Kudla M, Pit'ha J, Racek J, Haluzík M, Šenolt L, Štollová M.
Muscle and fat metabolism in obesity after kidney transplantation: no effect of peritoneal dialysis or hemodialysis.
J Ren Nutr. 2012 Jan;22(1):166-70 **IF 1.480/2012**

Teplan V, Mahrová A, Švagrová K, Racek J, Gürlich R, **Teplan V Jr**, Šenolt L, Štollová M.
Regular exercise training decreases asymmetric dimethylarginine after kidney transplantation
Vnitr Lek. 2012 Sep;58(9):640-6. Czech.

Teplan V, Valkovský I, **Teplan V Jr**, Štollová M, Vyhnánek F, Anděl M.
Nutritional consequences of renal transplantation.
J Ren Nutr. 2009 Jan;19(1):95-100. **IF 1.480/2009**

IV. Tuková tkáň

Tuková tkáň je složena z tukových buněk (zralých adipocytů) a z buněk stromatu zahrnujících makrofágy, lymfocyty, endotelové buňky a preadipocyty. Všechny tyto buňky mají velmi aktivní endokrinní (parakrinní i autokrinní) aktivitu a podílejí se na regulaci energetické homeostázy a na remodelaci tkání. Tvoří a secernují adipocytokiny jako jsou leptin, adiponektin, visfatin a cytokiny (TNFα, interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10, MPC-1). Dále pak enzymy (cytochrom P450, aromataza, triacylglycerolová lipáza, 17β-hydroxybutyrátdehydrogenaza typ l a 2, PAI-1, ACE, CETP, adipsin), pro-stacykliny (PGE), růstové faktory (VEGF, HGF), faktory komplementu (komplementový faktor 3b) a hormon angiotenziogen. Tyto faktory ovlivňují zánět a imunitu, působí na cévní endotel, spolupůsobí při regulaci chuti k jídlu, výdeji tělesné energie (termogeneze) a citlivosti na inzulín. Ovlivňují metabolizaci steroidních hormonů, růst a proliferaci buněk nebo podporují jejich přežívání.

Obezita je spojena se změnami v produkci adipocytokinů. Z tzv. klasických adipocytokinů, plazmatická koncentrace leptinu koreluje s BMI a dalšími indikátory tělesného složení. Naopak adiponectin je u obezity snížen.

Je tedy zřejmé, že se tuková tkáň může významně podílet na metabolické a imunitní odpovědi organismu na zátěž.

V. Cytokiny

Cytokiny jsou definovány jako sekreční regulační proteiny a glykoproteiny, které kontrolují přežívání, růst, diferenciaci a efektorové funkce somatických buněk. Jejich nejdůležitější funkcí je regulace imunitních dějů a zajištění homeostázy za normálních i patologických podmínek. Mezi cytokiny řadíme skupiny látek označovaných jako růstové faktory, kolonie stimulující faktory, interleukiny, lymfokiny, monokiny, chemokiny a interferony.

Pravděpodobně hlavní rys, odlišující cytokiny od hormonů, je skutečnost, že nejsou produkovány buňkami organizovanými ve speciálních endokrinních žlázách. Přesto není

hranice mezi oběma skupinami ostrá a některé cytokiny mají mnoho charakteristických rysů hormonů a naopak.

Vlastnosti cytokinů

Cytokiny nacházíme především extracelulárně, kde reakcí s příslušným receptorem na cílových buňkách přenášejí informaci o stavu organismu a vyvolávají příslušnou biologickou odpověď. Buňka produkující cytokiny přitom slouží jako jakýsi biologický senzor, který prostřednictvím cytokinu přenáší informaci na receptor citlivých buněk, vlastních efektorů biologické odpovědi. Senzorem může být kyslíkový senzor regulující produkci erytrocytů, senzory pro mikrobiální produkty, jejichž přítomnost indukuje dělení, funkci a chemotaxi leukocytů, senzory probíhající imunitní reakce, senzory produktů vzniklých poškozením nervových nebo epiteliálních buněk. Většina cytokinů je secernována klasickými sekrečními dráhami. Některé cytokiny se vyskytují také vázané na membránu buněk, jimiž jsou produkovány a vyžadují tak přímý buněčný kontakt (SCF). Další cytokiny nacházíme navázány na extracelulární matrix. Až na výjimky (TNF-α a PDGF v destičkách) nejsou cytokiny shromažďovány v zásobě v buňkách, ale jejich produkce bývá transientní v aktivovaných buňkách a je regulována na úrovni genové exprese podle okamžité potřeby organismu nebo tkáně. Některé cytokiny vykazují také konstitutivní expresi. Konstitutivní produkce těchto cytokinů udržuje rovnovážný stav obnovujících se tkání, v případě nervového či krvetvorného systému je vyžadována pro zajištění funkce a přežití buněk. Téměř všechny cytokiny mají mnoho různých účinků (pleiotropní účinky) a biologické aktivity mnoha cytokinů se do značné míry překrývají. Extrémním příkladem jsou LIF a TGF-β, které působí na téměř všechny somatické buňky, a to často s odlišným účinkem, ale i u některých vysoce specializovaných cytokinů bylo nalezeno širší spektrum účinků. Na druhé straně se zdá, že je jen málo účinků, jež jsou zprostředkovány pouze jedním cytokinem a že většina jich je shodně vyvolána několika různými cytokiny (redundance). Řada pokusů na „knock-out“ myších s vyřazeným genem pro určitý cytokin ukazuje, že jen minimum cytokinů je absolutně nezbytných pro přežití nebo pro správnou funkci efektorových buněk. Toto zjištění nevypovídá o zbytečnosti jednotlivých cytokinů, ale spíše o tom, že jejich funkce může být nahrazena jinou molekulou s podobnými účinky. Mnoho cytokinů vykazuje stimulační nebo inhibiční účinky, které mohou působit synergicky nebo antagonisticky s dalšími faktory. O

vzájemně provázaném účinku různých cytokinů v organismu, který zajišťuje i průběh velmi složitých procesů, mluvíme jako o cytokinové regulační síti (cytokine regulatory network). Význačným rysem cytokinů je jejich účinek v extrémně nízkých koncentracích (10^{9} –10^{12} M). Určitý cytokin může vyvolat v některých případech opačný účinek. Záleží na typu cílových buněk, na obklopujícím mikroprostředí, na koncentraci cytokinu a době jeho působení, na stavu buňky (v klidové/růstové fázi) a na přítomnosti dalších cytokinů, dokonce na časové sekvenci, v jaké buňka s jednotlivými cytokiny reagovala. Zatímco primární struktura různých cytokinů bývá obvykle velmi odlišná, jednotlivé cytokiny bývají v průběhu fylogeneze značně konzervovány (až z 90 i více procent). Mnoho cytokinů vykazuje zkříženou reaktivitu u řady savčích druhů (člověk-myš-krysa-prase apod.). Přesto jsou některé cytokiny druhově specifické. Většina cytokinů jsou glykoproteiny. Význam glykosylace pro stabilitu i aktivitu byl prokázán experimentálně i v klinických testech (G-CSF).

Receptory pro cytokiny

Biologické účinky cytokinů jsou zprostředkované vazbou na specifický membránový receptor. Variabilita v sekvenci a prostorovém uspořádání receptorů je nižší, než v případě vlastních cytokinů. Receptory jsou transmembránové proteiny nebo proteinové komplexy, jejichž extracelulární části jsou obvykle multidoménové proteiny, které se skládají z tzv. modulů. Podle přítomnosti určitých domén jsou receptory tříděny do skupin. Řada receptorů je členy tzv. rodin receptorů (receptor superfamilies). Mnoho receptorů se skládá z několika subjednotek, jež váží ligand, ale také zprostředkovávají přenos signálu do buňky. Stejné receptorové subjednotky bývají někdy součástí různých receptorů pro odlišné cytokiny. Některé receptory mají afinitu k více než jednomu cytokinu. Odlišná kombinace subjednotek může zvyšovat afinitu receptoru k jeho ligandu. Mnoho cytokinů využívá receptorů z tzv. rodiny receptorů pro cytokiny typu 2 (cytokine receptor family type 2). Tyto receptory jsou dimery tvořené 2 podjednotkami: α specifické pro daný cytokin, a β(γ) - nespecifické, ale zajišťující přenos signálu do buňky.

Některé receptory bývají odštěpeny z membrány a cirkulují v plazmě. V tomto případě slouží k vyvázání volného cytokinu a tím inhibují jeho možné účinky. Většina receptorů pro cytokiny na membráně předá buňce po navázání ligandu signál prostřednictvím tyrozinkinázové aktivity cytoplazmatické části (domény) receptoru. Poté často bývají receptor

i s navázaným cytokinem internalizovány a degradovány. Tento proces souvisí s regulací počtu receptorů na buňce (down-regulation). Počet a zastoupení (složení - receptory s vysokou/nízkou afinitou) jsou jedním ze zásadních parametrů určujících citlivost buňky k danému faktoru. Bylo pozorováno, že některé cytokiny (bFGF, EGF, NGF a PDGF) vytváří se svými receptory komplexy, které jsou velmi rychle internalizovány a bez degradace translokovány do buněčného jádra. Účinek těchto faktorů je zprostředkován přímou reakcí s intracelulárním receptorem nebo přímo s DNA.

V případě, že odpovídající receptory jsou exprimovány na buňce, která daný cytokin produkuje, mluvíme o *autokrinní* stimulaci. Speciálním případem autokrinní kontroly je tzv. *intrakrinní* stimulace. V tomto případě nepotřebují být cytokiny uvolněny cestou endoplazmatické retikulum/Golgiho aparát ven z buňky, ale mohou se vázat na receptor přítomný přímo v cytoplazmě nebo v buněčném jádru. Tento případ byl popsán u bFGF, ale působí zřejmě i u dalších faktorů, které pro svůj účinek potřebují internalizaci.

Pokud buňka secernující cytokin ovlivňuje buňky, s nimiž je v přímém kontaktu, jde o *juxtakrinní* stimulaci. Tento způsob regulace využívá cytokiny vázané na membráně produkující buňky, které musí přímo reagovat s receptory sousedních citlivých buněk. Většina z takto působících cytokinů je v organismu přítomna jak v membránově vázané, tak v solubilní formě (EGF, M-CSF, SCF, TGF-α a další). Na odlišnosti obou forem se podílí především postranskripční úpravy (alternativní sestřih). Další příklad juxtakrinní regulace jsou faktory vázané na extracelulární matrix (IL-3, IFN-γ, LIF). Vazba ligandu na receptor vyvolává odpovídající buněčnou reakci, ale také může mít svůj význam pro adhezi buněk. Juxtakrinní regulace byla nejlépe popsána při interakci krvetvorných buněk se stromatem kostní dřeně. *Parakrinní* stimulace je působení prostřednictvím solubilního faktoru na okolní buňky exprimující příslušný receptor. Jde o lokální regulaci, kterou odlišujeme od endokrinních účinků hormonů přenášených do cílové tkáně cirkulací. Přesto některé cytokiny mohou působit i endokrinní cestou - např. erytropoetin, který je produkován v ledvině a reguluje tvorbu erytrocytů v kostní dřeni.

Klasifikace cytokinů

V současné době je popsána struktura více než 150 cytokinů a růstových faktorů a každým rokem přibývají nové objevy. Předpokládá se, že skutečný počet faktorů mezibuněčné komunikace bude několikanásobně vyšší.

Klasifikace cytokinů není dosud zcela jednotná. Jejich výzkum probíhal v několika proudech, proto mnohokrát došlo k tomu, že jedna látka byla popsána a nezávisle označena různými jmény. Jedny z první cytokinů byly objeveny počátkem 60. let a nazvány růstovými faktory (nervový růstový faktor - NGF a epidermální růstový faktor - EGF). Po zavedení in vitro testů na přítomnost krvetvorných buněk (koncem šedesátých let) byla popsána skupina látek, které podporovaly růst kolonií krvetvorných buněk - CSF neboli kolonie stimulující faktory. Termín lymfokin byl zaveden r. 1969 pro solubilní mediátory produkované lymfocyty. Po objevu, že i monocyty vytvářejí podobné látky, byly tyto nazvány analogicky monokiny. Interferon byl nejdříve popsán jako protein interferující s virovou infekcí buňky, odtud je i jeho název. Od r. 1979 je používáno označení interleukin spolu s pořadovým názvem. Interleukiny jsou látky sloužící pro komunikaci mezi leukocyty. Termín cytokiny byl poprvé použit v r. 1974. Tento název je zřejmě nejobecnější a neomezuje se pouze na imunitní a krvetvorný systém.

Nejčastější dělení cytokinů bývá podle jejich nejvýznamnějšího zdroje nebo podle základní funkce. Toto rozdělení je třeba chápat poměrně volně, protože většina cytokinů je produkována řadou buněčných typů a také funkce daného faktoru mohou zasahovat do více skupin. Mezi hlavní skupiny cytokinů patří:

a) Zánětlivé cytokiny. Regulují rozvoj zánětlivé reakce a působí jako endogenní pyrogeny. Hlavní zástupci: TNF-α, β (tumor necrosis factor): reguluje expresi dalších cytokinů, receptorů, proteinů akutní fáze. Podílí se v boji proti infekci a na eliminaci nádorových buněk, IL-1α, β (interleukin-1): zvyšuje expresi dalších cytokinů, adhezních molekul a prokoagulační aktivitu endoteliálních buněk, stimuluje T- lymfocyty, podílí se na procesu hojení stimulací růstu fibroblastů a angiopoetickými účinky, působí radioprotektivně, IL-6: indukován zvýšenou hladinou IL-1 a TNF-α, synergizuje s nimi ve stimulaci lymfocytů a proteinů akutní fáze, ko-stimuluje krvetvorbu.

b**) Hematopoetické růstové faktory**. Řídí přežívání, dělení, diferenciaci a maturaci krvetvorných buněk. In vitro podporují tvorbu kolonií krvinek z progenitorových buněk. Hlavní zástupci: SCF (stem cell factor): stimuluje proliferaci časných kmenových buněk, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor): působí na zralejší progenitorové buňky, stimuluje tvorbu granulocytů a makrofágů, G-CSF: stimuluje tvorbu granulocytů, M-CSF: stimuluje tvorbu makrofágů, IL-5: stimuluje tvorbu eozinofilů,
EPO (erytropoetin): reguluje produkci erytrocytů, TPO (trombopoetin): stimuluje trombopoezu. G-CSF, GM-CSF a EPO jsou komerčně dostupné a terapeuticky využívané.
Nově je sem zařazován i pre-B cell colony enhancing factor (PBEF) zvaný visfatin.

c) Interferony. Původně pojmenovány podle schopnosti inhibovat virovou replikaci u neinfikovaných buněk. Vedle toho zvyšují expresi MHC I a MHC II antigenů na buňkách, aktivují makrofágy a cytotoxické T-lymfocyty. IFN-γ navíc inhibuje dělení endoteliálních buněk, ale zvyšuje na nich expresi adhezních molekul. Hlavní zástupci: IFN-α, β, γ.

d) Lymfokiny. Produkovány především lymfocyty. Primárně regulují imunitní odpověď prostřednictvím lymfocytů a granulocytů. Hlavní zástupci: IL-2: stimuluje proliferaci a diferenciaci T-lymfocytů, IL-4: indukuje diferenciaci CD4+ T-lymfocytů na Th2 buňky, diferenciační faktor pro B-lymfocyty, IL-9: stimuluje T a B-lymfocyty a mastocyty, IL-10: inhibuje tvorbu dalších cytokinů, IL-14: indukuje proliferaci B-buněk OSM (Onkostatin M): inhibuje proliferaci některých nádorových buněk, stimuluje růst fibroblastů. Lymphotoxin (TNF-β): široké spektrum účinků na expresi cytokinů, receptorů, proteinů akutní fáze, důležitý v obraně proti infekci a nádorovému růstu, ve vývoji lymfatických uzlin. IL-2 je komerčně dostupný a terapeuticky využívaný.

e) Monokiny. Produkovány především makrofágy. Účastní se regulace imunitní odpovědi, hojení ran. Hlavní zástupci: IL-1, TNF: viz výše IL-12: indukuje diferenciaci CD4+ T-lymfocytů na Th1 buňky, stimuluje T-lymfocyty, NK A LAK buňky IL-15: podobné účinky jako IL-2 TGF-α: stimuluje proliferaci fibroblastů, angiogenezi.

f) Chemokiny. Skupina malých (8-10 kDa) strukturálně podobných (20-50% homologie) prozánětlivých cytokinů, primárně působících chemotakticky a aktivačně na specifické typy leukocytů. Ovlivňují krvetvorbu, proces hojení i angiogeneze. Mohou se vázat na proteiny

extracelulární matrix, kde zajišťují gradient potřebný pro aktivaci leukocytů, diapedezu a migraci do tkání.

g) Další cytokiny. TGF-beta: ovlivňuje proliferaci a diferenciaci širokého spektra buněk - pozitivně i negativně. Zvyšuje syntézu proteinů extracelulární matrix, adhezních molekul (integrinů), má roli v hojení ran, chemotaxi, reguluje produkci dalších cytokinů, inhibuje proliferaci a aktivitu T a B-lymfocytů, i některé funkce monocytů. Jako jeden z mála cytokinů není zcela nahraditelný: knock-out myši s vyřazeným genem pro TGF-beta umírají do 3-4 týdnů po narození. IL-7: stimuluje proliferaci T a B- lymfocytů, LIF (leukemia inhibitory factor): indukuje syntézu proteinů akutní fáze, reguluje diferenciaci a proliferaci krvetvorných buněk, indukuje diferenciaci některých leukemických buněk, PDGF (platelet derived growth factor): mitogen pro fibroblasty, hladkosvalové, epiteliální a endoteliální buňky, chemotaktický faktor.

Výše uvedená klasifikace zahrnuje některé nejdůležitější cytokiny podílející se na regulaci imunitní odpovědi a krvetvorby (avšak nejen na ní). Vedle toho existuje mnoho dalších cytokinů ovlivňujících onkogenetické změny, obnovu tkání (morfogeneze kostí, angiogeneze, epitelizaci, hojení ran), nervový systém a další.

Terapeutické využití cytokinů

Popsané specifické účinky jednotlivých cytokinů vedly k myšlence na jejich terapeutické využití, především v léčbě poruch krvetvorby a v terapii nádorů, ale také při celkové stimulaci imunitního systému. Ačkoliv některé cytokiny jsou již pro klinické použití schváleny, je třeba si uvědomit, že naše znalosti o vzájemném působení cytokinů jsou dosud omezené a že in vivo modulace aktivity jednoho faktoru vždy nemusí vést k požadovanému efektu.

Léčba cytokiny není léčba substituční, nevychází tedy z předpokladu nedostatečné endogenní produkce příslušného faktoru. Aplikace vysokých, nefyziologických dávek cytokinu má docílit léčebného účinku – antiproliferačního (interferony, TNF), imunostimulačího (IL-2) nebo hemopoetického (erytropoetin). Vzhledem k chemické struktuře cytokinů (nejčastěji se jedná o glykoproteiny) je k dosažení systémového efektu

nutná parenterální aplikace. Pleiotropní charakter většiny pro i protizánětlivých cytokinů se projevuje vedle očekávaného efektu také spektrem dalších nežádoucích projevů. Vysoká toxicita je tak hlavním limitujícím faktorem léčby.

Technikou v současné době využívanou k získání cytokinů je technika rekombinantní. Metoda spočívá v izolaci sekvence DNA obsahující gen pro příslušný cytokin, akceptorem genu je pak nejčastěji bakterie (E.colli), která začne produkovat lidský cytokin. Po izolaci a purifikaci je pak k dispozici polypetpid s vlastnostmi identickými původnímu cytokinu.

Některé konkrétní terapeutické přístupy:

I. Systémová zánětlivá odpověď organismu - dochází k masivní produkci prozánětlivých cytokinů, především IL-1, IL-6 a TNF-α. IL-1 je multifunkční stimulační faktor pro lymfocyty, indukuje produkci chemokinů (chemotaxe), způsobuje tachykardii a hypotenzi a spolu s IFN-γ zvyšuje účinek TNF-α. TNF-α působí především na endoteliální buňky a zvyšuje jejich prokoagulační aktivitu. Aktivované endoteliální buňky navíc exprimují adhezní molekuly usnadňující vazbu leukocytů na endotelie. Akumulace leukocytů dále přispívá ke tkáňovému poškození.

- podání antagonisty IL-1 receptoru (IL-1Ra), přirozeného cytokinu s afinitou k receptoru pro IL-1, ale nezpůsobujícího přenos signálu do buňky, kompetuje o receptor s IL-1. Nevýhoda - krátký biologický poločas IL-1Ra, je snaha vytvořit umělý stabilní IL-1Ra
- podání protilátek proti TNF-α
- IL-4 snižuje produkci IL-1 a TNF-α makrofágy, jeho podání by mělo smysl v časné fázi
- IL-10 snižuje produkci řady (i zánětlivých) cytokinů a zvyšuje expresi IL-1Ra

II. Hojení ran je komplexní a dlouhodobý proces tkáňové reparace a přestavby zahrnující mnoho různých buněčných typů. Zahrnuje migraci buněk do oblasti poškození, růstovou stimulaci epiteliálních buněk a fibroblastů, novotvorbu cév a extracelulární matrix. Celého procesu se účastní řada cytokinů: chemokiny, EGF (epithelial growth factor), aFGF(fibroblast growth factor), bFGF, IGF, PDGF, TGF, VEGF a další. V první fázi dochází ke srážení krve, fibrinová síť slouží k fixaci buněk a plazmatických proteinů, dochází k infiltraci neutrofilů a makrofágů, k degranulaci destiček a uvolnění růstových faktorů TGF-β, PDGF, bFGF a řady dalších. Protein C inaktivuje koagulační faktory 5 a 7 a uvolňuje aktivátor plazminogenu, což vede k rozpouštění trombu. Hladkosvalové buňky uvolňují prostaglandiny, které inhibují

agregaci destiček a syntézu PDGF. Imunokompetentní buňky dále migrují do oblasti poškození, makrofágy uvolňují spektrum cytokinů, z nichž TGF-β je nejdůležitější pro tvorbu granulační tkáně a proteinů extracelulární matrix. Angiogenní faktory zajišťují tvorbu nových cév. Reepitelizace je řízena faktory ze skupiny EGF. Finální fáze hojení je charakteristická postupnou náhradou granulační tkáně tkání pojivovou za lokálního působení cytokinů (TGF-β a dalších).

• lokální podání cytokinů (bFGF, EGF, PDGF, TGF-β a dalších) značně urychluje proces hojení, umožňuje i úplné zhojení ran, jež nereagovaly na konvenční léčbu

III. Nádorové buňky mohou stimulovat svůj růst např. autokrinní cestou. Stávají se tak nezávislými na exogenní kontrole buněčného dělení. Mohou vytvářet celou řadu cytokinů (např. IL-3, EGF, PDGF a další). Příklad dalšího mechanismu, kterým nádorové buňky využívají cytokinů, jsou buňky glioblastomu, sekretující TGF-β, který inhibuje aktivaci T-lymfocytů v odpovědi na antigenní stimulaci, a tím znemožňují detekci nádorových antigenů. Pro kontrolu buněčného dělení nádorových buněk se (většinou zatím experimentálně) užívají následující kroky:

• snížení plazmatické koncentrace růstových faktorů produkovaných nádorem podáním protilátek proti danému faktoru

• opačně mohou být klidové (kmenové) nádorové buňky stimulovány růstovým faktorem k dělení, aby se staly citlivějšími pro následnou chemo/radioterapii (např. stimulace buněk karcinomu prsu estrogeny před chemoterapií)

• blokování receptorů pro růstový faktor pomocí protilátek

• podání tzv. „antisense“ oligonukleotidů, které se v buněčném jádru váží na DNA v místě genu a blokují expresi cytokinu na transkripční úrovni

• vložení genu pro některý z faktorů stimulující lymfocyty do nádorových buněk (IL-2, IL-4, IL-7 apod.) do buněk izolovaných ze slabě imunogenního nádoru, následná imunizace těmito buňkami vede k expanzi lymfocytů rozeznávajících primární nádor a k efektivnější imunitní odpovědi

• v případě glioblastomu izolace nádorových buněk, genetická modifikace vyvolávající tvorbu TGF-β antisense RNA, imunizace těmito nádorovými buňkami jako v předchozím případu

• izolace TIL (tumor infiltrujících lymfocytů) z nádorového ložiska, jejichž pomnožení in vitro (s přidáním IL-2), ev. vpravení genu pro TNF-α, vede po zpětné implantaci k efektivní eliminaci nádorových buněk

Adoptivní imunoterapie je terapie, při níž imunokompetentní buňky jsou aplikovány nádorovým pacientům, u nichž vykazují protinádorový efekt.

• nádorovým pacientům je po několik dnů podáván IL-2. Leukoferesou se získají leukocyty, které se kultivují in vitro za přítomnosti vysokých koncentrací IL-2. Tento postup vede k expanzi subpopulace lymfocytů označovaných jako LAK (lymphokine activated killer). Jedná se vlastně o aktivované NK buňky s vysokou lytickou aktivitou proti nádorovým buňkám. Tento postup je užíván při léčbě melanomu, renálního karcinomu, k eliminaci minimální reziduální nemoci po transplantaci kostní dřeně a v dalších případech. Jde o účinnou terapii, avšak s mnoha vedlejšími účinky, která se obvykle provádí na JIP. Jako zdroj lymfocytů pro aktivaci bývají někdy užívány TIL (tumor infiltrating lymphocytes) izolované přímo z nádorového ložiska.

IV. Glomerulonefritida - její etiologie (s výjimkou infekčních) je dosud neznámá. Poškození je iniciováno inadekvátní imunitní odpovědí (humorální i buněčnou) proti exogenním nebo nativním antigenům v glomerulu. Výsledkem je poškození glomerulu protilátkami, komplementem, adherujícími leukocyty i destičkami. Glomerulus reaguje na poškození buněčnou proliferací a hypertrofií, fenotypickými změnami a expanzí matrix, což může vést jak k reparaci (hojení), tak k ireverzibilní sklerotizaci (jizvě). Lokální poškození je zprostředkováno aktivovanými monocyty, secernujícími IL-1β a TNF-α. Tyto cytokiny stimulují tvorbu dalších prozánětlivých cytokinů, chemotaktických a adhezivních molekul, což vede k adhezi a aktivaci neutrofilů a destiček a k poškození glomerulárních buněk a bazální membrány.

• podání IFN-α u pacientů infikovaných virem hepatitidy C vede ke snížení proteinurie, pravděpodobně potlačením virémie

• inhibice imunitní odpovědi - blokování IL-2r, Tcr, podání protilátek proti CD40 ligandu (cytokin - homolog TNF-α - zprostředkuje kooperaci T a B-lymfocytů)

• inhibice IL-1 a TNF-α: a) IL-1ra, b) podání lisophyllinu, který blokuje intracelulární signální dráhy IL-1β a TNF-α, c) podání cytokinů interferujících s produkcí IL-1β a TNF- α: IL-4, IL-6, IL-10, d) inhibice chemotaktických faktorů PAF, leukotrienu B4, IL-8, e) inhibice adhezivních faktorů (E a P selektinů)

• modifikace reparační fáze: a) snížení expanze matrix pomocí protilátek proti růstovým faktorům PDGF a bFGF, které stimulují proliferaci mesangiálních buněk spojenou
s tvorbou aktinu a kolagenu, b) stimulace de novo angiogeneze pomocí VEGF (vascular endothelial growth factor)

V. Transplantace krvetvorných buněk.

• mobilizace krvetvorných progenitorů pro autologní transplantace, klinické využití GM- CSF a G-CSF samotných nebo v kombinaci s vysokou dávkou cyklofosfamidu

• podpůrná léčba při neutropenii (G-CSF a GM-CSF) a trombocytopenii (TPO) po transplantaci krvetvorných buněk

• inhibice dělení krvetvorných kmenových buněk při in vitro odstraňování leukemických buněk (purging) - MIP-1α

Cytokiny v kontextu zánětlivé odpovědi

Po narušení integrity vnitřního prostředí organismu, v těsném sledu za lokálními, integritu zachraňujícími ději (hemokoagulace, reakce endotelu) následuje aktivace imunitního systému s produkcí sekrečních peptidů a proteinů. Hlavní úlohou těchto mediátorů je usměrnění funkce a proliferace buněk a tkání v průběhu lokální nebo systémové zánětlivé odpovědi. Tyto mediátory – cytokiny působí v koordinaci s klasickými hormony a jaterními proteiny akutní fáze jako signální síť regulující chování řady buněk imunitního, hemopoetického, endokrinního, kardiovaskulárního a dalších systémů.

Monitorace prozánětlivých cytokinů může zásadním způsobem ovlivnit osud nemocných v časné diagnostice pooperační nitrobřišní sepse. Dle dynamiky změn cytokinů můžeme sledovat rovnováhu mezi prozánětlivými cytokiny a dalšími regulačními mechanismy rozhodujícími o vzniku a rozvoji zánětlivého procesu, zvláště pak u rizikových nemocných. Z tohoto aspektu je přínosná studie věnující se adipocytokinu leptinu, který se jeví v perioperačním údobí jako velmi časný marker pooperačního stresu.

Reakce akutní fáze **(APR)** představuje uniformní adaptační odpověď na narušení integrity organismu. Jde o souhrn změn iniciovaných humorálními faktory, především prozánětlivými cytokiny a hypothalamo-pituito-adrenální (HPA) osou. Syndrom reakce akutní fáze zahrnuje děje imunitní povahy, změny ve sféře endokrinní a metabolické, syntézu proteinů akutní fáze (APP) v jaterních buňkách, změny vodní a elektrolytové rovnováhy,

pyretickou reakci a další. Reakce akutní fáze je časově i rozsahem limitovaná. Hlavní význam reakce akutní fáze je možno shrnout do následujících bodů:

-udržení vodní, elektrolytové a teplotní homeostázy

-protiinfekční děje

-vnímání bolesti

-odstranění ireverzibilně poškozené tkáně

-dostatečná nabídka energie

-nabídka stavebního materiálu (zejména aminokyselin) pro tvorbu protilátek, enzymů, hormonů pro reparační a regenerační děje

Na inzult lokální povahy (pohmoždění, ohraničená kožní infekce) reaguje organismus obrannou lokální zánětlivou odpovědí **(LIRS)** vedoucí k rychlé reparaci a regeneraci tkáně.
Na inzult systémové povahy (generalizovaná infekce, ozáření, těžká akutní pankreatitida) organismus fyziologicky odpovídá celotělovou (systémovou) zánětlivou odpovědí. Systémová zánětlivá odpověď **(SIRS)** je opět odpovědí obrannou, ale v řadě případů nabývá autoagresivního obrazu charakterizovaného komplexní alterací homeostázy. Hranice, kde začíná autoagrese, tj. rozmezí mezi fyziologickou, intenzivní, ale regulovanou odpovědí na silnější podnět a patologickou dysregulovanou reakcí, je široká a klinickými parametry obtížně definovatelná.

SIRS (Systemic inflammatory response syndrom) je systémová odezva na infekční a neinfekční inzulty, která se projevuje přítomností dvou a více následujících symptomů:

-teplota ≥38°C nebo ≤36°C

-tepová frekvence ≥90/min

-dechová frekvence ≥20/min, nebo PaCO2 ≤32mmHg (4.25kPa)

-počet leukocytů ≥12 000/mm^3, nebo ≤4 000/mm^3, nebo ≥10% nematurovaných forem (tyčí)

SIRS představuje obrannou odpověď organismu se snahou lokalizovat a eliminovat exogenní nebo endogenní patogen infekčního nebo neinfekčního původu. Je tedy intenzivnější odpovědí než reakce akutní fáze (APR). Je komplexním narušením homeostázy a destruktivním postižením organismu vlastní obrannou odpovědí. Jako **sepse** je označován SIRS s dokumentovanou infekcí, těžká sepse je SIRS s alterací kardiovaskulárního systému.
SIRS může vyústit ve stav multiorgánové dysfunkce **(MODS)** -situaci, kdy orgánové funkce nejsou dostačující pro udržení homeostázy. MODS je systémovou hemodynamickou poruchou vedoucí k hypoperfuzi orgánů, tkáňové hypoxii, event. ke smrti organismu. Porucha

hemodynamiky při MODS v důsledku těžké sepse má charakter kapacitní nerovnováhy (vazodilatace, hypovolémie), na tkáňové úrovni vzniká nerovnováha bilance dodávky a spotřeby kyslíku. Změny původně kompenzačního charakteru přechází v reverzibilní, posléze ireverzibilní dekompenzaci s letálním vyústěním. V rozvinutých fázích se jedná o uniformní sled změn mikrocirkulace a makrocirkulace, metabolismu, neuroendokrinního systému atd.

Intenzita a průběh systémové zánětlivé odpovědi je dána rovnováhou prozánětlivých a protizánětlivých faktorů na lokální i systémové úrovni. Vedle cytokinů s převážně prozánětlivým působením, uplatňujících se v počáteční fázi obranné odpovědi, zasahuje do probíhajících dějů kontraregulační aktivita, označovaná jako syndrom kompenzační protizánětlivé odpovědi (CARS). **CARS (compensatory antiinflammatory response syndrome)** je indukován SIRS a probíhá současně s ním. Představuje součást mechanismu negativních zpětných vazeb cytokinové a endokrinní sítě, limituje rozsah a trvání systémové zánětlivé odpovědi. Poměr mezi SIRS a CARS, tedy mezi prozánětlivými a protizánětlivými faktory určuje rovnováhu mezi obrannou zánětlivou odpovědí a mírou imunosuprese.
Tato kompenzační odpověď zahrnuje:
1.aktivaci hypothalamo-pituito-adrenální osy s hyperprodukcí kortikoidů.Glukokortikoidy vystupují ve většině zánětlivých dějů jako antagonisté prozánětlivých cytokinů, inhibují tvorbu těchto faktorů a kontraregulují jimi aktivované buněčné procesy. Kortikoidy jsou ale současně nezbytné pro adekvátní sekreci jaterních proteinů akutní fáze, stimulovanou cytokiny.
2.cytokiny s protizánětlivým působením (IL-4, IL-10, IL-13)
3.afunkční cytokiny s kompetitivně antagonistickým působením na cílovém membránovém receptoru
4.solubilní receptory vyvazující cirkulující cytokiny před navázáním na membránový receptor
5.kompetici cytokinů na úrovni společných receptorových jednotek
6.down regulaci membránových buněčných receptorů
7.inhibitory zánětu mimo cytokinovou kaskádu (PGE2)
Nedostatečnost CARS odpovědi nebo neadekvátní převaha SIRS vede k oběhové a orgánové alteraci a multiorgánovému selhání. Naopak převaha CARS (podávání kortikoidů) může omezením aktivity T a B lymfocytů a makrofágových funkcí navodit imunosupresi.

Nově je do akutní medicíny zaváděn pojem syndromu smíšené antagonistické odpovědi – **MARS** (mixed antogonist response syndrome). Vyjadřuje kombinovanou prozánětlivou (SIRS) a protizánětlivou (CARS) systémovou obrannou reakci. Klinickým vyústěním interakce antagonistických mechanismů obranné odpovědi může být eliminace vyvolávající noxy, udržení homeostázy a uzdravení organismu. Nebo naopak narušení homeostázy s kardiovaskulárním selháním (septickým šokem), orgánovou dysfunkcí nebo imunosupresí. Pojem MARS tedy vyjadřuje aktuální rovnováhu (či nerovnováhu) reakcí a její patologické důsledky. Výsledkem MARS je jedna nebo více složek obrazu **CHAOS.**

•**C** Kardiovaskulární selhání (dominuje SIRS)
•**H** Homeostáza (rovnováha CARS a SIRS)
•**A** Apoptóza (dominuje SIRS)
•**O** Orgánová dysfunkce (dominuje SIRS)
•**S** Suprese imunitního systému (dominuje CARS)

Cytokinová síť

Cytokinová síť představuje souhrn vazeb, zajišťujících interakci buněk imunitního systému navzájem a s ostatními systémy jak za fyziologických podmínek, tak i v průběhu systémové zánětlivé reakce.
Akceschopnost odpovědi a stabilita sítě je závislá na systému pozitivních a negativních zpětných vazeb a na interakci s proteiny akutní fáze a hormonálními osami.
Cytokinová síť zahrnuje:
-cytokiny a lokálně uvolňované hormony (vazopresin, CRH)
-membránově vázané mediátory charakteru cytokinů (adhesivní molekuly)
-buněčné receptory cytokinů, solubilní inkompletní receptory a antagonisty inaktivující cirkulující cytokiny
-některé proteiny akutní fáze vázající cytokiny v cirkulaci nebo vykazující některé vlastnosti cytokinů (CRP)

Cytokiny a syntéza proteinů akutní fáze

Aktivace cytokinové kaskády se odráží i ve změně jaterní proteosyntézy. Hepatální odpověď je charakterizovaná kvantitativními i kvalitativními změnami v proteosyntéze. Dochází ke zvýšení celkové syntézy proteinů, která však nestačí k vyrovnání negativní dusíkové bilance. Z pohledu kvalitativního nastává koordinovaný vzestup exprese několika pro obranu organismu nezbytných plasmatických proteinů při současném poklesu proteinů strukturálních a transportních. K těmto změnám dochází pod přímým stimulačním nebo inhibičním vlivem proinflamatorních cytokinů za spoluúčasti dalších humorálních faktorů.

Jako proteiny akutní fáze **(APP)** označujeme ty bílkoviny, jejichž tvorba v hepatocytech a uvolnění do cirkulace jsou regulovány proinflamatorními cytokiny. Vzájemná provázanost systémem zpětných vazeb tyto proteiny přímo zahrnuje do sítě zánětlivých cytokinů.

V souhrnu jsou proteiny akutní fáze součásti nespecifického obranného mechanismu první linie proti systémovému poškození. Reakce proteinů akutní fáze představuje fyziologickou odpověď, poskytující zvýšenou koncentraci proteinů v místě zánětu, kde je většina těchto proteinů v průběhu svého působení likvidována.

Podle známých funkcí v organismu můžeme skupinu proteinů akutní fáze rozdělit do následujících podskupin:

-**mediátory**: C-reaktivní protein, složky komplementového systému, plazminogen,
jsou součástí sítě humorálních zánětlivých mediátorů.

-**zánětlivé modulátory**: Inhibiční faktory komplementové a koagulační kaskády, jako je inhibitor C1-esterázy, faktor I, faktor H, antitrombin III, modulují aktivitu zánětlivých mediátorů.

-**zametače (scavangery)**: Některé APP váží v cirkulaci nebo v tkáních fragmenty poškozených buněk uvolněné z krevních elementů nebo tkání. Řadíme sem haptoglobin a hemopexin, sérový amyloid A, ceruloplazmin.

-**imunomodulátory**: Některé z APP modulují imunitní odpověď, např. α2-makroglobulin
Inhibitory serinových proteáz (tzv. SERPIN), α1-anitrypsin, α1 kyselý glykoprotein aj. inhibují uvolnění a proteolytický efekt leukocytárních enzymů během fagocytózy a limitují tak rozsah zánětlivé odpovědi a dalšího tkáňového poškození.

-**koagulační faktory**: fibrinogen.

-proteiny reparačních dějů: Některé APP kontrolují novotvorbu pojivové tkáně, α1-antitrypsin a α1-antichymotrypsin jsou ukládány na příslušná místa nově formovaných elastických vláken.
-transportní proteiny: Většina transportních proteinů se chová jako negativní reaktanty a jejich plazmatická koncentrace v reakci akutní fáze klesá (albumin, prealbumin, transferin).

Ústřední úlohu v regulaci proteinů akutní fáze zastává **IL-6**, označovaný také jako faktor-1 stimulující hepatocyty. Bylo prokázáno, že pouze IL-6 je schopen rozvinout plný obraz reakce akutní fáze s charakteristickými změnami jaterních proteinů. IL-6 reguluje všechny hlavní pozitivní a negativní proteiny akutní fáze a další cytokiny hrají zřejmě jen pomocnou úlohu.

CRP – C reaktivní protein, reaktant akutní fáze, sleduje odpověď organismu na inzult (zánět, operace), maximální koncentrace dosahuje za 24-48 hodin.
ADMA – Asymetrický dimetylarginin, vedlejší produkt metabolismu proteinů, má blízký vztah k aminokyselině argininu, je inhibitorem NO syntázy, ovlivňuje funkci endotelu.

VI. Publikace č. 1

Zvýšená produkce prozánětlivých cytokinů v tukové tkáni u obézních pacientů s chronickým selháním ledvin (CKD)

Úvod

Již dlouhou dobu není tuková tkáň brána jen jako energetický reservoár, ale je považována za „orgán“ s vysokou metabolickou, hormonální a cytokinovou produkcí ve vztahu k zánětlivé odpovědi organismu, inzulinové rezistenci a endoteliální dysfunkci. Adipocyty a další buňky tukové tkáně jsou součástí systémové endokrinní funkce.

Obezita je doprovázena zvýšenou lokální zánětlivou odpovědí v tukové tkáni, což vede ke zvýšené systémové produkci prozánětlivých mediátorů jako IL-6, TNF α, MCP-1 a dalších. Zvýšené uvolnění prozánětlivých mediátorů z tukové tkáně může vést ke zvýšené subklinické zánětlivé odpovědi, a tak podporovat vznik inzulínové rezistence a aterosklerózy. Klinické i experimentální studie ukázaly, že úprava hladin adipocytokinů jako leptinu a adiponektinu působí protizánětlivě, antiaterogenně a ovlivňuje citlivost k inzulinu.

Asymetrický dimethylarginin (ADMA) je autokrinní regulátor endoteliální aktivity syntázy oxidu dusnatého (NO) a zvýšený ADMA u pacientů s CKD může odpovídat za endoteliální poruchy pozorované u těchto pacientů. U pacientů s normální funkcí ledvin je plasmatická koncentrace ADMA vyšší u obézních, inzulin rezistentních jedinců a snížení váhy vede k poklesu ADMA. Masivní elevace ADMA byla pozorována u obézních nemocných s BMI nad 35 a následně po gastroplastice a redukci váhy byl pozorován signifikantní pokles.

V naší studii jsme porovnáním hodnot u obézních a neobézních nemocných s CKD stadiem 3-4, testovali hypotézu, zda tuková tkáň přispívá k systémové zánětlivé odpovědi zvýšenou produkcí prozánětlivých mediátorů. Rovněž jsme hodnotili vztah sérových koncentrací a mRNA exprese vybraných cytokinů v podkožním a viscerálním tuku u pacientů podstupujících elektivní chirurgický výkon (laparoskopickou cholecystektomii).

Pacienti a metodika

Do prospektivní, průřezové (cross-sectional) studie bylo zařazeno celkem 40 pacientů s CKD stadiem 3-4 podstupující elektivní laparoskopickou cholecystektomii. 20 pacientů s CKD a obezitou (průměrný věk 54.5 let, průměrný BMI 32.2) tvořilo skupinu I. 20 neobézních pacientů s CKD (průměrný věk 58.1 let, průměrné BMI 25.2) tvořilo kontrolní skupinu II. Ve skupině I byla příčinou CKD diabetická nefropatie (8x), polycystóza ledvin (2x), chronická glomerulonefritida (3x), tubulointersticiální nefritida (3x), vaskulární nefroskleróza (3x) a Alportův syndrom (1x). V této skupině mělo 15 pacientů arteriální hypertenzi, 12 hyperlipidémii (10 na terapii statiny - atorvastatin 10mg/d).

Ve skupině II mělo 9 pacientů diabetickou nefropatii, 5 chronickou glomerulonefritidu, 3 vaskulární nefrosklerozu a 3 tubulointeristiciální nefritidu. 14 pacientů mělo arteriální hypertenzi a 9 bylo léčeno statiny ve stejné dávce jako ve skupině I.

Všichni pacienti dostávali stejnou antihypertenzí medikaci (ACEI a ARB) a nebyli signifikantní rozdíly ve věku, rase a pohlaví.

Krevní vzorky byly odebrány před úvodem do anestézie. Sérum bylo získáno centrifugací a vzorky byly zmraženy na -70°C k další analýze. Vzorky podkožního a viscerálního tuku byly odebrány na začátku operace z přibližně stejného místa u všech pacientů, následně byly uloženy do RNA lateru (Qiagen, Hilden, Německo) a uchovány při -70°C pro další analýzu. Sérový adiponektin byl stanoven metodou enzymatické imunoeseje ELISA kit (BioVendor, Brno, Česká republika, Linco Research, St. Charles, MI, USA). Sérové hladiny IL-6, TNF α a MCP-1 byly stanoveny pomocí Lincoplex kit, Luminex 200 (Linco research). Sérová koncentrace CRP pomocí ultrasenzitivního RP ELISA kit (DSL, Oxon, UK).

Celková RNA byla stanovena ze 60-100mg vzorků podkožního a viscerálního tuku homogenizací užitím MagNA lyser (Roche Diagnostic, GmbH, Mannheim, Německo), následně izolací RNA užitím MagNA Pure Compact RNA isolation kit (Roche diagnostic, GmbH) na automatickém MagNA Pure Compact izolátoru (Roche Diagnostic, GmbH). Koncentrace a čistota RNA vzorků byla stanovena spectrofotometrií (BioPhotometer Eppendorf AG, Hamburg, Německo).

Průměrná koncentrace RNA byla 70.2mg/ml a poměr R260/280nm byl 1.79. Celistvost RNA byla zkontrolována užitím ethidium-bromide vizualizací 18S a 28S ribozomálních skupin na agarósním gelu. Získaná RNA byla použita pro reverzní transkripci k syntéze cDNA pomocí oligo (dT) primerů RevertAid First - strand cDNA Synthesis kit (Fermentas Life Science, Vilnius, Lithuania). Komplementární DNA byla použita ke stanovení genové exprese leptinu, adiponectinu, rezistinu, receptoru adiponektinu-1 a 2, IL-6, TNFα, MCP-1 a imunokompetentního buněčného markeru CD68 pomocí real-time PCR metody na přístroji ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) TaqMan Universal PCR Master Mix, NA AmpErase UNG a specifický TaqMan esej genové exprese (Applied Biosystems).

Všichni pacienti byli ve stadiu 3-4 CKD s glomerulární filtrací mezi 28-48ml/min na 1.73m^2 tělesného povrchu stanovenou clearence inulinu. Ve skupině I měli pacienti BMI > 30kg/m^2 a znaky centrální obezity (poměr pas/boky > 0.85). Antihypertenzní medikace nebyla změněna, ale dávky upraveny s cílem TK 125/80 mmHg. Proteinurie byla v rozmezí 2.3-3.5g/24hod.

Pro stanovení ADMA byl použit ELISA kit (DLD Diagnostika GmbH, Hamburg, Německo) a AUTO-EIA II microplate reader (Labsystems Oy, Espoo, Finsko) a pacienti byli lační minimálně 10hod před odebráním vzorků s cílem zamezit zkreslení methioninem z potravy.

Ostatní standardní biochemické parametry byly stanoveny na přístroji Olympus (Diagnostica GbmH, Hamburk, Německo). Sérový inzulin byl měřen pomocí RIA (Cis Bio Int, Lyon, Francie) glykovaný hemoglobin (HbA1c) pomocí kapalinové chromatografie na Tosohi HLC-723 G7 (Shiba, Minato-ku, Tokio, Japonsko).

Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byl použit software Sigmastat (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Párový t-test a dvou výběrový t-test byly použity pro porovnání výsledků u obou skupin pacientů. Výsledky byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$.

Výsledky

Skupiny se signifikantně nelišily ve věku, pohlaví, renální funkci měřenou clearence inulinu. Skupina I měla signifikantně vyšší sérové hladiny ADMA, IL-6, TNF α, MCP-1, pentosidinu, HbA1c, LDL, triglyceridů a signifikantně nižší hladinu adiponektinu než skupina II. Skupina I měla rovněž vyšší hodnotu CRP. Exprese mRNA prozánětlivých faktorů TNFα a imunokompetentních buněčných markerů CD68 byly signifikantně zvýšeny v podkožním a viscerálním tuku ve skupině I. Exprese receptoru pro adiponektin I a MCP-1 byly rovněž signifikantně vyšší ve skupině I, zejména ve viscerálním tuku. Další výrazné rozdíly v expresi mRNA v tukové tkáni a sérové koncentrace adipokinů nebyly v porovnání obou skupin zjištěny.

Diskuze

Naše studie potvrdila, že tuková tkáň je důležitý endokrinně aktivní orgán infiltrovaný imunokompetentními buňkami produkující množství hormonů a cytokinů, včetně prozánětlivých faktorů jako TNFα, IL-6 atd.

U obézních nemocných s CKD je zvýšená koncentrace cirkulujících prozánětlivých faktorů důsledkem zvýšené produkce v tukové tkáni a sníženou degradací v ledvinách s chronickou insuficiencí.

Zvýšená produkce prozánětlivých faktorů u obézních pacientů také naznačuje vztah těchto faktorů k rozvoji inzulinové rezistence, cévních chorob a dalších patologií.

Domníváme se, že stimulace imunokompetentních buněk v tukové tkáni může být důležitou

složkou systémové zánětlivé odpovědi organismu na nejrůznější podněty.

Viscerální a do jisté míry i podkožní tuk pacientů s CKD byl charakterizován signifikantně zvýšenou expresí CD68 a zvýšenou infiltrací CD68 imunokompetentních buněk, což bylo již dříve popsáno u obézních nemocných s normální funkcí ledvin.

Ačkoliv popsané výsledky endokrinní produkce tukové tkáně u pacientů s CKD jsou do určité míry podobné výsledkům u obézních pacientů s normální funkcí ledvin, byly zde některé důležité rozdíly. Zvýšená koncentrace cirkulujících prozánětlivých cytokinů je doprovázena zvýšenou hladinou adiponektinu, hormonu tukové tkáně s protizánětlivým a antiaterogenním účinkem. Normálně jsou snížené hladiny adiponektinu pozorovány u obézních pacientů s aterosklerózou, inzulinou rezistencí a DM 2.typu, kdežto zvýšené hodnoty u fyzicky aktivních jedinců. Dále byla zjištěna signifikantně vyšší exprese mRNA receptoru pro adiponektin 1 ve viscerální tukové tkáni u pacientů s CKD a obezitou, což by mohlo naznačovat kompenzatorní protizánětlivou odpověď u těchto nemocných.

Souhrn

Obezita je známým rizikovým faktorem rozvoje cévních chorob a chronického selhání ledvin (CKD). V naší studii jsme se zaměřili na objasnění vlivu tukové tkáně na prozánětlivou složku u nemocných s CKD a obezitou. Do prospektivní studie byl zařazen soubor 40 pacientů s CKD (stadium 3-4) s mírnou proteinurií (2.3-3.5g/den). Soubor byl rozdělen na 2 skupiny, 20 pacientů s obezitou (BMI>30kg/m^2) - skupina I., a 20 pacientů neobézních (BMI<30kg/m^2) - skupina II. Pacienti podstoupili elektivní chirurgický výkon (laparoskopická cholecystektomie pro lithiasu), během kterého byly odebrány vzorky krve, podkožního a viscerálního tuku. Byly měřeny sérové koncentrace asymetrického dimethylargininu (ADMA), adiponectinu, C-reaktivního proteinu, interleukinu (IL-6), tumor necrosis faktoru α (TNF α), pentosidinu a monocyty chemoatrahujícího proteinu 1 (MCP-1). Exprese m-RNA TNF α, MCP-1, adiponektin receptoru 1 a 2, imunokompetentních buněk CD68 byla měřena v podkožním a viscerálním tuku užitím metody PCR. Dále byly hodnoceny další biochemické parametry jako inzulín, glykovaný hemoglobin, cholesterol, LDL a triacylglyceridy v obou skupinách.

Byly naměřeny signifikantně vyšší sérové hladiny ADMA, CRP, pentosidine, IL-6, TNF α, MCP-1 u obézních pacientů s CKD než u kontrolní skupiny. Signifikantně vyšší byla exprese mRNA v podkožním a viscerálním tuku TNF α, CD68, receptoru pro adiponektin 1 a MCP-1 u obézních pacientů, kdežto exprese adiponektinu, IL-6 a receptoru pro adiponektin 2

se v obou skupinách signifikantně nelišily. Celkově byla exprese mRNA vyšší ve viscerálním než podkožím tuku ($p < 0.01$ vs. $p < 0.05$). U skupiny obézních byla naměřena zvýšená infiltrace podkožního i viscerálního tuku CD68 imunokompetentními buňkami.

Zvýšená prozánětlivá produkce u obézních pacientů s CKD může vést ke zvýšené systémové zánětlivé odpovědi a rovněž urychlit progresi renální poruchy.

Závěr

Naše data ukazují, že exprese prozánětlivých cytokinů a infiltrace tukové tkáně imunokompetentními buňkami je zvýšena u obézních pacientů s CKD stadiem 3-4. Navíc sérové hladiny prozánětlivých cytokinů jsou u těchto pacientů vyšší a je více vyjádřena inzulínová rezistence. Otázkou zůstává, jak tyto zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů ovlivňují systémovou zánětlivou odpověď, zda urychlují cévní poškození a progresi renálního selhání a jestli intervence potlačující tuto produkci může mít pozitivní efekt.

Tabulka 1: Klinické a laboratorní parametry ve skupině I. (obézní s CKD) a skupině II. (kontrolní, neobézní s CKD)

Parametr	**Skupina I. (N=20)**	**Skupina II. (N=20)**	**Statistická signifikance Skup. I. vs Skup. II.**
Věk (roky)	54.5±7	58.1±9	NS
WHR (waist- hip ratio)	0,88±0.05	0,81±0,04	p<0,02
BMI (kg/m^2)	32,2±3,3	25.1±4,0	p<0,01
TK syst. (mmHg)	135±10	125±7	p<0,02
TK diast. (mmHg)	90±9	82±7	p<0,05
Cl in ($ml/min/1.73m^2$)	29,7±9,9	31.2±9.7	NS
Proteinurie (g/24h)	3,5±2,2	2,3±2,1	p<0,02
HbA_1C (%)	5,3±1,4	4,2±0,9	p<0,02
Inzulin (pg/ml)	365.3±40,1	292,4±49,1	p<0,02
Cholesterol (mmol/l)	6,1±1,2	5,8±2,2	p<0,02
Triglyceridy (mmol/l)	3,9±1,6	2.8±1,0	p<0,01
ADMA(umoL/L)	2,4±0,5	1,3±0,4	p<0,01
Adiponektin (ug/mL)	14,4±6,6	21,4±8,2	p<0,01
TNFα (pg/mL)	8,6±2,3	5,3±1,7	p<0,05
MCP-1 (pg/mL)	195±53	112±40	p<0,05
IL-6 (pg/mL)	14,8±4,2	9,0±3,1	p<0,05
Pentosidine (ug/L)	485±170	395±80	p<0,02
CRP (mg/L)	14,9±4,5	7,4±2,5	p<0,02
Albumin (g/L)	32,1±1,5	31,8±2,3	NS

Cl in – clearance inulinu
BMI – body mass index
HbA_1C – glykovaný hemoglobin
IL-6 – Interleukin 6
CRP – C -reaktivní protein
WHR – poměr pas - boky

VII. Publikace č. 2

Dynamika změn sérového visfatinu po abdominálním chirurgickém výkonu: nový proinflamační marker v časné diagnostice?

Úvod

Visfatin je nedávno podrobněji popsaný adipocytokin produkovaný především viscerální tukovou tkání. K jeho metabolickým účinkům patří ovlivnění účinnosti inzulinu vazbou na inzulínový receptor na odlišném místě než inzulin. Visfatin byl původně popsán jako růstový faktor proliferace B buněk, tzv. pre-B cell colony enhancing factor (PBEF) v lymfocytech. PBEF byl následně objeven jako ubikviterní cytokin přítomný v řadě buněk a tkání jako jsou neutrofilní leukocyty, tkáň jater, srdce a svalu.

Byl zmíněn v r. 2005 jakožto faktor s inzulino-mimetickým efektem. Jeho hladiny korelují s adiponektinem a ovlivňují inzulínovou rezistenci. V experimentálních studiích byl zvýšen při hyperglykémii a naopak snížen při podání inzulínu a somatostatinu. Má přímou vazbu k dostupnosti nutrientu a buněčné bioenergetice. Novější studie přisuzují visfatinu roli enzymu zodpovědného za intra i extra celulární NAD biosyntézu. Visfatin zasahuje i do glukózové homeostázy a má významný antidiabetický efekt, který moduluje i funkci B-buněk. Zajímavé jsou i nálezy prokazující změny visfatinu po tělesném cvičení: krátkodobé zvýšení bezprostředně po cvičebním tréninku a dlouhodobé snížení při pravidelném dlouhodobém cvičení nepochybně souvisejí s hladinami glukózy a inzulínu. Hladina visfatinu může být také ovlivněna změnou tělesné hmotnosti, tedy úbytkem tukové tkáně. Visfatin stimuluje také expresi IL-6 a IL-8 a je spojen s parametry oxidativního stresu.

Visfatin je významně obsažen v tukové tkáni, predominantně v tuku viscerálním. Z tohoto aspektu je úzce svázán s viscerální obezitou. Byl prokázán vztah mezi obezitou, hladinou visfatinu v séru a jeho mRNA expresí, podobně jako mezi visfatinem a BMI. Zatímco vztah k viscerální obezitě byl v této studii potvrzen, u subkutánního tuku tomu tak nebylo. Zvýšená hladina cirkulujícího visfatinu byla prokázána i u nemocných s metabolickým syndromem.

V recentních studiích bylo ukázáno, že visfatin má též významný vztah k imunitním procesům a je významným proinflamačním cytokinem u řady zánětlivých procesů (např. akutní záněty plic či sepse). Adiponectin má v tomto směru antagonistické účinky. Zvýšené hladiny visfatinu korelovaly i s dalšími prozánětlivými cytokiny jako je IL-1, IL-6 a TNF α.

Visfatin byl také sledován u chirurgických nemocných. U pacientů s cholecystolitiázou a následnou cholecystektomií byl v dlouhodobém sledování (1 rok po operačním výkonu) zvýšen. U nemocných s poklesem BMI a též množstvím tukové tkáně se hladiny visfatinu snížily. Po restrikčních operacích žaludku byly hodnoty visfatinu závislé na změně tělesné hmotnosti, v časném údobí 4. týdnů po výkonu klesly a následně na konci sledovaného jednoročního sledování se opět zvýšily. Korelovaly s hladinou IL-6 a plazmatickou koncentrací inzulinu. Naproti tomu, v prospektivní studii 27 morbidně obézních žen (BMI>40 kg/m^2) sledovaných 1 rok po biliopankreatickém diverzním výkonu, nebyla změna visfatinu přes signifikantní pokles BMI (ze 46,1 ± 13,1 na 35,1 ± 5,7 kg/m^2) prokázána.

Ve studii analyzující 200 000 úmrtí na sepsi v USA bylo ukázáno, že visfatin se signifikantně zvyšuje u pacientů se sepsí a koreluje významně s koeficientem rizika úmrtí. Tyto závěry byly potvrzeny i v experimentálních studiích se zjištěním, že IL-6 byl regulátorem genu pro visfatin ve 3T3-L1 adipocytech.

V současné studii jsme testovali hypotézu, zda a jak se sérové koncentrace visfatinu mění v časném perioperačním údobí v závislosti na možném rozvoji infekce (proinflamační marker) a to v dynamickém časovém perioperačním monitoringu 0-12-24-48 a 72 hodin a zda se jeho dynamika liší od dalších již užívaných proinflamačních cytokinů. Současně jsme sledovali, zda se jeho hodnoty liší v závislosti na množství tukové tkáně v předoperačním údobí. Všichni sledovaní nemocní se podrobili elektivnímu nitrobřišnímu výkonu (resekce části kolon pro adenokarcinom). Abdominální elektivní laparotomický výkon byl vybrán jako model neinfekční zánětlivé stimulace cytokinové kaskády, které dle některých nálezů může hrát významnou roli v aktivaci tvorby visfatinu.

Pacienti a metodika

Studie se uskutečnila na chirurgické klinice 3. LF UK a FNKV od 1. 1. 2010 do 30. 9. 2012. Laboratorní vyšetření proběhla na klinice nefrologie Transplantcentra IKEM a v Revmatologickém ústavu 1.LF UK a VFN.

Do prospektivní průřezové (cross-sectional) studie bylo zařazeno 20 pacientů, kteří podstoupili elektivní laparotomickou resekci části tlustého střeva. Z tohoto souboru celkem 10 nemocných mělo před operací závažnou obezitu (BMI> 30 kg/m^2, skupina I). Dalších 10 pacientů mělo BMI nižší než 30 kg/m^2, skupina II. Z hlediska přidružených onemocnění 4 nemocní ve skupině I měli diabetes mellitus 2. typu, ve skupině II to byli 3 nemocní. Léčba DM byla formou standardních perorálních antidiabetik a režimových opatření. V obou skupinách bylo vždy 5 nemocných s léčenou kompenzovanou systolicko-diastolickou hypertenzí. Nebyli zařazení pacienti, u kterých byly přítomny chirurgické operační a pooperační komplikace. Všichni pacienti měli provedeno základní antropometrické vyšetření den před operačním výkonem a byla vypočtena hodnota BMI. Krevní vzorky pro biochemickou analýzu byly odebrány v rámci předoperačního vyšetření a následně za 12, 24, 48 a 72 hodin po ukončení operačního výkonu. Sérum bylo získáno centrifugací a vzorky uloženy při teplotě -20°C a následně -70°C pro další analýzu.

Sérový visfatin byl stanoven metodou enzymatické imunoeseje (ELISA) dle protokolu Bio Vision Research Products, Mountain View, CA, USA. Adiponektin v séru, byl měřen komerčním ELISA kitem (Bio Vendor, Brno, Česká republika, Linco Research, St Charles, MI, USA). Sérové koncentrace IL-6 a TNF α byly určeny s použitím adipokinového LINCOplex kitu pro lidské sérum (Luminex 200 instrument Linco Research) a sérové koncentrace C-reaktivního proteinu (CRP) dle ultrasenzitivní metody CRP ELISA kit (DSL, Oxon, UK). Další standardní biochemické parametry byly stanoveny na přístroji Olympus Diagnostica GbmH, Hamburk, SRN. Sérový inzulin byl měřen pomocí RIA (Cis Bio Int, Lyon, Francie) glykovaný hemoglobin (HbA1c) pomocí kapalinové chromatografie na Tosohi HLC-723 G7 (Shiba, Minato-ku, Tokio, Japonsko).

Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byl použit software Sigmastat (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Párový t-test a dvou výběrový t-test byly použity pro porovnání výsledků u obou skupin pacientů. Výsledky byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$.

Výsledky

Základní klinické a laboratorní parametry obou skupin pacientů před břišním chirurgickým výkonem jsou uvedeny v tabulce 1. Skupiny se nelišily v parametrech věku a pohlaví, v hodnotách sérového kreatininu, cholesterolu a diastolického TK. Lehce zvýšené, leč signifikantní rozdíly ($p < 0.05$) byly zachyceny v hodnotách systolického TK, glykémie nalačno a inzulinu. Významnější signifikantní rozdíly ($p < 0.02$) byly v hodnotách HbA1c a triglyceridů. Tyto nálezy mohou souviset se signifikantním rozdílem BMI ($p < 0.02$) v obou skupinách ($31,2 \pm 4,2$ vs $27,3 \pm 3,3 kg/m^2$).

Sérové hladiny vybraných adipocytokinů (visfatin, leptin, rezistin, adiponektin) a dalších proinflamačních cytokinů (TNF α, IL-6 a CRP) v předoperačním údobí jsou v tabulce 2. S výjimkou hodnot adiponektinu (vyšší hodnoty ve skupině II) a IL-6 (vyšší hodnoty ve skupině I), u obou $p < 0.05$, nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v předoperačních hodnotách uvedených cytokinů.

Tabulka 3 uvádí průměrné hodnoty a směrodatné odchylky vybraných adipocytokinů a proinflamačních cytokinů v perioperačním údobí (0h,+12h,+24h,+48h a +72 hodin po operačním výkonu) v obou sledovaných souborech. Současně hodnotí i dynamiku změn jednotlivých parametrů vzhledem k výchozí hodnotě před operací. Z tabulky je zřejmé, že visfatin dynamicky signifikantně roste již v časném perioperačním údobí (od +12h), více ve skupině I, a že mezi oběma skupinami jsou signifikantní rozdíly ($p < 0.02$). Maxima hodnot je dosaženo v obou skupinách v periodách +24h ($p < 0.01$), ale opět jsou mezi skupinami rozdíly ($p < 0.01$). Pozvolný pokles nastává v periodě +48h ($p < 0.01$) s dalším snížením v periodě +72h. Zůstávají však trvale signifikantní rozdíly v hodnotách obou skupin ($p < 0.02$) při vyšších hodnotách ve skupině I.

Analogický trend perioperačních změn sérových hladin byl zachycen u leptinu (maximum vzestupu v periodách +24h). I zde byly signifikantní změny obou skupin a vyšší hodnoty ve skupině I. Naproti tomu, dynamika změn hladin adiponektinu měla obrácený trend: nejvyšší hodnoty byly zachyceny v obou skupinách před operačním výkonem s dynamicky signifikantním poklesem od periody +24h ($p < 0.02$). Byly zachyceny signifikantní rozdíly obou skupin s nejnižšími hodnotami ve skupině I. Hladina adiponektinu měla negativní korelaci k proinflamačním cytokinům TNF α a IL-6. Hladina TNF α byla nejvyšší v periodách +24h, zatímco IL-6 v periodě +48h. Sérová koncentrace CRP stoupala postupně s maximem v periodách +72 hodin. Zatímco u cytokinů TNF α a IL-6 byly

zaznamenány signifikantní rozdíly mezi skupinami I a II, tento rozdíl nebyl patrný při stanovení CRP, jehož hodnoty nebyly rozdílné s ohledem na BMI.

Obrázek č. 1 zachycuje dynamiku změn sérové koncentrace visfatinu v obou skupinách s maximem v periodách +24h. Analogický trend je zachycen na obrázku č. 2, který zachycuje dynamiku změn u leptinu. Také zde je maximum nárůstu v periodách +24h, i když statistická signifikance rozdílu mezi skupinami je nižší ($p < 0.01$ vs. $p < 0.02$). Rozdílná dynamika změn těchto adipocytokinů a tzv. klasických proinflamačních cytokinů TNF α a IL-6 je zřejmá z obrázků 3. a 4. Oba cytokiny, především však IL-6, mají maximum nárůstu posunuto do pozdějších časových period, především +48h u IL-6. Tyto zvýšené hodnoty déle přetrvávají a to i v periodách +72h. Jinou dynamiku změn má typický marker bakteriální infekce CRP. Obrázek č. 5 zachycuje s časem zarůstající hodnoty a to souběžné v obou skupinách, bez rozdílu v BMI. Maximum hodnoty je dosaženo v poslední měřené period +72h.

Při srovnání dynamiky změn visfatinu s ostatními sledovanými prozánětlivými cytokiny byl nejvyšší regresní koeficient u leptinu v periodě +24h ($r = 0,45$, $p < 0.02$), zatímco pro další zánětlivé markery (TNF α, IL-6) byly korelace méně signifikantní ($r = 0,32$, resp. $r = 0,20$, $p<0.05$). Vztah k CRP nebyl v naší studii signifikantní stejně jako k adiponektinu.

Diskuze

Odpověď organismu na operační zátěž je charakterizována celou škálou zánětlivých, hormonálních a metabolických změn, které v souhrnu vytvářejí obraz reakce akutní fáze. Stresový podnět operace indukující uvolňování řady hormonů (ACTH, kortizol, ADH atd.) a prozánětlivých cytokinů (např. TNF α a IL-6) stimuluje systém tvorby proteinů akutní fáze v játrech, svalový katabolismus, termogenezi a další četné metabolické, psychické a imunologické odpovědi.

Iniciace, průběh a prognóza systémové zánětlivé odpovědi na chirurgický výkon tak závisí na interakci prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů a dalších solubilních a membránových mediátorů. Tuková tkáň představuje důležitý endokrinní orgán produkující řadu hormonů a cytokinů včetně prozánětlivých (např. i TNF α a IL-6). Produkce

proinflamačních cytokinů je obecně u obézních pacientů vyšší, což může významně zasahovat i do metabolismu inzulinu (inzulínová rezistence). Experimentální i klinické studie prokazují, že tuková tkáň je infiltrována imunokompetentními buňkami, které jsou významnými producenty proinflamačních cytokinů.

Visfatin je relativně novým adipocytokinem, který má kromě vlivu v energetickém metabolismu svoji roli v přirozené imunitě a zánětu. V posledních několika letech byl prokázán jeho prozánětlivý, až tkáně destruující účinek. Představuje z tohoto aspektu adipocytokin akutní fáze. V naší studii byly současně vyšetřeny i další adipocytokiny (leptin, rezistin, adiponectin) a klasické prozánětlivé cytokiny (TNF α, IL-6 a CRP). Časový horizont sledování (0h, +12h, +24h, +48h, +72 hodin) odpovídá dynamice exprese cytokinů v časném pooperačním údobí. Vyšetření zánětlivých klinických a laboratorních parametrů v předoperačním údobí prokázalo pouze marginální rozdíly v obou souborech – vyšší hodnoty glykémie nalačno, hladiny inzulinu, triglyceridů a systolického TK ve skupině I s BMI 31,2± 4,2 kg/m^2, $p < 0,05$. Tento nález nepochybně souvisí s přítomností většího množství viscerálního tuku a přítomnou inzulinorezistencí. S vyšším zastoupením tukové tkáně zřejmě souvisí i nevelké, leč signifikantně vyšší hodnoty IL-6 a snížení adiponektinu ve skupině I v předoperačním údobí.

V časném postoperačním údobí se rychle zvyšuje hladina visfatinu, která dosahuje trojnásobného zvýšení za 24 hodin ($p < 0.01$). Toto zvyšování je zachyceno již za 12 hodin ($p<0.02$), naopak postupné snížení nastupuje za 48 hodin ($p < 0.02$) a je následováno návratem k nesignifikantním hodnotám zvýšení za 72 hodin. Během celého sledování byly zachyceny signifikantní rozdíly mezi oběma soubory s tím, že skupina II s BMI 27,3 ± 3,3 kg/m^2 měla ve všech časových periodách hodnoty visfatinu nižší, jak zachycuje obr. č. 1. Analogickou dynamiku změn jsme zjistili při monitoraci hladin leptinu, který také dosahoval maxima hodnot již 24 hodin po operačním výkonu (šestinásobné zvýšení v souboru I a čtyřnásobné zvýšení v souboru II), obr. č. 2. V případě visfatinu zatím nejsou relevantní experimentální a klinická data týkající se bezprostředně operačního výkonu. U leptinu bylo ukázáno, že v časném pooperačním údobí chirurgický stres vede k přechodné elevaci leptinu a jeho hladina dále koreluje s hladinami prozánětlivých cytokinů IL-6 a TNF α, i když s časnějším nástupem změn. Protože v naší studii byla zachycena časově analogická dynamika změn visfatinu a leptinu a mezi oběma veličinami byla zachycena pozitivní signifikantní korelace ($r = 0,43$, $p < 0.02$) je možná časově i kvantitativně analogická exprese obou adipocytokinů tukové tkáně v časném perioperačním údobí. Současně jsme potvrdili perioperační zvýšení proinflamačních cytokinů TNF α a IL-6 s maximem změn v časově

pozdějším údobí. Hodnota CPR měla výrazně pozdější dynamiku a relativně vysoké hodnoty přetrvávaly i po ukončení studie. Hladina „ochranného" adiponektinu byla nejvyšší před započetím operačního stresu a následně se snižovala s hraničními signifikantními rozdíly mezi skupinami.

Uvedené nálezy dynamiky dvou sledovaných adipocytokinů (časné zvýšení) jsou velmi významné, neboť u "klasických" prozánětlivých cytokinů docházelo ke zvýšení hodnot později a nebyly rozdíly v zánětlivé odpovědi souvisejícím s množstvím tukové tkáně. Monitorace sérového visfatinu by tedy mohla být časným markerem zánětlivých změn v perioperačním údobí indikujícím i zvýšené riziko exprimace zánětlivých cytokinů v souvislosti s přítomnou viscerální tukovou tkání (na rozdíl od leptinu je visfatin exprimován prakticky pouze viscerální tukovou tkání). Při výskytu zánětlivých komplikací by diagnostika pomocí CRP byla až o 48 hodin opožděna oproti možnostem časné diagnostiky s využitím vybraných adipocytokinů, především visfatinu. Dosud však není jasné, jaká je jeho predikční váha v dlouhodobější zánětlivé odpovědi.

Souhrn

Visfatin je adipocytokin produkovaný především viscerální tukovou tkání. Vedle účinku na inzulínový receptor je i proinflamačním cytokinem, jehož hladina se může měnit při zánětlivých procesech. Cílem naší studie bylo zjistit, jak se mění sérové koncentrace visfatinu v časném údobí po abdominálním chirurgickém výkonu v korelaci s dalšími proinflamačními cytokiny. Do prospektivní průřezové (cross-sectional) studie bylo zařazeno 20 pacientů, kteří podstoupili elektivní laparotomickou resekci části tlustého střeva pro adenokarcinom. Sledovali jsme hladiny visfatinu, leptinu, rezistinu, adiponectinu, TNF α, IL - 6 a CRP a srovnávali dynamiku změn jednotlivých parametrů za +12, +24, +48 a +72 hodin.
V časném pooperačním údobí po abdominálním chirurgickém výkonu byly zachyceny signifikantně zvýšené hladiny sérového visfatinu, které předcházely zvýšení hodnot jiných proinflamačních markerů TNF α, IL-6 a CRP. Sérové koncentrace visfatinu kulminovaly již za 24 hodin po chirurgickém výkonu a po 72 hodinách se vracely k normě. TNF α a IL-6 měly maximum o 12 až 24 hodin později a u CRP hodnoty stoupaly s maximem za 72 hodin. Visfatin by proto svojí dynamikou mohl být časným prediktorem rozvoje zánětlivých změn operovaných nemocných především s viscerální obezitou.

Závěr

V časném postoperačním údobí po abdominálním chirurgickém výkonu byly zachyceny signifikantně zvýšené hladiny adipocytokinu visfatinu, které korelovaly s hladinou leptinu a jejichž hladiny byly vyšší v souboru nemocných s vyšším BMI (viscerální obezitou). Postupný pokles následoval po 24 hodinách. Pooperační zvýšení klasických prozánětlivých cytokinů (TNF α a IL-6) bylo časově o 24 - 48 hodin opožděno. U hodnoty CRP byla dynamika zvyšování postupná s přetrvávajícím zvýšením i při posledním vyšetření za 72 hodin, a to bez signifikantního rozdílu hodnot v obou souborech.

Visfatin by svojí dynamikou mohl být významným prediktorem časných zánětlivých změn u nemocných po abdominálním chirurgickém výkonu, především s viscerální obezitou.

Tabulka 1: Základní klinické a laboratorní parametry v souboru I. a souboru II. před elektivním abdominálním chirurgickým výkonem (resekce kolon)

Parametr	**Skupina I. (N=10)**	**Skupina II. (N=10)**	**Statistická signifikance Skup. I. vs Skup. II.**
Věk (roky)	62±6	64±8	NS
Pohlaví (M/Ž)	4/6	5/5	NS
BMI (kg/m^2)	31,2±4,2	27,3±3,3	p<0,02
TK syst. (mmHg)	145±12	135±10	p<0,05
TK diast. (mmHg)	92±6	85±7	NS
Kreatinin (μmol/l)	101,7±12,1	98,5±10,1	NS
Glykémie (mmol/l)	6,5±3,2	5,7±3,5	p<0,05
HbA_1C (%)	5,3±1,4	4,4±1,2	p<0,05
Inzulin (pg/ml)	365±39,1	290,4±45,3	p<0,05
Cholesterol (mmol/l)	6,1±2,1	5,9±1,2	NS
Triglyceridy (mmol/l)	3,8±1,6	3,0±1,2	p<0,05

Tab. 2 Vybrané adipocytokiny a další cytokiny v předoperačním údobí v obou sledovaných souborech

Parametr	**Skupina I. (N=10)**	**Skupina II. (N=10)**	**Statistická signifikance Skup. I. vs Skup. II.**
Visfatin (ng/ml)	1,01±0,87	0,84±0,65	NS
Rezistin (μg/ml)	20,2±10,1	18,4±6,6	NS
Leptin (ng/l)	51,3,±11,2	45,4±10,2	NS
Adiponectin (μg/ml)	14,6±6,6	17,6±4,4	$p<0,05$
TNF-α (pg/ml)	9,2±2,3	8,2±4,4	NS
IL – 6 (pg/ml)	14,8±4,5	9,0±3,1	$p<0,05$
CRP (ng/l)	15,1±4,5	12,4±4,1	NS

Tab. 3 Dynamika sledovaných parametrů v obou souborech v před- a pooperačním údobí (0-72hodin)

Parametr	**Visfatin** (ng/ml)	**Leptin** (ng/l)	**Adiponectin** (μg/ml)	**TNF –α** (pg/ml)	**IL-6** (pg/ml)	**CRP** (ng/l)
Skupina I. $_0$	1,01±0,87	51,3±11,2	14,6±6,6	9,2±2,3	14,8±4,5	15±4
	NS	NS	*	NS	*	NS
Skupina II. $_0$	0,84±0,65	45,4±10,2	17,6±4,4	8,2±4,4	9,0±3,1	12±4
Skupina I. $_{12}$	+1,76±0,96	+156,4±47,1	12,4±5,4	++49,6±18,4	+26,2±6,8	+25±6
	**	*	*	NS	NS	NS
Skupina II. $_{12}$	+1,43±0,28	+124,2±40,1	16,4±5,6	++44,7±19,2	+24,2±8,8	++18±10
Skupina I. $_{24}$	+++3,08±1,22	+++301,7±62,4	8,2±3,6	+++89,4±42,5	+++125,2±62,3	++45±24
	***	**	*	*	*	NS
Skupina II. $_{24}$	++2,01±1,21	++224,2±60,1	12,4±6,4	++78,4±38,5	++108,2±45,1	++35±18
Skupina I. $_{48}$	++1,52±0,97	++148,2±79,1	+6,6±3,2	++69,7±24,1	++164,2±68,4	++72±26
	**	**	NS	NS	*	NS
Skupina II. $_{48}$	++1,12±0,48	+80,6±36,1	+8,6±3,6	++66,4±18,4	++115,5±56,2	++68±16
Skupina I. $_{72}$	+1,37±0,65	+80,4±22,4	+7,1±3,1	+36,2±9,1	++156,4±72,3	+++82±30
	*	*	NS	*	**	*
Skupina II. $_{72}$	1,01±0,32	61,4±18,2	+10,6±4,1	+25,4±8,1	++78,3±34,6	++70±12

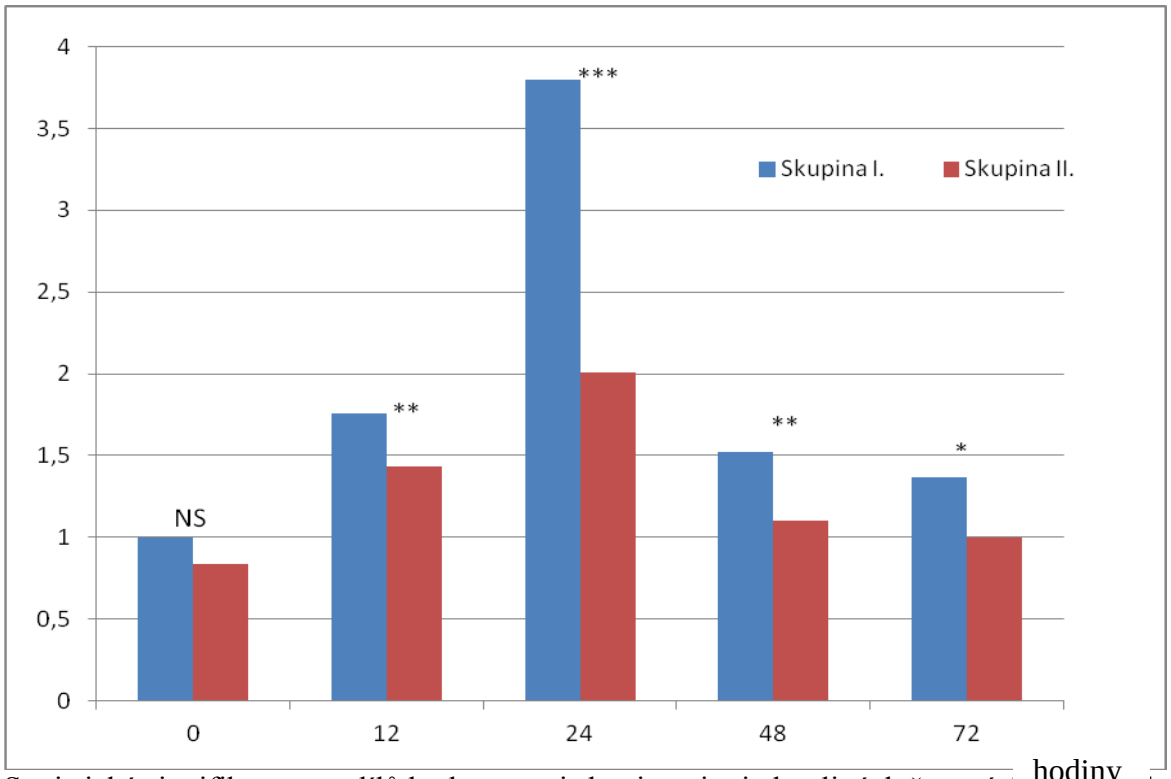
Statistická signifikance mezi skupinami ve sledovaných parametrech v jednotlivých časových periodách 0-12-24-48-72 hod.

NS nesignifikantní
* $p<0,05$
** $p<0,02$
*** $p<0,01$

Statistická signifikance v každé z obou skupin ve sledovaných parametrech v časových periodách 0-12-24-48-72 hod. (vztaženo k předoperační hodnotě jednotlivých parametrů v čase 0 hod.)

+ $p<0,05$
++ $p<0,02$
+++ $p<0,01$

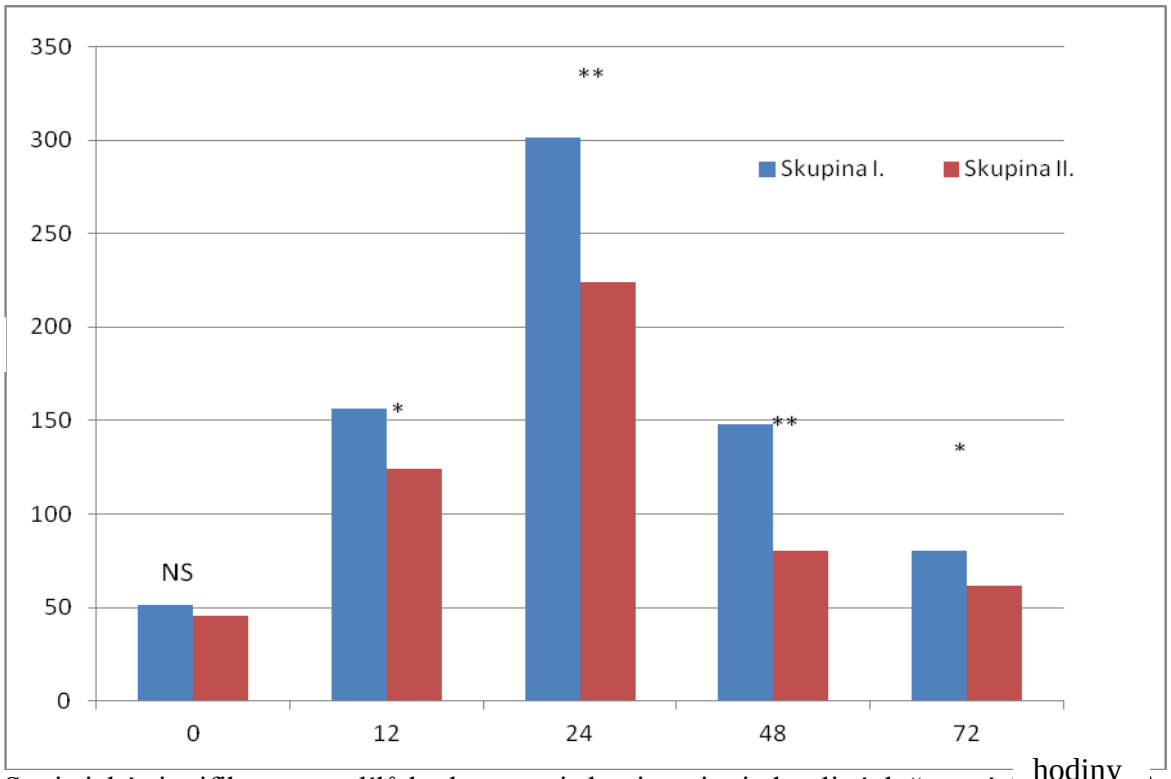
Obr. 1 Sérové koncentrace visfatinu v před a pooperačním údobí v obou sledovaných skupinách (průměrné hodnoty)



Statistická signifikance rozdílů hodnot mezi skupinami v jednotlivých časových (před- a post) operačně

NS	nesignifikantní
*	$p<0,05$
**	$p<0,02$
***	$p<0,01$

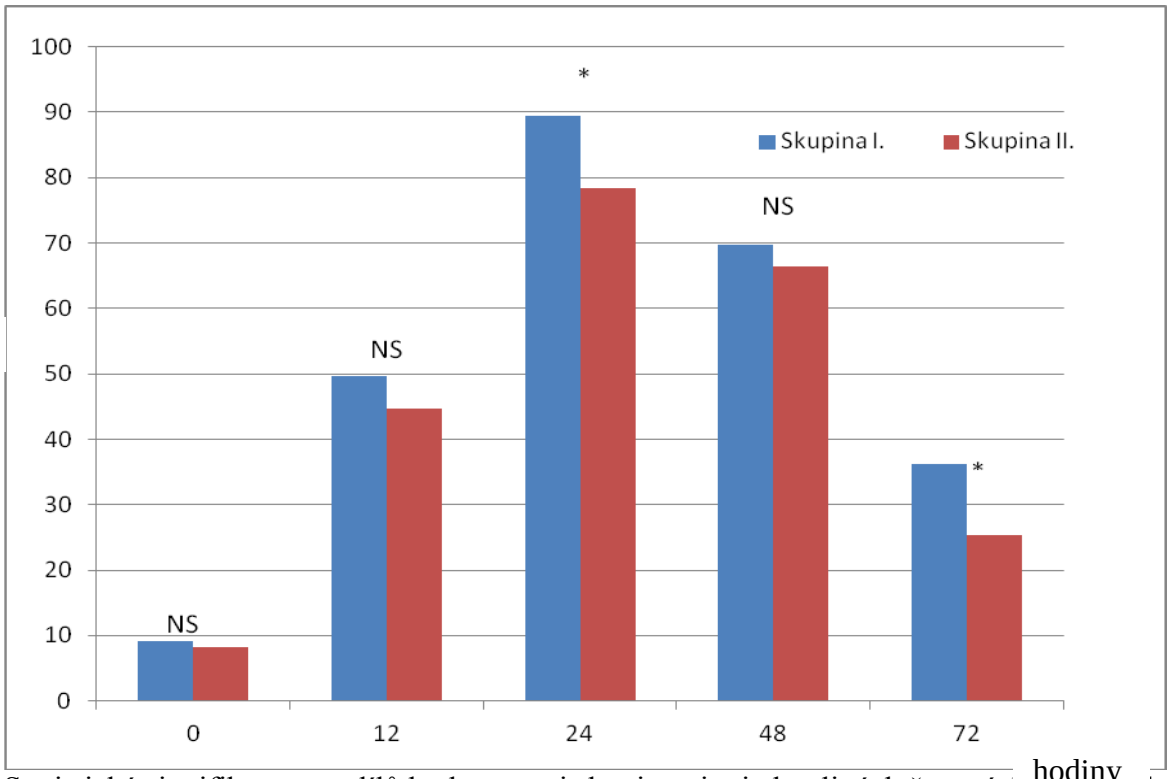
Obr. 2 Sérové koncentrace leptinu v před a pooperačním údobí v obou sledovaných skupinách (průměrné hodnoty)



Statistická signifikance rozdílů hodnot mezi skupinami v jednotlivých časových (před- a post) operačně

NS	nesignifikantní
*	$p<0,05$
**	$p<0,02$
***	$p<0,01$

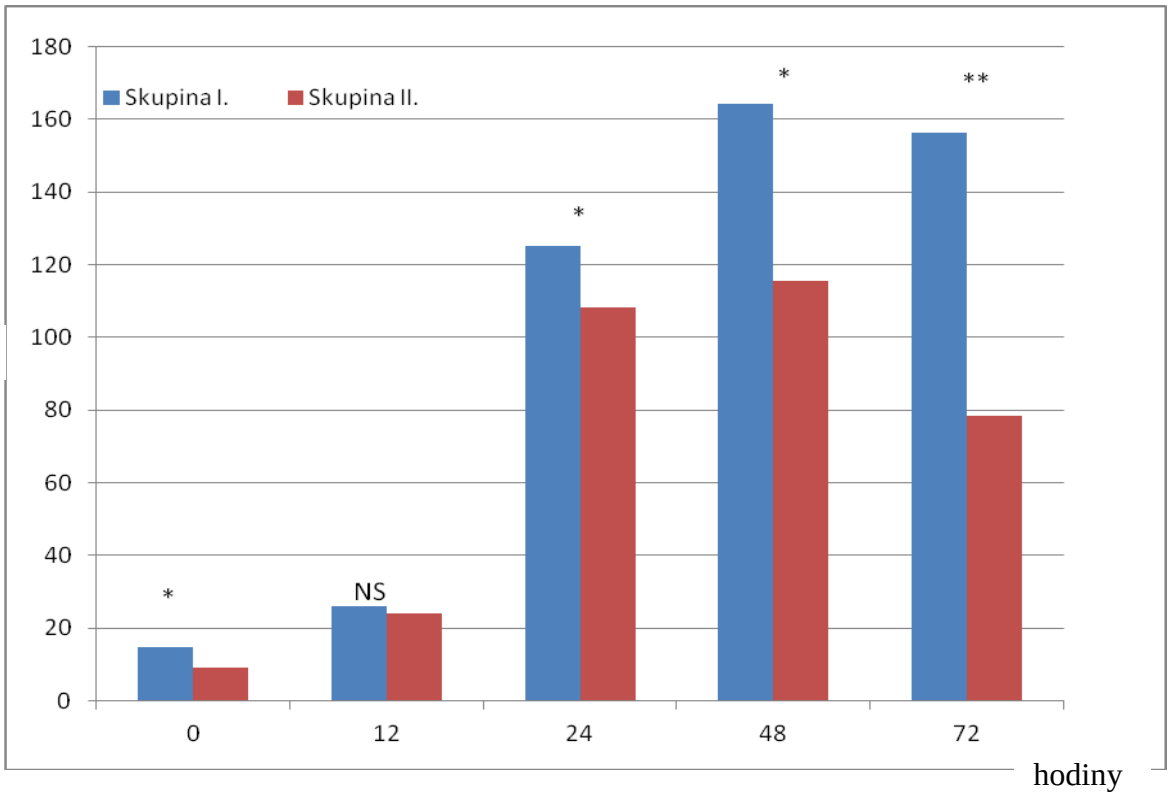
Obr. 3 Sérové koncentrace TNF-α v před a pooperačním údobí v obou sledovaných skupinách (průměrné hodnoty)



Statistická signifikance rozdílů hodnot mezi skupinami v jednotlivých časových (před- a post) operačně

NS nesignifikantní
* p<0,05
** p<0,02
*** p<0,01

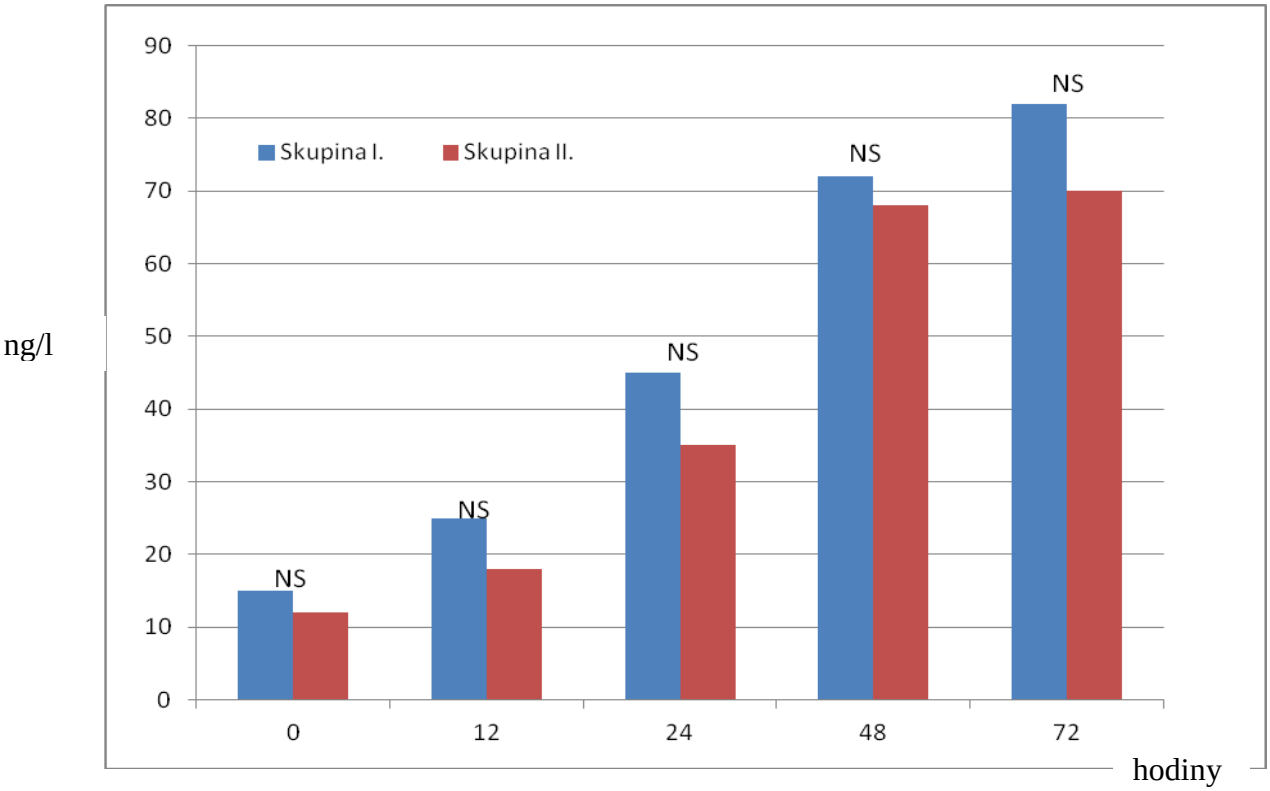
Obr. 4 Sérové koncentrace IL-6 v před a pooperačním údobí v obou sledovaných skupinách (průměrné hodnoty)



Statistická signifikance rozdílů hodnot mezi skupinami v jednotlivých časových periodách (před- a post) operačně

NS	nesignifikantní
*	p<0,05
**	p<0,02
***	p<0,01

Obr. 5 Sérové koncentrace CRP v před a pooperačním údobí v obou sledovaných skupinách (průměrné hodnoty)



Statistická signifikance rozdílů hodnot mezi skupinami v jednotlivých časových periodach (před- a post) operačně

NS	nesignifikantní
*	p<0,05
**	p<0,02
***	p<0,01

VIII. Publikace č. 3

Metabolismus svalu a tuku u obézních po transplantaci ledviny: neprokázán vliv peritoneální dialýzy nebo hemodialýzy

Úvod

Obezita je jednou z nejčastějších komplikací po transplantaci ledviny a výrazně ovlivňuje dlouhodobý výsledek a funkci. Jedná se zejména o nitrobřišní (abdominální) typ obezity a postihuje ženy i muže ve zhruba 25-35% v prvním roce po transplantaci. Úspěšná transplantace ledviny obnovuje renální funkci, ale v důsledku imunosupresivní léčby (především prednison) a nárůstem příjmu energie vede ke zvýšení incidence obezity a dokonce v některých případech rozvoji metabolického syndromu. Obezita je doprovázena zvýšenou lokální prozánětlivou odpovědí v tukové tkáni (zvýšená infiltrace imunokompetentních buněk), což vede ke zvýšené produkci prozánětlivých faktorů – IL-6, TNF alfa, MCP-1 atd. Zvýšené uvolňovaní prozánětlivých faktorů může vyústit v systémovou subklinickou zánětlivou odpověď a tak podporovat rozvoj inzulinové rezistence a aterosklerózy. Cévní endotelová dysfunkce může být způsobena redukcí aktivity oxidu dusnatého (NO) a zvýšenou koncentrací cirkulujícího inhibitoru NO syntázy - asymetrického dimethylargininu (ADMA). Pokles hladin ADMA po transplantaci ledviny je spojen se zlepšenou endoteliální funkcí. Naproti tomu, adiponektin, jakožto nejhojnější protein tukové tkáně má funkci protizánětlivou a antiaterogenní. U neobézních pacientů po transplantaci se hladina adiponektinu bezprostředně zvyšuje. Některé studie u pacientů s chronickým selháním ledvin prokázaly, že peritoneální dialýza (PD) předpovídá lepší přežití pacientů v prvních 2 letech po transplantaci než pacientů na hemodialýze. Jiné závěry retrospektivních studií posuzujících benefit PD nebo HD na potransplantační vývoj jsou ovšem protikladné.

V naší studii jsme porovnávali nálezy obézních a neobézních pacientů po transplantaci ledviny. Ověřovali jsme hypotézu, zda jsou rozdíly mezi obézními a neobézními pacienty při předchozí léčbě PD nebo HD. Rovněž jsme hodnotili, zda může tuková tkáň přispět k systémové zánětlivé odpovědi zvýšenou produkcí prozánětlivých cytokinů.

Pacienti a metodika

Sledovali jsme celkem 70 pacientů po transplantaci ledviny po dobu 12 měsíců. U 30 pacientů došlo k rozvoji obezity (skupina I), 40 pacientů bylo neobézních (skupina II), bez rozdílu předtransplantační léčby PD nebo HD. Všichni pacienti dostávali standardní imunosupresivní léčbu (cyklosporin A nebo takrolimus a mykofenolát mofetil, s přidáním prednisonu v brzkém potransplantačním období). Statisticky se nelišily HLA typizací, věkem, pohlavím, trváním předchozí dialýzy. Pacienti byli hodnoceni antropometricky v základním čase (po transplantaci) a za 12 měsíců.

Ke stanovení hladin ADMA byl použit ELISA kit (DLD Diagnotic GmbH, Hamburg, Německo) a AUTO-EIA II (Labsystems Oy, Espoo, Finsko) ke kvantifikaci ADMA.

Sérové hladiny adiponektinu byly měřeny komerčním ELISA kitem (BioVendor, Brno, Česká republika, Linco Research, St.Charles, MI, USA). Sérové hladiny IL-6, TNF α, MCP-1 byly stanoveny použitím adipokine Lincoplex kit Luminex 200 (Linco research). Koncentrace CRP ultrasenzitivní metodou CRP ELISA kit (DSL, Oxon, United Kingdom). Visfatin byl stanoven enzymatickou imunoesejí (ELISA kit BioVisionResearch Product, Mountain view, CA, USA). Glomerulární filtrace byla stanovena clearance inulinu.

Další standardní biochemické parametry byly stanoveny na přístroji Olympus (Diagnostica GbmH, Hamburk, Německo). Sérový inzulín byl měřen pomocí RIA (Cis Bio Int, Lyon, Francie) glykovaný hemoglobin (HbA1c) pomocí kapalinové chromatografie na Tosohi HLC-723 G7 (Shiba, Minato-ku, Tokio, Japonsko).

Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byl použit software Sigmastat (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Párový t-test a dvou výběrový t-test byly použity pro porovnání výsledků u obou skupin pacientů. Výsledky byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$.

Výsledky

Skupina I měla signifikantně vyšší sérové hladiny ADMA, leptinu, visfatinu, TNF α, MCP-1, IL-6, HbA1c, LDL cholesterolu, triglyceridů a inzulinu a hsCRP než kontrolní skupina II. Dále byly rozdíly v proteinurii, která byla rovněž signifikantně vyšší u skupiny I.

Diskuse

Některé studie u pacientů s chronickým selháním ledvin prokázaly, že peritoneální dialýza (PD) předpovídá lepší přežití pacientů v prvních 2 letech po transplantaci než pacientů na hemodialýze. Závěry jiných retrospektivních studií posuzujících benefit PD nebo HD na potransplantační vývoj jsou ovšem protikladné.

V naší studii jsme analyzovali potransplantační obezitu v obou skupinách (PD a HD) 12 měsíců po transplantaci ledviny.

Tuková tkáň je důležitým endokrinním orgánem produkujícím množství hormonů a cytokinů, včetně prozánětlivých faktorů jako IL-6, TNF α, MCP-1. Mimoto produkce prozánětlivých cytokinů je zvýšena u obézních pacientů, naznačujícím vliv těchto faktorů na rozvoj inzulinové rezistence a cévních chorob. Tuková tkáň obézních pacientů je zvýšeně infiltrována imunokompetentními buňkami, které se stávají hlavním producentem prozánětlivých cytokinů.

Zvýšená hladina cirkulujících prozánětlivých cytokinů po transplantaci ledviny je doprovázena sníženou hladinou adiponektinu, hormonu tukové tkáně s protizánětlivým a antiaterogenním vlivem.

Visfatin je nedávno rozpoznaný cytokin se zvýšenou produkcí ve viscerálním tuku, patří mezi prozánětlivé cytokiny a podílí se na rozvoji systémové zánětlivé odpovědi. Monitoraci sérových hladin visfatinu jsme se podrobně věnovali v naší další studii.

Souhrn

Naše prospektivní studie analyzovala určené adipocytokiny: adiponektin (ADPN), leptin, visfatin a asymetrický dimethylarginin v plazmě u pacientů po transplantaci ledviny po předchozí léčbě peritoneální dialýzou nebo hemodialýzou. Bylo sledováno celkem 70 pacientů 12 měsíců po transplantaci. U 30 pacientů se rozvinula obezita (skupina I), 40 bylo neobézních (skupina II). Všichni pacienti dostávali standardní imunosupresivní léčbu (cyklosporin A nebo takrolimus a mykofenolát mofetil, s přidáním prednisonu v brzkém potransplantačním období). Statisticky se nelišily HLA typizací, věkem, pohlavím, trváním předchozí dialýzy. Na konci studie byly signifikantní rozdíly mezi skupinami v plazmatických hladinách - ADPN, visfatinu, ADMA, leptinu. Vzestup tělesného tuku po transplantaci ledviny byl spojen se zvýšením ADMA, leptinu, TNF α, MCP-1 a visfatinu a poklesem

adiponektinu. Naše studie neprokázala dlouhodobý význam peritoneální dialýzy nebo hemodialýzy v rozvoji potransplantační obezity.

Závěr

Naše data ukazují, že exprese prozánětlivých cytokinů je zvýšena u obézních osob po transplantaci ledviny a není závislá na předchozím typu léčby - peritoneální dialýza nebo hemodialýza. Sérové hladiny některých prozánětlivých cytokinů byly u obézních pacientů signifikantně vyšší a rovněž byla více vyjádřena inzulínová rezistence.

Význam peritoneální dialýzy na rozvoj potransplantační obezity nebyl v naší studii potvrzen.

IX. Publikace č. 4

Časný pohybový režim snižuje asymetrický dimetylarginin a ovlivňuje hladiny cytokinů u pacientů po transplantaci ledviny

Úvod

Pacienti po transplantaci ledvin mají zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění a úmrtí. Cévní změny mohou být spojeny s omezenou biologickou aktivitou oxidu dusnatého (NO) a zvýšením koncentrací cirkulujícího endogenního inhibitoru NO syntázy asymetrického dimetylargininu (ADMA), markeru endoteliální dysfunkce u onemocnění ledvin. Zvýšení hladiny ADMA souvisí se sníženou funkcí ledvin. Z přibližně 300 mmol (60 mg) ADMA za den je kolem 50 mmol vylučováno močí, a proto se hladina ADMA zvyšuje u pacientů se selháním ledvin. Transplantace ledvin normalizuje hladinu symetrického dimetylargininu (SDMA), zatímco hodnota ADMA zůstává zvýšena. Důvodem může být snížené odbourávání ADMA v ledvinách (alterovaná činnost enzymu dimetylarginin dimetylaminohydrolázy (DDAH)) a/nebo jeho zvýšená tvorba.

Zatím je málo dokladů o dalším ovlivnění ADMA farmakoterapií. Údaje o účinku inhibitorů angiotenzin-konvertujícího enzymu či blokátorů receptorů pro angiotenzin II jsou protichůdné, nicméně o perorálních antidiabetikách (např. metforminu či glitazonu) se předpokládá, že by prostřednictvím zlepšení inzulinové rezistence mohly snížit hladiny ADMA. Tento účinek pravděpodobně vyplývá ze zvýšení DDAH. U netransplantovaných pacientů jsou plazmatické koncentrace ADMA vyšší u obézních inzulín-rezistentních jedinců a hubnutí bylo spojeno se snížením plazmatických koncentrací ADMA. Vysoce zvýšené koncentrace ADMA u morbidně obézních pacientů [body mass index (BMI) > 35 kg/m2] se významně snížily po bariatrické gastroplastice, jež vedla ke snížení tělesné hmotnosti. Vyšší koncentrace ADMA byly opakovaně popsány v situacích zvýšeného kardiovaskulárního rizika. Dle zvýšení hladiny ADMA lze předpovědět riziko kardiovaskulárních příhod u pacientů se selháním ledvin, především u mužů s již přítomnou ischemickou chorobou srdeční.

Pacienti po transplantaci ledviny mají známky významné endoteliální dysfunkce a také významně vyšší hladiny ADMA, než je tomu u zdravých osob se srovnatelnou renální funkcí. Tento nález by mohl výrazně přispět k vysoké kardiovaskulární morbiditě a mortalitě. Po úspěšné transplantaci ledviny s rozvojem renální funkce sice ADMA klesá ve srovnání s hodnotami u dialyzovaných nemocných, ale zůstává trvale významně vyšší. Na tom se mohou podílet i další faktory, z nichž velmi důležitou roli hraje přírůstek tukové tkáně - především viscerálního tuku - po transplantaci.

Tuková tkáň vylučuje řadu hormonů a cytokinů, které jsou považovány za klíčové při vzniku inzulinové rezistence a endoteliální dysfunkce. Mění se i hladina adiponektinu (ADPN), jenž má naopak předpokládané účinky antiaterosklerotické a protizánětlivé. U neobézních pacientů po úspěšné transplantaci ledviny jeho zvýšená hladina může částečně snížit riziko endoteliální dysfunkce. Bylo prokázáno, že pravidelné aerobní cvičení významně zlepšuje vazodilataci závislou na funkci endotelu u kardiologických nemocných. Pravidelná tělesná aktivita ovlivňuje pozitivně endoteliální dysfunkci i u nemocných s chronickým onemocněním ledvin a u pacientů na dialýze se zvýšeným kardiovaskulárním rizikem. Lze proto předpokládat pozitivní vliv i u transplantovaných pacientů. Dosud však nebyly publikovány žádné relevantní údaje podporující tuto hypotézu.

Cílem naší práce bylo proto charakterizovat a zhodnotit plazmatické hladiny ADMA ve vztahu k ostatním rizikovým faktorům u příjemců transplantované ledviny před pravidelným fyzickým cvičením a po jeho ukončení. Současně jsme vyšetřili vybrané adipocytokiny (ADPN, leptin, rezistin a visfatin), cytokiny tumor nekrotizujícího faktoru α (TNFα) a C-reaktivní protein (CRP), které by mohly být cvičením ovlivněny. Dále vybrané parametry metabolizmu lipidů a sacharidů spolu s hodnocením renální funkce clearancovými metodami.

Pacienti a metodika

Do prospektivní randomizované studie bylo zařazeno celkem 128 nemocných po 1. transplantaci kadaverózní ledviny, která byla provedena v Transplantcentru Institutu klinické a experimentální medicíny Praha od 1. 9. 2009, z toho 68 randomizovaně vybraných pacientů (skupina I, 36 mužů a 32 žen, průměrný věk 58 ± 7,2 let, rozmezí 25 až 71 let, střední věk 54,0 let) souhlasilo s účastí v kontrolovaném aerobním cvičebním programu s nutriční edukací po dobu 6 měsíců od transplantace ledviny. Randomizace byla provedena standardní metodou výběru dle data narození. Kontrolní skupinu tvořilo 60 nemocných (skupina II, 30

mužů a 30 žen) po transplantaci ledviny, srovnatelných z hlediska věku, pohlaví, HLA typizace, délky předchozí dialýzy, anamnézy kardiovaskulárních onemocnění a imunosupresivního režimu, kteří nepodstoupili pravidelný cvičební režim spojený s nutriční edukací. Sběr dat pacientů byl dokončen 31. 10. 2011.

Pacienti byli vyšetřeni a sledováni na metabolickém oddělení a v clearancové laboratoři Kliniky nefrologie IKEM Praha se zahájením v 1. měsících po transplantaci při stabilizaci funkce transplantované ledviny po dobu 6 měsíců. Vzorky krve a moči byly vyšetřeny při zahájení studie a za 6 měsíců sledování. Funkce ledvin byla hodnocena clearancí inulinu a kreatininu.

Dlouhodobý imunosupresivní protokol zahrnoval podávání cyklosporinu (Sandimmun Neoral, Novartis, Basilej, Švýcarsko) nebo takrolimu (Prograf, Astellas, Praha, Česká republika) v dávkách odpovídajících doporučeným léčebným hladinám, dále mykofenolát mofetilu (Cellcept, HoffmannLa Roche, Basilej, Švýcarsko), 1-2 g/den a steroidů 5-10 mg/den (Prednison, Zentiva, Praha, Česká republika). Nemocní s epizodami rejekce štěpu byli vyřazeni ze studie. Z hlediska komplikujících onemocnění 4 z 68 cvičících pacientů a 3 z 60 necvičících pacientů měli již před transplantací cukrovku a byli léčeni inzulínem. V době 4 týdnů před odběrem krevních a močových vzorků žádný pacient neměl projevy akutní infekce. Všichni zařazení nemocní měli hodnotu funkce transplantované ledviny měřenou korigovanou clearancí kreatinu větší než 60 ml/min (1 ml/s). Pacienti s pozitivní anamnézou již proběhlých závažných kardiovaskulárních příhod (IM, MCP) byli z této studie vyřazeni a všichni sledovaní nemocní byli nekuřáci. Přítomná hypertenze byla léčena dle standardních postupů u nemocných po transplantaci ledviny včetně podávání ACE inhibitorů a blokátorů receptoru pro angiotenzin II. Při prokázané hyperlipidemii byly použity ve standardním postupu statiny.

Nutriční a dietologickou intervenci provedla zkušená nutriční terapeutka standardním dotazníkem a opakovaným nutričním pohovorem u všech intervenovaných nemocných s užitím počítačového programu DIETA (IKEM Praha). Pacienti byli poučeni o doporučeném složení diety během své první návštěvy tak, aby příjem proteinů nepřesáhl hodnotu 1,2 g/kg/den a energie 30 kcal/kg/den během sledovaného údobí. Kontroly byly prováděny měsíčně v prvních 3 měsících po transplantaci a na konci sledování za 6 měsíců.

Hodnocení tělesné kondice a pravidelného cvičebního programu

Fyzická kondice byla hodnocena pomocí baterie motorických testů „Senior Fitness Tests - SFT“ (Rikli, Jones) spolu s kvalitou života hodnocenou standardizovaným dotazníkem

HRQOL SF36-Bref. Výsledky na začátku a konci sledování byly srovnávány jak se zdravou populací (populační normy), tak v obou časových periodách v intervenovaném souboru a kontrolní skupině (pre-post testy). Výkonnostní cvičení sestávalo z fáze kontrolní a testové (1. měsíc), kontrolně edukační (kontrolované cvičení po dobu 3 měsíců) a pokračující individuální pohybové aktivitě (další 3 měsíce), a to převážně formou cyklických opakovaných cviků (stationary cycling). Každá cvičební aktivita trvala 1 hod a zátěž byla postupně individuálně zvyšována k dosažení požadovaného rozmezí cvičební zátěže. Po 3-5 min úvodního rozcvičení (warmup) byla tak cvičební zátěž zvýšena až do srdeční frekvence 60-70 % dříve zjištěné hodnoty rozdílu mezi klidovým režimem a maximální individuální tolerovanou srdeční frekvencí. Tato zátěž trvala minimálně 40 min s následujícím 5minutovým uvolněním (cooldown). Frekvence cvičebního režimu s edukací byla během prvních 2 týdnů od zahájení cvičebně - edukačního programu 2x týdně, v následujícím údobí 3x týdně. Celý výcvik byl veden zkušenou fyzioterapeutkou pod dohledem lékaře. Pacienti byli po poučení a kontrole oprávněni provádět další tréninkový program doma, ale dodržování garantovaných školení muselo mít při kontrole více než 60% complianci.

Antropometrické vyšetření, odběry vzorků a clearancové metody

Antropometrické vyšetření pacientů byla provedena za bazálního stavu na začátku a na konci studie. Všichni pacienti byli standardně změřeni a zváženi s výpočtem BMI. Krevní vzorky pro stanovená měření byly odebrány v 1. měsíci po transplantaci při obnově funkce transplantované ledviny a za 6 měsíců po transplantaci. Funkce ledvin byla vyšetřena v clearancové laboratoři metabolického oddělení Kliniky nefrologie IKEM Praha za použití metodiky clearance inulinu/polyfruktosanu (Cin) a současně i korigované clearance kreatininu (Ckr) technikou se sběrem moči. Přesné měření Cin vyžaduje stabilní plazmatickou koncentraci inulinu pro odběry vzorků krve a moči během vyšetření. K zajištění adekvátní diurézy je nutné předchozí zavodnění 0,5–1,0 l vody 1 hod před začátkem vyšetření. Renální clearance inulinu byla měřena s plazmatickou hladinou inulinu mezi 20–30 mg/100 ml. Té bylo dosaženo počátečním podáním inulinu/polyfruktosanu i.v. v dávce vypočítané dle hmotnosti nemocného a jeho renální korigované clearance kreatininu s následující udržovací infuzí inulinu/polyfruktosanu. Po ekvilibrační periodě 60 min se vzorky krve a moči odebírají na začátku, uprostřed a na konci dalšího 60minutového údobí. Korigovaná clearance kreatininu vyžaduje přesný sběr moči za 24 hod a 2 vzorky žilní krve na začátku a na konci sběrného období.

Biochemické analýzy

Pro stanovení ADMA byly krevní vzorky odebrány do vakuet s etylendiamintetraoctovou kyselinou a krev byla okamžitě centrifugována při 3 600 otáčkách a 3 G po dobu 5 min při 20°C. Všichni pacienti byli nalačno po dobu nejméně 10 hod před odběrem vzorků, aby se zabránilo vlivu metioninu z potravy na koncentraci ADMA. ADMA byla stanovena metodou ELISA (Kit ADMA, ELISA, DLD Diagnostika GmbH, Hamburk, Německo) a AUTO-EIA II readeru (Labsystems Oy, Espoo, Finsko). Tato kompetitivní metoda používá mikrotitrační desky. ADMA je vázána na pevnou fázi a acetylovaná ADMA ve vzorcích kompetuje s navázanou ADMA s užitím králičího antiséra proti ADMA. Poté je vázaná protilátka detekována antikráličí peroxidázou. Výsledný produkt této reakce je sledován při 450 nm. Množství protilátek je nepřímo úměrné koncentraci ADMA vzorku.

Stanovení adiponektinu (ADPN) bylo provedeno radioimunoesejí ze 2 vzorků krve po předchozím 12hodinovém lačnění (Human adiponektin RIA Kit, Dinco Research, Inc, St. Char- les, MO, USA). Pro zhodnocení výsledků u obou skupin (cvičící a necvičící) bylo nutné měřit vzorky ve stejnou dobu. Sérový leptin a rozpustný/solubilní leptinový receptor (ObRe) byly měřeny komerční imunoesejí (Bio-Vendor, Praha, Česká republika). Sérové koncentrace TNFα byly stanoveny s užitím adipokine LINCOplex kitu s Luminexem 200 (Linco Research). Sérová koncentrace C reaktivního proteinu (CRP) byla měřena vysoce senzitivním CRP ELISA kit (DSL, Oxon, UK). Sérový visfatin metodou ELISA (Bio Vision Research Products, Mountain View, USA). Inulin (polyfruktosan S) byl analyzován metodou s antronem na spektrofotometru při vlnové délce 580 nm (Antelie Light Secoman, Domond Cedex, Francie).

Celkový cholesterol, HDL cholesterol a triglyceridy byly stanoveny pomocí enzymatické kolorimetrické metody na přístroji Olympus AU 600 (Olympus Diagnostics, GmbH, Hamburk, Německo). Hladina LDL cholesterolu byla vypočtena z Friedewaldova vzorce. Sérové koncentrace inzulínu byly měřeny pomocí RIA (CisBio International, Lyon, Francie), glykovaného hemoglobinu (HbA1c) byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie na Tosoh HLC-723 G7 (Shiba, Minato-ku, Tokio, Japonsko) a proteinurie na 24 hod fotometricky s pyrogallolovou červení pomocí systému Olympus 800 (Hamburk, Německo).

Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byl použit software SigmaStat (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Párový t-test a dvou výběrový t-test byly použity pro porovnání výsledků u obou skupin pacientů. Výsledky byly považovány za statisticky významné při $p < 0,05$.

Výsledky

Základní klinické charakteristiky obou skupin pacientů po transplantaci ledviny jsou uvedeny v tab. 1. Skupiny se významně nelišily s ohledem na věk, pohlaví, HLA typizaci či imunosupresivní léčbu. V porovnání s kontrolní skupinou II měli pacienti ve skupině I po 6 měsících pravidelného cvičebního tréninku významně nižší sérové hladiny ADMA a leptinu. Naopak hladiny ADPN a rozpustného/solubilního leptinového receptoru byly zvýšeny (vše $p < 0,01$). Cvičební režim byl spojen s mírným, leč signifikantním snížením sérové hladiny rezistinu ($p < 0,025$) a visfatinu ($p < 0,05$). Snížily se i parametry prozánětlivých cytokinů (CRP $p < 0,025$ a TNFα $p < 0,05$). Současně bylo zaznamenáno i snížení některých parametrů lipidového a sacharidového metabolizmu (celkový cholesterol, LDL cholesterol, triacylglyceroly, HbA1c a inzulinu, $p < 0,05$), zatímco hladiny HDL cholesterolu zůstaly nezměněny. Pohybový režim ovlivnil též snížení BMI ($p < 0,02$). Během 6 měsíců sledování se funkce ledvin měřená inulinovou a kreatininovou clearancí signifikantně nezměnila.

Diskuze

V předchozích studiích bylo prokázáno, že pravidelná aerobní fyzická aktivita vede u nemocných s ICHS a diabetem ke zlepšení na endotelu dependentní vazodilataci, a tím ke snížení kardiovaskulárního rizika nemocných. Vliv programu aerobního cvičení ale může být přechodný a jeho účinek zmizí s ukončením pravidelné fyzické aktivity. Pravidelná tělesná aktivita pozitivně ovlivňuje přítomnou endoteliální dysfunkci i u nemocných s chronickým onemocněním ledvin a v dialyzačním programu. Zvýšené kardiovaskulární riziko spojené se zvýšenou koncentrací ADMA zůstává i po úspěšné transplantaci ledviny. Nejčastější příčinou úmrtí po transplantaci ledviny jsou kardiovaskulární příhody a jejich riziko je mnohonásobně vyšší ve srovnání se zdravými osobami. Časná pohybová rehabilitace však toto riziko významně snižuje. Bazální produkce NO je snížena u těchto pacientů stejně jako u

nemocných s diabetem a na endotelu závislá vazodilatace v reakci na acetylcholin je podobná jako u zdravých kontrol.

Nedávná studie u nemocných s chronickou renální insuficiencí (CHRI) ukázala, že ADMA souvisí s bazální produkcí NO, ale není závislá na acetylcholinem indukované vazodilataci. Zvýšené hladiny ADMA v naší studii představují marker či mediátor snížené bazální produkce NO, kterou lze zlepšit aerobním cvičením. Zvýšení ADMA souvisí s vyšším rizikem vzniku akutních koronárních příhod u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a kardiovaskulárních příhod po perkutánní koronární intervenci. U pacientů s diabetickou nefropatií je zvýšená ADMA spojena se zvýšenou prevalencí kardiovaskulárních příhod. Naopak snížení ADMA pravidelným aerobním cvičením tak může přispět ke snižování kardiovaskulárního rizika u pacientů po transplantaci ledvin. Je zajímavé, že snížení hladiny ADMA bylo spojeno i se změnami v klasických rizikových faktorech metabolizmu lipidů a sacharidů. Navíc opětné zvýšení hladiny ADMA po ukončení cvičebního programu naznačuje, že je třeba dlouhodobé fyzické aktivity pro udržení nižšího kardiovaskulárního rizikového profilu. Potvrzení předpokladu, že snížená koncentrace ADMA je spojena se sníženou kardiovaskulární morbiditou, vyžaduje proto delší sledování s klinickou kontrolou.

Na rozdíl od našich nálezů studie u pacientů s chronickým srdečním selháním ukazují, že hladina ADMA u těchto nemocných nemusí být vždy ovlivněna aerobním cvičením. V této studii ale hladiny ADMA u pacientů i kontrol byly podobné před zahájením cvičebního programu, a tedy normální koncentrace ADMA již nebyla cvičením dále snižována. V lidském těle ADMA vzniká především metylací L-argininu metyltransferázami. Celková degradace ADMA dimetylaminohydrolázou (DDAH) významně determinuje zvýšení koncentrace ADMA, zatímco podíl degradace ledvinami je považován za méně důležitou cestu eliminace. SDMA není metabolizován DDAH a je vylučován pouze ledvinami.

Mechanizmy účinku cvičení vedoucí ke snížení ADMA však nelze přímo uzavřít z výsledků naší studie. Není pravděpodobné, že změny ve funkci ledvin, které se rovněž týkaly ovlivnění endoteliální funkce, rozhodujícím způsobem vedly ke snížení ADMA v plazmě, protože inulinová a kreatininová clearance zůstaly v normálním rozmezí u pacientů po transplantaci a nelišily se na konci sledovaného údobí. Je pravděpodobné, že pravidelné aerobní cvičení může mít vliv i na antioxidační stav organizmu prostřednictvím zvýšené exprese superoxid dismutázy a zlepšení antioxidačního statusu souvisí s redukcí ADMA.

Studie in vitro prokázala, že glukóza může snížit činnost DDAH. Nicméně, změny v metabolizmu sacharidů v naší studii byly jen na hranici statistické signifikance. Pouze mírné zlepšení kompenzace diabetu je v souladu s předchozími výsledky ukazujícími, že tělesná

aktivita neznamená automaticky zlepšení kompenzace diabetu u pacientů po transplantaci ledvin bez upravené diety. Krevní lipidy se mírně zlepšily po 6 měsíčním tréninku a také jejich spojení se změnami ADMA nelze vyloučit.

Změny v ADMA však mohou být zcela nezávislé, jak bylo zjištěno v několika dalších studiích. Studie u nemocných po transplantaci ledviny prokázaly, že s rozvojem funkce ledvin se původně vysoká koncentrace ADMA snižuje, ale tyto hodnoty zůstávají 2-3krát vyšší ve srovnání se netransplantovanými jedinci se stejnou úrovní glomerulární filtrace. U pacientů po transplantaci užívajících dlouhodobě imunosupresi můžeme uvažovat o vlivu těchto léků především s ohledem na jejich vedlejší metabolický účinek (inzulínová rezistence se sníženou aktivitou DDAH po podání steroidů). Protokol studie nedovolil srovnat účinky cyklosporinu A a takrolimu. Dřívější údaje naznačují, že inhibitory kalcineurinu mohou vyvolat endoteliální dysfunkce u pacientů po transplantaci ledvin, pravděpodobně potlačením syntézy NO. Podle našich výsledků hladiny ADMA byly signifikantně vyšší u obézních pacientů po transplantaci ledvin, ačkoli imunosupresivní režimy byly srovnatelné v obou skupinách. Pravděpodobné vysvětlení souvisí s významnými rozdíly v tukové hmotě spojené se zvýšenou tvorbou adipocytokinů.

Vývoj proteinurie po transplantaci ledvin také částečně souvisí s endoteliální dysfunkcí pří zvýšené úrovni ADMA. Obezita a redukce hmotnosti byly spojeny se změnami funkce endotelu. Klinické studie prokázaly snížení NO-dependentní vazodilatace u obézních osob ve srovnání s osobami neobézními. Je proto možné, že zvýšené koncentrace ADMA by mohly přispět k rozvoji endoteliální dysfunkce u obezity.

Vliv předepsané diety nelze zcela vyloučit jako důvod pro zvýšení ADMA. Nicméně zvýšený příjem sacharidů je spojen se snížením koncentrace ADMA, zatímco vliv příjmu bílkovin a tuků na ADMA nebyl prokázán. Vliv antihypertenzní léčby na hladiny ADMA není dosud zcela objasněn. Dlouhodobá léčba s užitím ACE inhibitorů vedla ke snížení plazmatické koncentrace ADMA. Vyloučení pacientů s antihypertenzní léčbou ze statistického hodnocení však nezměnilo výsledky, a nemělo tak významný vliv na ovlivnění hladiny ADMA. Vliv na zvýšené riziko kardiovaskulárního onemocnění u nemocných v CHRI a po transplantaci ledviny mohou mít i další faktory.

CHRI je často spojena s vyšší plazmatickou hladiny adiponektinu. Důvody pro toto zvýšení nejsou zcela jasné, lze však předpokládat roli porušené metabolické degradace. Po úspěšné transplantaci ledvin hladina adiponektinu může mírně klesat, což podporuje představu o podílu ledvin na jeho biodegradaci a eliminaci. Jasná korelace mezi změnou funkce ledviny a snížení plazmatického adiponektinu nebyla v naší studii prokázána. Tyto

údaje podporují názor, že hladinu adiponektinu ovlivňují další faktory, především obsah tukové tkáně a přítomnost chronického zánětu.

Snížení zánětlivých parametrů po transplantaci i v souvislosti s cvičebním režimem by tak mohlo ovlivnit hladinu ADPN. U leptinu jsme zjistili jeho pokles po cvičebním režimu se současným zvýšením hladin solubilního leptinového receptoru. Rezistin byl původně objeven v tukových buňkách a jeho hladina byla zvýšena při obezitě. Jeho významná role však může být v jeho prozánětlivých účincích. Jeho pokles v naší studii mohl souviset s poklesem prozánětlivých markerů po pravidelném cvičení.

Visfatin je novým adipocytokinem, který je zvýšen ve viscerálních tukových buňkách. Visfatin má kromě energetického metabolizmu svoji roli v přirozené imunitě a zánětu. V posledních několika letech byl objeven jeho prozánětlivý až tkáň destruktivní účinek. Jeho pokles by mohl souviset se snížením celkové prozánětlivé aktivity po pravidelném cvičení.

Limitem naší studie je nemožnost srovnání výsledků cvičení u nemocných s CHRI a u transplantovaných nemocných bez imunosupresivní léčby. Také role obezity ve skupině necvičících nemocných nebyla podrobněji analyzována. Soubor nemocných po transplantaci ledviny byl heterogenní z hlediska základní diagnózy ledvinového selhání (diabetes mellitus v 7 případech). Naši pacienti neměli klinické projevy závažné ateroskleróz a vztahy mezi ADMA a kardiovaskulární morbiditou byly popsány především u pacientů s manifestním cévním onemocněním. Je tedy zřejmé, že cvičení může snížit ADMA po transplantaci ledvin především u kardiovaskulárních pacientů. Kromě toho není v současné době známo, zda ADMA může být dále snížena u jinak zdravých osob nebo je-li snížení pod normální hodnoty výhodné pro endoteliální funkci.

Souhrn

Hladiny endogenního inhibitoru NO syntázy asymetrického dimetylargininu jsou zvýšeny u pacientů po transplantaci ledvin a mohou významně přispět k cévním komplikacím. V této studii jsme testovali hypotézu, zda pravidelné fyzické cvičení započaté po transplantaci ledviny může snížit zvýšené hladiny asymetrického dimetylargininu. Současně jsme vyšetřili vybrané cytokiny a metabolické parametry. V prospektivní randomizované studii byly vyšetřeny plazmatické vzorky pro analýzu asymetrického dimetylargininu, adiponektinu, leptinu, rozpustného receptoru pro leptin, rezistinu, visfatinu, CRP, TNFα a další vybrané parametry lipidového a sacharidového metabolizmu u pacientů po 1. kadaverózní transplantaci ledviny. Vzorky byly odebrány před zahájením cvičení v 1. měsíci po

transplantaci při již stabilní funkci transplantované ledviny a kontrolní odběry za 6 měsíců od zahájení. Kontrolní skupinu tvořilo 60 transplantovaných pacientů (skupina II).

Na začátku sledovaného údobí nebyly mezi oběma skupinami zjištěny signifikantní rozdíly v hladinách asymetrického dimetylargininu. Po 6měsíčním pravidelném cvičebním programu hladiny asymetrického dimetylargininu ve skupině I významně poklesly (z 3,5 ± 0,45 na 2,11 ± 0,35 μmol/l, $p < 0,01$) a byly také signifikantně nižší ve srovnání s kontrolní skupinou II (2,11 ± 0,23 vs 3,25 ± 0,34 μmol/l,$p < 0,01$). Byly zjištěny i další signifikantní změny ve skupině I v následujících sledovaných parametrech: adiponektin (z 14,6 ± 6,6 na 22,3 ± 6,2 mg/ml, $p < 0,01$), leptin (z 51,3 ± 11,2 na 20,3 ± 9,2 ng/l, $p < 0,01$), rozpustný/solubilní receptor pro leptin (z 24,6 ± 8,4 na 46,1 ± 11,4 U/ml, $p < 0,01$), rezistin (z 20,8 ± 10,1 na 14,6 ± 6,4 mg/ml, $p < 0,025$) a visfatin (z 1,8 ± 0,2 na 1,2 ± 0,01 ng/ml, $p < 0,05$). Současně byly ovlivněny i parametry lipidového a sacharidového metabolizmu (celkový a LDL-cholesterol, triacylglyceroly, HbA1c, hladina inzulínu), jakož i hladiny prozánětlivých cytokinů (CRP a TNFα).

Zvýšená hladina asymetrického dimetylargininu a vybrané adipocytokiny byly u pacientů po transplantaci ledviny signifikantně ovlivněny časným pravidelným pohybovým režimem. Cvičební režim může významně snížit i riziko kardiovaskulárních onemocnění po transplantaci ledviny.

Závěr

Závěry studie lze shrnout tak, že u pacientů časně po transplantaci ledviny pravidelná fyzická aktivita po dobu 6 měsíců snížila zvýšené koncentrace ADMA, ovlivnila adipocytokiny a další rizikové faktory pro rozvoj kardiovaskulárního onemocnění. Získané výsledky však musí být ještě potvrzeny v dlouhodobých studiích obézních pacientů a kardiovaskulárních komplikací po transplantaci ledviny.

Tabulka 1: Klinické a laboratorní parametry v souboru transplantovaných nemocných. Skupina IA – cvičící pacienti před zahájením cvičebního programu, skupina IB – cvičící pacienti po 6 měsících cvičebního programu, skupina II – kontrolní skupina necvičících pacientů na konci sledování za 6měsíců

Parametr	**Skup IA.**	**Skup IB.**	**Skup II.**	**Statistická signifikance Sk IA vs Sk IB**	**Statistická signifikance Sk IB vs Sk II.**
Počet pacientů	68	68	60	NS	NS
Pohlaví (M/Ž)	36/32	36/32	30/30	NS	NS
Věk (roky)	58±7,2	58±7,2	55±8,4	NS	NS
BMI (kg/m^2)	24,4±3,3	26,6±4,2	32,0±3,1	NS	p<0,02
Cl $_{in}$ (ml/min/1,73 m^2)	58,6±10,2	60,1±8,7	58,2±8,0	NS	NS
Cl $_{kr}$ (ml/min/1,73 m^2)	72,4±7,4	74,2±6,6	68,4±7,4	NS	NS
ADMA (umol/l)	3,50±0,45	2,11±0,35	3,25±0,34	p<0,01	p<0,01
ADPN (ug/ml)	14,6±6,6	22,3±6,2	17,6±4,4	p<0,01	p<0,01
Leptin (ng/l)	51,3±11,2	20,3±9,2	45,4±10,2	p<0,01	p<0,01
Solubilní leptinový receptor (U/ml)	24,6±8,4	46,1±11,4	18,4±6,6	p<0,01	p<0,01
Rezistin (ug/ml)	20,8±10,1	14,6±6,4	18,4±6,6	p<0,025	NS
Visfatin (ng/ml)	1,8±0,2	1,2±0,1	1,6±0,4	p<0,05	NS
Cholesterol (mmol/l)	6,1±2,1	5,4±2,2	5,9±0,4	p<0,05	NS
LDL-cholesterol (mmol/l)	3,9±1,1	2,6±1,9	3,5±0,2	p<0,5	NS
HDL-cholesterol (mmol/l)	1,1±0,2	1,2±0,2	1,2±0,1	NS	NS
CRP (ng/l)	15,1±4,5	10,1±2,5	12,4±4,1	p<0,025	NS
TNFα (pg/ml)	9,2±2,3	5,4±1,7	7,2±1,9	p<0,05	NS
Triglyceridy (mmol/l)	3,8±1,6	2,8±1,0	3,4±1,2	p<0,05	NS
Inzulin (pg/ml)	365,3±40,1	292,4±49,3	320,6±56,4	p<0,05	NS
HbA_{1c} (%)	5,3±1,4	4,2±1,2	5,0±1,3	p<0,05	NS

BMI – body mass index
ADPN – adiponektin
Cl in – inulinová clearance
TNFα – tumor necrosis faktor α
Cl kr – kreatininová clearance
CRP – C reaktivní protein
ADMA – asymetrický dimetylarginin
NS – nesignifikantní závislost

X. Publikace č. 5

Nutriční důsledky transplantace ledviny (ve vztahu k obezitě)

Úvod

Úspěšná transplantace ledviny vede k obnovení ledvinné funkce. Některé metabolické poruchy z důsledku předchozí snížené funkce ledvin mohou přetrvávat, některé nové se mohou rozvinout (obezita, diabetes, hypertenze, osteoporóza, anemie). Navíc vliv imunosupresivní léčby (kortikosteroidy, cyklosporin A, takrolimus a rapamycin) může zhoršit stav diabetu, hypertenze a dyslipidemie. Výživa v tomto období je rozdělena na periodu před transplantací, vlastní transplantaci a brzké a pozdní potransplantační údobí. U pacientů v pretransplantačním období na dialýze se může rozvinout bílkovinná podvýživa s negativní dusíkovou bilanci a ztrátou tělesné hmoty a zásob tuku. Výživa v brzkém potransplantačním období u funkčního štěpu zahrnuje potřebu rovnováhy přísunu tekutin a elektrolytů s příjmem bílkovin 1.2g/kg tělesné váhy a 30-35kcal/kg tělesné váhy. U nefunkčního štěpu pokračuje dialýza a dávky imunosupresiv musí být sníženy. Základní cíl pozdního potransplantačního období je udržení optimálního stavu výživy, jako důležité součásti léčby diabetu, hypertenze a hyperlipidemie. Mezi další potransplantační stavy vyžadující vyrovnanou nutriční bilanci patří sklon k hypomagnesemii, hypofosfatemii, hyperkalemii a osteoporóze.

Transplantace ledviny je nejčastější orgánová transplantace. Vyrovnaná výživa může výrazně zlepšit její výsledky. Náš článek shrnuje hlavní rizikové faktory výživy na výsledek transplantace ledviny.

Metabolická role ledvin

Úspěšná transplantace ledviny vede k obnovení ledvinných funkcí, ale některé metabolické poruchy mohou přetrvávat a některé se mohou rozvinout (diabetes, hypertenze, malnutrice, osteoporóza). Metabolická role ledviny je ovlivněna kvalitou odebraného štěpu, ischemicko-reperfuzním poškozením, brzkou potransplantační hydratací a brzkou potransplantační minerálovu bilancí (K, Mg, Na, Ca, P).

Malnutrice, změněný metabolismus bílkovin a tuků jsou spojeny se zbytkovou funkcí ledvin a typem náhrady jejich funkce.

Cíl výživy před transplantací je příjem dostatku bílkovin a energie a tak udržet svalovou hmotu, snížit riziko infekce a zlepšit hojení rány. K udržení stavby kostí je rovněž důležitý příjem vápníku a fosforu.

Pokud je transplantace nekomplikovaná, je hlavní cíl v mírně zvýšeném příjmu tekutin, úpravě hladin draslíku a acidobazické rovnováhy. Operační výkon je spojen se zvýšenou potřebou příjmu energie a bílkovin, u transplantace navíc prohloubené vysokými dávkami kortikoidů zvyšujícími katabolismus bílkovin a navozujícími negativní dusíkovou bilanci.

Hlavní cíle výživy v brzkém potransplantačním období jsou:

1.udržení bílkovin a svalové hmoty

2.podpora hojení rány

3.prevence infekce spojená s operací a imunosupresí

4.prevence minerálové dysbalance

Funkce štěpu se po transplantaci rozvine na různé úrovni. Někteří pacienti musí být po přechodnou dobu několika dnů až týdnů udržováni na dialýze. Nutriční potřeby u těchto pacientů se podobají těm s chronickou renální insuficiencí, ale jsou prohloubeny potransplantačním podáváním kortikoidů.

Hlavní cíle výživy v pozdním potransplantační období jsou:

1. nabytí a udržení celkové tělesné hmoty

2. eliminace obezity, hypertenze a hyperlipidemie

3. podpora normoglykemie

4. prevence osteoporózy

5. prevence výživového deficitu

Malnutrice

Vzhledem k tomu, že většina transplantovaných pacientů jsou pacienti dialyzovaní, musí být bezprostředně po transplantaci dodržovány výživové zásady stejně jako v předtransplantačním stadiu. Malnutrice je hlavním problémem spojeným s vyšší potransplantační morbiditou a mortalitou v důsledku horšího hojení a vyššího rizika infekce. Znovuobnovením ledvinné funkce je bezprostředně zlepšen i stav výživy.

Obezita, inzulínová rezistence, potransplantační diabates mellitus

Transplantovaní pacienti mají vyšší riziko narušení glukózové tolerance a inzulínové rezistence. Vyskytuje se zhruba u 31-33% proti 20-25% běžné populace. Transplantovaní pacienti mají často predisponující faktory inzulinové rezistence, zejména obezitu, sníženou funkci ledvin a léčbu glukokortikoidy, diuretiky a beta blokátory. inzulínová rezistence má také vztah k typu obezity - abdominální (viscerální) obezita je vyšším rizikem k rozvoji inzulinové rezistence než obezita podkožní (periferní). Množství nitrobřišního tuku může být důležitým ukazatelem vlivu obezity na glukózový metabolismus.

Inzulínová rezistence je spojená se skupinou poruch známých jako metabolický syndrom. Do tohoto syndromu patří hyperinzulinémie, nitrobřišní obezita, hypertenze, dyslipidemie, glukózová intolerance, abnormality inhibitoru aktivátoru plazminogenu a fibrinogenu, snížení adiponektinu, hyperurikemie a mikroalbuminurie. Metabolický syndrom je rovněž spojen s vyšším rizikem dysfunkce endotelu a kardiovaskulárních příhod.

Dieta, cvičení a úprava životního stylu mají důležitou roli v prevenci a léčbě inzulinové rezistence a diabetu. Citlivost k inzulinu je zvýšena snížením váhy a nitrobřišní obezity a rovněž pravidelným cvičením stejně jako úpravou diety s omezením mastných kyselin.

Dalším důležitým prvkem stravy je množství vlákniny, jejíž množství ovlivňuje výšku glykemického indexu a produkci inzulinu. Glukokortikoidy jsou spojeny s rozvojem potransplantačního diabetu (PTDM), pravděpodobně v důsledku zvýšení inzulínové rezistence a relativním snížení produkce inzulinu.

Dyslipidemie po transplantaci ledviny

Dyslipidemie je hlavní poruchou po transplantaci ledviny vyžadující většinou jak dietní opatření, tak farmakologickou léčbu. Prevalence poruchy metabolismu lipidů po transplantaci je velmi vysoká. Lipidový profil u transplantovaných pacientů se liší, pravděpodobně v důsledku genetické predispozice, imunosupresivní léčby, chronické medikace (diuretika, beta blokátory), obezity a obnovení ledvinné funkce. Nejčastější typy dyslipidemie jsou zvýšený celkový cholesterol a LDL. Ačkoliv nízkotučná dieta má u

transplantovaných pacientů menší vliv než u běžné populace, zůstává důležitým prvkem léčby.

Hypertenze

Omezení přijmu soli je hlavním prvkem léčby hypertenze, ačkoliv její příjem ve vztahu ke krevnímu tlaku zůstává kontroverzní a individuálně odlišný. Vysoký výskyt hypertenze u transplantovaných pacientů je zejména v důsledku imunosupresivní léčby (kortikosteroidy, CsA, takrolimus).

Hyperhomocysteinemie

Hyperhomcysteinemie je spojena s vyšším výskytem kardiovaskulárních chorob, ale patogeneze zůstává nejasná. Transplantovaní pacienti mají vyšší riziko kardiovaskulárních chorob a vyšší prevalenci zvýšeného homocysteinu. Suplementace vitaminu B6 a B12 snižuje hladinu homocysteinu, ale u transplantovaných v současné době není známo dietní opatření vedoucí ke snížení homocysteinu.

Draslík, vápník, fosfor, vitamin D

Hyperkalemie v brzkém potransplantačním období je spojena s léčbou cyklosporinem A, stejně jako s antihypertenzní léčbou beta blokátory. V případě hyperkalemie a oligurie je indikováno omezení příjmu draslíku na 1-3g/den. Metabolismus vápníku, fosforu a vitaminu D je ovlivněn předtransplantačním obdobím snížené funkce ledvin. Zásadní roli hraje prevence, jelikož účinná léčba osteopenie je již obtížná. Denní příjem vápníku je doporučen na 800-1500mg. Denní příjem fosforu je většinou v rozsahu 1200-1500mg vzhledem k častému přetrvávání hypofosforemie po transplantaci.

Magnézium, kyselina močová a vitaminy

Hypomagnesemie se může rozvinout sekundárně vzhledem k terapii cyklosporinem a také hyperlipidemií u transplantovaných pacientů. Častý výskyt hyperurikemie v důsledku

snížené ledvinné funkce a léčbě diuretiky nutí ke sníženému příjmu bílkovin. Zvláštní vitaminové doplňky nejsou po úspěšné transplantaci většinou nutné.

Výživa u chronické nefropatie štěpu

Chronická nefropatie štěpu (<40-50ml/min glomerulární filtrace) je jednou z nejčastějších příčin pozdní ztráty funkce ledvinného štěpu. Nutriční opatření hraje důležitou roli v rozvoji chronické rejekce. Omezení příjmu bílkovin zpomalí rozvoj chronické renální insuficience, ale nesmí vést ke snížení celkové tělesné hmoty. Dlouhodobé studie ukázaly, že asi 0.8g bílkovin/kg/den udržují jak dobrý nutriční stav pacienta, tak dobrou ledvinnou funkci. Jak již bylo zmíněno, výrazně omezený příjem bílkovin s cílem omezení progrese renální insuficience u netransplantovaných pacientů zůstává kontroverzní a není podpořen dlouhodobými randomizovanými studiemi.

Závěr

Dietní opatření a výživové doporučení hrají důležitou roli ve všech stadiích transplantace. V prvním roce po transplantaci je hlavním nutričním cílem zlepšit preexistující malnutrici a předejít nadbytečnému zvýšení váhy.

XI. Závěr:

Cílem disertace bylo ukázat, zda a jak viscerální tuková tkáň ovlivňuje expresi proinflamačních cytokinů, zda lze tento stav časně diagnostikovat a event. léčebně ovlivnit. Zvýšené množství tukové tkáně u obézních nemocných je spojeno se změnami v produkci adipocytokinů, zejména proinflamačních. Je tedy zřejmé, že se tuková tkáň může významně podílet na metabolické a imunitní odpovědi organismu na zátěž (operační výkon).

Publikace č.1 ukazuje, že exprese prozánětlivých cytokinů a infiltrace tukové tkáně imunokompetentními buňkami je zvýšena u obézních pacientů (BMI>35kg/m^2) s CKD. Otázkou zůstává, jak tyto zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů ovlivňují systémovou zánětlivou odpověď, zda urychlují cévní poškození a progresi renálního selhání a jestli intervence potlačující tuto produkci může mít pozitivní efekt.

V publikaci č.2 popisujeme brzké zvýšení hladiny adipocytokinu visfatinu po resekci kolon pro adenokarcinom (maximální hladina za 24hodin), vyjádřenou zejména u skupiny s vyšším BMI. Zvýšení „klasických" prozánětlivých cytokinů (TNF α a IL-6) bylo opožděno o 24-48 hodin. U hodnoty CRP byla dynamika zvyšování postupná s přetrvávajícím zvýšením i při posledním vyšetření za 72 hodin, a to bez signifikantního rozdílu hodnot v obou souborech. Visfatin by proto mohl být významným prediktorem časných zánětlivých změn u nemocných po abdominálním chirurgickém výkonu, především s viscerální obezitou.

V publikaci č.3 ukazujeme, že exprese prozánětlivých cytokinů je zvýšena u obézních osob po transplantaci ledviny a není závislá na předchozím typu léčby - peritoneální dialýza nebo hemodialýza. Význam peritoneální dialýzy na rozvoj potransplantační obezity nebyl v naší studii rovněž potvrzen.

V publikaci č.4 ukazujeme, že u pacientů po transplantaci ledviny pravidelná fyzická aktivita po dobu 6 měsíců snížila zvýšené koncentrace ADMA a vybraných prozánětlivých adipocytokinů, což by mohlo snížit kardiovaskulární riziko těchto pacientů.

V publikaci č.5 se věnujeme dietním opatřením a výživovým doporučením v peritransplantačním období zejména s cílem předejit nadbytečnému zvýšení váhy v prvním roce po transplantaci.

XII. Souhrn:

Cytokiny a adipocytokiny významně ovlivňují pooperační prognózu nemocných. U obézních pacientů dochází k signifikantně vyšší exprimaci prozánětlivých mediátorů.
V první části vědeckého projektu se zaměřujeme na cytokinovou odpověď organismu po elektivním chirurgickém abdominálním výkonu. Operační výkon byl vybrán jako model stresové reakce pro organismus. Výsledky ukázaly, že prozánětlivá cytokinová odpověď byla u obézních pacientů signifikantně vyšší a zejména brzká elevace adipocytokinu visfatinu by mohla být novým ukazatelem časných pooperačních zánětlivých komplikací.

Související publikace přináší podrobný popis metodiky, designu a výsledků studií.

Druhá část projektu se věnuje pacientům po transplantaci ledviny v souvislosti s obezitou, typem předchozí dialýzy, časným pooperačním pohybovým režimem a výživou. Naše výsledky ukázaly, že po transplantaci ledviny dochází ke zvýšené prozánětlivé expresi cytokinů neovlivněnou předchozím typem dialýzy. Naopak časný pohybový režim expresi cytokinů pozitivně ovlivňuje a rovněž snižuje hladinu ADMA.

Související publikace přináší popis metodiky a výsledky několika studií.

XIII. Summary:

Cytokines and adipocytokines have major effect on post-operative prognosis of patients. In obese patients, we find significantly higher expression of proinflammatory mediators. In first part of our project we focus on cytokine expresion after elective abdominal surgery. Abdominal surgery was choosen as model of stress reaction to organism. Our results show, that proinflammatory cytokine expresion was significantly higher in obese patients and especially early elevation of visfatin could be a new marker in diagnosis of postoperative inflammatory complications.

Related publications describe methods, design and results of trials.

Second part of our project is focused on patients after kidney transplantation, considering obesity, type of previous dialysis, early postoperative movement a nutrition. Our results show, that there is higher proinflammatory expresion after kidney transplantation with no effect of previous type of dialysis. On the other side early exercise have positive effect on cytokine expresion and decreases ADMA.

Related publications bring methods, details and results of trials.

XIV. LITERATURA

Angus DL, Linde-Zwirble WT, Lidicker J ,Crermont G,Carcillo J,Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated cost of care. Crit Care Med 2001,29:1303-10

Arita Y, Kihara S, OuchiN, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun. 1999;257:79-83.

Armstrong KA, Campbell SB, Hawley CH, et al. Impact of obesity on renal transplant outcomes. Nephrology. 2005;10:405-413.

Axelsson J, Heimbürger O, Lindholm B et al. Adi- pose tissue and its relation to inflammation: the role of adipokines. J Ren Nutr 2005; 15: 131–136.

Boots JM, Christiaans MH, van Hooff JP. Effect of immunosuppressive agents on long-term sur- vival of renal transplant recipients: focus on the cardiovascular risk. Drugs 2004; 64: 2047–2073.

Cekmez R, Canpolat FE, Cetinkaya M ,Aydinöz S,Aydemir G,Karademir F,Ipcioglu OM,Sarici SÜ. Diagnostic value of resistin and visfatin,in comparison with C-reactive protein, procalcitonin and interleukin-6 in neonatal sepsis. Eur Cytokine Netw 2011,22:113-117

de Mattos AM, Prather J, Olyaei AJ et al. Cardiovascular events following renal transplanta- tion: role of traditional and transplant-specific risk factors. Kidney Int 2006; 70: 757–764.

el-Agroudy AE, Wafa EW, Gheith OE et al. Weight gain after renal transplantation is a risk factor for patients and graft outcome. Trans- plantation 2004; 77: 1381–1385.

Fazelzadeh A, Mehdizadeh A, Ostovan MA et al. Incidence of cardiovascular risk factors and complications before and after kidney trans- plantation. Transplant Proc 2006; 38: 506–508.

Fuhrmann I, Krause R. Principles of exerci- sing in patients with chronic kidney disease, on dialysis and for kidney transplant recipients. Clin Nephrol 2004; 61 (Suppl 1): S14–S25.

Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M et al. Regulation of the vascular extracellular supero- xide dismutase by nitric oxide and exercise trai- ning. J Clin Invest 2000; 105: 1631–1639.

Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M ,Segawa K,Tanaka M,Kishimoto K,Matsuki Y,Murakami M,Ichisaka T,Murakami H,Watanabe E,Tagaki T,Akioshi M,Ohtsubo T,Kihara S,Yamashita S,Makishima M,Funahashi T,Yamanaka S,Hiramatsu

R,Matsuzawa Y,Shimomura I. Visfatin: a protein secreted by visceral fat mimics the effect of insulin. Science 2005,307:426-30

Goldfarb-Rumyantzev AS, Hurdle JF, Scandling JD, Baird BC, Cheung AK. The role of pretransplantation replacement therapy modality in kidney allograft and recipient survival.

Gore JL, Pham PT, Danovitch M, et al. Obesity and outcome following renal transplantation. Am J Transplant. 2006;6:357-363.

Gürlich R, Maruna P. Cytokiny v chirurgii, Praha: Galén 2001, ISBN 80-7262-121-1

Gürlich R, Maruna P, Čermák J. Význam cytokinů pro časnou diagnostiku pooperační nitrobřišní sepse. Rozhl Chir 1998,77:146-49

Gürlich R, Maruna P, Pešková M ,Čermák J,Chachkhini I,Fraško R. Využití cytokinů v diagnostice zánětů pobřišnice. Rozhl Chir 2000,79:585-88

Haluzik M, Parizkova J, Haluzik M. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. Physiol Res 2004; 53: 123–129.

Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein and adiponectin. Curr Opin Lipidol 2002; 13: 51–59.

Chudek J, Adamczak M, Karkoszka H, et al. Plasma adiponectin concentration before and after successful kidney transplantation. Transplant Proc. 2003;35:2186-2189.

Ito A, Egashira K, Narishige T et al. Renin-angiotensin system is involved in the mechanism of increased serum asymmetric dimethylarginine in essential hypertension. Jpn Circ J 2001; 65: 775–778.

Jia SH, Li Y, Parodo J,Kapus A,Fan L,Rotstein OD,Marshall JC.Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis. J Clin Invest 2004,113:1318-27

Kasap B, Soylu A, T€urkmen M, Karakcu S, Bora S, Gulay H. Effect of obesity and overweight on cyclosporine blood levels and renal functions in renal adolescent recipients. Transplant Proc. 2006;38:463-465.

Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM et al. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 170–176.

Kielstein JT, Frohlich JC, Haller H, Fliser D. ADMA: An atherosclerotic disease mediating agent in patients with renal disease? Nephrol Dial Transplant. 2001;16:1742-1745.

Kimoto M, Tsuji H, Ogawa T et al. Detection of NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohyd- rolase in the nitric oxide-generating systems of rats using monoclonal antibody. Arch Biochem Biophys 1993; 300: 657–662.

Korabiewska L, Lewandowska M, Juskowa J et al. Need for rehabilitation in renal replacement therapy involving allogenetic kidney transplanta- tion. Transplant Proc 2007; 39: 2776–2777.

Kralisch S, Klein J, Lossner U,Bluther M,Paschke R,Stumvol M,Fessahuer M. Interleukin-6 is a negative regulator of visfatine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Am J Physiol Endocrinol Metab 2005,17:586-90

Krzyzanowska K, Mittermayer F, Kopp HP et al. Weight loss reduces circulating asymmetrical dimethylarginine concentrations in mor- bidity obese women. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 6277–6281.

Krzyzanowska K, Mittermayer F, Krugluger W,Kopp HP,Schernthaler G. Increase in visfatin after weight loss induced by gastroplastic surgery. Obesity 2006,14:1886-1889

Lee KA, Gong MN. Pre-B-cell colony-enhancing factor and its clinical correlates with acute lung injury and sepsis. Chest 2011,140:382-90

Lin KY, Ito A, Asagami T et al. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dime- thylarginine dimethylaminohydrolase. Circula- tion 2002; 106: 987–992.

Lu TM, Ding YA, Lin SJ et al. Plasma levels of asymmetrical dimethylarginine and adverse car- diovascular events after percutaneous coronary intervention. Eur Heart J 2003; 24: 1912–1919.

Luis DA, Izaola O, Conde R,Primo D,Sagrado MG,Aller R.. Visfatin levels in female,morbid,nodiabetic obese patients after biliopancreatic diversion surgery. Surgery for obesity and related disease 2011,7:195-98

Luk T, Malam Z, Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor(PBEF)/visfatin: a novel mediator of innate immunity. J Leukoc Biol 2008,83:804-16

Mahrová A, Bunc V, Panáček V et al. Exercise rehabilitation during haemodialysis – clinical experience. Aktual Nefrol 2009; 15: 16–24.

Mahrova A, Švagrová K, Bunc V et al. Fyzická a psychická kondice u jedinců po transplantaci ledviny – význam časné pohybové intervence. Aktual Nefrol 2011; 17: 30–40.

Manco M, Fernandez- Real J M, Equitani F,Vendrell J,Mora MEV,Nanni G,Tondolo V,Calvani M,Ricart W,Castegneto M,Mingrone G..Effect of massive weight loss on inflammatory adipocytokines and the innate immune system in morbidly obese women.j Clin Endocrinol Metab 2007,92:483-90

Maruna P et al. Proteiny akutní faze, Praha: Maxdorf 2004, ISBN 80-85912-05-8

Maruna P, Gürlich R, Fraško R,Chochkhiani I,.Marunová M,Owen K,Pešková M. Cytokiny a solubilní cytokinové receptory v perioperačním údobí. Sborník lékařský 2002,103:273-82

Maruna P, Gürlich R, Fraško R. Dynamika plazmatické hladiny leptinu po abdominálním chirurgickém výkonu. Rozhl Chir 2001,80:299-303

McLaughlin T, Stühlinger M, Lamendola C et al. Plasma asymmetric dimethylarginine con- centrations are elevated in obese insulin-re- sistant women and fall with weight loss. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91: 1896–1900.

Meier-Kriesche HV, Arndorfer JA, Kaplan B. The impact of body mass index on renal transplant outcomes: a significant independent risk factor for graft failure and patient death. Transplantation. 2002;73:70-74.

Mittermayer F, Mayer BX, Meyer A et al. Circulating concentrations of asymmetrical dimethyl-L-arginine are increased in women with previous gestational diabetes. Diabetologia 2002; 45: 1372–1378.

Niebauer J, Clark AL, Webb-Peploe KM et al. Home-based exercise training modulates pro-oxidant substrates in patients with chronic heart failure. Eur J Heart Fail 2005; 7: 183–188.

Oflaz H, Turkmen A, Kazancioglu R et al. The effects of calcineurin inhibitors on endothe- lial function in renal transplant recipients. Clin Transplant 2003; 17: 212–216.

Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. J Biol Chem 1989; 264: 10205–10209.

Painter P, Carlson L, Carey S et al. Physical functioning and health-related quality of life changes with exercise training in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 2000; 35: 482–492. 3815-3915.

Painter PL, Tomlanovich SL, Hector LA et al. A randomized trial of exercise training after renal transplantation. Transplantation 2002; 74: 42–48.

Päivä H, Lehtimäki T, Laakso J et al. Dietary composition as a determinant of plasma asymmetric dimethylarginine in subject with mild hypercho- lesterolemia. Metabolism 2004; 53: 1072–1075.

Päivä H, Lehtimäki T, Laakso J et al. Plasma concentrations of asymmetric-dimethyl-arginine in type 2 diabetes associate with glycemic con- trol and glomerular filtration rate but not with risk factors of vasculopathy. Metabolism 2003; 52: 303–307.

Pilz S, Mangge H, Obermayer-Pietsch B,März W..Visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor: a protein with various suggested functions. J Endocrinol Invest 2007,30:138-44

Rasouli N, Kern PA. Adipokines and the metabolic complications of obesity. J Clin Endocrinol Metab 2008,93:564-73

Sciacqua A, Candigliota M, Ceravolo R et al. Weight loss in combination with physical activity improves endothelial dysfunction in human obe- sity. Diabetes Care 2003; 26: 1673–1678.

Senolt L, Krystufkova O, Hulejova H, et al. The level of serum visfatin (PBEF) is associated with total number of B cells in patients with rheumatoid arthritis and decreases following B cell depletion therapy. Cytokine. 2011;55:116-121.

Sethi JK,Vidal-Puig A. Visfatin: the missing link between intra-abdominal obesity and diabetes ? Trends in Molecular Medicine 2005,11:344-47

Song Hui Jia, Yue Li, Parodo J,Kapus A,Fan L,Rotstein OD,Marshall JC. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in Experimental inflammation and clinical sepsis. J Clin Invest 2004,113:1318-27

Stenvienkel P, Marchlewska A, Pecoits-Filho R et al. Adiponectin in renal disease: relationship to phenotype and genetic variation of the gene encoding adiponectin. Kidney Int 2004; 65: 274–281. 46. Sharma AM, Chettey VT. Obesity, hyperten- sion and insulin resistance. Acta Diabetol 2005; 42 (Suppl 1): S3–S8.

Stephens JM,Vidal-Puig A. An update on visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor, an ubiquitously expressed, illusive cytokine that is regulated in obesity. Current Opinion in Lipidology 2006,17:128-31

Stofkova A. Resistin and visfatin: regulators of insulin sensitivity, inflammation and immunity. Endocrine regulations 2010:44:25-36

Tarnow L, Hovind P, Teerlink T et al. Elevated plasma asymmetric dimethylarginine as a mar- ker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. Diabetes Care 2004; 27: 765–769.

Teplan V Jr, Vyhnánek F, Gürlich R,Haluzík M,Racek J,Vyhnálková I,Štollová M, Teplan V. Increased proinflammatory cytokine production in adipose tissue of obese patients with chronic kidney disease. Wien Klin Wochenschr 2010, 122:466-73

Teplan V Jr, Šenolt L, Hulejová H, Teplan V, Štollová M, Gürlich R. Dynamics of serum visfatin level after abdominal surgery: a new pro-inflammatory marker in the early diagnosis? Cas Lek Cesk. 2013;152(5):226-32.

Teplan V, Malý J, Gürlich R, Teplan V Jr ,Kudla M,Piťha J,Racek J,Haluzík M,Šenolt L, Štollová M.. Muscle and fat metabolism in obesity after kidney transplantation: no effect of peritoneal dialysis or hemodialysis. J Ren Nutr 2012, 22:166-170

Teplan V, Mahrová A, Svagrová K, Racek J, Gürlich R, Teplan V Jr, Senolt L, Stollová M. Regular exercise training decreases asymmetric dimethylarginine after kidney transplantation Vnitr Lek. 2012 Sep;58(9):640-6.

Teplan V, Schuck O, Racek J, et al. Asymmetric dimethylarginine in obesity after renal transplantation. J Ren Nutr. 2008;18:513-520.

Teplan V, Valkovský I, Teplan V Jr, Štollová M, Vyhnánek F, Anděl M. Nutritional consequences of renal transplantation. J Ren Nutr. 2009 Jan;19(1):95-100.

Tilg H, Moschen AR. Role of adiponectin and PBEF/visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated disease. Clinical Science 2008,114:275-88

Valkonen VP, Laakso J, Päivä H et al. Asymme- trical dimethylarginine (ADMA) and risk of acute coronary events. Does statin treatment influence plasma ADMA levels? Atheroscler 2003; 4: 19–22.

Valkonen VP, Päivä H, Salonen JT et al. Risk of acute coronary events and serum concentra- tion of asymmetrical dimethylarginine. Lancet 2001; 358: 2127–2128.

Van BiesenW, Vanholder R, Van Loo A, Van Der Vennet M, LameireN. Peritoneal dialysis favorably influences early graft function after renal transplantation compared to hemodialysis. Transplantation. 2000;69:508-514.

Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Bodles AM,Phanavanh B,Lee MJ,Starks T, Kern LM,Spencer HJ III,Mc Geheee RE Jr,Fried SK,Kern P. Human visfatin expression : relationship to insulin sensitivity,intramyocellular lipids,and inflammation.J Clin Endocrinol Metabol 2007,92:666-72

Wang S-N, Yeh Y-T, Wang S-T,Chuang S- Ch,Wang Ch-L,Yu M-L,Lee K-T. Visfatin–a proinflammatory adipokine–in gallstone disease. Am J Surgery 2010,199:459-65

Weisberg SP, McCann D, Desai M et al. Obe- sity is associated with macrophage accumula- tion in adipose tissue. J Clin Invest 2003; 112: 1796–1808.

Wiecek A, Kokot F, Chudek J et al. The adi- pose tissue: a novel endocrine organ of interest to the nephrologist. Nephrol Dial Transplant 2002; 17: 191–195.

Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, et al. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-infl ammatory protein, adiponectin. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86:

Yilmaz MI, Saglam M, Caglar K et al. Endothelial functions improve with decrease in asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels after renal transplantation. Transplantation 2005; 80: 1660–1666.

Zaletel J, Cerne D, Lenart K et al. Renal functio- nal reserve in patients with Type 1 diabetes melli- tus. Wien Klin Wochenschr 2004; 116: 246–251.

Zoccali C, Kielstein J. Asymmetric dimethylarginine: a new player in the pathogenesis of renal disease? Curr Opin Nephrol Hypertens 2006; 15: 314–320.

Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Adipose tissue as a source of inflammatory cytokines in health and disease: focus on end-stage renal disease. Kidney Int 2003; 63 (Suppl 84): S65–S68.

Zoccali C, Mallamaci F, TripepiG, et al. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end stage renal disease. J Am Soc Nephrol. 2005;13:134-141.

XV. Přílohy:

Teplan V Jr, Vyhnánek F, Gürlich R, Haluzík M, Racek J, Vyhnánková I, Štollová M, Teplan V.
Increased proinflammatory cytokine production in adipose tissue of obese patients with chronic kidney disease.
Wien Klin Wochenschr. 2010 Aug;122(15-16):466-73**. IF 0.780/2010**

Teplan V Jr, Šenolt L, Hulejová H, Teplan V, Štollová M, Gürlich R.
Dynamics of serum visfatin level after abdominal surgery: a new pro-inflammatory marker in the early diagnosis?
Cas Lek Cesk. 2013;152(5):226-32.

Teplan V Jr, Šenolt L, Hulejová H, Teplan V, Štollová M, Gürlich R.
Early changes in serum visfatin after abdominal surgery: a new pro-inflammatory marker in diagnosis?
Biomedical Papers **IF 0.99/2014**
Rozšířená práce se zaměřením na visfatin, přijata k tisku. Přiložena v akceptované tiskové verzi

Teplan V, Malý J, Gürlich R, **Teplan V Jr**, Kudla M, Pit'ha J, Racek J, Haluzík M, Šenolt L, Štollová M.
Muscle and fat metabolism in obesity after kidney transplantation: no effect of peritoneal dialysis or hemodialysis.
J Ren Nutr. 2012 Jan;22(1):166-70 **IF 1.480/2012**

Teplan V, Mahrová A, Svagrová K, Racek J, Gürlich R, **Teplan V Jr**, Senolt L, Stollová M.
Regular exercise training decreases asymmetric dimethylarginine after kidney transplantation
Vnitr Lek. 2012 Sep;58(9):640-6. Czech.

Teplan V, Valkovský I, **Teplan V Jr**, Štollová M, Vyhnánek F, Anděl M.
Nutritional consequences of renal transplantation.
J Ren Nutr. 2009 Jan;19(1):95-100. **IF 1.480/2009**