

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Využití zánětlivých biomarkerů v predikci a diferenciální diagnostice
závažnosti akutní pankreatitidy

DISERTAČNÍ PRÁCE

PÍSEK 2015

Pavel Malina



Využití zánětlivých biomarkerů v predikci a diferenciální diagnostice
závažnosti akutní pankreatitidy

DISERTAČNÍ PRÁCE

PÍSEK 2015

Pavel Malina



AUTOR PRÁCE: MUDr. Pavel Malina
ŠKOLITEL: Ing. Dalibor Novotný, Ph.D.
STUDIJNÍ PROGRAM: Lékařská chemie a biochemie

Disertační práce byla vypracována na Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek, a.s. a Oddělení klinické biochemie Fakultní Nemocnice Olomouc v období od září 2009 do února 2015

Prohlašuji, že jsem pracoval samostatně a použil pouze prameny, které cituji.

V Písku, dne 10. 2. 2015

MUDr. Pavel Malina

Výzkumná práce (studie II) sloužící jako podklad pro vypracování disertační práce byla podořena interním grantovým projektem Lékařské fakulty Univerzity Palackého číslo IGA_LF_2014_005.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji zejména svému školiteli, Ing. Daliborovi Novotnému, Ph.D. za pomoc při koncipování disertační práce a za předávání zkušeností i pedagogické vedení během celého postgraduálního studia.

Děkuji svému učiteli, prof. MUDr. Antonínu Jaborovi, CSc. za rady, připomínky a pomoc při statistickém zpracování uvedených dat.

Mé poděkování patří také mým pedagogům při studiu na lékařské fakultě prof. MUDr. Vladimíru Paličkovi, CSc., Dr. H.c. a prof. MUDr. Zdeňku Zadákovi, CSc. za jejich přístup v době mého pregraduálního studia, který mne přivedl k oboru klinické biochemie.

Dále chci poděkovat spolupracovníkům z Oddělení klinické biochemie Nemocnice Písek, a.s., a pracovníkům Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc za spolupráci při realizaci mé práce a prim. MUDr. Vladimíru Cejpovi za cenné rady a předání praktických zkušeností z péče o pacienty s akutní pankreatitidou.

Děkuji paní prof. RNDr. Jitce Ulrichové, CSc., za pomoc a podporu prokazovanou po celou dobu mého studia.

Děkuji mé manželce Šárce za trpělivost.

SOUHRN

Úvod:

Akutní pankreatitida (AP) je i v současné době, přes veškerý pokrok diagnostiky i léčby, včetně všech možností intenzivní péče, závažným onemocněním. Mortalita těžkých forem AP sice poklesla, ale stále se pohybuje kolem 10%. Co nejčasnější stratifikace nemocných a predikce závažného a komplikovaného průběhu umožňuje cílenou terapii šitou na míru. Důležitým faktorem pro prognózu onemocnění je infekce pankreatické nekrózy, která s sebou nese dramatický vzestup morbidit i mortality a vyžaduje odlišný terapeutický přístup.

Řadu let se používají pro predikci závažnosti akutní pankreatitidy různé laboratorní ukazatele nebo jejich kombinace ve formě skórovacích systémů. Jelikož stále není jejich diagnostická efektivita (senzitivita, specifita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota) ideální, hledají se nové markery a skórovací systémy s lepšími charakteristikami.

Cíle disertační práce:

Předkládaná disertační práce se zaměřuje na dvě oblasti využití laboratorních vyšetření u akutní pankreatitidy, kterými jsou:

- a) diferenciální diagnostika sterilní a infikované nekrózy
- b) časná predikce závažnosti průběhu akutní pankreatitidy

Hlavní cíle práce:

a) studie I:

1. Analyzovat možnost diferenciální diagnostiky sterilní a infikované pankreatické nekrózy u pacientů s těžkou AP sériovým stanovením interleukinu 6 (IL-6)

b) studie II:

2. Analyzovat hladiny adiponektinu (ADP), fibroblastového růstového faktoru 21 (FGF-21) a adipocytárního vazebného proteinu pro mastné kyseliny (A-FABP) v porovnání se zánětlivými markery C-reaktivním proteinem (CRP), IL-6 a prokalcitoninem (PCT) v časně fázi AP
3. Ověřit možnost predikce závažnosti AP s použitím hladin ADP, A-FABP a FGF-21 4. den po přijetí ve srovnání se zánětlivými markery CRP, IL-6 a PCT
4. Studovat vzájemnou asociaci uvedených markerů – adipokinů a zánětlivých ukazatelů – v průběhu AP metodami korelační a regresní analýzy.

Experimentální část:

Studie I:

Metodika: V první práci jsme analyzovali laboratorní výsledky celkem 59 pacientů hospitalizovaných s těžkou akutní pankreatitidou (klasifikované podle Atlantské klasifikace 1992) na chirurgickém oddělení Nemocnice Písek v letech 2000 – 2006. U 76% z nich byl pravidelně každý den od přijetí vyšetřován C-reaktivní protein (CRP) a interleukin-6 (IL-6), u 24% z nich byla data k dispozici obden. Pacienti bez výsledků CRP a IL-6 dostupných alespoň obden byli ze studie vyřazeni. Dostatečná data byla k dispozici u 42 pacientů: 14 s IN prokázanou mikrobiologicky či dle jednoznačných CT známek, 28 se SN. Data byla získána retrospektivně z chorobopisů a laboratorního informačního systému. CT vyšetření bylo prováděno mezi 4. a 7. dnem hospitalizace za použití aplikace kontrastní látky intravenózně k posouzení rozsahu nekróz a určení Balthazarovy klasifikace, na CT přístroji firmy TOSHIBA, rok výroby 1999. Mikrobiologický průkaz infikované nekrózy byl proveden kultivací nekrotické tkáně odebrané tenkojehlovou biopsií nebo při drenáži abscesových dutin realizované pod CT kontrolou. Jasně CT známky infekce pankreatických nekróz zahrnovali přítomnost bublinek plynu (svědčící pro anaerobní infekci). Hodnocení CRP a IL-6 bylo realizováno pro prvních 8 dnů hospitalizace. Při statistickém zpracování byl použit průměr hodnot markerů ze dnů 5 a 6 a dále 7 a 8, důvodem byly chybějící hodnoty u některých pacientů v každém uvedeném dni – pokud byla k dispozici pouze jedna hodnota, použila se tato.

Výsledky: **Cíl 1.** Signifikantní rozdíly hodnot IL-6 mezi soubory pacientů se sterilní vs. infikovanou nekrózou byly nalezeny pro 5. a 7. den hospitalizace ($p=0,004$ pro oba dny). U CRP nebyly ve studované dny žádné signifikantní rozdíly mezi uvedenými skupinami prokázány. ROC analýza prokázala statisticky významný rozdíl mezi CRP a IL-6 v 5. a 7. den hospitalizace: AUC pro IL-6 v 5. den=0,774, 95% CI=0,630–0,882, $p=0,037$; AUC pro IL-6 v 7. den=0,781, 95% CI=0,618–0,899, $p=0,006$. Pro cut-off hodnotu IL-6 v diskriminaci sterilní a infikované nekrózy 100 ng/l platnou od 5. dne hospitalizace bylo $p<0,005$, senzitivita 87%, specifická 90%, PPV 78%, NPV 77%; pro 150 ng/l bylo $p<0,01$, senzitivita 100%, specifická 92%, PPV 100%, NPV 76%.

Studie II:

Metodika: Druhá práce se zabývala analýzou hodnot adipokinů a zánětlivých biomarkerů u pacientů s akutní pankreatitidou. Zaměřili jsme se na korelaci hodnot uvedených markerů při přijetí a 4. den hospitalizace s průběhem, resp. závažností akutní pankreatitidy hodnoceným dle zobrazovací metody (CT vyšetření se stanovením CTSI skóre závažnosti AP).

Soubor pacientů ($n=84$, 37 žen, 47 mužů) byl tvořen pacienty hospitalizovanými pro akutní pankreatitidu na interním a chirurgickém oddělení Nemocnice Písek, a.s. ($n=15$) a

pacienty s akutní pankreatitidou hospitalizovanými na II. interní klinice gastroenterologické a hepatologické Fakultní nemocnice Olomouc (n=69). Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc. Nábor pacientů započal 1.7.2012 a byl ukončen 30.4.2014. Kritériem pro zařazení byla diagnóza akutní pankreatitidy stanovená na základě anamnézy, klinického nálezu a nejméně 5ti násobného vzestupu hladiny amylázy v séru proti hornímu rozmezí referenčního intervalu. U těchto pacientů byly shromažďovány vzorky séra ze dne přijetí, dále 4. dne a 7. dne hospitalizace (v závislosti na době hospitalizace). Od pacientů byl získáván informovaný souhlas. Celkem bylo do studie zahrnuto 84 pacientů s akutní pankreatitidou, u všech bylo provedeno CT vyšetření. Zánětlivé biomarkery – CRP, IL-6 a PCT byly vyšetřeny u všech vzorků v den odběru, do 2 hodin od provedení separace séra. Ze vzorků byl oddělen aliquot séra, který byl zamražen na -80 °C a po ukončení náboru pacientů byla provedena analýza adipokinů: celkový adiponektin, A-FABP a FGF-21 (aliquot byl skladován při -80 °C do dne analýzy). Analýzy byly provedeny na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc za použití následujících kitů: Human Adiponectin ELISA, Human A-FABP ELISA a Human FGF-21 ELISA (vše Biovendor Laboratorní Medicína, Brno, Česká republika), podle návodu výrobce a po verifikaci všech metod. Oba variační koeficienty za podmínek opakovatelnosti i mezilehlé preciznosti byly <15%. Všichni pacienti podstoupili kontrastní CT vyšetření. Bylo stanoveno Balthazarovo skóre, rozsah nekrózy a CTSI. Číselné maximum CTSI je 10 bodů a je součtem Balthazarova skóre a skóre pankreatické nekrózy. CT vyšetření ve FN Olomouc byla provedena na přístrojích CT LightSpeed VCT a CT LightSpeed RT16 firmy GE Healthcare, Waukesha, USA. CT vyšetření v Nemocnici Písek, a.s. byla provedena na přístroji Toshiba Aquilion 64 CT scanner, firmy TOSHIBA, Tokyo, Japonsko. CT vyšetření byla provedena během 5 dnů od přijetí. Pacienti byli rozděleni v závislosti na závažnosti AP do skupin a to dvojím způsobem:

- I. rozdělení na 2 skupiny lehká AP (0-3 b. CTSI) a těžká AP (4-10 b. CTSI)
- II. rozdělení na 3 kategorie A (0-2 b. CTSI), B (3-4 b. CTSI), C (5-10 b. CTSI)

Druhé rozdělení bylo provedeno kvůli možnosti sledovat podrobněji trend hodnot adipokinů a zánětlivých markerů v závislosti na závažnosti AP.

Data byla statisticky zpracována (software MEDCalc, firma MedCalc Software, Ostend, Belgie). Data byla testována na normalitu D'Agostino-Pearsonovým testem, pro nenormální rozložení dat bylo porovnání skupin provedeno pomocí Kruskal-Wallisova testu.

Po prvotním zpracování naměřených dat byly provedeny tři subanalýzy (členěno dle cílů práce):

Cíl 2. Analýza hladin adiponektinu, A-FABP a FGF-21 v časně fázi AP:

Statistická analýza byla provedena ve skupině všech jedinců s diagnózou AP a dále ve skupinách rozdělených podle BMI ($BMI \leq 25,0 \text{ kg/m}^2$ and $BMI > 25,0 \text{ kg/m}^2$), CTSI skóre (CTSI A, 0–2 body; CTSI B, 3–4 body; CTSI C, 5–10 bodů) a podle klasifikace na

lehkou/těžkou AP na základě CTSI skóre (lehká AP, 0–4 body; těžká AP, 5–10 bodů). Rozdíly mezi proměnnými v jednotlivých laboratorních ukazatelích ve skupině byly analyzovány Wilcoxonovým párovým testem. Rozdíly mezi proměnnými v jednotlivých laboratorních ukazatelích mezi dvěma skupinami byly analyzovány Mann-Whitneyho U testem. Rozdíly v proměnných mezi třemi skupinami (rozdělenými podle CTSI skóre) byly analyzovány Kruskal-Wallisovým testem. Pro statistické zpracování korelace mezi jednotlivými parametry jsme použili pro sešikmené rozdělení jednorozměrnou Spearmanovu korelační analýzu. Vícenásobná regresní analýza byla provedena pro otestování nezávislé asociace mezi závislými a nezávislými proměnnými.

Cíl 3. Analýza predikce závažnosti AP s použitím hladin ADP, A-FABP a FGF-21 4. den po přijetí

V této analýze byl použit Kolmogorovův-Smirnovův test k otestování normálního rozložení dat. Rozdíly proměnných mezi podskupinami lehké a těžké AP byly otestovány Mann-Whitneyho U testem. Rozdíly mezi proměnnými tří skupin rozdělených podle CTSI skóre byly analyzovány Kruskal-Wallisovým testem. Pro statistické zhodnocení korelace mezi jednotlivými parametry jsme použili jednorozměrnou Spearmanovu korelační analýzu pro proměnné se sešikmeným rozložením. Pro otestování nezávislé asociace mezi závislými a nezávislými proměnnými byla provedena vícenásobná regresní analýza. Pro výpočet cut-off hodnot, pozitivních prediktivních hodnot (PPV), negativních prediktivních hodnot (NPV), plochy pod křivkou (AUC), senzitivity a specifity byla provedena receiver-operator characteristics (ROC) analýza.

Cíl 4. Analýza vzájemné asociace uvedených markerů – adipokinů a zánětlivých ukazatelů – v průběhu AP metodami korelační a regresní analýzy.

Pro statistické zhodnocení korelace mezi jednotlivými parametry jsme použili jednorozměrnou Spearmanovu korelační analýzu pro proměnné se sešikmeným rozložením. Pro otestování nezávislé asociace mezi závislými a nezávislými proměnnými byla provedena vícenásobná regresní analýza.

Ve všech případech byl statistická analýza provedena programem SPSS pro Windows, verze 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Hodnoty pravděpodobnosti $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

Výsledky:

Cíl 2. V celé skupině jednotlivců s diagnózou AP nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi ADP a CRP ve srovnání hladin v den 1 a 4. Oproti tomu byl během 4 dní hospitalizace zjištěn významný pokles v koncentracích A-FABP, FGF-21, IL-6 ($p < 0,000$) a PCT ($p < 0,05$). Ve skupině jedinců s $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ bylo pozorováno významné zvýšení hladin A-FABP jak

v den 1, tak v den 4 ($p=0,002$ a $p=0,005$), ve srovnání s pacienty s $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$. Koncentrace CRP a IL-6 byly vyšší pouze v den 4 ($p=0,005$ a $p=0,003$). Podobně jako ve skupině všech pacientů byly hladiny A-FABP, FGF-21, IL-6 a PCT (pouze u jedinců s $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$) významně nižší v den 4 v porovnání se dnem 1.

Cíl 3. Ve skupinách těžké AP ve srovnání s lehkou formou nemoci byl pozorován 4. den významný vzestup hladin CRP ($p<0,000$) a IL-6 ($p<0,01$), zatímco v plazmatických hladinách adipokínů a PCT nebyly zjištěny žádné významné rozdíly. Pouze hladiny FGF-21 a PCT jeví trend k vyšším hodnotám u těžké AP. Při ROC analýze výsledná plocha pod křivkou (AUC) odhalila, že nikoli ADP, FGF-21 a A-FABP, avšak pouze CRP (AUC=0,815) a IL-6 (AUC=0,738) byly vhodné, ale nikoli vynikající, jako potenciální prediktory závažnosti nemoci 4. den po přijetí. Cut-off hodnoty stanoveny pro oba ukazatele: 100 mg/l pro CRP a 37 ng/l pro IL-6, s negativními prediktivními hodnotami 96% a 92% a pozitivními prediktivními hodnotami 39% a 29%.

Cíl 4. V podskupinách lehké/těžké AP byly hodnoty A-FABP významně korelovány se všemi prozánětlivými ukazateli a v případě jedinců s těžkou AP také s FGF-21 (4. den po přijetí). Pozitivní korelace FGF-21 se všemi vyšetřovanými ukazateli byla nalezena u těžké AP, zatímco v podskupině lehké AP byla zjištěna korelace pouze s CRP. A-FABP byl pozitivně asociován s PCT u podskupin lehké i těžké AP a také hladiny ADP a CRP predikovaly koncentrace A-FABP u pacientů z podskupiny lehké AP. Oproti tomu FGF-21 byl pozitivně asociován s ADP a negativně s CRP, zejména v podskupině těžké AP.

Závěry:

Členěno dle jednotlivých cílů práce:

1. V naší práci bylo zjištěno, že **hladiny interleukinu-6 od 5. dne hospitalizace dokážou rozlišit sterilní a infikovanou nekrózu**. ROC analýza prokázala hodnotu AUC pro IL-6 v 5. den=0,774, v 7. den=0,781. Pro cut-off hodnotu IL-6 v diskriminaci sterilní a infikované nekrózy 100 ng/l platnou od 5. dne hospitalizace bylo $p<0,005$, senzitivita 87%, specificita 90%, PPV 78%, NPV 77%; pro 150 ng/l bylo $p<0,01$, senzitivita 100%, specificita 92%, PPV 100%, NPV 76%. Dle výsledků naší práce by mohl IL-6 diagnostikovat infikovanou nekrózu s vysokou senzitivitou, specificitou a pozitivní prediktivní hodnotou 2-5 dní před potvrzením kultivačním mikrobiologickým vyšetřením. CRP na rozdíl od IL-6 tuto diskriminační schopnost (odlišení sterilní a infikované nekrózy) nemá, jeho hladiny jsou od 2. dne výrazně zvýšeny, statisticky významný rozdíl u pacientů se sterilní nekrózou vs. infikovanou nekrózou není přítomen.

2. **V celé skupině jednotlivců s diagnózou AP nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi ADP a CRP ve srovnání hladin v den 1 a 4. Oproti tomu byl během 4 dní hospitalizace zjištěn významný pokles v koncentracích A-FABP, FGF-21, IL-6 ($p < 0,000$) a PCT ($p < 0,05$). Podobně jako ve skupině všech pacientů byly hladiny A-FABP, FGF-21, IL-6 a PCT (pouze u jedinců s $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$) významně nižší v den 4 v porovnání se dnem 1.**

3. **Adiponektin, fibroblastový růstový faktor 21 ani adipocytární vazebný protein pro mastné kyseliny neprokázaly schopnost predikovat závažnost akutní pankreatitidy. Pouze u fibroblastového růstového faktoru 21 byl patrný určitý trend ke schopnosti diskriminace mezi některými kategoriemi závažnosti akutní pankreatitidy. Oproti zánětlivým markerům tedy adipokiny nelze prozatím pro predikci závažnosti AP využít.** Nicméně je nutný další výzkum k posouzení jejich dynamiky v dalším průběhu AP. Zejména pro FGF-21, který je exprimován v metabolicky aktivních tkáních, tedy i v pankreatu, existuje málo studií a s ohledem na určitý trend diskriminace kategorií CTSI v naší práci je nutno jej brát v potaz. Podle našich znalostí je naše studie první, kde byly zjišťovány hodnoty A-FABP a FGF-21 v časně fázi AP. Nenalezli jsme žádné rozdíly mezi skupinami. Nicméně významný pokles byl zjištěn v podskupinách mezi 1. a 4. dnem po přijetí (společně, ale nezávisle na poklesu hladin IL-6). FGF-21 byl výrazně zvýšen v den 1, což potvrzuje výsledky animálních studií, kde jeho gen naznačuje potenciální úlohu v bezprostřední odpovědi na poškození pankreatu stimulací redukce tkáňového zánětu a fibrózy. ADP, A-FABP a FGF-21 neposkytly významný výsledek v ROC analýze naznačující chabý potenciál pro diskriminaci závažnosti onemocnění v den 4. **Možnost predikce závažnosti AP jsme potvrdili u CRP 1. den hospitalizace pouze pro část pacientů (kategorie CTSI A vs. B). V prezentované studii bylo CRP 4. den po přijetí v podskupinách pacientů s těžkou AP a vyšším CTSI skóre významně zvýšeno. Pro cut-off hodnotu CRP 100 mg/l byla zjištěna vysoká NPV (96%), pozitivní predikce je však problematická. Na rozdíl od PCT, byly v naší práci zvýšené hodnoty IL-6 asociovány s těžkými formami AP v den 4. Mezní hodnota IL-6 37 ng/l vyloučila těžkou AP s NPV 92%, ale PPV byla pouze 29 %. Tudiž naše výsledky mohou naznačovat diagnostickou použitelnost jak CRP, tak IL-6 k vyloučení těžké formy AP s vysokou negativní prediktivní hodnotou 4. den po přijetí. Tato studie přinesla další evidenci diagnostického využití plazmatických koncentrací CRP a IL-6 k vyloučení těžké formy AP s vysokou negativní prediktivní hodnotou ve čtvrtém dnu po přijetí. Vybraná cut-off hodnota pro IL-6 může být použita i při přijetí pro prognózu závažnosti a systémových komplikací AP.**

4. **Použitím vícenásobné regresní analýzy jsme demonstrovali úzké propojení A-FABP s procalcitoninem během časně fáze AP bez ohledu na tíži onemocnění. Negativní asociace FGF-21 s CRP pravděpodobně odráží průběh těchto parametrů v prvních čtyřech dnech těžké AP.** Objasnění v dalším výzkumu je nezbytné pro silnou pozitivní asociaci FGF-21 s ADP. Žádná asociace nebyla pozorována mezi FGF-21 a A-FABP a IL-6 napříč všemi podskupinami. Tento fenomén může naznačovat nezávislé chování všech tří parametrů v průběhu časně fáze AP. Vícenásobná regresní analýza laboratorních charakteristik s A-FABP jako závisle proměnnou ukázala pozitivní asociaci s procalcitoninem v obou podskupinách, navzdory nebakteriálnímu zánětlivému původu AP. **Prokázali jsme, že A-FABP byl v naší studii během časně fáze AP úzce spjat s prozánětlivými faktory, bez ohledu na závažnost onemocnění.** Pozitivní asociace s ADP u jedinců s lehkou AP byla překvapivá a nenalezli jsme žádné relevantní vysvětlení tohoto fenoménu.

SUMMARY

Introduction:

Despite all the progress of diagnosis and treatment including the possibility of intensive care acute pancreatitis (AP) is still a serious disease. Mortality of severe forms decreased, but still hovers around 10%. Soon stratification of patients and prediction of complications enables targeted and tailored therapy. Another important factor for the prognosis of the disease is the infection of pancreatic necrosis, which carries a dramatic increase in morbidity and mortality and requires a different therapeutic approach. For many years, various laboratory biomarkers or combinations of them in the form of scoring systems have been used to predict the severity of acute pancreatitis. Because of their diagnostic efficiency (sensitivity, specificity, positive and negative predictive value) is not perfect, research for markers or new scoring systems with improved characteristics still continues.

Thesis of dissertation

The thesis focuses on two areas of use of laboratory biomarkers in acute pancreatitis:

- a) differential diagnosis of sterile and infected necrosis
- b) early prediction of pancreatitis severity

Objectives of dissertation

a) study I:

1. To analyze the possibility of the differential diagnosis of sterile and infected pancreatic necrosis in patients with severe AP with serial measurement of interleukin-6 (IL-6)

b) study II:

2. To analyze the levels of adiponectin (ADP), fibroblast growth factor 21 (FGF-21) and adipocyte-fatty acids binding protein (A-FABP) in comparison with inflammatory markers C-reactive protein (CRP), IL-6 and procalcitonin (PCT) in the early phase of AP
3. To verify the possibility of prediction of severity of AP with determining levels of ADP, A-FABP and FGF-21 on the fourth day of hospitalization in comparison with inflammatory markers CRP, IL-6 and PCT
4. To analyze the association of individual markers - adipokines and inflammatory markers during AP through correlation and regression analysis

Experimental part:

Study I:

Methods: In the first work (study I), we examined 59 patients hospitalized with severe acute pancreatitis (classified according to the Atlanta classification 1992) in the surgical ward of Hospital Písek in 2000-2006. 76% of them were investigated by C-reactive protein (CRP) and interleukin-6 (IL-6) every day from the date of admission, in 24% of them data were available every other day. Patients without results of CRP and IL-6 available at least every other day were excluded from the study. Sufficient data were available in 42 patients: 14 with microbiologically proven IN or according to unambiguous CT marks, 28 with SN. All data were obtained by retrospective study of medical records and laboratory information system. CT examination was performed between the 4th and 7th day of hospitalization using intravenously administered contrast agent to assess the extent of necrosis and determine Balthazar classification, using CT device TOSHIBA, production year 1999. Microbiological verification of infected necrosis was performed by culturing necrotic tissue removed by fine needle biopsy or during abscess cavities drainage under CT control. Clear CT signs of infection of pancreatic necrosis included the presence of gas bubbles (indicative of anaerobic infection). Evaluation of CRP and IL-6 were implemented for the first 8 days of hospitalization, significant differences between groups of patients with sterile vs. infected necrosis were found between the 5th and 8th day of hospitalization. We used average values of markers of days 5 and 6 and also 7 and 8 for statistical processing, this was due to missing values in some patients at each specified day - if there was only one value, this was applied.

Results: **Objective 1.** Significant differences in IL-6 levels between groups of patients with sterile vs. infected necrosis were found for the fifth and seventh day of hospitalization ($p = 0.004$ for both days). For CRP no significant differences between the above mentioned groups were demonstrated at studied days. ROC analysis showed a statistically significant difference between CRP and IL-6 in the 5th and 7th day of hospitalization: AUC for IL-6 on the day 5=0,774, 95% CI=0,630–0,882, $p=0,037$; AUC for IL-6 on day 7=0,781, 95% CI=0,618–0,899, $p=0,006$. For the cut-off value of IL-6 in the discrimination of sterile and infected necrosis 100 ng/l, valid from the fifth day of hospitalization we found following results: $p<0.005$, sensitivity 87%, specificity 90%, PPV 78%, NPV 77%; for 150 ng/l: $p<0.01$, sensitivity 100%, specificity 92%, 100% PPV, NPV 76%.

Study II:

Methods: In the study II we analyzed the levels of adipokines and inflammatory biomarkers in patients with acute pancreatitis. We focused to correlation of above mentioned markers at admission and on the 4th day of hospitalization with the course and severity of AP evaluated according imaging methods (CT examination with the determination of CTSI – CT severity score of AP).

The study was performed in the subjects with acute pancreatitis (n=84, 37 females, 47 males), diagnosed according to revised Atlanta classification from 2012. They had been examined for the first time after admission on the 2nd Department of Internal Medicine, University Hospital Olomouc, Czech Republic (n=69), and Department of Internal Medicine, Hospital Písek, Czech Republic (n=15), during the period from June 2012 to April 2014. The inclusion criteria were the diagnosis of acute pancreatitis was based on patient's history, clinical, laboratory (pancreatic amylase 5 times above upper reference limit) and radiological findings during computed-tomography (CT) examination. The study was reviewed and approved by the Ethics Committee of Medical Faculty and University Hospital Olomouc, and the Ethics Committee of Hospital Písek, and written informed consent was obtained from all participants. In these patients, serum samples were collected from the date of adoption, as well as the 4th day and 7th day of hospitalization (depending on the time of hospitalization). From the patients was obtained informed consent. Study included 84 patients with acute pancreatitis, CT examination was performed at every one of them. Inflammatory biomarkers – CRP, IL-6 and PCT were investigated on the day of blood collection until 2 hours from serum separation. Aliquots were separated from each sample and concentrations of adipokines (total adiponectin, A-FABP and FGF-21) were measured in these aliquots (stored at -80 °C) when inclusion was finished. Total adiponectin, A-FABP and FGF-21 were measured in the Department of clinical biochemistry, University Hospital Olomouc by following immunochemical kits: Human Adiponectin ELISA, Human A-FABP ELISA and Human FGF-21 ELISA (all Biovendor Laboratory Medicine Inc., Brno, Czech Republic), according to the manufacturer's instructions and after verification of all three methods. Both the intra- and inter-assay coefficients of variation were below 15 % for all parameters.

Every patient underwent contrast-enhanced CT examination (University Hospital Olomouc: multislice helical CT, CT LightSpeed VCT and LightSpeed RT16, GE Healthcare, Waukesha, USA; Hospital Písek: Toshiba Aquilion 64 CT scanner, TOSHIBA, Tokyo, Japan) within 5 days of admission. Patients were divided according to severity of AP into groups in two ways according to CTSI score:

- III. 2 groups: mild AP (0-3 p. CTSI) and severe AP (4-10 p. CTSI)
- IV. 3 groups: A (0-2 p. CTSI), B (3-4 p. CTSI), C (5-10 p. CTSI)

The second division was performed because of the possibility to follow more closely the trend values adipokines and inflammatory markers, depending on the severity of AP.

Data were statistically processed (MedCalc software, company MedCalc Software, Ostend, Belgium), outliers were excluded (tested by Grubbs two-sided test with a coefficient $\alpha = 0,05$ and according to Tukey's test of 1977). The data were tested for normality with D'Agostino-Pearson test and Kruskal-Wallis test was performed to compare the groups due to non-normal distribution of the data.

After initial processing of measured data we performed three detailed subanalysis (classified by individual dissertation objectives):

Objective 2. Analysis of ADP, A-FABP and FGF-21 in the early phase of AP:

Statistical analysis was performed in the group of all subjects with diagnosis of AP and in groups divided according to BMI ($BMI \leq 25,0 \text{ kg / m}^2$ and $BMI > 25,0 \text{ kg / m}^2$), CTSI score (CTSI A 0-2 points; CTSI B 3-4 points; CTSI C, 5-10 points) and classification according to mild/severe AP based on CTSI score (mild AP 0-4 points; severe AP 5-10 points). Kolmogorov-Smirnov test was used to test the normal distribution of data. Differences between the variables in the individual laboratory markers in the group were analyzed by Wilcoxon paired test. Differences between the variables in different laboratory parameters between the two groups were analyzed by the Mann-Whitney U test. Differences in variables between the three groups (divided by CTSI score) were analyzed by Kruskal-Wallis test. For statistical analysis of the correlation between the parameters we used one-dimensional Spearman correlation analysis for skewed distribution. Multiple regression analysis was performed to test the independent association between dependent and independent variables.

Objective 3. Analysis of prediction of AP severity with ADP, A-FABP a FGF-21 – day 4 after admission:

Kolmogorov-Smirnov test was used to test the normal distribution of data. Differences between variables in mild and severe AP subgroups were tested with Mann-Whitney U test. Differences in variables between the three groups (divided by CTSI score) were analyzed by Kruskal-Wallis test. . For statistical analysis of the correlation between the parameters we used one-dimensional Spearman correlation analysis for skewed distribution. Multiple regression analysis was performed to test the independent association between dependent and independent variables. Receiver Operator Characteristics (ROC) analysis was performed to calculate cut-off values, positive predictive values (PPV), negative predictive values (NPV), area under the curve (AUC), sensitivity and specificity.

Objective 4. Analysis of association of these markers - adipokines and inflammatory markers - during AP with methods of correlation and regression analysis.

For statistical evaluation of the correlation between the parameters we used a one-dimensional Spearman correlation analysis for variables with sloping layout. To test the independent association between dependent and independent variables multiple regression analysis was performed.

In all cases, the statistical analysis was done using SPSS for Windows, version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Probability values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results:

Objective 2. Throughout the group of individuals with a diagnosis of AP no significant differences between ADP and CRP levels as compared on day 1 and 4 were found. In contrast, during the 4 days of hospitalization A-FABP, FGF-21, IL 6 ($p < 0.000$) and PCT ($p < 0.05$) revealed a significant decrease in concentrations. In the group of individuals with a $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ a significant increase in the levels of A-FABP as on day 1 and on day 4 ($p = 0.002$ and $p = 0.005$) compared to patients with $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$ was observed. The concentration of CRP and IL-6 were higher only on day 4 ($p = 0.005$ and $p = 0.003$). Like in the group of all patients, the levels of A-FABP, FGF-21, IL-6 and PCT (only in individuals with a $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$) were significantly lower at day 4 compared with the day 1.

Objective 3. In the groups of severe AP in comparison with the mild form of the disease a significant increase in CRP levels ($p < 0.000$) and IL-6 ($p < 0.01$) was observed on the 4th day, while in plasma adipokines, and PCT we found no significant differences. Only levels of FGF-21 and PCT appeared trend towards higher values in severe AP. When analyzing the resulting ROC area under curve (AUC) revealed that not ADP, FGF-21 and A-FABP, but only CRP (AUC = 0.815) and IL-6 (AUC = 0.738) are appropriate, but not excellent, as potential predictors of disease severity on the 4th day after admission. Cut-off values were determined for both parameters: 100 mg/l for CRP and 37 ng/l for IL-6, with negative predictive values of 96% and 92% and positive predictive values of 39% and 29% respectively.

Objective 4. In subgroups of mild/severe AP the values of A-FABP were significantly correlated with all inflammatory markers and in the case of individuals with severe AP also with FGF-21 (4 days after admission). Positive correlation of FGF-21 with all the markers was found in severe AP, while in the subgroup of mild AP correlation was found only with CRP. A-FABP was positively associated with PCT in subgroups of mild/severe AP and the levels of ADP and CRP predicted concentrations of A-FABP in the subset of patients with mild AP. In contrast, FGF-21 was positively associated with ADP and negatively with CRP, especially in the subgroup of severe AP.

Conclusions:

Classified by individual dissertation objectives:

1. In our study, we found that **interleukin-6 levels from the fifth day of hospitalization can distinguish sterile and infected necrosis**. ROC analysis showed an AUC for IL-6 in the fifth day = 0.774, 7th day = 0.781. For the cut-off value of IL-6 in discrimination of sterile and infected necrosis 100 ng/l, valid from the fifth day of hospitalization, was

$p < 0.005$, sensitivity 87%, specificity 90%, PPV 78%, NPV 77%; for 150 ng/l, was $p < 0.01$, sensitivity 100%, specificity 92%, 100% PPV, NPV 76%. According to the results of our work IL-6 could diagnose infected necrosis with high sensitivity, specificity and positive predictive value 2-5 days prior to confirmation of microbiological examination. Unlike IL-6, CRP this discriminatory ability (discrimination of sterile and infected necrosis) has not, since the second day its levels are significantly increased and statistically significant difference in patients with sterile vs. infected necrosis is not present.

2. **Throughout the group of individuals with a diagnosis of AP there were no significant differences between ADP and CRP levels compared to day 1 and 4. In contrast, during the 4 days of hospitalization a significant decrease in the concentrations of A-FABP, FGF-21, IL-6 ($p < 0.000$) and PCT ($p < 0.05$) revealed.** Like in the group of all patients, the levels of A-FABP, FGF-21, IL-6 and PCT (only in individuals with a $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$) were significantly lower at day 4 as compared with the day one.

3. **Neither adiponectin and fibroblast growth factor 21 nor adipocyte fatty acids binding protein showed no ability to predict the severity of acute pancreatitis. Only in fibroblast growth factor 21 there was an apparent trend to a certain discrimination among some categories of severity of acute pancreatitis. Compared to inflammatory markers, adipokines therefore cannot yet be useful for prediction of the severity of AP.** However, further research is needed to assess their dynamics in the course of the AP. Especially for FGF-21, which is expressed in metabolically active tissues, including the pancreas, there are few studies and with regard to certain trend in discrimination among categories of CTSI in our work must be taken into account. To our knowledge, our study is the first, where the values of A-FABP and FGF-21 in the early phase of the AP were determined. We found no differences between groups. However, a significant decrease was observed in the subgroups between day 1 and 4 after adoption (together, but independently of the decrease in IL-6). FGF-21 was significantly increased on day 1, which confirms the results of animal studies, wherein its gene suggests a potential role in immediate response to pancreatic damage by stimulation of reduction of tissue inflammation and fibrosis. ADP, A-FABP and FGF-21 did not provide a significant result in ROC analysis, suggesting the poor potential for discrimination of severity of the disease on the day four. **The possibility of prediction of the severity of AP was confirmed for CRP on first day of hospitalization for only a fraction of patients (CTSI category A vs. B). In the presented study CRP on fourth day after admission**

in the subgroups of patients with severe AP and higher CTSI score was significantly increased. For the cut-off value of CRP 100 mg/l we found high NPV (96%), however positive prediction is problematic. Unlike the PCT, in our work elevated IL-6 levels were associated with severe forms of AP on day 4. The limit of IL-6 37 ng/l excluded severe AP with NPV of 92%, but PPV was only 29%. Hence, our results could indicate diagnostic usability of CRP and IL-6 for the exclusion of a severe form of the disease with high negative predictive value of the fourth day after admission. This study provides further records of diagnostic use of plasma concentrations of CRP and IL-6 to exclude severe forms of AP with a high negative predictive value on the fourth day after admission. The selected cut-off value for IL-6 can also be used on admission for the severity prognosis and prognosis of systemic complications of AP.

4. **By way of multiple regression analysis we demonstrated the close link between A-FABP and procalcitonin during the early phase of AP regardless of disease severity. Negative association of CRP and FGF-21 probably reflects the progress of these parameters in the first four days of severe AP.** Clarification in further research is necessary for a strong positive association of FGF-21 with ADP. No association was observed among FGF-21, A-FABP and IL-6 across all subgroups. This phenomenon can indicate the independent behavior of all three parameters during the early phase of AP. Multiple regression analysis of laboratory characteristics with A-FABP as dependent variable showed a positive association with procalcitonin in both subgroups, despite nonbacterial inflammatory origin of AP. **Thus we have shown that in our study A-FABP was closely associated with pro-inflammatory factors during the early phase of AP, regardless of the disease severity.** Positive association with ADP in individuals with mild AP was surprising and we found no relevant explanation for this phenomenon.

Obsah

PODĚKOVÁNÍ.....	5
SOUHRN	6
SUMMARY.....	13
SEZNAM ZKRATEK.....	22
1. ÚVOD	24
2. TEORETICKÁ ČÁST	24
2.1 ZÁNĚTLIVÉ LABORATORNÍ UKAZATELE	24
2.1.1 <i>Proteiny akutní fáze</i>	25
2.1.2 <i>Cytokiny</i>	27
2.1.3 <i>Interleukin-6</i>	28
2.1.4 <i>Vybrané adipokiny</i>	29
2.1.5 <i>Prokalcitonin</i>	35
2.2 AKUTNÍ PANKREATITIDA	35
2.2.1 <i>Epidemiologie AP</i>	38
2.2.2 <i>Etiologie AP</i>	39
2.2.3 <i>Patogeneze AP</i>	39
2.2.4 <i>Klasifikace AP</i>	41
2.2.5 <i>AP, obezita a zánět</i>	43
2.2.6 <i>Možnosti predikce závažnosti akutní pankreatitidy</i>	46
2.2.7 <i>Možnosti diferenciální diagnostiky sterilní a infikované nekrózy</i>	49
3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	50
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	51
4.1 POUŽITÁ PŘÍSTROJOVÁ TECHNIKA, REAGENCIE, ROZTOKY	51
4.1.1 <i>Přístroje a zařízení</i>	51
4.1.2 <i>Roztoky, chemikálie a kity</i>	51
4.1.3 <i>Ostatní materiál</i>	51
4.2 IL-6 PRO DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKU STERILNÍ A INFIKOVANÉ NEKRÓZY	52
(STUDIE I)	52
4.2.1 <i>Materiál a použité metody</i>	52
.....	52
4.3 ADIPOKINY A ZÁNĚTLIVÉ MARKERY PRO PREDIKCI ZÁVAŽNOSTI AP (STUDIE II)	75
4.3.1 <i>Materiál a použité metody</i>	75
.....	81
4.3.3 <i>Analýza hladin adiponektinu, A-FABP a FGF-21 v časně fázi AP</i>	112
4.3.4 <i>Analýza predikce závažnosti AP s použitím hladin ADP, A_FABP a FGF-21</i>	119
4. den po přijetí.....	119

4.3.5 Analýza vzájemné asociace uvedených markerů – adipokinů a zánětlivých ukazatelů – v průběhu AP metodami korelační a regresní analýzy.....	122
5. DISKUZE	124
5.1 DISKUZE – STUDIE I: IL-6 u AP.....	124
5.2 DISKUZE – STUDIE II: ADIPOKINY PRO PREDIKCI ZÁVAŽNOSTI AP	125
5.2.1 Diskuze - úvod.....	125
5.2.2 Diskuze – STUDIE II: Adipokiny a zánětlivé markery v časně fázi AP	130
5.2.3. Diskuze – STUDIE II: Adipokiny a zánětlivé markery v den 4.....	132
5.2.4 Diskuze - omezení studie.....	135
6. ZÁVĚRY	136
7. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI	138
PUBLIKACE.....	138
PŘEDNÁŠKY, POSTERY:	139
8. LITERATURA	140

Seznam zkratek

ABCA-1	ATP-binding cassette transporter
ADP	adiponektin
A-FABP	adipocyte-fatty acids binding protein/ adipocytární vazebný protein pro mastné kyseliny
AP	akutní pankreatitida
APACHE-II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation-II
APACHE-O	APACHE-II skóre + faktor obezity
APP (APR's)	acute phase proteins/proteiny akutní fáze
AST	aspartátaminotransferáza
AUC	area under the curve/plocha pod křivkou
BISAP	bedside index for severe acute pancreatitis/index těžké akutní pankreatitidy využívaný u lůžka pacienta
CD	cluster of differentiation/povrchové znaky imunitních buněk
CECT	contrast enhanced computed tomography/ výpočetní tomografie s využitím kontrastní látky
CIP	coerulein induced pancreatitis/pankreatitida navozená ceruleinem
CRP	C-reaktivní protein
CSF	colony stimulating factor/faktor stimulující kolonie
CT	computed tomography/výpočetní tomografie
CT-1	kardiotrofin-1
CTSI	computed tomography severity index/ CT index závažnosti
Da	Dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermal growth factor/epidermální růstový faktor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay/ imunostanovení pomocí enzymu
EUS	endosonografie
FGF	fibroblast growth factor/fibroblastový růstový faktor
G-CSF	granulocyte stimulating factor/granulocytový kolonie stimulující faktor
GLUT	glucose transporter/glukózový transportér
HDL	high density lipoprotein/lipoprotein o vysoké denzitě
HSL	hormon senzitivní lipáza
ICAM	intercellular adhesion molecule/molekula pro mezibuněčnou adhezi
IL	interleukin
IN	infected necrosis/infikovaná nekróza
IRMA	immunoradiometric assay/imunoradiometrická analýza
IRS-1	insulin receptor substrate 1/substrát inzulinového receptoru 1

JAK/STAT faktory	buněčná signalizační dráha - Janusova kináza a STAT transkripční faktory
LCFA	long chain fatty acids/mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LDH	laktátdehydrogenáza
LDL	low density lipoprotein/ lipoprotein o nízké hustotě
MOSS	skórovací systém multiorgánového selhání
MR	magnetic resonance (imaging)/magnetická rezonance
mRNA	„messenger“ ribonukleová kyselina
NF kappa-B	nuclear factor kappa B/nukleární faktor kappa B
NK	natural killers/přirození zabíječi (imunitní buňky)
NPV	negativní prediktivní hodnota
PAF	plasminogen activating factor/faktor aktivující plazminogen
PCT	procalcitonin
PIP-3	phosphorylated phosphoinositide 3/fosfatidylinositoltrifosfát
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor/nitrojaderné receptory ovlivňující transkripci a expresi genů
PPV	positive predictive value/pozitivní prediktivní hodnota
ra	receptor antagonist/receptorový antagonista
RBP	retinol binding protein/protein vázající retinol
RIA	radioimmunoassay/radioimunoanalýza
ROC	receiver operating characteristics
ROS	reactive oxygen substances/reaktivní formy kyslíku
SAA	serum amyloid A/sérový amyloid A
SAP	severe acute pancreatitis/ těžká akutní pankreatitida
SAPS2	Simplified Acute Physiology Score 2/ zjednodušené skóre akutní fyziologie 2
SIRS	systemic inflammatory response syndrome/ syndrom systémové zánětlivé odpovědi
SN	sterile necrosis/sterilní nekróza
SOCS-3	suppressor of cytokine signalization 3/supresor signalizace cytokinů 3
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score/ sekvenční skóre orgánového selhání
TAP	trypsinogen activating peptid/trypsinogen aktivující peptid
TNF	tumor necrosis factor/faktor nekrotizující tumory
UZ	ultrazvuk
VEGF	Vascular endothelial growth factor/vaskulární endoteliální růstový faktor
WBC	white blood cells/leukocyty

1. ÚVOD

Akutní pankreatitida (AP) je i přes výrazné pokroky v diagnostice i léčbě stále závažným onemocněním s relativně vysokou mortalitou těžkých forem onemocnění. Těžké formy se sice vyskytují méně často než lehké, ale progresse z lehké formy do těžké je obtížně předvídatelná a často blesková (1). Akutní pankreatitida je jednou z celosvětově nejčastějších gastrointestinálních nemocí vyžadujících akutní hospitalizaci s udávanou roční incidencí 13-45 případů na 100 000 osob (2-5). V důsledku AP je v USA ročně přijato až 270 000 tisíc pacientů k akutní hospitalizaci a náklady na jejich léčbu činí přes 2,5 miliardy dolarů (3). Rozlišit v úvodu lehkou formu od těžké je dle klinických známek obtížné, a proto jsou stále hledány nové markery, které by toto rozlišení umožnily co nejčasněji po stanovení diagnózy (6-8). Dalším problémem u těžké formy onemocnění je rozlišení sterilní a infikované nekrózy. Infikovaná nekróza má výrazně vyšší mortalitu a vyžaduje odlišný terapeutický přístup. Složitost problematiky lze ilustrovat na problému profylaktického podávání antibiotik: zjednodušeně by se dalo očekávat, že jejich podání zabráni infekci pankreatické nekrózy. Bohužel nutnost použití antibiotik širokospektrých a těžký stav těchto pacientů vede k vysokému výskytu nežádoucích účinků jako jsou mykotické infekce, pseudomembranózní kolitida a další (10,11).

K určení prognózy, tzn. budoucí závažnosti průběhu akutní pankreatitidy, se používá celá řada biomarkerů a skórovacích systémů, které zahrnují jednak laboratorní ukazatele, jednak klinické údaje a nálezy zobrazovacích metod, zejména CT. Mezi laboratorní vyšetření využívané pro stratifikaci prognózy akutní pankreatitidy se řadí zánětlivé markery klasické, jako např. C-reaktivní protein, a markery novější, jako jsou cytokiny, prokalcitonin a další. V klinické praxi je snahou použít takový ukazatel, který by dokázal predikovat závažnost co nejčasněji, s co největší specificitou a senzitivitou (sumárně vyjádřenou jako AUC) a pozitivní prediktivní hodnotou.

Pro rozlišení sterilní a infikované pankreatické nekrózy je možno použít jednotlivé markery nebo jejich kombinace, CT a mikrobiologické kultivační metody z materiálu odebraného tenkojehlovou biopsií. Každá z těchto metod má své výhody i nevýhody (12-23).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 ZÁNĚTLIVÉ LABORATORNÍ UKAZATELE

Mezi zánětlivé laboratorní ukazatele se řadí několik skupin biomarkerů: již rutinně využívané proteiny akutní fáze zánětu (APP), a nověji dále: cytokiny, jakožto induktory syntézy APP, solubilní receptory cytokinů, adhezivní molekuly, prokalcitonin, který lze v širším smyslu řadit mezi proteiny akutní fáze, neopterin, elastáza neutrofilů, presepsin atd.

Ve vztahu k naší práci budou podrobněji uvedeny následující markery, resp. skupiny markerů: proteiny akutní fáze se zaměřením na C-reaktivní protein, cytokiny se zaměřením

na interleukin-6, adipokiny jakožto působky tukové tkáně se zvláštním vztahem k akutní pankreatitidě, a prokalcitonin.

2.1.1 Proteiny akutní fáze

Proteiny akutní fáze jsou dle nové definice sekrečními proteiny jaterních buněk, jejichž tvorba a uvolnění do cirkulace jsou regulovány prozáněťovými cytokiny. Za APP však nejsou považovány:

- hormony tvořené jaterními buňkami – např. prokalcitonin
- cytokiny jaterních buněk – např. interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, receptorový antagonist IL-1 (IL-1ra)
- růstové faktory tvořené v játrech

Reakce akutní fáze je fyziologický děj, který se rozvíjí při lokálním nebo systémovém zánětu, při traumatickém poškození tkání včetně stavů po chirurgických výkonech, nebo při nádorovém bujení. Méně vyjádřená je tato reakce v mnoha dalších situacích, např. po extrémní fyzické zátěži, při akutním infarktu myokardu či v období po porodu. Zjednodušeně se dá říci, že reakci akutní fáze vyvolávají stavy, kdy dochází k destrukci buněk, k jejich reverzibilnímu poškození a následné reparaci (24-25).

Při reakci akutní fáze buňky aktivně produkují a do okolí uvolňují celé spektrum mediátorů a signálních molekul, které navozují v játrech (a v menší míře i v jiných tkáních) rychlé změny v syntéze různých bílkovin. Proteiny, jejichž koncentrace v plazmě se mění výrazně (více než o 25 %), označujeme jako reaktanty akutní fáze (též proteiny akutní fáze, PAF; anglicky acute phase reactants, APR's).

Hlavní význam reakce akutní fáze:

- udržení vodní, elektrolytové a teplotní homeostázy
- protiinfekční obrana
- modulace vnímání bolesti
- odstranění ireverzibilně poškozené tkáně
- dostatečná nabídka energie
- nabídka "stavebního materiálu" (zejména aminokyselin) pro tvorbu protilátek, enzymů, hormonů a pro reparační a regenerační děje

Proteiny akutní fáze se podle odpovědi jaterních buněk na prozáněťové cytokiny dělí na pozitivní APP, jejichž koncentrace při zánětu stoupá, negativní APP, jejichž koncentrace v důsledku konverze proteosyntetické kapacity jaterních buněk klesá, a neutrální APP, jejichž koncentrace se v důsledku antagonistických efektů různých prozáněťových cytokinů výrazněji nemění.

Soubor proteinů akutní fáze je značně různorodý. Jedno z dělení uvádí následující skupiny (24): pentraxiny, inhibitory serinových proteáz, metaloproteázy, proteiny s dominantní imunomodulační aktivitou, koagulační faktory a složky komplementu. Dále rozlišujeme tzv. negativní APP, jejichž koncentrace při zánětu klesá, což je zejména albumin, transferin, prealbumin a protein vážící retinol (RBP).

Plazmatická koncentrace různých reaktantů akutní fáze se mění s různou dynamikou. Podle doby od začátku onemocnění, za niž se změní, rozdělujeme reaktanty akutní fáze do tří skupin: na časné, se střední dobou odpovědi a pozdní. Časné proteiny akutní fáze jsou bílkoviny s velmi krátkým biologickým poločasem. Změny jejich plazmatické koncentrace jsou patrné již za 6–10 hodin po začátku onemocnění. Vzestup vrcholí obvykle v průběhu druhého a třetího dne. Hlavními představiteli jsou především C-reaktivní protein (CRP) a sérový amyloid A (SAA). Posledních 10 let se v klinické praxi používá prokalcitonin (PCT), který se však podle novější definice již mezi APP neřadí.

C-reaktivní protein

C-reaktivní protein je jedním z nejdůležitějších reaktantů akutní fáze. Je to bílkovina, která hraje úlohu opsoninu. Navázaný CRP je efektivním aktivátorem klasické cesty komplementové kaskády. Dále se podílí na přímých imunomodulačních účincích vazbou svou a aktivních fragmentů na specifické receptory na membránách neutrofilů, monocytů a NK-buněk. Díky své pentamerické struktuře se řadí mezi pentraxiny. Své jméno získal díky tomu, že precipituje s tzv. C-polysacharidem pneumokoků (24).

Plazmatická koncentrace CRP se zvyšuje již za 4 hodiny po navození reakce akutní fáze a v průběhu prvních dvou dnů jeho koncentrace vzroste i více než 100krát. Maximální koncentrace CRP je dosaženo za 24–48 hodin, s biologickým poločasem 24 hodin (24). Fyziologicky bývá plazmatická koncentrace nižší než 2–4 mg/l. Rychlý a vysoký vzestup CRP (typicky na hodnoty nad 60 mg/l) doprovází především akutní bakteriální infekce, méně obvykle také mykotické infekce. Virové infekce naproti tomu bývají charakterizovány relativně malým vzestupem CRP (zpravidla pod 40 mg/l). Stanovení plazmatické koncentrace CRP proto napomáhá v rozhodnutí, zda zahájit léčbu antibiotiky (24–29). Úspěšná antibiotická terapie se pak projeví poklesem CRP, naopak při neúspěšné léčbě přetrvává zvýšení.

Stanovením CRP lze odhalit riziko pooperační infekce. Třetí den po operaci má jeho koncentrace rychle klesat k normě. Přetrvávající zvýšení nebo jen částečný pokles, následovaný dalším zvýšením, naznačuje přítomnost infekce nebo jiné zánětlivé komplikace (24).

Mírný vzestup CRP provází i infarkt myokardu. Obecně lze také konstatovat, že mírně elevované hladiny CRP jsou známkou zvýšeného kardiovaskulárního rizika. Sledování koncentrací CRP je užitečné i při monitorování autoimunitních onemocnění.

Nevýhodou CRP je jeho nízká specifita. Na rozdíl od prokalcitoninu neinformuje o tíži orgánového poškození, nýbrž pouze o přítomnosti infektu, resp. reakce akutní fáze. Vzájemně se tyto dva markery nenahrazují, ale doplňují (24-30).

Proteiny akutní fáze se střední dobou odpovědi jsou bílkoviny, jejichž koncentrace se mění 12–36 hodin po začátku onemocnění a maxima je dosaženo ke konci prvního týdne. Patří k nim α_1 -kyselý glykoprotein (orosomukoid), α_1 -antitrypsin, haptoglobin a fibrinogen.

Pozdní proteiny akutní fáze jsou zastoupeny složkami komplementu C3 a C4 a ceruloplazminem, u nichž se změny rozvíjí až po 48–72 hodinách po začátku onemocnění. Vzestup koncentrací je ve srovnání s oběma předchozími skupinami proteinů méně vyjádřen a vrcholu dosahují až po 6–7 dnech.

2.1.2 Cytokiny

Cytokiny jsou polypeptidové hormony secernované buňkami, které ovlivňují růst a metabolismus vlastních buněk nebo jiných buněk v okolí. Zřejmě první cytokin – interferon – objevili již v roce 1957 Issacs a Lindenmann jako solubilní faktor produkovaný buňkami po expozici inaktivovaným virem chřipky. Od šedesátých let minulého století byly izolovány další látky, které se v mnoha ohledech podobaly hormonům, ale jejich produkce nebyla zpravidla omezena na jeden orgán a původně se předpokládalo, že působí zejména na nejbližší okolí (parakrinní působení). Prvními peptidovými makromolekulami, které byly takto identifikovány, byly některé růstové faktory. Postupně však byla identifikována řada peptidů, které měly různé role ve vzájemné komunikaci buněk. V posledních třech desetiletích dochází k prudkému nárůstu poznatků o cytokinech, a to jak z hlediska jejich fyzikálně-chemických vlastností, tak jejich receptorů a účinků.

Cytokin je označení pro skupinu menších signálních proteinů, účastnících se významně v imunitní odpovědi. Cytokiny jsou produkovány buňkami imunitního systému (makrofágy, T-lymfocyty, atp.) a jsou schopné navodit například rychlé dělení a diferenciaci určitých typů buněk, které se účastní boje proti patogenům, případně další rysy imunitní obrany. V určitém slova smyslu cytokiny nemusejí být produkovány pouze bílými krvinkami a význam slova se rozšiřuje na všechny malé signální proteiny; termín interleukin se v tom případě používá pro signální molekuly vylučované bílými krvinkami (24).

Kromě toho byly identifikovány i membránové formy některých cytokinů. Membránové cytokiny působí na rozdíl od ostatních výrazně lokálně a nedochází k zřetelné difuzi a k odplavování. Podobného lokalizačního efektu je u některých cytokinů dosahováno jejich přilnutím na povrchové proteoglykany některých buněk.

Pro většinu cytokinů platí, že působí na několik různých buněk (jsou pleiotropní), jeden cytokin indukuje tvorbu druhého (působí v kaskádě) a také, že jednotlivé cytokiny mohou být nahrazeny jinými (cytokinový systém je tedy do jisté míry redundantní). Cytokin působí buď na buňku, která ho produkuje (autokrinní působení), na buňky ve své těsné

blízkosti (parakrinní působení) a nebo po transportu cévním řečištěm působí na vzdálené tkáně (endokrinní působení) (24, 31).

Zdrojovými buňkami cytokinů jsou především T lymfocyty (CD4+) a makrofágy, ale též jiné buňky. Obecně řečeno, cytokiny produkované leukocyty se nazývají interleukiny, z lymfocytů jsou secernovány lymfokiny a z makrofágů a monocytů monokiny.

Cytokiny hrají důležitou úlohu při iniciaci a řízení dějů vrozené i specifické imunity, dále kontrolují vývoj a funkci buněk imunitního systému, ale i jiných buněk. Cytokiny ovlivňují proliferaci, diferenciaci a migraci řady buněk. Funkce cytokinů je realizována prostřednictvím specifických receptorů, které jsou na buněčných membránách cílových buněk, cytokiny působí především lokálně (parakrinně nebo autokrinně), jen výjimečně (podobně jako hormony) endokrinně. Cytokiny působí i redundantně (více působků má stejný účinek) a někdy též antagonisticky (jeden působek inhibuje jiné) (24,32-34).

Jako léky lze cytokiny používat vzhledem k možnosti jejich přípravy rekombinantní technikou. Při klinické aplikaci se používají dávky významně převyšující přirozené koncentrace cytokinů. Vzhledem k pleiotropnímu účinku cytokinů se ostatní účinky použitého cytokinu projeví zpravidla jako nežádoucí účinky. V současné době jsou jako léky využívány nejvíce interferony, hematopoetické růstové faktory a některé interleukiny. Interferony jsou např. využívány v hepatologii a hematologii (24,35-38).

Cytokiny, růstové faktory a hormony představují chemické posly, které zprostředkovávají komunikaci mezi buňkami. Regulace buněčných a nukleárních funkcí začíná aktivací receptorů na povrchu buňky. Tyto receptory mají 2 hlavní komponenty: doménu vázající ligand, která zajišťuje specifickou vazbu s příslušným ligandem a efektorovou doménu, která zahajuje vznik biologické odpovědi po vazbě ligandu (24,34-39).

Výsledky signalizace přes cytokinové receptory závisí na několika faktorech, kterými jsou především: typ buňky, typ signálu (t.j. povaha receptoru) a spolupůsobení jiných signálů. Důsledkem může být řada procesů: stimulace buněčného dělení, diferenciaci, spouštění efektorových mechanismů, zablokování buněčného cyklu či indukce apoptózy (24,38-44).

Pro stanovení koncentrace cytokinů byly dříve používány metody biologických testů, které byly nedostatečně specifické, pracné, nákladné a obtížně reprodukovatelné. V klinické laboratoři dominují při stanovování koncentrace cytokinů různé typy imunoanalýz. Mezi nejčastěji užívané techniky patří ELISA, RIA a IRMA analýzy. Využívány jsou i metody polymerázové řetězové reakce a blottingu. Metody molekulárně biologické umožňují stanovit genotypické rozdíly nebo expresi genů pro cytokiny (kvantitu mRNA jednotlivých cytokinů).

2.1.3 Interleukin-6

Jedním z klinicky nejvíce užívaných zánětlivých markerů ze skupiny cytokinů je interleukin-6, označovaný také jako hepatocyty stimulující faktor, který je hlavním aktivátorem syntézy proteinů akutní fáze. IL-6 je pleiotropní cytokin regulující imunitní,

zánětové a hematopoetické procesy a spolu s TNF- α a IL-2 spoluvytváří celý obraz systémové zánětové reakce. IL-6 indukuje syntézu všech základních pozitivních APP.

Abnormální produkce IL-6 se uplatňuje u celé řady patologických procesů, jako jsou např. nádorová onemocnění (mnohočetný myelom, srdeční myxom) a chronické choroby na imunopatologickém podkladu (revmatoidní artritida, psoriáza).

Funkce IL-6 jsou zprostředkovány receptorem pro IL-6 a následně postreceptorovými mechanismem – JAK/STAT signální cestou.

Podobné účinky jako interleukin-6 má tzv. rodina cytokinů IL-6. Tato skupina pravděpodobně vznikla během evoluce postupnou duplikací primordiálního genu. Patří sem např. IL-11, G-CSF (granulocytární-kolonie stimulující faktor), kardiostrofin-1 (CT-1) a mj. též leptin.

IL-6 je hlavním induktorem APP v zánětové odpovědi a poskytuje tedy časnější informaci o nástupu systémové reakce než např. CRP. Nástup elevace plazmatické hladiny IL-6 je o několik hodin zpožděn oproti TNF α a IL-1 β , ale také je poté výrazně protrahovanější.

Stanovení IL-6 v kombinaci s některými APP je nesporným přínosem včasné diagnostice akutních stavů. Naráží však zejména na problémy ekonomické. Stanovení IL-6 poskytuje časnější informaci o počínající bakteriální infekci (6-12 h před vzestupem CRP). Řádově kratší poločas IL-6 může vést k „falešně“ negativním výsledkům v pozdější fázi zánětové odpovědi, na druhou stranu však umožňuje dříve zachytit časné změny (24,42,44).

Interleukin-6 vykazuje nejvyšší senzitivitu pro záchyt infekční příčiny zánětu ze všech běžně dostupných markerů (45).

2.1.4 Vybrané adipokiny

Vzhledem k tomu, že obezita je závažným rizikovým faktorem rozvoje akutní pankreatitidy a navíc se u obézních vyskytují její závažnější formy, nabízí se možnost hledat nové potenciální ukazatele závažnosti AP mezi „hormony tukové tkáně“ – adipokiny (46,47).

Tuková tkáň je aktivním sekrečním orgánem produkujícím proteinové hormony a řadu látek s autokrinním, parakrinním nebo endokrinním účinkem. Tuková tkáň není složena pouze z diferencovaných adipocytů. Na její stavbě se podílí mnoho dalších druhů buněk jako jsou endotelie, fibroblasty, myocyty, nediferencované adipocyty (preadipocyty) a imunokompetentní buňky, zejména monocyty a lymfocyty (48-51). Produkty z adipocytů a ostatních buněk tukové tkáně byly souhrnně nazvány adipokiny a podílejí se na regulaci glukózového a lipidového metabolismu, příjmu potravy, modulaci imunitní funkce, zánětlivých procesů a dalších homeostatických pochodů (49-52).

Dále jsou uvedeny adipokiny, které vykazují možný potenciál využití v prognóze akutní pankreatitidy.

Adiponektin (ADP)

Adiponektin je protein produkovaný převážně adipocyty, který byl objeven a popsán nezávisle na sobě několika skupinami (53-55). Zajímavým zjištěním je podobnost struktury adiponektinu se strukturou faktoru nekrotizujícího nádory- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α), což ukazuje na společný evoluční původ. Adiponektin je uvolňován adipocyty do cirkulace v koncentracích o několik řádů vyšších, než je tomu například u leptinu (55-56). V cirkulaci nacházíme adiponektin v nízkomolekulární formě tvořené trimery a hexamery, a vysokomolekulární formě s rozdílným účinkem na produkci glukózy a účinkem na apoptózu cévního endotelu (57).

Sekrece adiponektinu, adipokinu s inzulin-senzitizujícími a protizánětlivými účinky, je snížena u obezity a s ní spojených chorob. Přibývající důkazy naznačují, že adiponektin chrání před cévní dysfunkcí vyvolanou obezitou a diabetem, a to prostřednictvím jeho mnoha příznivých účinků na metabolismus glukózy a lipidů, jakož i na cévní funkci. Adiponektin zlepšuje citlivost na inzulín a metabolický profil, čímž snižuje klasické rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění. Kromě toho, adiponektin chrání cévy prostřednictvím pleiotropních účinků na endoteliální buňky, endoteliální progenitorové buňky, buňky hladkého svalstva a makrofágy. Údaje z humánních i animálních studií ukazují, že adiponektin je důležitou součástí adipo-cévní osy, která zprostředkovává komunikaci mezi tukovou tkání a cévním systémem (58).

Adiponektin je polypeptid o 244 aminokyselinách. Existují čtyři různé oblasti adiponektinu. První z nich je krátká signální sekvence, která cílí hormon pro sekreci mimo buňku, další je krátká oblast, která je mezidruhově variabilní, třetí je region o 65 aminokyselinách s podobností kolagenním bílkovinám, poslední je globulární doména. ADP vykazuje podobnost s C1q faktorem komplementu (C1q). Nicméně určením 3-dimenzionální struktury globulární oblasti byla zjištěna výrazná podobnost s TNF α . Adiponektin je proteinovým hormonem, který ovlivňuje celou řadu metabolických procesů včetně regulace metabolismu glukózy a oxidace mastných kyselin. ADP je secernován z tukové tkáně (a během těhotenství také z placenty) do krevního oběhu v nadbytečném množství ve vztahu k řadě dalších hormonů. Hodnoty ADP jsou u dospělých v inverzní korelaci s procentem tukové tkáně, na rozdíl od dětí, kde je tato korelace méně zřetelná (56-58).

Adiponektin je secernován do krevního oběhu, kde tvoří přibližně 0,01% všech plazmatických proteinů v koncentraci cca 5-10 mg/l. Plazmatické koncentrace odrážejí pohlavní dimorfismus, přičemž ženy mají vyšší koncentrace než muži. Hladiny adiponektinu jsou sníženy u diabetiků. Pokles hmotnosti významně zvyšuje hladiny adiponektinu.

Adiponektin se automaticky sdružuje do větších aglomerátů. V úvodu se váží tři molekuly adiponektinu a vzniká homotrimer. Trimery pokračují ve vzájemné vazbě a tvoří hexamery či dodekamery. Stejně jako plazmatické koncentrace jsou relativní hladiny struktur vyššího řádu pohlavně dimorfické, přičemž ženy mají zvýšený podíl forem s vysokou

molekulovou hmotností. Recentní studie ukazují, že vysokomolekulární formy jsou v působení na glukózovou homeostázu biologicky neaktivnější. Adiponektin o vysoké molekulové hmotnosti je asociován s nižším rizikem diabetu v podobném rozsahu jako celkový adiponektin. Oproti tomu ischemická choroba srdeční je asociována s vysokomolekulárním adiponektinem, nikoli však s nízkomolekulárním. Některé účinky adiponektinu na redukci hmotnosti jsou zprostředkovány centrálním nervovým systémem. Tento efekt je podobný efektu leptinu, tyto dva hormony mají komplementární účinky a působí synergicky (56-58).

Fibroblastový růstový faktor 21 (FGF-21)

FGF-21 je členem rodiny fibroblastových růstových faktorů (FGF) (59). Je přednostně exprimován v játrech, ale také je produkován ve tkáních ovlivňujících metabolismus glukózy – adipocytech, pankreatu a kosterních svalech (60). Reguluje glukózový a lipidový metabolismus prostřednictvím pleiotropních účinků v těchto tkáních a mozku (61). U myši vede hladovění ke vzestupu exprese FGF-21 zprostředkované PPAR-alfa v játrech, kde stimuluje glukoneogenezi, oxidaci mastných kyselin a ketogenezi jako adaptivní odpověď na hladovění. U obézních myši a opic s diabetem vede podání rekombinantního FGF-21 k mnoha pozitivním metabolickým vlivům na inzulinovou senzitivitu, hladinu glykémie, lipidový profil a tělesnou hmotnost. Tyto poznatky podporují potenciální roli FGF-21 jako léčebného prostředku pro zdravotní komplikace spojené s obezitou. Avšak v humánních studiích jsou vysoké cirkulující hladiny FGF-21 nalézány u pacientů s obezitou a s ní spojenými kardiometabolickými poruchami včetně metabolického syndromu, diabetu 2. typu, nealkoholického jaterního poškození a koronární aterosklerózy (62-64). Tato zjištění mohou vést k uplatnění FGF-21 jakožto biomarkeru komplikací spojených s obezitou (65).

Studie na hlodavcích podporují hypotézu, že FGF-21 je klíčovým fyziologickým regulátorem odpovědi na hladovění stejně jako autokrinní regulace aktivity PPAR-gama v tukové tkáni ve stavu sytosti (66,67).

FGF-21 náleží do tzv. FGF-19 podrodiny, která zahrnuje FGF-19, FGF-20 a FGF-21. Lidský FGF-21 je polypeptid o 181 aminokyselinách. FGF-21 stimuluje vychytávání glukózy v adipocytech, ale nikoli v jiných buňkách. Tento účinek je aditivní k aktivitě inzulinu. Aplikace FGF-21 u ob/ob myši vede ke vzestupu glukózových transportérů GLUT-1 v tukové tkáni. FGF-21, pokud je nadměrně exprimován u transgenních myši, také chrání zvířata před potravou vyvolanou obezitou a snižuje hladinu glukózy a triglyceridů v krvi u hlodavců s diabetem (68-72).

Adipocytární typ vazebného proteinu pro mastné kyseliny (A-FABP)

A-FABP, také označovaný jako aP2, ALBP a FABP4, je jedním z nejrozšířenějších intracelulárních transportních proteinů pro lipidy ve zralých adipocytech a makrofázích. A-FABP patří do konzervativní multigenové rodiny intracelulárních lipidů-vázajících proteinů. Dosud bylo identifikováno devět tkáňově specifických cytoplazmatických FABP (73-74).

Navzdory širokému rozptylu v proteinové sekvenci je terciární struktura společná pro všechny členy této rodiny, přičemž každá z nich tvoří charakteristický β -válec, který obklopuje hydrofobní jádro. FABP regulují metabolismus lipidů podporou difúze, sekvestrace a transportu mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCFA). Pro A-FABP bylo prokázáno, že se váže s kyselinou olejovou, kyselinou retinovou a kyselinou arachidonovou (75-82). Exprese A-FABP může být indukována jak nasycenými, tak nenasycenými LCFA (77-80).

A-FABP může fungovat jako pozitivní faktor v signalizaci mastných kyselin přímým cílením a dodávkou metabolitů mastných kyselin lipidové dráze signální transdukce. Po spojení s jednotlivými ligandy se A-FABP přemístí z cytosolu do jádra, kde dodává ligandy pro nukleární receptor PPAR γ , čímž usnadní jeho ligaci a zvýší transkripční aktivitu receptoru. Kromě toho se zdá, že A-FABP hraje důležitou roli v lipolýze. Cílené narušení A-FABP u myši vedlo ke snížení jak bazální, tak hormonálně stimulované lipolýzy v reakci na β - adrenergní stimulaci. Stimulační účinek A-FABP na lipolýzu je pravděpodobně zprostředkován fyzickou interakcí s hormon-senzitivní lipázou (HSL) (81-88).

A-FABP-knockout myši jsou částečně chráněny před inzulinovou rezistencí vyvolanou dietou navozenou či geneticky podmíněnou obezitou, což naznačuje, že tento lipidový kofaktor se také podílí na regulaci inzulinové senzitivity (89). A-FABP je sekreční protein a jeho cirkulující hladiny jsou zvýšeny nezávisle na pohlaví a věku u pacientů s obezitou a některými rysy metabolického syndromu včetně nepříznivého lipidového profilu (zvýšené triglyceridy a LDL-cholesterol, nízký HDL-cholesterol), hyperglykémie a hypertenze. Pětiletá prospektivní studie zahrnující 495 dospělých bez diabetu ukazuje, že jedinci s vyšší hladinou A-FABP při vstupu do studie—mají postupně se zhoršující kardiometabolický rizikový profil. Podle počáteční hladiny A-FABP bylo možné předpovídat rozvoj metabolického syndromu, nezávisle na obezitě, inzulinové rezistenci a dalších klasických rizikových faktorech. Na druhou stranu váhový úbytek způsobený bandáží žaludku snižuje cirkulující hladiny A-FABP u obézních jedinců. Kromě jeho role v metabolismu lipidů a citlivosti na inzulin klinické zkoušky i studie na zvířatech ukazují, že A-FABP hraje hlavní roli ve zprostředkování obezitou způsobených cévní onemocnění především tím, že vede k rozvoji inzulinové rezistence. Genetické studie podporují také úlohu A-FABP jako kauzálního faktoru zdravotních komplikací spojených s obezitou (90-96).

Rezistin

Rezistin je potenciálním spojovacím článkem mezi obezitou a inzulinovou rezistencí, resp. diabetem mellitem 2. typu. Rezistin podléhá hormonální a nutriční regulaci. U hlodavců je rezistin primárně exprimován a secernován z dospělých adipocytů, částečná tvorba je též přítomna v pankreatických ostrůvcích částech hypofýzy a hypothalamu. Sekrece rezistinu může být up-regulována několika faktory, včetně inzulinu a glukózy. U lidí je rezistin exprimován primárně makrofágy a zdá se, že je zapojen do stimulace jiných imunitních buněk k sekreci prozánětlivých faktorů včetně TNF- α . Lidský rezistin může interferovat s inzulinovou signalizací stimulací exprese fosfatázového a tenzinového homologa, který defosforyluje fosfatidylinositoltrifosfát (PIP-3) (98-99).

Také se zdá, že rezistin se podílí na rozvoji aterosklerózy u lidí tím, že podporuje tvorbu pěnových buněk a proliferaci a migraci buněk cévního endotelu a buněk hladkého svalstva. Mnoho prozánětlivých funkcí lidského rezistinu se zdá být regulováno aktivací transkripčního faktoru - nukleárního faktoru kappa B. Rozdílné role resistinu u lidí a hlodavců jsou zřejmé na základě řady publikovaných údajů, ale zcela objasněny budou až po identifikaci receptoru pro rezistin (100,101).

Adipokiny hrají významnou roli v patogenezi zánětu „nízkého“ stupně asociovaného s obezitou a metabolickým syndromem a u chronických zánětlivých a autoimunitních chorob jako je revmatoidní artritida. Rezistin a visfatin jsou pokládány za významné prozánětlivé mediátory, které rovněž zasahují do centrální regulace citlivosti na inzulin. Rezistin byl zpočátku považován za rizikový faktor inzulinové rezistence, ale následné výzkumy u lidí přinesly na rozdíl od hlodavců rozporuplné nálezy (102). Visfatin je pokládán za prospěšný adipokin s inzulin-napodobujícími a senzitivizujícími účinky, ale regulace jeho syntézy a jeho fyziologický význam v podmínkách obezity a diabetu mellitu 2. typu stále ještě nejsou plně objasněny. Přes antagonizující účinky rezistinu a visfatinu na regulaci inzulinové senzitivity mají oba tyto adipokiny prozánětlivé vlastnosti. Klinické a experimentální studie ukázaly, že exprese a sekrece rezistinu a visfatinu jsou up-regulovány během zánětu jako odpověď na prozánětlivé cytokiny. Také se zdá stále více zřejmé, že rezistin i visfatin mohou přispět k zánětlivým procesům spouštěním produkce cytokinů a aktivací NF-kappa B. Nový pohled na úlohu adipokinů z nich dělá atraktivní cíle pro nové terapeutické strategie u chronických zánětlivých chorob nebo u subklinického zánětu v souvislosti s obezitou a různými metabolickými poruchami (101).

Visfatin

Visfatin je nedávno objeveným adipocytárním hormonem s přímým vztahem k diabetu 2. typu (103). Visfatin se váže na inzulinový receptor a způsobuje hypoglykémii redukcí uvolňování glukózy z jaterních buněk a stimulací utilizace glukózy v adipocytech a myocytech. Visfatin je upregulován hypoxií, zánětem a hyperglykemií a down-regulován inzulinem, somatostatinem a statiny. Tento hormon se nachází v cytoplazmě i v jádře a byl

identifikován v mnoha tkáních a orgánech včetně mozku ledviny, plic, sleziny a varlat, ale preferenčně je exprimován ve viscerální tukové tkáni a upregulován je u některých animálních modelů obezity (104).

Viscerální tuková tkáň je považována za více škodlivou než subkutánní tuková tkáň. Visfatin je endokrinní, autokrinní i parakrinní peptid s mnoha funkcemi včetně podpory buněčné proliferace, biosyntézy nikotinamidu mono- a dinukleotidu a hypoglykemizujícího účinku. Visfatin je také známý jako kolonie pre-B-buněk stimulující faktor. U CD14+ monocytů indukuje tvorbu IL-1 β , TNF- α a zvláště IL-6. Navíc zvyšuje povrchovou expresi kostimulačních molekul CD54, CD40 a CD80. Monocyty stimulované visfatinem vykazují zvýšenou kapacitu indukce aloproliferativní odpovědi lymfocytů. U pacientů s nespecifickými střevními záněty jsou plazmatické hladiny visfatinu a exprese jeho mRNA významně zvýšena ve tkáni tlustého střeva v porovnání pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerosní kolitidou a zdravých kontrol. Makrofágy, dendritické buňky a kolonocyty mohou být podle studií s konfokální mikroskopií dalším zdrojem visfatinu. Visfatin může být považován za nový prozánětlivý adipokin (105-107).

Leptin

Leptin je proteinový hormon podílející se na regulaci energetického příjmu a výdeje. Leptin je důležitý cytokin, který hraje klíčovou roli při regulaci chuti k jídlu, příjmu potravy a metabolismu (108,109).

Leptin je 16 kDa protein tvořený tukovou tkání, obsahující 167 aminokyselin. Hormon je kódován „ob“ genem, který je lokalizován na 7. chromozómu. Většina leptinu je produkována v bílých tukových buňkách. Hladiny leptinu jsou přímo spojeny s celkovým množstvím tuku v těle. Leptin může být také produkován v hnědé tukové tkáni a v jiných částech těla, jako jsou vaječníky, kosterním svalu, fundu žláz v žaludku, placenty, kostní dřeni, jater a hypofýzy. V roce 1990 byl zmapován „ob“ gen a nakonec byl označen jako gen odpovědný za produkci hormonu, který reguluje příjem potravy a tělesnou hmotnost. Leptin působí jako hormon, který ovlivňuje objem tukové tkáně v těle. Leptin také působí přes specifické receptory v hypothalamu inhibicí chuti k jídlu dvěma mechanismy: cílí proti účinkům stimulantu uvolňovaného při příjmu potravy ve střevě nazývaného neuropeptid Y, stejně jako proti efektu kanabinoidního neurotransmiteru anandamidu, který stimuluje chuť k jídlu. Leptin také spouští syntézu inhibitoru chuti k jídlu nazývaného α -melanocyty-stimulující hormon.

Při redukci objemu tukové tkáně hladina leptinu v plazmě klesá tak, že chuť k jídlu je stimulována, dokud se tuková neobnoví. Také dochází k poklesu tělesné teploty a energetický výdej se snižuje. Naproti tomu se zvyšujícím se objemem tukové tkáně se také zvyšuje hladina leptinu a chuť k jídlu je potlačena, až dojde k úbytku hmotnosti. Tímto způsobem leptin reguluje energetický příjem a objem tukových zásob, aby byla zachována hmotnost v relativně úzkém rozmezí. Leptin také hraje důležitou roli v regulaci a ovlivnění nástupu

puberty. Např. štíhlé a podvyživené ženy mají pozdější nástup puberty než ženy s vyšší hmotností. Štíhlé ženy mají často problém s ovulací. Tukové zásoby jsou tedy velmi důležité při regulaci reprodukčních funkcí (108-111).

2.1.5 Procalcitonin

V posledních 15ti letech se v klinické praxi začíná jako reaktant akutní fáze využívat procalcitonin (PCT). Tuto bílkovinu o 116 aminokyselinách a molekulové hmotnosti 13 000 kDa fyziologicky tvoří C buňky štítné žlázy jako prekurzor hormonu kalcitoninu. Zejména při generalizovaných bakteriálních infekcích jej však začnou produkovat i další buňky, hlavně monocyty, makrofágy a neurokrinní buňky, a koncentrace této bílkoviny v plazmě prudce stoupá. PCT uvolněný při sepsi není konvertován na kalcitonin (24).

Přesný fyziologický význam procalcitoninu není zdaleka objasněn; předpokládá se, že se podílí na regulaci zánětu a má analgetické účinky. Poločas procalcitoninu je 1 den a po imunitní stimulaci vzrůstá jeho sérová koncentrace již během 2–3 hodin asi dvacetinásobně. Zvýšení lze pozorovat jen při generalizovaných bakteriálních, mykotických a protozoárních infekcích, neobjevuje se u virových infekcí. S méně výrazným vzestupem se lze setkat u polytraumat, popálenin a po rozsáhlých břišních operacích (24).

Tvorba PCT během zánětu úzce souvisí s bakteriálním endotoxinem, jehož účinek zprostředkují prozánětové cytokiny (TNF- α , IL-1, IL-6). TNF- α a IL-6 stoupají na maximum do 90-180 min po stimulu, PCT začíná stoupat po 3-6 h a jeho tvorba vrcholí za 6-8 h po stimulu. Poločas PCT je 25-30 h, kulminace plazmatických hladin nastává mezi 12 – 48 h po stimulu. Na rozdíl od prozánětových cytokinů (IL-6, TNF- α), jejichž elevace v zánětových situacích je nespecifická vůči typu zánětu, stoupá PCT s vysokou selektivitou u zánětů bakteriálních. Procalcitonin má (zejména u septických pacientů) na rozdíl od cytokinů (IL-6) vysokou senzitivitu a specificitu. Nejvyšších plazmatických hladin dosahuje PCT u akutních bakteriálních infekcí a při sepsi – největším přínosem PCT je diferenciální diagnostika lokalizované bakteriální infekce a sepse, těžké sepse a septického šoku. V některých situacích PCT slouží k odlišení bakteriálního a virového zánětu. Lokální bakteriální záněty stejně jako opouzdřené abscesy PCT významně nezvyšují. Virové infekce a generalizované mykózy nezvyšují PCT vůbec, nebo jen mírně (112-118).

2.2 AKUTNÍ PANKREATITIDA

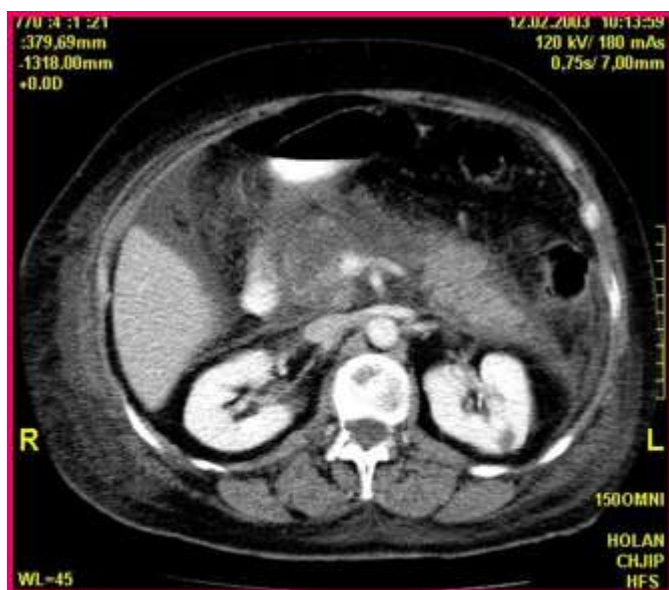
Akutní pankreatitida (AP) je akutním zánětem exokrinního pankreatu. Etiopatogeneticky jde o zánět pankreatu a dalších retroperitoneálních tkání. Ve střevě, peritoneální dutině a retroperitoneu jsou zadrženy litry extracelulární tekutiny. Nejzávažnějším faktem je skutečnost, že progresse ze stadia lehkého edému k hemoragické nekrotizující pankreatitidě je často blesková. Úkolem laboratorních ukazatelů v rámci diagnostiky AP je přispět ke stanovení diagnózy, pomoci rozlišit lehkou a těžkou

pankreatitidu, a to pokud možno co nejdříve, stratifikovat nemocné do skupin s rozdílným terapeutickým přístupem a následně rozlišit sterilní a infikovanou nekrózu (1,6,7,15,133-140). Diagnostické kritérium pro akutní pankreatitidu je splnění minimálně 2 ze 3 následujících kritérií: klinického (bolest břicha v horní polovině), laboratorního (trojnásobný vzestup sérové hladiny amylázy a/nebo lipázy proti horní hranici referenčního rozmezí) a/nebo zobrazovacího (CT/MR/UZ) (140).

Normální hodnota sérové amylázy ne vždy stoprocentně vylučuje akutní pankreatitidu, záleží na anamnéze – odstupu od začátku potíží (141,142).

Těžká akutní pankreatitida je definována přítomností zánětu pankreatu s alespoň jednou z následujících charakteristik:

- lokální komplikace zánětu žlázy:
 - nekróza (viz Obr. 1)
 - pseudocysta (viz Obr. 2)
 - absces (viz Obr. 3)
- orgánové selhání (nejčastěji plicе, oběh, ledviny, játra) (viz Obr. 4)



Obr. 1: Akutní pankreatitida v CT obraze

Legenda: CT nález znázorňuje těžkou akutní pankreatitidu u 63leté ženy s rozsáhlou nekrózou v oblasti hlavy pankreatu a části těla, jejichž struktura je výrazně setřelá a zánět infiltruje peripankreatickou tkáň; kauda pankreatu má relativně zachovalou strukturu.

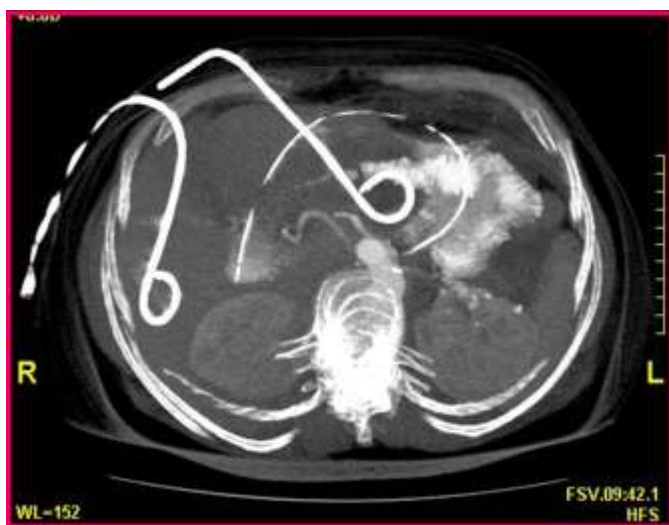
CT snímek byl poskytnut s laskavým svolením prim. MUDr. Hany Paškové a MUDr. Jiřího Holana, MBA z Radiodiagnostického oddělení Nemocnice Písek, a.s.



Obr. 2 Pankreatická pseudocysta v CT obraze

Legenda: CT nález znázorňuje těžkou akutní pankreatitidu u 53letého muže s rozvojem objemné pseudocysty v oblasti nekrotické hlavy pankreatu

CT snímek byl poskytnut s laskavým svolením prim. MUDr. Hany Paškové a MUDr. Jiřího Holana, MBA z Radiodiagnostického oddělení Nemocnice Písek, a.s.



Obr. 3 Pankreatický absces na CT rekonstrukci

Legenda: CT nález znázorňuje těžkou akutní pankreatitidu u 53letého muže s rozvinutým abscesem oblasti hlavy a těla pankreatu a dalším abscesem vpravo pararenálně; oba tyto abscesy jsou drénovány (silné CT-kontrastní drény v uvedených prostorech); tenká CT-kontrastní linie je nasojugální sonda.

CT snímek byl poskytnut s laskavým svolením prim. MUDr. Hany Paškové a MUDr. Jiřího Holana, MBA z Radiodiagnostického oddělení Nemocnice Písek, a.s.



Obr. 4: Systémová komplikace AP v CT obraze – ARDS (adult respiratory distress syndrome)

Legenda: CT nález znázorňuje těžkou formu ARDS u 53letého muže s těžkou AP; jsou přítomny rozsáhlé infiltráty a konsolidace plicní tkáně v důsledku intersticiálního i alveolárního edému, atelektázy.

CT snímek byl poskytnut s laskavým svolením prim. MUDr. Hany Paškové a MUDr. Jiřího Holana, MBA z Radiodiagnostického oddělení Nemocnice Písek, a.s.

Pro predikci tíže AP se používají laboratorní ukazatele, modifikovaná Ransonova kritéria, APACHE-II skóre a řada dalších skórovacích systémů. Mortalita těžké akutní pankreatitidy se pohybuje od 10-20% u sterilní nekrózy (SN) po 20-85% u nekrózy infikované (IN). K úmrtí dochází v časně šokové fázi nebo na komplikace infikované nekrózy (sepsi či multiorgánové selhání). Strategie léčby je u SN a IN výrazně odlišná, a proto je žádoucí tyto dvě formy rozlišit co nejdříve. Definitivním potvrzením infikované nekrózy je pozitivita kulturačního nálezu odebraného tenkojehlovou biopsií či pooperačně, nebo nepochybné známky infekce při zobrazovacím vyšetření, nejčastěji CT (bublinky plynu). Nicméně tyto nálezy nejsou ihned k dispozici, často se s provedením biopsie váhá, a to i oprávněně, a proto jsou stále hledány laboratorní markery infekce pankreatické nekrózy, které by umožnily běžným biochemickým vyšetřením sterilní a infikovanou nekrózu diskriminovat (134,135,143).

2.2.1 Epidemiologie AP

Incidence AP je ve vyspělých zemích udávána 79/100 000/rok, celková mortalita se pohybuje kolem 1,3/100 000/rok. V posledních dvaceti letech se klinický obraz a průběh akutní pankreatitidy výrazně změnily. Do osmdesátých let se pohybovala letalita ve všech studiích u pankreatitidy bez ohledu na tíži onemocnění mezi 11% a 15%, zatímco v současné době klesla na rozmezí mezi 5 - 10%. Podobně je tomu u těžké pankreatitidy, kde mortalita dosahovala až 50%, zatímco nyní se pohybuje mezi 10 – 20% a v některých studiích se

dostává až pod 10%. Podle údajů z Long Island Jewish Medical Center v New Yorku klesla letalita ze 13,5% v období 1978 – 1982 na 5% v období 1993 – 1997 (75, resp. 208 nemocných), přičemž ve skupině nemocných s těžkou pankreatitidou se snížila letalita dokonce z 50% na 18%. Podobně sníženou mortalitu lze zaznamenat i u jiných akutních stavů. Jednou z příčin je zkvalitnění intenzivní péče s monitorací a rychlou a účinnou korekcí kardiálních, plicních, renálních, metabolických a hematologických abnormalit. Průměrná mortalita u infikované pankreatické nekrózy dosáhla 25% (rozmezí 6 - 56%) (2-5).

2.2.2 Etiologie AP

K nejčastějším etiologickým faktorům AP patří cholelitiáza a alkohol, méně častými bývají nitrobrší operace, endoskopická retrográdní cholangiopankreatografie, papilosfinkterotomie, abdominální traumata, virové, bakteriální a parazitární infekce, kongenitální anomálie pankreatu, benigní a maligní procesy Vaterovy papily, hypertriglyceridémie, renální insuficience, systémová onemocnění a některé typy intoxikací. Vzácně je příčinou AP hyperkalcémie vyvolaná primární hyperparatyreózou.

Podle recentních publikací jsou příčiny zastoupeny následovně: cholecystolitiáza (50%), alkohol (30%), hyperlipidémie (5%), trauma (3%), idiopatická (12%) (2,5,144).

2.2.3 Patogeneze AP

Patogeneticky je AP zánětem pankreatu a dalších retroperitoneálních tkání vyvolaný autodigescí proteázami, které jsou slinivkou produkovány. Ve střevě, peritoneální dutině a retroperitoneu jsou mnohdy zadrženy litry extracelulární tekutiny. Nejzávažnějším faktem je, že progresse ze stadia lehkého edému k hemoragické, nekrotizující pankreatitidě je často blesková.

Těžká akutní pankreatitida má 2 klinické fáze. První je charakterizována syndromem systémové zánětové odpovědi (SIRS) a trvá prvních deset dní onemocnění. Druhá fáze začíná na konci druhého týdne, když se objeví infekční komplikace. První 4 dny jsou zásadní pro vývoj akutní pankreatitidy, během nich se objeví těžká forma nemoci u 15 – 25% pacientů.

Průběh akutní pankreatitidy je variabilní. Akutní pankreatitida se může vyvíjet jako lehká nebo těžká forma. Ve velké většině případů (80 – 90%) je o průběhu rozhodnuto již během prvních 24 hodin (jak o tom svědčí laboratorní markery tíže onemocnění) a jen u menšiny pacientů se z počáteční lehké pankreatitidy postupně vyvíjí těžké onemocnění. Lehká pankreatitida reprezentuje přibližně 80% všech onemocnění. Specifickým a iniciálním prvkem AP je aktivace pankreatických enzymů. Ústřední roli hraje aktivace trypsinu odštěpením TAP, který následně aktivuje další enzymy s výjimkou lipázy. Největší patogenní potenciál vykazují elastáza a lipáza spolu s volnými mastnými kyselinami. Pankreas chrání před předčasně intrapancreaticky aktivovanými enzymy celá řada ochranných mechanismů: separovaná tvorba enzymů v Golgiho komplexu, extrapancreatická aktivace trypsinogenu, konfigurace molekuly trypsinu, inhibitory trypsinu, autodegradace. Významnou roli v

patogenezi hraje kalcium, které je důležitým mediátorem patologických změn. Fyziologické zvýšení kalcia má charakter oscilací a vede ke stimulaci sekrece, zatímco patologické dlouhodobé či nízkofrekvenční vede k buněčnému poškození. Časným i perzistujícím patogenetickým faktorem jsou ischemie/reperfuze s hypoxií a následným vznikem reaktivních forem kyslíku (ROS), které se v patogenezi zánětlivých onemocnění uplatňují univerzálně. Do patogenních mechanismů jsou zapojeny cytokiny a mediátory zánětlivých pochodů, které se tvoří v monocitech, makrofázích, fibroblastech, endoteliích a lymfocytech v důsledku jejich hyperstimulace. Pro- a protizánětlivé cytokiny tvoří delikátně vybalancovanou soustavu (IL-1, IL-2, IL-6, TNF-alfa, vs. IL-1ra, IL-4, IL-10). Významným momentem je chemotaktické atrahování neutrofilů do postižených oblastí zprostředkované ROS, které naopak aktivované leukocyty v nadbytku generují. Jedním z ústředních mediátorů je faktor aktivující plazminogen (PAF), který se tak stal cílem terapeutických pokusů, klinicky ovšem nepřínosných.

Pro lehkou pankreatitidu jsou příznačné minimální poruchy funkce jednotlivých orgánů a její průběh směřuje k rychlé a úplné úzdavě. Subjektivní obtíže, fyzikální nález a laboratorní odchylky se při adekvátní léčbě rychle upravují. Patologickoanatomickým korelátem je intersticiální edém. Ojediněle mohou být přítomny drobné parenchymové nekrózy. Peripankreatické tukové nekrózy nevylučují diagnózu lehké pankreatitidy.

Definice těžké akutní pankreatitidy je podle Atlantského konsenzu podmíněna přítomností vznikem systémové (kardiovaskulární, respirační, renální selhání, poruchy koagulace a hypokalcémie, krvácení do trávicí trubice) či lokální komplikace (nekróza, absces nebo pseudocysta) (133,145-148).

Morfologickým korelátem těžké pankreatitidy je obvykle pankreatická nekróza, oba pojmy však vycházejí z odlišných aspektů a překrývají se pouze z větší části. Zjednodušeně lze říci, že nekrotizující pankreatitida je vždy těžká, avšak u klinicky těžké pankreatitidy (definované například renální insuficiencí) může nekróza chybět. Těžká pankreatitida je charakterizována rozsáhlou nekrózou a omezenou přítomností apoptózy, zatímco u lehké (například ceruleinové) pankreatitidy je tomu naopak. Tato pozorování vedou k úvahám o protektivním působení apoptózy.

Přibližně první dny až dva týdny u těžké pankreatitidy probíhají pod obrazem tzv. SIRS (systemic inflammatory response syndrome, definuje jej přítomnost nejméně dvou z těchto faktorů: teplota $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ či $<36\text{ }^{\circ}\text{C}$, tep $>90/\text{min}$, dechová frekvence $>20/\text{min}$ či $\text{PaCO}_2 <4,3\text{ kPa}$, počet leukocytů $>12 \times 10^9/\text{l}$ nebo $<4 \times 10^9/\text{l}$ či více než 10% nezralých elementů) (146).

Pankreatická nekróza se často infikuje s pravděpodobností úměrnou svému rozsahu. Pankreatická infekce negativně ovlivňuje další průběh onemocnění, je nejčastější indikací k operaci pankreatu a vedle časného oběhového selhání je další nejčastější příčinou úmrtí. Dnes je prokázáno, že infekce rozsáhlé pankreatické nekrózy je závažným rizikovým faktorem

akutní pankreatitidy. Rozvoj závažných komplikací a letalita je u infikované nekrózy vyšší než u nekrózy sterilní (17,143,148,149).

2.2.4 Klasifikace AP

Podle atlantské klasifikace, původem z roku 1993, revidované v roce 2012, by měla být AP klasifikována jako lehká nebo těžká v závislosti na rozvoji orgánových selhání a/nebo lokálních komplikací. Většina případů AP odpovídá lehké formě a pacienti se většinou uzdraví spontánně během několika dnů bez potřeby specifické terapie. Těžká forma AP byla podle původní atlantské klasifikace definována přítomností jednoho nebo více následujících kritérií: Ransonovo skóre ≥ 3 nebo APACHE-II skóre ≥ 8 , selhání jednoho nebo více systémů jako je šok, respirační insuficience, selhání ledvin, gastrointestinální krvácení, těžká trombocytopenie a hypokalémie a lokální komplikace jako je nekrotizující pankreatitida, vznik abscesu nebo pankreatická pseudocysta. Takto definovaná těžká forma AP je přítomna až ve 25% případů, s mortalitou 10 – 20% (3,145,151).

Revize atlantské klasifikace z roku 2012 přinesla určité změny v klasifikaci závažnosti AP i terminologii názvů používaných pro nálezy na CECT (contrast enhanced computed tomography) (152):

Stupně závažnosti akutní pankreatitidy:

- lehká AP: chybí orgánové selhání nebo lokální/ systémové komplikace
- středně závažná AP: lokální nebo systémové komplikace
- těžká AP: přetrvávající jednotlivé nebo vícečetné orgánové selhání

Lehká AP nemá orgánové, lokální ani systémové komplikace. Pankreatitida rychle regreduje, úmrtí je vzácné a pacienti jsou obvykle propuštěni do 1 týdne.

Středně těžkou AP doprovází přechodné orgánové selhání, lokální komplikace a/nebo systémové komplikace trvající do 48 hodin. Mortalita je zvýšená stejně jako morbidita, ale převážně jen do 8%. Pacienti jsou obvykle propuštěni druhý nebo třetí týden, někdy však vyžadují delší hospitalizaci kvůli lokálním či systémovým komplikacím. Těžká AP je definována přetrvávajícím orgánovým selháním buď v úvodu nebo v dalším průběhu nemoci, pacienti většinou mají 1 nebo více lokálních a/nebo systémových komplikací. Pacienti, u nichž se vyvine těžká AP v časně fázi, mají výrazně zvýšenou mortalitu (36-50%). Pozdější rozvoj infikované nekrózy vede k extrémně vysoké mortalitě.

Termíny používané pro novou klasifikaci založené na kontrastním CT vyšetření (150, 153):

- intersticiální edematózní pankreatitida: zánět pankreatické a/nebo peripankreatické tkáně bez nekrózy

- nekrotizující pankreatitida: nekróza ve tkáni pankreatu a/nebo peripankreatická nekróza
- akutní peripankreatická tekutinová kolekce: peripankreaticky uložená tekutina, která se objeví během prvních 4 týdnů akutní edematózní pankreatitidy
- pankreatická pseudocysta: dobře definovaná ohraničená kolekce tekutiny bez nebo s minimální solidní složkou, která se objeví během prvních 4 týdnů akutní edematózní pankreatitidy
- akutní nekrotická kolekce: kolekce tekutiny i solidní složky (nekrózy), která se objeví během nekrotizující pankreatitidy; tato kolekce může ovlivňovat pankreatickou nebo peripankreatickou tkáň
- ohraničená nekróza: zralá, ohraničená akutní nekrotická kolekce s dobře definovanou zánětlivou stěnou; tendence k uzrání se objevuje po více než 4 týdnech po začátku AP

CT je nejdůležitější metoda pro určení morfologických změn na slinivce v souvislosti s akutní pankreatitidou. CT s podáním kontrastní látky má cca 90 % přesnost pro detekci nekrózy. Pro číselnou klasifikaci nálezu na CT se používá tzv. CTSI prognostické skóre (CT severity index) (150-158). CTSI skóre je součtem Balthazarova skóre a skóre pankreatické nekrózy – viz tabulka 1.

Tabulka 1. CTSI skóre (Computed Tomography Severity Index)

Balthazarovo skóre	Nález na CT	Body
A	Normální CT	0
B	Fokální nebo difúzní edém pankreatu	1
C	Abnormality pankreatu a peripankreatický zánět	2
D	Tekutinová kolekce v jedné lokalizaci	3
E	2 nebo více tekutinových kolekcí a/nebo bubliny plynu v pankreatu nebo přiléhající	4
Procento nekrózy		
	Bez nekrózy	0
	0 - 30% nekróza	2
	30 - 50% nekróza	4
	> 50% nekrózy	6

Lehká pankreatitida odpovídá 0 – 2 b. CTSI, středně těžká AP 3 – 6 b. CTSI, těžká AP 7 – 10 b. CTSI.

Důležité je správné načasování kontrastního CT vyšetření. Do 48 hodin od začátku příznaků nemá smysl, protože morfologické změny nejsou ještě zřetelně vyjádřeny. Detekce nekrózy pomocí dynamického CT vyšetření (bez kontrastní látky a následně s kontrastní látkou) je 80 – 90 %. CTSI skóre závažnosti akutní pankreatitidy bylo pro predikci závažnosti potvrzeno množstvím studií jako přesnější než APACHE-II skóre, Ransonovo skóre a CRP (159). CTSI dobře koreluje s prognózou pacientů (160-166).

2.2.5 AP, obezita a zánět

Obezita jako rizikový faktor těžké AP

Obezita je rizikovým faktorem vzniku AP. Incidence AP u obézních (BMI>30 kg/m²) je častější než u neobézních (odds ratio OR=2,9). Navíc obezita je asociována s rozvojem lokálních a systémových komplikací a zvyšuje mortalitu (OR=2,1). Klinická pozorování naznačují, že intraabdominální tuková tkáň může hrát důležitou patofyziologickou roli v rozvoji multiorgánové dysfunkce a morbidit i mortality asociované s AP (167).

Mechanismy, kterými obezita zvyšuje závažnost AP jsou nejasné. Bylo navrženo několik hypotéz:

- 1) u obézních pacientů je výraznější zánět slinivky břišní;

- 2) je přítomno zvýšené nahromadění tuku ve slinivce břišní, kde jsou často lokalizovány nekrózy;
- 3) zvýšené množství jak peri-, tak intrapancreatického tuku a zánětlivých buněk vysvětluje vysoký výskyt zánětu slinivky a nekróz u obézních pacientů;
- 4) jaterní dysfunkce spojená s obezitou může zvýšit systémovou zánětlivou reakci změnou detoxifikace zánětlivých med.átorů;
- 5) nesoulad ventilace a perfúze vede k hypoxii spojené s nízkým průtokem slinivkou a může snížit oxygenaci pankreatických buněk a zesílit poškození pankreatu.

Nekróza peripankreatického tuku způsobuje masivní uvolnění cytokinů (jako je IL-1, IL-6, TNF) a adipokinů (adiponektin, rezistin, leptin), což pravděpodobně vede k multiorgánové dysfunkci a metabolickým změnám jako je inzulinová rezistence nebo dyslipidémie. Progrese peripankreatických tukových nekróz určuje závažnost pankreatitidy a tudíž vzestup specifických adipocytárních proteinových markerů by mohl sloužit jako prediktor klinického průběhu.

Jedna hypotéza je založena na faktu, že obézní pacienti mají vyjádřenou zvýšenou zánětlivou odpověď v pankreatu. Druhá hypotéza předpokládá, že obézní pacienti mají zvýšenou akumulaci tuku ve slinivce a okolo ní, kde jsou často lokalizovány nekrózy. Riziko pankreatické infekce a zánětu je proporcionální zvýšenému množství peripankreatického tuku (168).

Podle studie Franco-Ponse, má poškození tukové tkáně důležitý vliv na aktivaci rezidentních makrofágů a dynamiku odpovědi imunitních buněk. Je pravděpodobné, že nekróza tukové tkáně vede k silné infiltraci poškozených oblastí leukocyty. V těchto podmínkách se může tuková tkáň stát důležitým zdrojem prozánětlivých mediátorů účastnících se progrese lokálního poškození k systémové zánětlivé odpovědi u AP. V tom případě lze souhlasit, že zánět tukové tkáně u AP může vést k horší prognóze u obézních pacientů (169).

Na základě publikovaných studií jsme vybrali následující tři adipokiny:

1. adiponektin, jakožto marker s rozporuplnými daty o možnosti predikce prognózy u AP
2. A-FABP, jakožto marker propojující metabolickou homeostázu a zánět, jehož zvýšené hladiny jsou přítomny u kriticky nemocných a jsou asociovány s horší prognózou
3. FGF-21, u něhož prakticky chybí data z humánních studií u AP a experimentální modely prokazují jeho protektivní roli proti buněčnému poškození během zánětu u AP

Adiponektin

ADP ve většině dosavadních studií selhal jako prediktivní marker i jako marker nekrózy peripankreatického tuku. ADP jak u lidí, tak v experimentálních modelech, jeví tendenci k nižším hladinám u těžkých forem akutní pankreatitidy, což vede k domněnce, že ADP hraje protektivní roli. Hypoadiponektinémie přítomná u obézních pacientů může být zodpovědná za jejich horší klinický průběh (167). Tuto domněnku potvrzují např. práce Sharmy (193) a Schäfflera (195), v rozporu je naopak práce Tukiainena (194).

A-FABP

U kriticky nemocných byly prokázány zvýšené hladiny A-FABP, které vedou k inzulinové rezistenci a uplatňují se také jako prognostický ukazatel. Propojují tak metabolickou homeostázu a zánět. A-FABP může souviset s expresí Toll-like receptorů, aktivací makrofágů, syntézou a uvolněním prozánětlivých cytokinů interleukinu-6 a tumor nekrotizujícího faktoru alfa, aktivací exprese cyklooxygenázy-2 (COX-2) a syntézy eikosanoidů. Tyto faktory mohou způsobit inzulinovou rezistenci a iniciaci i progresi zánětu a sepse. Sériové měření těchto pro- a proti- zánětlivých molekul a korelace jejich hladin k progresi nebo regresi sepse a jiných zánětlivých procesů může vytvořit nový přístup k predikci prognózy u zánětlivých stavů a eventuálně by mohlo vést k rozvoji nových terapeutických strategií (170). Huang a kol. uvádějí, že A-FABP může být využit jako biomarker prognózy u kriticky nemocných. Není ale jasné, proč by měly být hodnoty A-FABP u kriticky nemocných zvýšeny nebo co tento vzestup znamená (171). A-FABP moduluje tvorbu zánětlivých cytokinů a akumulaci cholesterolových esterů, blokáda genu pro A-FABP chrání před aterosklerózou. Tyto poznatky posilují domněnku, že A-FABP integrací metabolických a zánětlivých drah zajišťuje klíčové spojení mezi složkami metabolického syndromu, což by mohlo vést k využití blokady proteinu A-FABP v léčbě srdečních chorob, diabetu mellitu, astmatu, obezity a steatózy jater (170).

FGF-21

Fibroblastové růstové faktory prokazují různé biologické účinky v rozličných vývojových a metabolických procesech. Většina fibroblastových růstových faktorů zprostředkuje své biologické aktivity jakožto extracelulárně působící proteiny vazbou na buněčné povrchové tyrozinkinázové FGF receptory a jejich aktivací (FGFRs). Typickým znakem signalizace zprostředkované FGF je to, že k vazbě a aktivaci vyžaduje β Klotho, transmembránový obligátní koreceptor. Studie Johnsona při použití in vivo modelu ceruleinem indukované AP demonstruje velmi rychlou expresi FGF-21 (během minut), což vede k domněnce, že FGF-21 má důležitou funkci v počátku zánětu. Na myších modelech jejich studie prokazuje protektivní roli FGF-21 proti buněčnému poškození během zánětu.

Jejich nálezy prokázaly, že FGF-21 inhibuje časnou aktivaci pankreatických stelátních buněk (PSC), čímž tlumí fibrotickou remodelaci. Tato studie podporuje domněnku, že poškozené pankreatické acinární buňky exprimují β Klotho receptor, což je základem parakrinní nebo autokrinní regulace FGF-21. Zdá se, že indukce tvorby FGF-21 je omezena na časnou fázi zánětu na rozdíl od exprese růstových faktorů FGF-1, -2, -7 a -10 během regenerace pankreatu. Aktivace rychlých signálních drah a jaderná translokace transkripčních faktorů byly identifikovány jako kritický regulátor a modulátor lokálního a systémového poškození během AP (172).

2.2.6 Možnosti predikce závažnosti akutní pankreatitidy

Závažnost AP lze predikovat různými způsoby. Je možno používat jednotlivé laboratorní ukazatele (IL-6, PCT, Trypsinogen activating peptid – TAP) nebo jejich kombinace spolu s parametry fyziologických funkcí ve formě různých skórovacích systémů (modifikovaná Ransonova kritéria, Glasgowská kritéria, APACHE-II skóre, BISAP skóre). Často se používá predikce na základě nálezu na CT – CTSI skóre (viz kap. 2.2.4). Není však možné predikovat závažnost AP na podkladě hodnot amylázy a lipázy.

2.2.6.1 Vybraná laboratorní vyšetření

Existuje celá řada publikací zaměřených na různé markery a jejich kombinace ve vztahu k různým klinickým situacím v průběhu akutní pankreatitidy: diagnostiku, predikci závažnosti v průběhu prvních 48 hodin, pozdější predikci závažnosti a diferenciální diagnostiku sterilní a infikované nekrózy. Nejvíce konzistentních dat bylo publikováno o následujících biomarkerech: CRP, PCT, IL-6. V posledních letech přibývá velké množství publikací o adipokinech.

2.2.6.1.1 CRP

O CRP jakožto „klasickém“ markeru je k dispozici velké množství publikovaných dat. Převážná většina studií prokazuje významnou schopnost predikce závažnosti AP v časně fázi, tzn. do 48 h. Např. ve studii Khany z roku 2013 (173) byla AUC pro CRP v predikci těžké AP 0,90 a pro mortalitu 0,75. CRP v této práci prokázalo slibné výsledky v časně predikci závažnosti AP a rozvoji pankreatické nekrózy. Již od roku je CRP součástí Ransonových kritérií – viz dále kap. 2.2.5.2 (174,175). Práce o významu predikce závažnosti AP pomocí CRP lze v literatuře vystopovat již od roku 1986 (170-178,180).

Podle studie Raua, ale i dalších publikovaných prací, je z ROC analýzy patrné, že CRP (AUC=0,924) je výrazně lepším prediktorem pankreatické nekrózy než PCT (AUC=0,792) a IL-8 (AUC=0,524) (181).

2.2.6.1.2 Prokalcitonin

O PCT jakožto zástupci novějších markerů v predikci závažnosti AP se objevují práce cca od roku 1996. Např. již zmíněná studie Raua z roku 1997 (181) a další z roku 2000 (182) uvádějí, že mediány koncentrací PCT jsou významně vyšší u pacientů s infikovanou nekrózou než u pacientů se sterilní nekrózou, zatímco pro CRP nebyla taková diference zjištěna. U edematózní pankreatitidy byly mediány PCT i CRP nízké. Pomocí ROC analýzy byl nalezen cut-off pro predikci infikované nekrózy či perzistující pankreatické sepse pro PCT 1,8 µg/l. Pokud byl tento cut-off překročen po dva následující dny, schopnost predikce infikované nekrózy byla následující: senzitivita 94% a specifita 91% (181).

Podle studie Richého z roku 2003 byly hodnoty PCT a IL-6 vyšší u pacientů s IN ($p<0,003$ a $p<0,04$). Žádný rozdíl nebyl nalezen pro TNF- α a CRP. Kombinace IL-6<400 ng/l a PCT<2 µg/l nejlépe identifikovala pacienty, kteří neměli riziko pro rozvoj infikované nekrózy. Negativní prediktivní hodnota činila pro tyto cut-off hodnoty 91%, senzitivita a specifita 75% a 84% (183). Ve studii Mándiho byly koncentrace PCT relativně vysoké u pacientů s IN a sepsí různého původu 8,5±4,8 µg/l (průměr ± směrodatná odchylka). Žádní pacienti se SN nepřesáhly hodnoty 1 µg/l. Senzitivita, specifita a pozitivní prediktivní hodnota pro diskriminaci IN a SN byly pro PCT 90%, 100% a 100% ($p<0,0001$) (184). Podle Dambrauskase PCT samotný nebo v kombinaci s IL-6 nejlépe identifikuje pacienty, kteří nejsou v riziku infekce pankreatické nekrózy (185).

Systematický přehled Mofidiho z roku 2009 uvádí senzitivitu a specifitu PCT pro predikci těžké AP na podkladě 52 prací 72% resp. 86% s AUC=0,87. Senzitivita a specifita PCT pro predikci pankreatické nekrózy zde byla 80% a 91% (186).

2.2.6.1.3 Interleukin-6

Podle Khanny hodnoty IL-6 v den přijetí a koncentrace CRP 2. den po přijetí umožňují lepší predikci závažnosti AP v porovnání s multifaktoriálními skórovacími systémy (173).

Podle přehledu Aouna z roku 2009 bylo pro IL-6 publikováno 7 studií ve vztahu k hodnotám 1. den po atace a 4 studie týkající se hodnot 2. a 3. den. Senzitivita IL-6 pro predikci SAP se pohybovala mezi 81,0 až 83,6% a specifita mezi 75,6 až 85,3% pro den 1, 2 a 3 (187).

Ve studii Mándiho, která porovnávala PCT, IL-6 a ICAM v predikci infikované pankreatické nekrózy dosáhla senzitivita, specifita a PPV IL-6 pro diskriminaci infikované od sterilní pankreatické nekrózy 100%, 20% a 55% ($p=0,474$) (184).

2.2.6.1.4 Další cytokiny

Z dalších cytokinů je nejvíce publikací ve vztahu k predikci závažnosti AP dostupných o IL-8, IL-10 a solubilním receptoru TNF- α . Relativně nejvíce prací se týká IL-8. Ve studii Aouna bylo pro IL-8 analyzováno 5 studií pro 1. den a 4 studie pro 2. den.

Senzitivita pro IL-8 byla pro 1. a 2. den 65,8% a 70,9% se specifitou 66,5% a 91,3%. AUC pro IL-8 byly 0,73 a 0,91 pro 1. a 2. den (187).

V práci Fisica z roku 2013 byly zkoumány následující cytokiny: IL-6, IL-8, IL-10. Pro IL-6 byla zjištěna senzitivita 82%, specificita 65%, PPV 35% a NPV 94%. Prozánětlivý IL-8 měl horší schopnost diferenciaci lehkých a těžkých forem AP. I když cut-off 42,5 ng/l dosáhl statistické významnosti ($p < 0,008$), senzitivita a specificita byla relativně nízká (68% a 67%). Cut-off pro IL-10 7,2 ng/l diskriminoval lehké a těžké formy se senzitivitou 75% a specifitou 56% (188).

Studie Bucura týkající se IL-17 prokázala jeho 97% senzitivitu a 94% specifitu v časně predikci těžké AP (189).

Podle Mentuly IL-10 > 50 ng/l predikoval SAP se senzitivitou 88%, specifitou 93%, PPV 56% a NPV 99% (190).

2.2.6.2 Skórovací systémy

Skórovací systémy jsou u AP používány desítky let a stále se objevují další. K nejstarším skórovacím systémům patří tzv. Ransonovo skóre, po drobných úpravách nazýváno jako modifikované Ransonovo skóre. Původní z roku 1974 bylo určeno pro alkoholickou AP (175), v roce 1978 bylo skóre modifikováno i pro biliární AP (206). Zahrnuje celkem 11 hodnot: 5 vstupních a 6 hodnocených za 48 h. Méně než 3 body značí nulovou mortalitu, 3 a více pozitivních faktorů svědčí pro těžkou pankreatitidu, více než 6 predikuje mortalitu větší než 50% (175). Již sám Ranson ale zdůrazňoval, že prognosticky nejzávažnějším faktorem je obezita.

Novější jsou Glasgowská kritéria (Glasgow-Imrie), která mohou být stanovena pouze po 48 h od přijetí. Zahrnují 8 laboratorních ukazatelů a věk. Cut-off hodnota pro rozlišení lehké a těžké AP je rovná 3 (207-209).

BISAP skóre (bedside index for severity in acute pancreatitis) zahrnuje hodnotu močoviny v séru, mentální status, SIRS, věk a pleurální výpotek (173,210).

Pro informační úplnost lze dále uvést běžná intenzivistická skóre APACHE II, které se při doplnění o kritérium obezity nazývá APACHE-O, dále MOSS a SOFA skóre. Tyto skórovací systémy se u pacientů s AP často používají, protože jsou pacienti převážně hospitalizováni na jednotkách intenzivní péče. Podrobnější rozbor těchto skóre přesahuje rámec této práce (21, 143, 212-214). Rozlišení lehké a těžké AP pomocí 3 nejčastějších skórovacích systémů je následovné:

Lehká AP: Ransonovo skóre < 3, APACHE II < 8, CTSI < 7

Těžká AP: Ransonovo skóre ≥ 3 , APACHE II ≥ 8 , CTSI ≥ 7

Podle Khanny dosahují AUC těchto skórovacích systému pro predikci závažnosti AP následujících hodnot: Ranson 0,85; Glasgow 0,75; MOSS 0,73; SIRS 0,73; APACHE-II 0,88; BISAP 0,80; CTSI 0,90; pro pankreatickou nekrózu: Ranson 0,70; Glasgow 0,64;

MOSS 0,61; SIRS 0,61; APACHE-II 0,68; BISAP 0,61; CTSI 0,75; pro mortalitu: Ranson 0,84; Glasgow 0,83; MOSS 0,77; SIRS 0,76; APACHE-II 0,86; BISAP 0,83; CTSI 0,57 (173).

2.2.7 Možnosti diferenciální diagnostiky sterilní a infikované nekrózy

Závažným a velmi důležitým problémem u pacientů s AP je rozlišení přímnosti infekce v pankreatické nekróze. Přístup k léčbě sterilní nekrózy (SN) a infikované nekrózy (IN) je diametrálně odlišný. Paušálně je možno shrnout, že SN se léčí konzervativně, zatímco IN chirurgicky, a to buď otevřenou laparotomií, nebo podle novějších přístupů endoskopickou či transperitoneální drenáží pod CT či endosonografickou navigací (215, 227).

Existuje řada prací zaměřených na jednotlivé biomarkery i multifaktoriální skórovací systémy v časně predikci infekce pankreatické nekrózy (185).

Podle Raua (181, 182) je prokalcitonin přesným prediktorem infikované nekrózy a perzistujících septických komplikací po chirurgickém odstranění nekróz (cut-off 1,8 µg/l se senzitivitou 94%, specificitou 91%, AUC=0,96, $p<0,0001$).

Ve studii Mandiho byla hladina PCT přesným parametrem, který dokázal rozlišit IN a SN (cut-off 1,2 µg/l, PPV 100%, senzitivita 90% a specificita 100%) (228).

Podle Richého a kol. kombinace IL-6<400 pg/l a PCT<2 µg/l nejlépe identifikovala pacienty bez rizika rozvoje infikované nekrózy (NPV 91%, senzitivita 75%, specificita 84%). Pro skórovací systémy v rozlišení SN a IN našel následující hodnoty AUC: pro SAPS2 (Simplified Acute Physiology Score II) 0,75; $p<0,002$; Ranson 0,65; $p<0,03$; CTSI=0,67; $p<0,04$ (183).

Co se týká multifaktoriálních skórovacích systémů, Rau našel statisticky významný rozdíl mezi skupinami pacientů se SN a IN u Ransonova skóre a APACHE II (181, 182). Podle Mettuho lze predikovat IN, pokud je CTSI skóre při přijetí > 8 (229).

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Disertační práce je zaměřena na akutní pankreatitidu jakožto závažné onemocnění, které i v současné době může skončit fatálně. Hlavním cílem bylo zpracovat údaje o možnostech laboratorních ukazatelů jednak v predikci závažnosti AP, jednak pro rozlišení sterilní a infikované nekrózy s ohledem na rozdílný terapeutický přístup k těmto dvěma klinickým situacím. Práce vychází z vlastních výzkumných prací: první studie byla zaměřena na diferenciální diagnostiku sterilní a infikované nekrózy využitím interleukinu-6, druhá studie na predikci závažnosti AP pomocí adipokinů a markerů zánětu.

Cíle disertační práce:

a) studie I:

1. Analyzovat možnost diferenciální diagnostiky sterilní a infikované pankreatické nekrózy u pacientů s těžkou AP sériovým stanovením interleukinu 6 (IL-6)

b) studie II:

2. Analyzovat hladiny adiponektinu (ADP), fibroblastového růstového faktoru 21 (FGF-21) a adipocytárního vazebného proteinu pro mastné kyseliny (A-FABP) v porovnání se zánětlivými markery C-reaktivním proteinem (CRP), IL-6 a prokalcitoninem (PCT) v časně fázi AP
3. Ověřit možnost predikce závažnosti AP s použitím hladin ADP, A-FABP a FGF-21 4. den po přijetí ve srovnání se zánětlivými markery CRP, IL-6 a PCT
4. Studovat vzájemnou asociaci uvedených markerů – adipokinů a zánětlivých ukazatelů – v průběhu AP metodami korelační a regresní analýzy.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 POUŽITÁ PŘÍSTROJOVÁ TECHNIKA, REAGENCIE, ROZTOKY

4.1.1 Přístroje a zařízení

4.1.1.1 IL-6 pro diferenciální diagnostiku sterilní a infikované nekrózy

Stanovení IL-6 byla prováděna imunochemiluminiscenční metodou na analyzátoru Immulite 1000 a 2500 firmy Siemens, stanovení CRP metodou suché chemie na analyzátoch VITROS 950 a VITROS Fusion 5.1 FS firmy Ortho Clinical Diagnostics (dodavatel Assista Czech), obojí na OKB Nemocnice Písek. Turn-around-time uvedených vyšetření činil maximálně 120 min pro IL-6, 60 min pro CRP.

4.1.1.2 Adipokiny pro predikci závažnosti AP

Analýza adipokinů byla provedena metodou ELISA na automatickém přístroji Microplate reader 3550 firmy Bio-Rad na OKB FN Olomouc.

4.1.2 Roztoky, chemikálie a kity

4.1.2.1 IL-6 pro diferenciální diagnostiku sterilní a infikované nekrózy

Stanovení IL-6 byla prováděna kitem firmy DPC Interleukin-6 (dodavatel SIEMENS, Česká republika), stanovení CRP kitem CRP firmy Ortho Clinical Diagnostics (dodavatel Assista Czech). Variační koeficient za podmínek opakovatelnosti činil pro CRP 3,8%, pro IL-6 9,7%.

4.1.2.2 Adipokiny pro predikci závažnosti AP

Celkový adiponektin, A-FABP a FGF-21 byly měřeny v séru (separátní alikvoty skladované při -80 °C do dne analýzy) následujícími imunochemickými kity: Human Adiponectin ELISA, Human A-FABP ELISA a Human FGF-21 ELISA (vše Biovendor Laboratorní Medicína, Brno, Česká republika), podle návodu výrobce a po verifikaci všech tří metod. Oba variační koeficienty (za podmínek opakovatelnosti i mezilehlé preciznosti) byly při verifikaci metod pod 15% u všech parametrů.

4.1.3 Ostatní materiál

Jako odběrový systém byly použity zkumavky Vacuette firmy Greiner, konkrétně zkumavky pro srážlivou krev s akcelerátorem srážení bez separačního gelu.

Pro zpracování výsledků byl použit u obou prací software Microsoft Excel pro zápis a pořádání naměřených dat, statistické výpočty byly provedeny pomocí softwaru MEDCalc, firmy MedCalc Software, Ostend, Belgie.

4.2 IL-6 pro diferenciální diagnostiku sterilní a infikované nekrózy (studie I)

4.2.1 Materiál a použité metody

V této retrospektivní studii bylo zahrnuto 59 pacientů hospitalizovaných s těžkou akutní pankreatitidou (klasifikované podle Atlantské klasifikace 1992) na chirurgickém oddělení Nemocnice Písek v letech 2000-2006. Pravidelně (převážně každý den, výjimečně obden ode dne přijetí) u nich byl vyšetřován C-reaktivní protein (CRP) a interleukin-6 (IL-6). Pacienti bez výsledků CRP a IL-6 dostupných alespoň obden byli ze studie vyřazeni. Dostatečná data byla k dispozici u 42 pacientů: 14 s IN prokázanou mikrobiologicky či dle jednoznačných CT známek, 28 se SN. Veškerá data byla získána retrospektivním studiem chorobopisů a laboratorního informačního systému. CT vyšetření bylo prováděno mezi 4. a 7. dnem hospitalizace za použití aplikace kontrastní látky intravenózně k posouzení rozsahu nekrotizace a určení Balthazarovy klasifikace, na CT přístroji firmy TOSHIBA, rok výroby 1999.

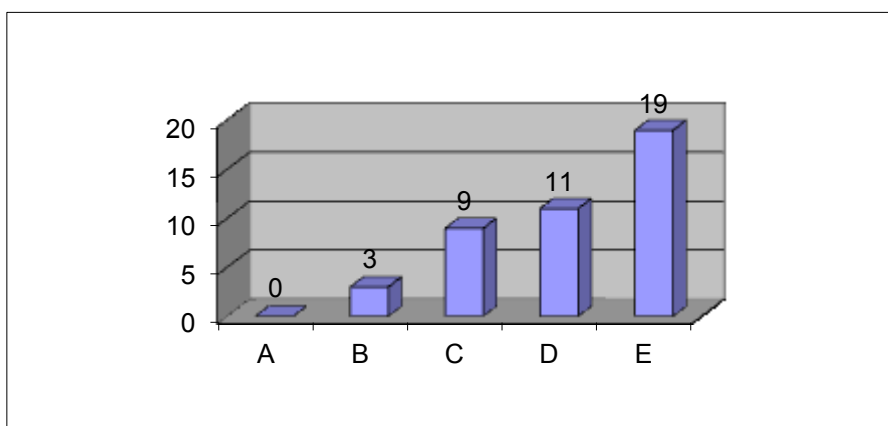
Mikrobiologický průkaz infikované nekrotizace byl proveden kultivací nekrotické tkáně odebrané tenkojehlovou biopsií nebo při drenáži abscesových dutin realizované pod CT kontrolou. Jasně CT známky infekce pankreatických nekrotizací zahrnovali známky přítomnosti bublinek plynu (svědčící pro anaerobní infekci).

Hodnocení CRP a IL-6 bylo realizováno pro prvních 8 dnů hospitalizace, signifikantní souborů pacientů se sterilní vs. infikovanou nekrotizací byly nalezeny mezi 5. a 8. dnem hospitalizace. Při statistickém zpracování byl použit průměr hodnot markerů ze dnů 5 a 6 a dále 7 a 8, důvodem byly chybějící hodnoty u některých pacientů v každém uvedeném dni – pokud byla k dispozici pouze jedna hodnota, použila se tato.

Ze 14ti pacientů s IN bylo 6 mužů a 8 žen. Věk těchto pacientů se pohyboval od 32 do 90ti let, zatímco v souboru SN bylo 14 mužů i žen ve věku 22 – 83 let.

Data byla testována na normalitu pomocí D'Agostino-Pearsonova testu, jejich rozložení bylo vesměs nenormální. Dále byly otestovány a vyloučeny odlehle hodnoty Grubbsovým dvojstranným testem s koef. $\alpha=0,05$. Statistické vyhodnocení a porovnání obou souborů bylo provedeno pomocí Fisherova testu a chí-kvadrát testu, dále byly propočteny parametry charakterizující diagnostickou efektivitu obou testů ve vztahu k uvedené diagnóze a provedena ROC analýza pro den 1 až 7 ve vztahu k diagnóze sterilní resp. infikované nekrotizace pro oba markery – CRP i IL-6. Byly získány plochy pod křivkou (AUC), jejich standardní chyby (SE) a 95% intervaly spolehlivosti (95% CI). Následně bylo provedeno porovnání křivek obou markerů pro každý den podle DeLonga et al., 1998, provedena analýza cut-off hodnot, prediktivních hodnot, specificity a senzitivity.

Charakteristiku souboru dle tíže pankreatitidy uvádí obrázek 5.



Obr. 5. Charakteristika souboru pacientů dle Balthazarova skóre

Na ose x jsou uvedeny kategorie Balthazarova skóre (viz tabulka 1 na str. 54), na ose y počty pacientů.

Tabulka 2: Přehled pacientů v souboru s uvedením maximálních hodnot CRP a IL-6 – pacienti se sterilní nekrózou

Iniciály	věk	IL6_max.	CRP_max.
B. P.	79	723	120
J. T.	59	79,4	173
M. H.	69	83,9	251
J. J.	51	12,8	120
M. S.	75	47,2	91
V. K.	65	63,2	120
J. M.	61	71,6	424
J. K.	21	10,8	41
F. S.	80	45,5	235
V. D.	65	163	477
M. Z.	24	184	120
J. Ž.	63	120	78
H. D.	53	132	259
T. H.	31	309	510
T. H.	31	178	462
J. J.	74	51,8	156
M. T.	79	55,6	144
B. V.	64	50,4	225
Z. S.	49	743	622
H. M.	26	154	324
V. Š.	76	50,2	282
F. T.	50	37,9	96
H. W.	51	84,2	503
V. V.	68	293	354
V. J.	72	289	312
V. W.	46	89,8	437
P. S.	33	142	593
M. L.	71	95,8	175
M. P.	62	33,5	69
J. Š.	56	255	377
V. F.	68	650	242
D. P.	48	124	138

Tabulka 2 - pokračování: Přehled pacientů v souboru s uvedením maximálních hodnot CRP a IL-6 – pacienti se sterilní nekrózou

Iniciály	věk	IL6_max.	CRP_max.
J. C.	67	13,1	59
J. H.	76	95,5	265
K. H.	81	317	96
V. S.	57	163	171
A. CH.	74	1000	320
Z. J.	38	242	210
J. C.	47	70,8	120
M. P.	23	311	119
J. B.	38	48,8	104
B. K.	41	116	114
Z. Š.	71	154	397

Legenda:

Inic. = iniciály pacienta, *nar.* = rok narození, *věk* uveden v letech, *IL-6_max.* = maximální hodnota IL-6 uvedená v ng/l, *CRP_max.* = maximální hodnota CRP uvedená v mg/l

Tabulka 2 uvádí věk a maximální hodnoty CRP a IL-6 u pacientů se sterilní nekrózou, tabulka 3 uvádí totéž u pacientů s infikovanou nekrózou. U některých pacientů se sterilní nekrózou jsou přítomny nižší maximální hodnoty CRP i IL-6, ale celá řada pacientů se sterilní nekrózou dosahuje podobných maximálních hodnot CRP i IL-6 jako pacienti s infikovanou nekrózou.

Tabulka 3: Přehled pacientů v souboru s uvedením maximálních hodnot CRP a IL-6 – pacienti s infikovanou nekrózou

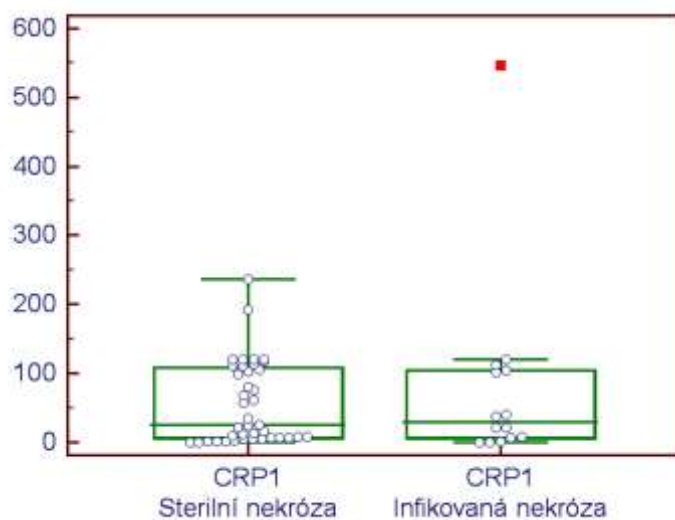
Iniciály	věk	IL6_max.	CRP_max.
A. S.	55	476	221
R. P.	78	627	557
L. Z.	89	475	342
A. M.	28	34,3	264
M. H.	58	736	601
M. P.	79	354	329
M. F.	76	66	104
M. S.	78	148	291
M. P.	63	202	462
Z. D.	59	168	253
A. J.	58	346	333
J. V.	61	536	301
K. V.	47	701	264
R. S.	25	560	406

Legenda:

Inic. = iniciály pacienta, *nar.* = rok narození, *věk* uveden v letech, *IL-6_max.* = maximální hodnota IL-6 uvedená v ng/l, *CRP_max.* = maximální hodnota CRP uvedená v mg/l

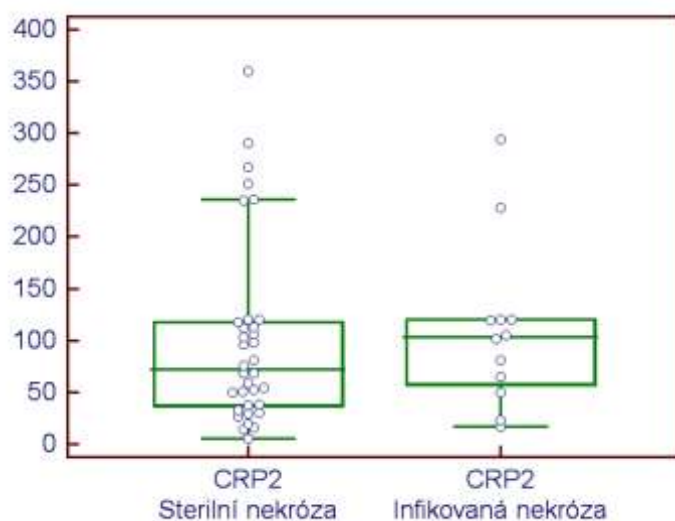
4.2.2.1 Výsledky studie I – CRP

Na obr. 6-12 jsou prezentovány hodnoty CRP rozdělené do skupin pacientů se sterilní a infikovanou nekrózou.



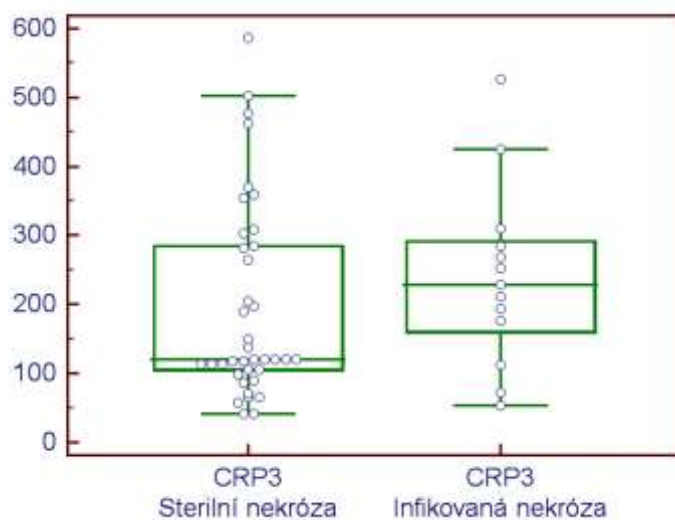
Obr. 6. Porovnání hodnot CRP u pacientů se SN a IN – den 1

Na ose y jsou hodnoty CRP v mg/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil a odlehlé hodnoty.



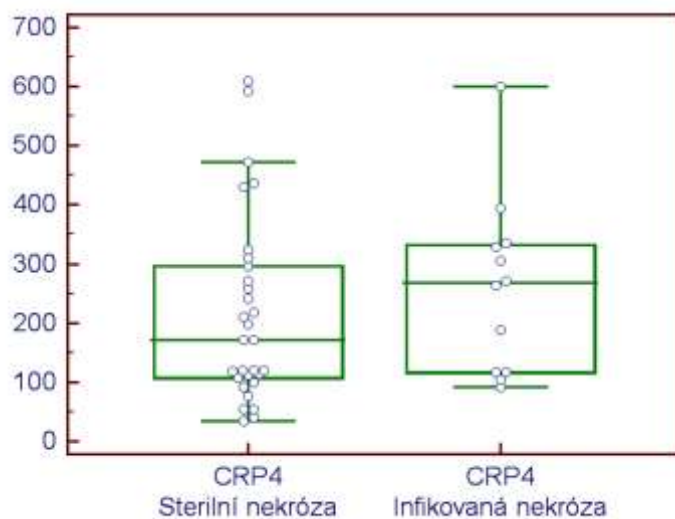
Obr. 7. Porovnání hodnot CRP u pacientů se SN a IN – den 2

Na ose y jsou hodnoty CRP v mg/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil.



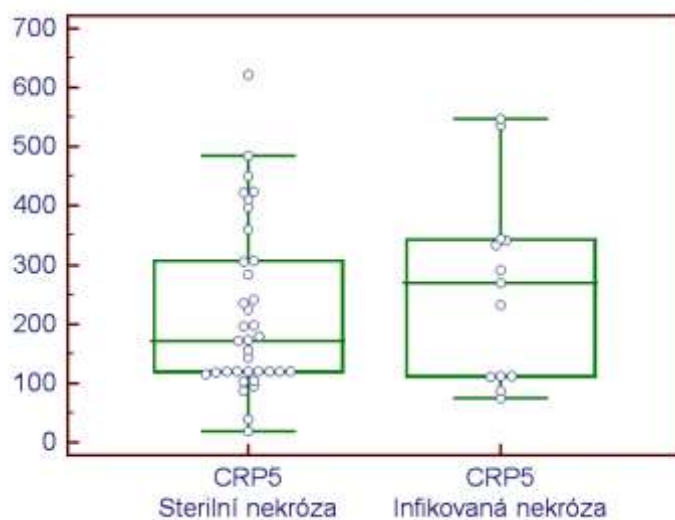
Obr. 8. Porovnání hodnot CRP u pacientů se SN a IN – den 3

Na ose y jsou hodnoty CRP v mg/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil.



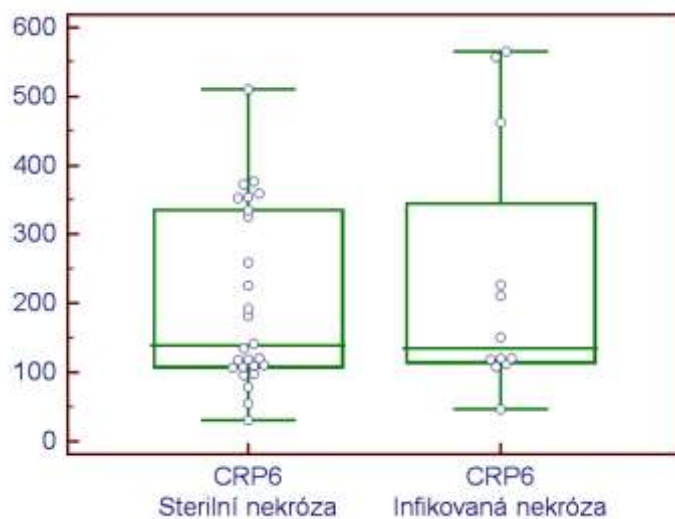
Obr. 9. Porovnání hodnot CRP u pacientů se SN a IN – den 4

Na ose y jsou hodnoty CRP v mg/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil.



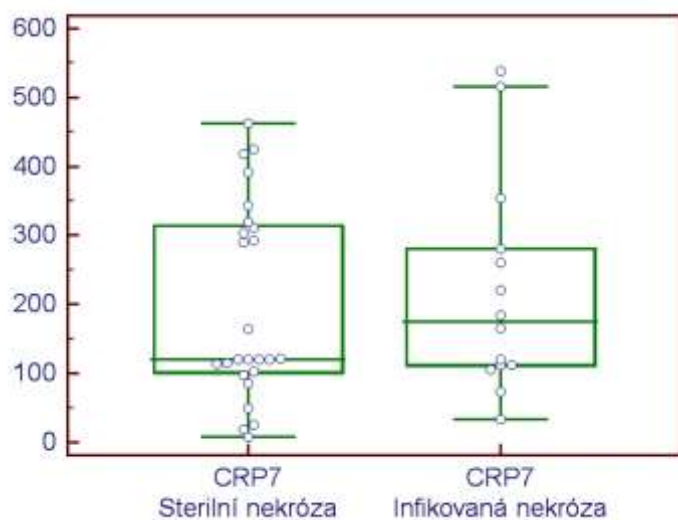
Obr. 10. Porovnání hodnot CRP u pacientů se SN a IN – den 5

Na ose y jsou hodnoty CRP v mg/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil a odlehlé hodnoty.



Obr. 11. Porovnání hodnot CRP u pacientů se SN a IN – den 6

Na ose y jsou hodnoty CRP v mg/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil.



Obr. 12. Porovnání hodnot CRP u pacientů se SN a IN – den 7

Na ose y jsou hodnoty CRP v mg/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil.

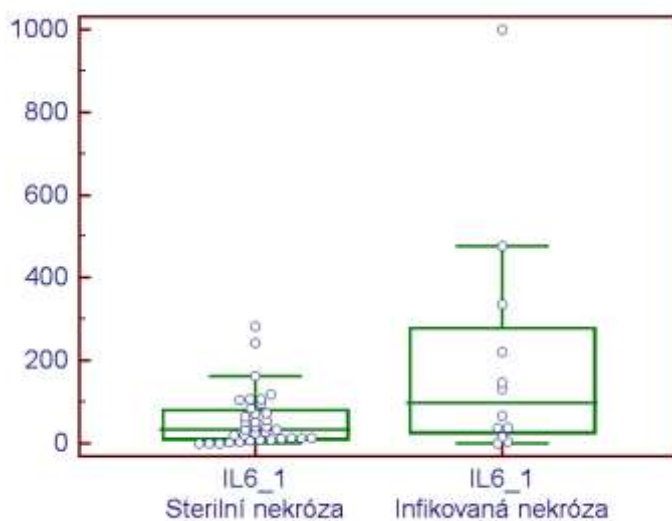
Tabulka 4. Porovnání hodnot CRP u pacientů se sterilní vs. infikovanou nekrózou

Den N_{SN}/N_{IN}		SN	IN	p
Den 1 40/14	medián	25	29	n.s.
	25. – 75. percentil	7 – 108	7 – 104	
	5. – 95. percentil	0,5 – 156	0 – 461	
Den 2 34/12	medián	72,5	104	n.s.
	25. – 75. percentil	37 – 118	57,5 – 120	
	5. – 95. percentil	14,4 – 285	17,6 – 287	
Den 3 38/13	medián	120	229	n.s.
	25. – 75. percentil	37 – 118	57,5 – 121	
	5. – 95. percentil	14,4 – 285	17,6 – 287	
Den 4 30/12	medián	171	268	n.s.
	25. – 75. percentil	107 – 296	117 – 331	
	5. – 95. percentil	41 – 593	98,6 – 611	
Den 5 36/13	medián	172	270	n.s.
	25. – 75. percentil	119 – 307	112 – 343	
	5. – 95. percentil	53,4 – 475	77 – 546	
Den 6 26/12	medián	139	136	n.s.
	25. – 75. percentil	108 – 336	116 – 345	
	5. – 95. percentil	50,2 – 404	53,1 – 564	
Den 7 25/14	medián	117	175	n.s.
	25. – 75. percentil	102 – 314	112 – 280	
	5. – 95. percentil	16,3 – 434	41,2 – 534	

Legenda: Hodnoty CRP jsou uvedeny v mg/l; v kolonce „Den“ je uveden počet hodnot ze souboru sterilní nekrózy (N_{SN}) / počet hodnot ze souboru infikované nekrózy (N_{IN}). Porovnání souborů bylo provedeno Kruskal-Wallisovým testem.

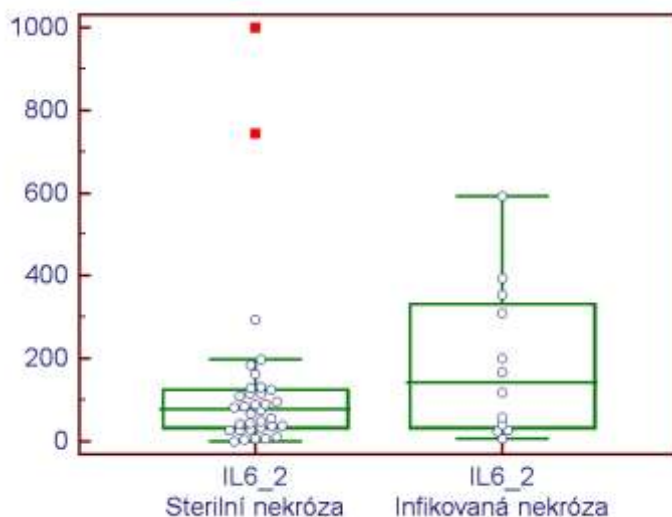
4.2.2.2 Výsledky studie I – IL-6

Na obr. 13-19 jsou prezentovány hodnoty IL-6 rozdělené do skupin pacientů se sterilní a infikovanou nekrózou.



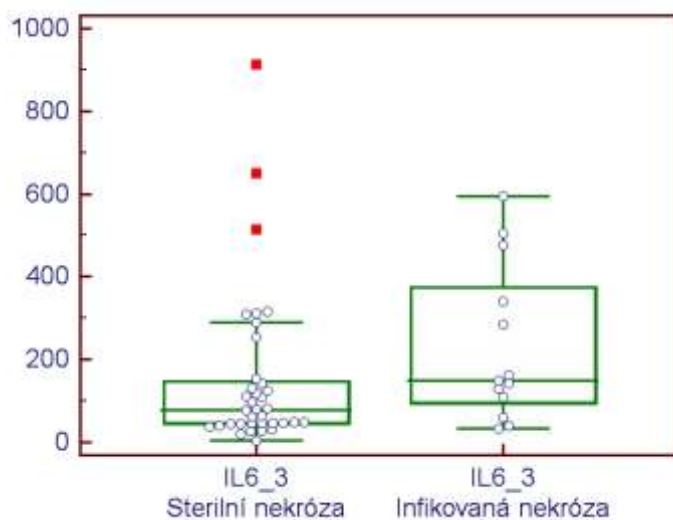
Obr. 13. Porovnání hodnot IL-6 u pacientů se SN a IN – den 1

Na ose y jsou hodnoty IL-6 v ng/l. Na ose x vlevo pacienti se SN, vpravo s IN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil.



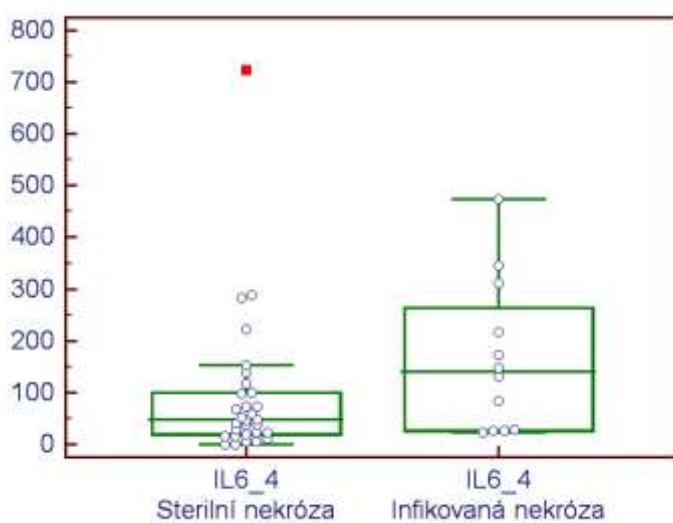
Obr. 14. Porovnání hodnot IL-6 u pacientů se SN a IN – den 2

Na ose y jsou hodnoty IL-6 v ng/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil a odlehlé hodnoty.



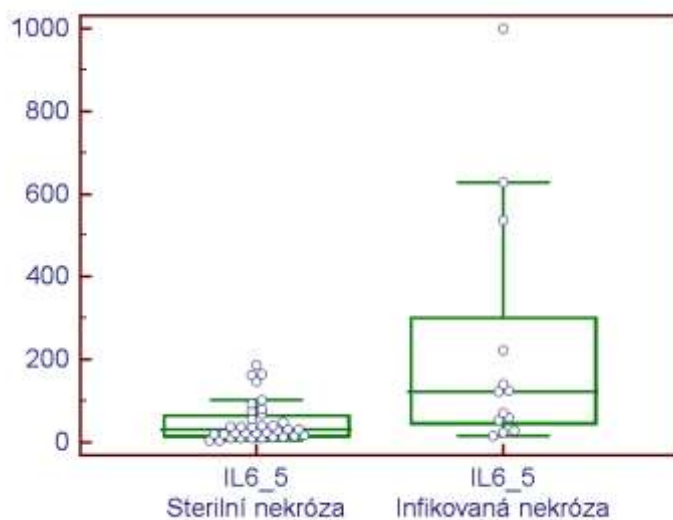
Obr. 15. Porovnání hodnot IL-6 u pacientů se SN a IN – den 3

Na ose y jsou hodnoty IL-6 v ng/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil a odlehlé hodnoty.



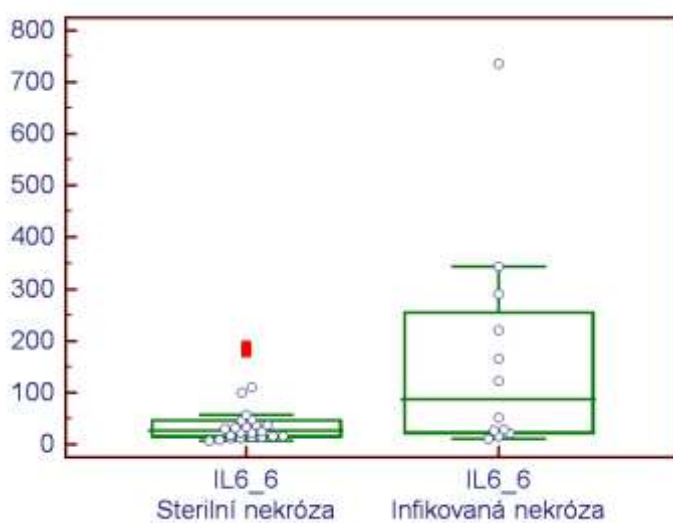
Obr. 16. Porovnání hodnot IL-6 u pacientů se SN a IN – den 4

Na ose y jsou hodnoty IL-6 v ng/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil a odlehlé hodnoty.



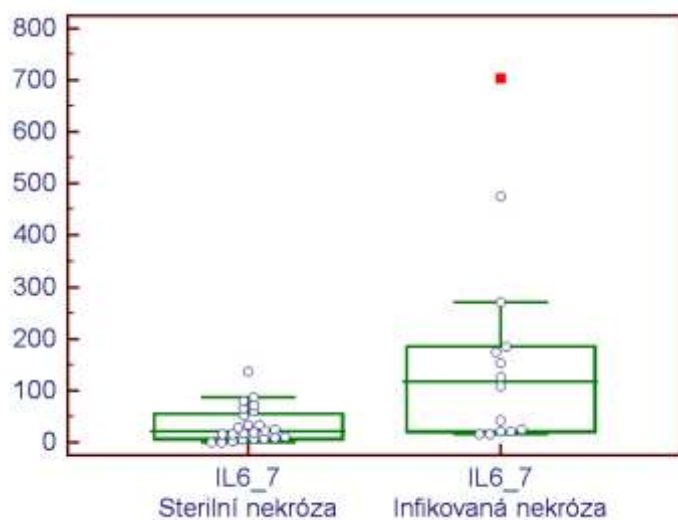
Obr. 17. Porovnání hodnot IL-6 u pacientů se SN a IN – den 5

Na ose y jsou hodnoty IL-6 v ng/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil.



Obr. 18. Porovnání hodnot IL-6 u pacientů se SN a IN – den 6

Na ose y jsou hodnoty IL-6 v ng/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil a odlehlé hodnoty.



Obr. 19. Porovnání hodnot IL-6 u pacientů se SN a IN – den 7

Na ose y jsou hodnoty IL-6 v ng/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 10. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 90. percentil a odlehlé hodnoty.

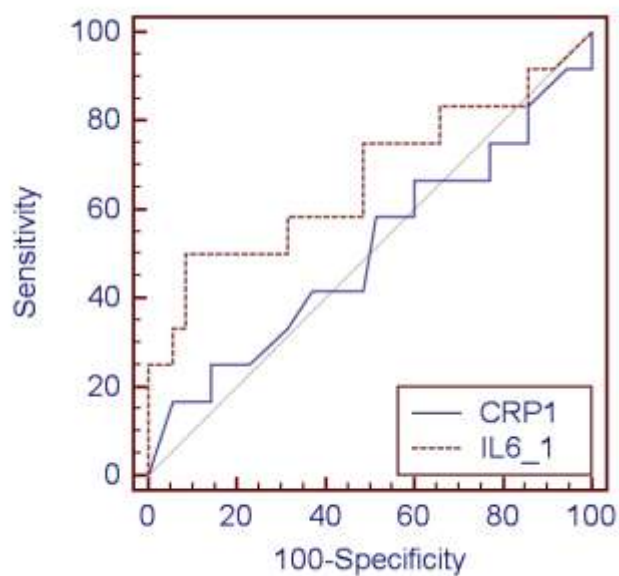
Tabulka 5. Porovnání hodnot IL-6 u pacientů se sterilní vs. infikovanou nekrózou

Den N_{SN}/N_{IN}		SN	IN	p
Den 1 35/12	medián	33,9	98,5	n.s.
	25. – 75. percentil	11,2 – 81	27 – 279	
	5. – 95. percentil	0 – 222	0,5 – 948	
Den 2 34/12	medián	78,8	144	n.s.
	25. – 75. percentil	33,7 – 124	33,5 – 332	
	5. – 95. percentil	4,8 – 653	8,2 – 573	
Den 3 36/13	medián	78,8	149	n.s.
	25. – 75. percentil	46 – 148	96,8 – 375	
	5. – 95. percentil	22,3 – 610	35,2 – 582	
Den 4 30/12	medián	47,4	140	n.s.
	25. – 75. percentil	19,5 – 99	27,4 – 265	
	5. – 95. percentil	0,7 – 289	24 – 261	
Den 5 35/13	medián	30,6	122	0,004
	25. – 75. percentil	16,3 – 65,1	46,5 – 301	
	5. – 95. percentil	6,9 – 164	16,9 – 944	
Den 6 24/12	medián	27,3	87,8	n.s.
	25. – 75. percentil	15,3 – 47	24 – 256	
	5. – 95. percentil	8,1 – 182	11,5 – 697	
Den 7 24/14	medián	21,8	118	0,004
	25. – 75. percentil	8 – 56,1	22,2 – 186	
	5. – 95. percentil	0 – 102	15,5 – 658	

Legenda: Hodnoty IL-6 jsou uvedeny v ng/l; v kolonce „Den“ je uveden počet hodnot ze souboru sterilní nekrózy (N_{SN}) / počet hodnot ze souboru infikované nekrózy (N_{IN}). Porovnání souborů bylo provedeno Kruskal-Wallisovým testem.

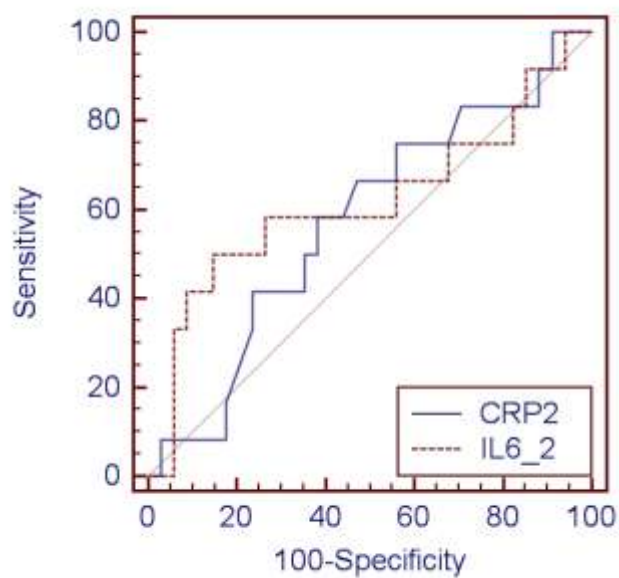
Tabulka 5 uvádí porovnání hodnot IL-6 u pacientů se sterilní vs. infikovanou nekrózou. Úbytek počtu pacientů s pokračujícím průběhem hospitalizace ve skupině sterilní nekrózy je dán jejich lehčím průběhem, který vedl jednak k časnější dimisi, jednak k méně intenzivnímu laboratornímu vyšetřování, což znamenalo chybějící hodnotu markeru.

4.2.2.3 Výsledky studie I – ROC analýza



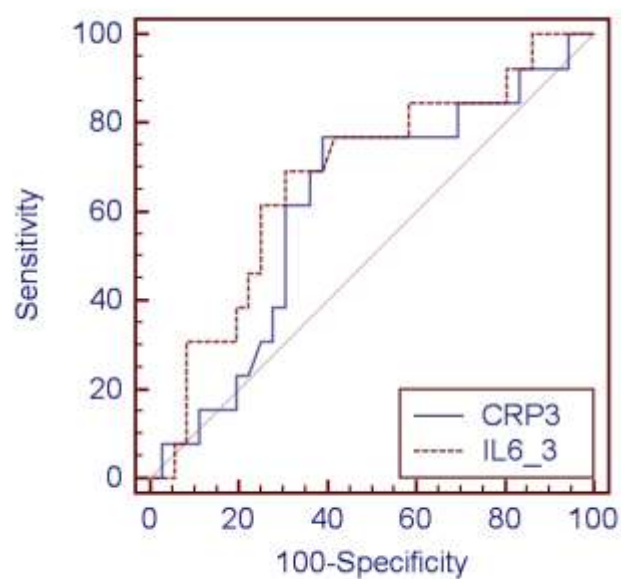
Obr. 20. Porovnání ROC křivek – den 1

Na ose x je uvedena hodnota 100-specifická v %, na ose y senzitivita v %.



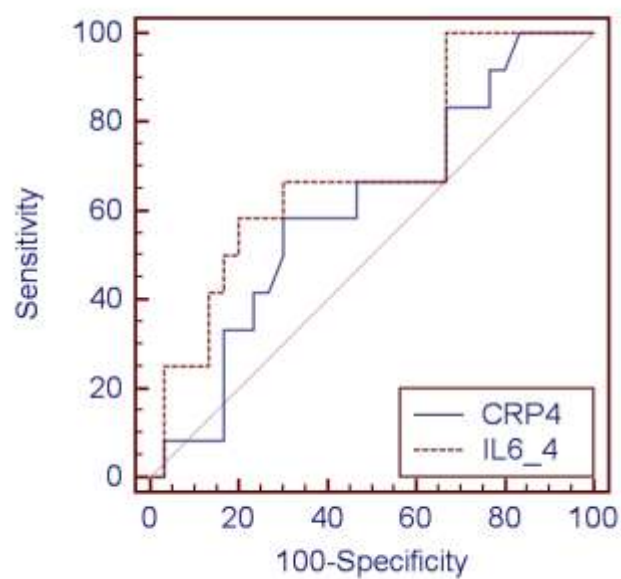
Obr. 21. Porovnání ROC křivek – den 2

Na ose x je uvedena hodnota 100-specifická v %, na ose y senzitivita v %.



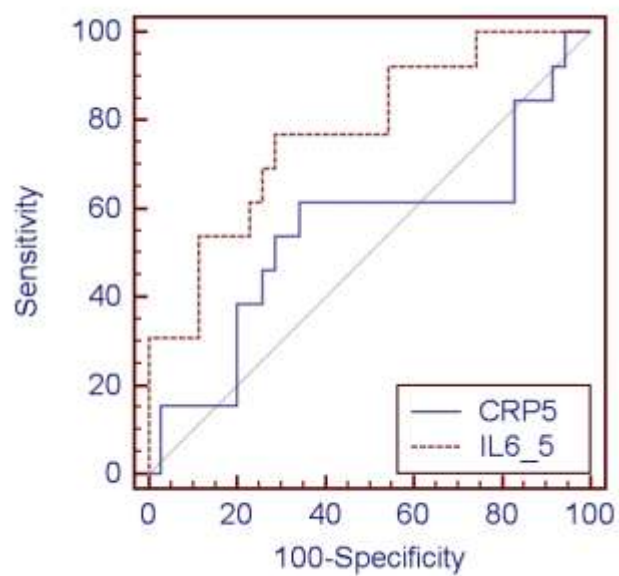
Obr. 22. Porovnání ROC křivek – den 3

Na ose x je uvedena hodnota 100-specificita v %, na ose y senzitivita v %.



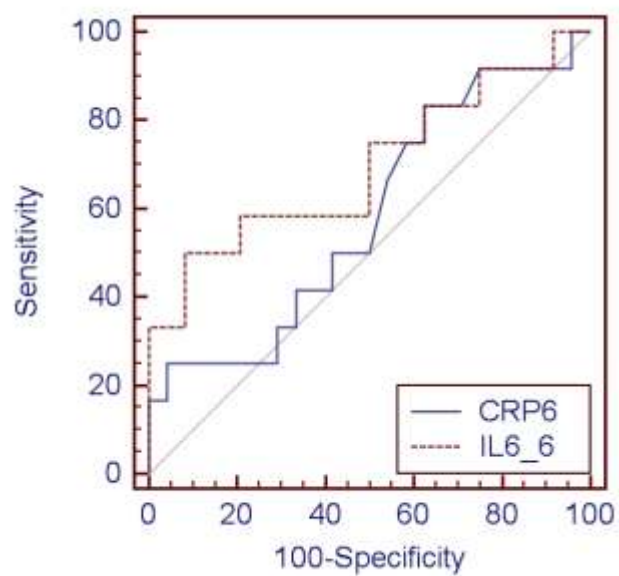
Obr. 23. Porovnání ROC křivek – den 4

Na ose x je uvedena hodnota 100-specificita v %, na ose y senzitivita v %.



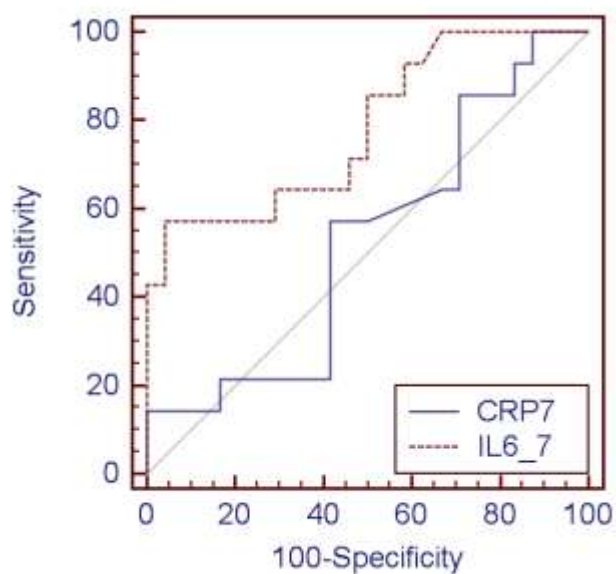
Obr. 24. Porovnání ROC křivek – den 5

Na ose x je uvedena hodnota 100-specificita v %, na ose y senzitivita v %.



Obr. 25. Porovnání ROC křivek – den 6

Na ose x je uvedena hodnota 100-specificita v %, na ose y senzitivita v %.



Obr. 26. Porovnání ROC křivek – den 7

Na ose x je uvedena hodnota 100-specificita v %, na ose y senzitivita v %.

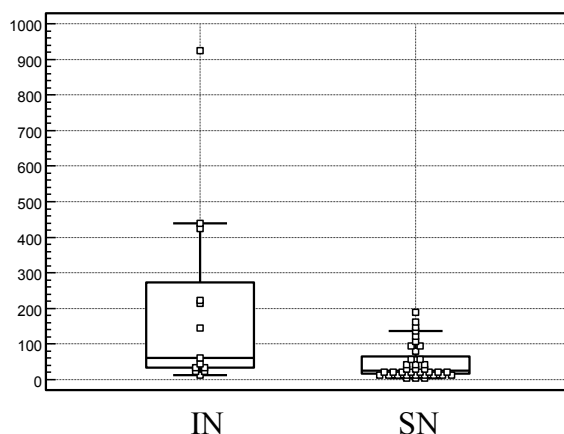
Dále v tabulce 6. je uvedeno porovnání ROC křivek pro CRP a IL-6 v diskriminaci sterilní a infikované nekrózy v jednotlivých dnech hospitalizace. Statisticky významný rozdíl ve schopnosti této diskriminace byl nalezen 5. a 7. den hospitalizace, přičemž pro IL-6 se plochy pod křivkou statisticky významně lišily od 0,5.

Tabulka 6. Porovnání ROC křivek pro CRP a IL-6 u pacientů se sterilní vs. infikovanou nekrózou

Den N_{SN}/N_{IN}		CRP	IL-6	p
Den 1 35/12	AUC	0,505	0,668	n.s.
	95% CI	0,355 – 0,654	0,515 – 0,798	
Den 2 34/12	AUC	0,572	0,618	n.s.
	95% CI	0,422 – 0,720	0,463 – 0,757	
Den 3 36/13	AUC	0,616	0,678	n.s.
	95% CI	0,467 – 0,752	0,530 – 0,805	
Den 4 30/12	AUC	0,606	0,692	n.s.
	95% CI	0,443 – 0,753	0,530 – 0,725	
Den 5 35/13	AUC	0,547	0,774	0,037
	95% CI	0,397 – 0,691	0,630 – 0,882	
Den 6 24/12	AUC	0,583	0,694	n.s.
	95% CI	0,408 – 0,745	0,519 – 0,837	
Den 7 24/14	AUC	0,524	0,781	0,006
	95% CI	0,356 – 0,688	0,618 – 0,899	

Legenda: AUC = plocha pod křivkou; 95% CI = 95% interval spolehlivosti; v kolonce Den je uveden počet hodnot ze souboru sterilní nekrózy (N_{SN}) / počet hodnot ze souboru infikované nekrózy (N_{IN})

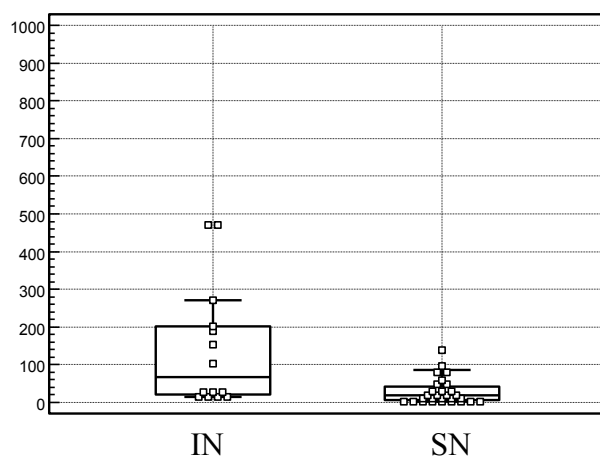
4.2.2.5 Výsledky studie I – analýza průměrů hodnot IL-6 ze dne 5+6, resp. 7+8



Obr. 27. Porovnání průměrů hodnot IL-6 5. a 6. den hospitalizace u pacientů s infikovanou nekrózou a sterilní nekrózou

Na ose y jsou hodnoty IL-6 v ng/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují 5. percentil, 25. percentil, medián, 75. percentil, 95. percentil.

Rozdíl mezi skupinami je statisticky významný: $p=0,001$



Obr. 28. Porovnání průměrů hodnot IL-6 7. a 8. den hospitalizace u pacientů s infikovanou nekrózou a sterilní nekrózou

Na ose y jsou hodnoty IL-6 v ng/l. Na ose x vlevo pacienti s IN, vpravo se SN. Krabicové grafy znázorňují minimum, 25. percentil, medián, 75. percentil, maximum a odlehlé hodnoty.

Rozdíl mezi skupinami je statisticky významný: $p=0,001$

4.2.2.5 Výsledky studie I – souhrn

Hladiny CRP byly u převážné většiny pacientů od 2. do 8. dne setrvale výrazně zvýšeny, bez významného rozdílu mezi pacienty se sterilní a infikovanou nekrózou.

Průběh koncentrací IL-6 byl následující: při přijetí docházelo k výrazné elevaci nezávislé na pozdějším rozvoji IN a již od druhého dne hospitalizace byl přítomen výrazný pokles. Další vzestup IL-6 byl přítomen pouze u pacientů s rozvojem IN, docházelo k němu nejčastěji 5. den hospitalizace.

5. den je medián IL-6 ve skupině IN čtyřnásobkem mediánu skupiny SN a převyšuje 90. percentil SN. Ve skupině SN se však ještě objevují hodnoty IL-6 nad 150 ng/l. Tento den je dnem, kdy se začínají klinicky objevovat projevy infikované nekrózy. Jejich standardní průkaz (kultivace materiálu odebraného tenkojehlovou biopsií pod CT kontrolou) je však minimálně o 3-4 dny opožděna. Zde je prostor pro IL-6, jakožto marker infekce pankreatické nekrózy. 6. den je již většina hodnot IL-6 (při vyloučení odlehklých) skupiny SN do 100 ng/l, zatímco ve skupině IN je již cca 40% hodnot nad 100 ng/l. 7. den je již medián hodnot IL-6 skupiny IN vyšší než 95. percentil skupiny SN, což potvrzuje předchozí trend hodnot IL-6 v obou skupinách.

Rozvoj IN reálně nastával nejčastěji mezi 5. a 8. dnem (definitivním průkazem IN byl mikrobiologický průkaz agens či nepochybné CT známky infekce). S ohledem na chybějící data hodnot markerů CRP a IL-6 u některých pacientů pro některé ze dnů 5 – 8, byla doplněna analýza průměrů hodnot pro den 5 a 6 + den 7 a 8 (průměr hodnot v přítomnosti obou u jednoho pacienta, použita jedna známá hodnota v přítomnosti jedné u jednoho pacienta). Toto spojení hodnot ze dvou dnů bylo nutné jednak kvůli úbytku pacientů zejména ve skupině sterilní nekrózy – někteří pacienti s lehčím průběhem již byli dimitováni a dále kvůli tomu, že u některých pacientů s nekomplikovaným průběhem nebyly prováděny odběry krve již každý den, ale pouze obden.

Byla nalezena statisticky významná diskriminační schopnost denních průměrů IL-6 5. a 6. + 7. a 8. den hospitalizace mezi IN a SN ($p=0,001$ pro den 5 a 6, resp. $p=0,001$ pro den 7 a 8) – viz obr. 27, 28.

Pro cut-off IL-6 vzhledem k diskriminaci sterilní a infikované nekrózy (platný od 5. dne hospitalizace) 100 ng/l bylo $p<0,005$, pro 150 ng/l $p<0,01$. Senzitivita cut-off 150 ng/l (vztahená k aktuálně nepřítomné IN) činila 87% při specifitě 90%, pro cut-off 100 ng/l činila senzitivita 100% při specifitě 92%.

Významný rozdíl byl nalezen při porovnání ROC křivek CRP a IL-6 pro den 5 (AUC pro CRP=0,547; AUC pro IL-6=0,774; $p=0,037$) a den 7 (AUC pro CRP=0,524; AUC pro IL-6=0,781; $p=0,006$) – viz obr. 24, 26.

AUC pro hodnoty IL-6 5. a 6. den hospitalizace ve vztahu k diskriminaci infikované nekrózy činilo 0,746 – viz. obr. 27.

Tabulka 7 – Porovnání cut-off hodnot IL-6 pro diferenciální diagnostiku SN a IN

	cut-off hodnota IL-6	
	100 ng/l	150 ng/l
senzitivita	87%	100%
specifita	90%	92%
PPV	78%	100%
NPV	77%	76%

Legenda: PPV = pozitivní prediktivní hodnota; NPV = negativní prediktivní hodnota.

Ve studii I jsme prokázali možnost využití IL-6 pro diskriminaci sterilní a infikované nekrózy u infikované pankreatitidy. Naproti tomu CRP tuto diskriminaci neumožňuje.

Cut-off hodnoty IL-6 uvedené v tabulce 7 jsou platné od 5. dne hospitalizace. Jsou určeny pro praktické řešení klinických situací: hodnoty pod daný cut-off vylučují přítomnost infikované nekrózy (za uvedených testových charakteristik). Vzestup hodnot IL-6 nad uvedený cut-off svědčí pro přítomnost infikované nekrózy. Tento postup je používán lékaři chirurgického oddělení Nemocnice Písek, a.s. od roku 2011 a v praxi se osvědčuje.

4.3 Adipokiny a zánětlivé markery pro predikci závažnosti AP (studie II)

4.3.1 Materiál a použité metody

Studie byla provedena retrospektivní analýzou hodnot zánětlivých biomarkerů a adipokinů u pacientů s akutní pankreatitidou. Zaměřili jsme se na korelaci hodnot uvedených markerů při přijetí a 4. den hospitalizace s následným průběhem, resp. závažností akutní pankreatitidy hodnoceným dle zobrazovací metody (CT vyšetření se stanovením CTSI skóre závažnosti AP).

Soubor pacientů byl tvořen dvěma skupinami:

- 1) pacienti hospitalizovaní pro akutní pankreatitidu na interním a chirurgickém oddělení Nemocnice Písek, a.s.
- 2) pacienti s akutní pankreatitidou hospitalizovaní na II. interní klinice gastroenterologické a hepatologické Fakultní nemocnice Olomouc.

Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc.

Nábor pacientů započal 1.7.2012 a byl ukončen 30.4.2014. Kritériem pro zařazení byla diagnóza akutní pankreatitidy stanovená na základě anamnézy, klinického nálezu a nejméně 5ti násobného vzestupu hladiny amylázy v séru proti hornímu rozmezí referenčního intervalu. U těchto pacientů byly shromažďovány vzorky séra ze dne přijetí, dále 4. dne a 7. dne hospitalizace (v závislosti na době hospitalizace). Od pacientů byl odebíráán informovaný souhlas. Celkem bylo do studie zahrnuto 84 pacientů s akutní pankreatitidou, u všech bylo provedeno CT vyšetření.

Analýza adipokinů a zánětlivých markerů

Zánětlivé biomarkery – CRP, IL-6 a PCT byly vyšetřeny u všech vzorků v den odběru, do 2 hodin od provedení separace séra.

Na OKB Nemocnice Písek, a.s. byly pro stanovení zánětlivých markerů použity následující soupravy a analyzátory:

CRP byl stanoven soupravou CRPL3 firmy ROCHE (dodává ROCHE Diagnostics s.r.o. Principem testu je částicemi usnadněné imunoturbidimetrické stanovení. Lidské CRP aglutinuje s latexovými částicemi, potaženými protilátkami proti CRP. Agregáty jsou stanoveny turbidimetricky. Stanovení bylo prováděno na analyzátoru COBAS 6000, resp. jeho klinicko-chemickém modulu COBAS c501. Stanovení CRP bylo verifikováno na 2 hladinách s relativní kombinovanou nerozšířenou nejistotou 9,2%.

IL-6 byl stanoven soupravou ELECSYS IL-6 (Roche Diagnostics s.r.o.) elektrochemiluminiscenčním imunostanovením („ECLIA“). Princip testu je sendvičový, celková doba stanovení 18 minut. 30 µl vzorku se inkubuje s biotinylovanou monoklonální protilátkou specifickou proti IL-6. Po přidání monoklonální protilátky specifické proti IL-6, značené rutheniovým komplexem Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium (II)-komplex Ru(bpy) a streptavidinem potažených mikročástic, vytvářejí protilátky sendvičový komplex s antigenem

vzorku. Reakční směs je nasáta do měřicí komůrky, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky se odstraní roztokem ProCell. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem. Výsledky vzorků se odečítají z kalibrační křivky, která je specificky vytvořena pro přístroj a master křivky, dodávané v čárovém kódu reagentie.

Rozsah měření je 1,5 – 5000 ng/l, vyšší hodnoty se stanovují po 10ti násobném naředění vzorku. Variační koeficient za podmínek opakovatelnosti se pohybuje mezi 0,9 – 2,9%, variační koeficient za podmínek mezilehlé preciznosti se pohybuje mezi 1,1 – 3,1%. Stanovení IL-6 bylo prováděno na analyzátoru COBAS 6000, resp. jeho imunochemickém modulu COBAS e601.

PCT byl stanoven soupravou ELECSYS BRAHMS PCT (dodává Roche Diagnostics s.r.o.). elektrochemiluminiscenčním imunostanovením („ECLIA“). Princip testu je sendvičový, celková doba stanovení 18 minut. Antigen ve vzorku, biotinylovaná monoklonální protilátka proti PCT a monoklonální protilátka proti PCT, značená rutheniovým komplexem Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-komplex (Ru(bpy)) reagují a vytvářejí sendvičový komplex. Po přidání mikročástic, potažených streptavidinem, se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem. Reakční směs je nasáta do měřicí komůrky, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou odstraněny roztokem ProCell/ProCell M. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem. Výsledky vzorků jsou odečteny z kalibrační křivky, která je specificky vytvořena pro přístroj a master křivky, dodávané v čárovém kódu reagentie.

Rozsah měření je 0,02 – 100 µg/l, vyšší hodnoty se stanovují po čtyřnásobném naředění vzorku (PCT negativní lidské sérum). Variační koeficient za podmínek opakovatelnosti se pohybuje mezi 1,1 – 7,1%, variační koeficient za podmínek mezilehlé preciznosti se pohybuje mezi 1,6 – 8,7%. Stanovení PCT bylo prováděno na analyzátoru COBAS 6000, resp. jeho imunochemickém modulu COBAS e601.

Stanovení CRP, PCT a IL-6 na OKB FN Olomouc bylo prováděno identickými soupravami, rozdíl byl pouze v použitém analyzátoru – COBAS 8000 firmy ROCHE: CRP na klinicko-chemickém modulu COBAS c701, PCT a IL-6 na imunochemickém modulu COBAS e602. Variační koeficienty se pohybovaly ve výše uvedeném rozmezí.

Ze vzorků byl oddělen separátní aliquot séra, který byl zamražen na -80 °C a po ukončení nábory pacientů byla provedena analýza adipokinů: celkový adiponektin, A-FABP a FGF-21(separátní aliquot byl skladován při -80 °C do dne analýzy). Analýzy byly provedeny na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc za použití následujících kitů: Human Adiponectin ELISA, Human A-FABP ELISA a Human FGF-21 ELISA (vše Biovendor Laboratorní Medicína, Brno, Česká republika), podle návodu výrobce

a po verifikaci všech metod. Oba variační koeficienty za podmínek opakovatelnosti i mezilehlé preciznosti byly <15%.

Stanovení adiponektinu

Standardy, kontrolní vzorky a vzorky séra se inkubují v jamkách mikrotitračních destiček potažených rekombinantním lidským adiponektinem společně s protilátkou proti adiponektinu značenou křenovou peroxidázou (konjugát). Po důkladném promytí reaguje konjugát vázaný na adiponektinem potažené jamky s peroxidem vodíku. Reakce se zastaví přidáním roztoku kyseliny sírové a absorbance výsledného produktu žluté barvy je stanovena spektrofotometricky při 450 nm. Absorbance inverzně koreluje s koncentrací adiponektinu. Standardní křivka je vytvořena vynesemím hodnot absorbance oproti koncentracím standard adiponektinu a koncentrace neznámých vzorků se určí použitím této standardní křivky.

Reagencie:

Mikrotitrační destičky potažené rekombinantním lidským adiponektinem, vakuově baleny, 96 jamek

Roztok konjugátu (anti-adiponektinové protilátky, křenová peroxidáza) 7ml

Standardy lidského adiponektinu (0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 a 10 mg/l) 0,22 ml/lahvičku

Diluční pufr 2 x 13 ml

Koncentrát promývacího roztoku (10x) 100 ml

Roztok substrátu (TMB) 2 x 13 ml

Zastavovací roztok (0,5 M H₂SO₄) 9 ml

Příprava reagií:

Všechny reagencie musejí být vytemperovány na pokojovou teplotu před použitím.

Standardy se ředí 1:3 ředícím pufrem těsně před použitím. (50 µl vzorku + 100 µl ředícího pufru).

Promývací roztok se připraví následovně: 100 ml promývacího roztoku se smíchá s 900 ml destilované vody. Pracovní promývací roztok je stabilní 1 měsíc při 2-8° C.

Příprava vzorků:

Sérové vzorky se naředí ředícím pufrem (1:30) (10 µl vzorku + 290 µl ředícího).

Stabilita sérových vzorků skladovaných při -80 °C je nejméně 1 rok. I když bylo ověřeno, že koncentrace adiponektinu se nemění během 3 cyklů zmražení-rozmražení, není doporučeno vzorky opakovaně zamrazovat a rozmrazovat. Neředěné vzorky jsou stabilní nejméně 2 týdny při 2-8°C nebo 1 den při pokojové teplotě.

Proces analýzy:

1) 50 µl ředěných standardů a vzorků se pipetuje do odpovídajících jamek.

2) Do každé jamky se přidá 50 µl roztoku konjugátu.

- 3) Destička se inkubuje 2 hodiny za třepání při cca 300 rpm na třepáče.
- 4) Jamky se 3x promyjí promývacím roztokem (0,35 ml na jamku).
- 5) Přidá se 200 μ l roztoku substrátu a destička se přikryje aluminovou folií.
- 6) Destička se inkubuje 10-15 minut při pokojové teplotě.
- 7) Vývoj barvy se zastaví přidáním 50 μ l zastavovacího roztoku.
- 8) Absorbance se změří na spektrofotometru při 450 nm do 5 minut

Kalibrační křivka se vytvoří vynesemím absorbancí (Y) standardů versus logaritmus známých koncentrací standardů (X) použitím čtyřparametrové funkce. Výsledky se vydávají jako koncentrace adiponektinu (μ g/l) ve vzorcích sér pacientů. Protože standardy se ředí 3x, zatímco kontroly a vzorky 30x, hodnoty vypočtené z kalibrační křivky se vynásobí dilučním faktorem 10.

Mez stanovitelnosti je vypočtena ze skutečné koncentrace adiponektinu v jamkách a její hodnota činí 7 μ g/l.

Stanovení A-FABP

Standardy, kontrolní vzorky a vzorky pacientů se inkubují v jamkách mikrotitračních destiček potažených polyklonální protilátkou proti lidskému A-FABP. Po 60ti minutách inkubace a důkladném promytí se přidá biotinem značená protilátka proti lidskému A-FABP a pokračuje 60ti minutová inkubace se zachyceným A-FABP. Po dalším promytí se přidá konjugát streptavidinu s křenovou peroxidázou. Po dalších 30ti minutách inkubace a posledním promytí zbylý konjugát reaguje s roztokem substrátu (TMB). Reakce se zastaví přidáním roztoku kyseliny a absorbance výsledného produktu žluté barvy se změří spektrofotometricky při 450 nm. Standardní křivka je vytvořena vynesemím hodnot absorbance oproti koncentracím standard A-FABP a koncentrace neznámých vzorků v μ g/l se určí s použitím této standardní křivky.

Kalibrační křivka byla vytvořena vynesemím absorbancí (Y) standardů versus logaritmus známých koncentrací standardů (X) použitím čtyřparametrové funkce. Výsledky se vydávají jako koncentrace A-FABP (μ g/l) ve vzorcích sér pacientů.

Mez stanovitelnosti definovaná jako koncentrace, která dává absorbanci vyšší než průměrnou absorbanci blanku plus 3 standardní odchylky absorbance blanku, byla výrobcem stanovena na hodnotu 0,05 μ g/l Naměřená koncentrace vzorků a kontrol kvality se vynásobí dilučním faktorem.

Stanovení FGF-21

Bylo provedeno podobným způsobem jako stanovení celkového adiponektinu a A-FABP za použití ELISA soupravy. Standardy, kontrolní vzorky a vzorky séra byly inkubovány v jamkách mikrotitračních destiček potažených polyklonální protilátkou proti

FGF-21. Po 60 min inkubace a důkladném promytí byla přidána biotinem značená protilátka proti lidskému FGF-21, s následnou 60 min inkubací. Po dalším promytí byl přidán konjugát streptavidinu a křenové peroxidázy. Po 30 min inkubace a posledním promytí reagoval vzniklý konjugát s roztokem substrátu (TMB).

Reakce se zastavila přidáním roztoku kyseliny sírové a absorbance výsledného produktu žluté barvy byla změřena spektrofotometricky při 450 nm. Standardní křivka byla vytvořena vynesemím hodnot absorbance oproti koncentracím standard FGF-21 a koncentrace neznámých vzorků byla určena s použitím této standardní křivky.

Kalibrační křivka byla vytvořena vynesemím absorbancí (Y) standardů versus logaritmus známých koncentrací standardů (X) použitím čtyřparametrové funkce. Výsledky byly vydány jako koncentrace FGF-21 (ng/l) ve vzorcích.

Mez stanovitelnosti definovaná jako koncentrace, která dává absorbanci vyšší než průměrnou absorbanci blanku plus 3 standardní odchylky absorbance blanku, byla výrobcem stanovena na hodnotu 7 ng/l. Naměřená koncentrace vzorků a kontrol kvality byla vynásobena příslušným dilučním faktorem.

CT vyšetření – skórovací systém

47 pacientů podstoupilo kontrastní CT vyšetření. Bylo stanoveno Balthazarovo skóre, rozsah nekrózy a CTSI. Číselné maximum CTSI je 10 bodů a je součtem Balthazarova skóre a skóre pankreatické nekrózy.

CT vyšetření ve FN Olomouc byla provedena na přístrojích CT LightSpeed VCT a CT LightSpeed RT16 firmy GE Healthcare, Waukesha, USA. CT vyšetření v Nemocnici Písek, a.s. byla provedena na přístroji Toshiba Aquilion 64 CT scanner, firmy TOSHIBA, Tokyo, Japonsko. Jedná se o 64kanálová CT s rozlišením Z-osy do 0,35 mm a 40 mm axiálním pokrytím.

CT vyšetření byla provedena během 5 dnů od přijetí. CTSI skóre závažnosti akutní pankreatitidy bylo potvrzeno množstvím studií jako přesnější než APACHE II skóre, Ransonovo skóre a CRP (163).

Statistika

Naměřené hodnoty byly shrnuty do tabulky zároveň s následujícími klinickými údaji: věk, pohlaví, hmotnost, výška, body mass index, etiologie pankreatitidy, úmrtí, CT vyšetření – Balthazarovo skóre, rozsah nekrózy, CTSI skóre. Pacienti byli rozděleni v závislosti na závažnosti AP do skupin a to dvojím způsobem s ohledem na CTSI skóre:

- a) rozdělení na 2 skupiny lehká AP (0-3 b. CTSI) a těžká AP (4-10 b. CTSI)
- b) rozdělení na 3 kategorie A (0-2 b. CTSI), B (3-4 b. CTSI), C (5-10 b. CTSI)

Druhé rozdělení bylo provedeno kvůli možnosti sledovat podrobněji trend hodnot adipokínů a zánětlivých markerů v závislosti na závažnosti AP.

Data byla statisticky zpracována (software MEDCalc, firma MedCalc Software, Ostend, Belgie), odlehlé hodnoty byly vyloučeny (testováno Grubbsovým dvojstranným testem s koef. alfa = 0,05 a testem dle Tukeyho z roku 1977). Data byla testována na normalitu D'Agostino-Pearsonovým testem, pro nenormální rozložení dat bylo porovnání skupin provedeno pomocí Kruskal-Wallisova testu.

Po prvotním zpracování naměřených dat byly provedeny dvě podrobné subanalýzy:

1) analýza hladin adiponektinu, A-FABP a FGF-21 v časně fázi AP:

Statistická analýza byla provedena ve skupině všech jedinců s diagnózou AP a dále ve skupinách rozdělených podle BMI ($BMI \leq 25,0 \text{ kg/m}^2$ a $BMI > 25,0 \text{ kg/m}^2$), CTSI skóre (CTSI A, 0–2 body; CTSI B, 3–4 body; CTSI C, 5–10 bodů) a podle klasifikace na lehkou/těžkou AP na základě CTSI skóre (lehká AP, 0–4 body; těžká AP, 5–10 bodů).

Kolmogorovův-Smirnovův test k otestování normálního rozložení dat. Rozdíly mezi proměnnými v jednotlivých laboratorních ukazatelích ve skupině byly analyzovány Wilcoxonovým párovým testem. Rozdíly mezi proměnnými v jednotlivých laboratorních ukazatelích mezi dvěma skupinami byly analyzovány Mann-Whitneyho U testem. Rozdíly v proměnných mezi třemi skupinami (rozdělenými podle CTSI skóre) byly analyzovány Kruskal-Wallisovým testem. Pro statistické zpracování korelace mezi jednotlivými parametry jsme použili pro sešikmené rozdělení jednorozměrnou Spearmanovu korelační analýzu. Vícenásobná regresní analýza byla provedena pro otestování nezávislé asociace mezi závislými a nezávislými proměnnými.

2) analýza predikce závažnosti AP s použitím hladin ADP, A-FABP a FGF-21 4. den po přijetí

V této analýze byl použit Kolmogorovův-Smirnovův test k otestování normálního rozložení dat. Rozdíly proměnných mezi podskupinami lehké a těžké AP byly otestovány Mann-Whitneyho U testem. Rozdíly mezi proměnnými tří skupin rozdělených podle CTSI skóre byly analyzovány Kruskal-Wallisovým testem. Pro statistické zhodnocení korelace mezi jednotlivými parametry jsme použili jednorozměrnou Spearmanovu korelační analýzu pro proměnné se sešikmeným rozložením. Pro otestování nezávislé asociace mezi závislými a nezávislými proměnnými byla provedena vícenásobná regresní analýza. Pro výpočet cut-off hodnot, pozitivních prediktivních hodnot (PPV), negativních prediktivních hodnot (NPV), plochy pod křivkou (AUC), senzitivity a specifity byla provedena receiver-operator characteristics (ROC) analýza.

V obou případech byl statistická analýza provedena programem SPSS pro Windows, verze 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Hodnoty pravděpodobnosti $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

4.3.2.1 Studie II – základní charakteristiky

V této části jsou uvedeny základní charakteristiky studovaného souboru – rozdělené podle jednotlivých kategorií Balthazara skóre, CTSI skóre, podle klasifikace AP lehká vs. těžká (tabulky 8, 9, 10)

V tabulkách 11 a 12 je uvedeno dělení podle příčin pankreatitidy jednak podle kategorií CTSI, jednak podle klasifikace AP lehká vs. těžká.

Tabulka 8. Charakteristika pacientů v jednotlivých kategoriích Balthazara skóre

	n	Muži (%)	Průměrný věk (roky)	Průměrné BMI (kg/m ²)
Balthazar A	21	48	64,0	26,7
Balthazar B	21	52	55,2	27,6
Balthazar C	26	50	59,7	27,8
Balthazar D	7	86	45,1	26,9
Balthazar E	9	78	58,7	32,6
Celkem	84	56	58	27,5

N = počet pacientů v jednotlivých kategoriích; BMI = body mass index

Tabulka 9. Charakteristika pacientů v jednotlivých kategoriích CTSI skóre

	N	Muži (%)	Průměrný věk (roky)	Průměrné BMI (kg/m ²)
CTSI A (0-2 b.)	64	50	60,4	27,3
CTSI B (3-4 b.)	10	60	45,1	23,9
CTSI C (5-10 b.)	10	90	58,2	32,6

Tabulka 10. Charakteristika pacientů v kategoriích lehká/těžká AP

	N	Muži (%)	Průměrný věk (roky)	Průměrné BMI (kg/m ²)
lehká AP (0-5 b.)	70	53	58,7	25,1
těžká AP (6-10 b.)	14	71	56,1	28,7

Tabulka 11. Etiologie pankreatitidy v jednotlivých kategoriích CTSI skóre

	Alkohol (%)	Biliární (%)	Exacerbace CHP (%)	Idiopatická (%)
CTSI A (0-2 b.)	7	48	13	22
CTSI B (3-4 b.)	60	20	10	10
CTSI C (5-10 b.)	30	50	10	10

CHP = chronická pankreatitida; jiné příčiny nejsou zahrnuty, tudíž suma nemusí být rovna 100%

Tabulka 12. Etiologie pankreatitidy v kategoriích lehká/těžká AP

	Alkohol (%)	Biliární (%)	Exacerbace CHP (%)	Idiopatická (%)
lehká AP (0-5 b.)	13	46	13	13
těžká AP (6-10 b.)	36	43	14	36

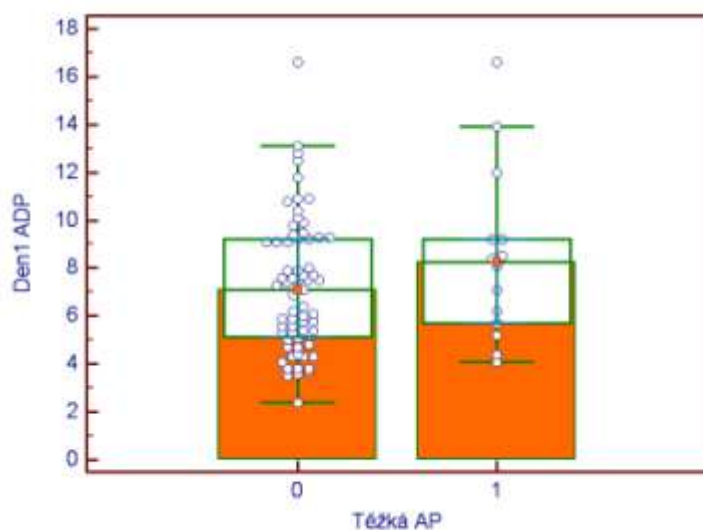
CHP = chronická pankreatitida; jiné příčiny nejsou zahrnuty, tudíž suma nemusí být rovna 100%

4.3.2.2 Výsledky studie II – jednotlivé markery

Adiponektin – den 1

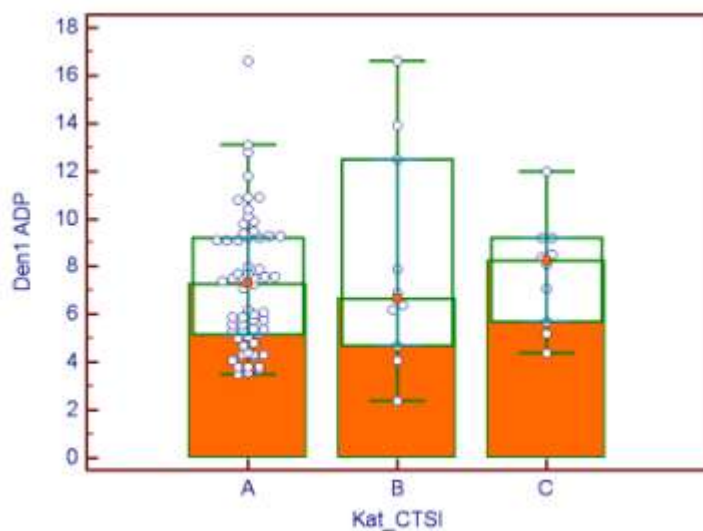
Na obr. 29, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39, 41, 42, 44, 45 jsou uvedeny krabicové grafy hodnot vyšetřených pacientů pro sledované laboratorní ukazatele v den 1.

Na obr. 31, 34, 37, 40, 43 a 46 jsou uvedeny grafy korelace sledovaných laboratorních ukazatelů s CTSI skóre v den 1.



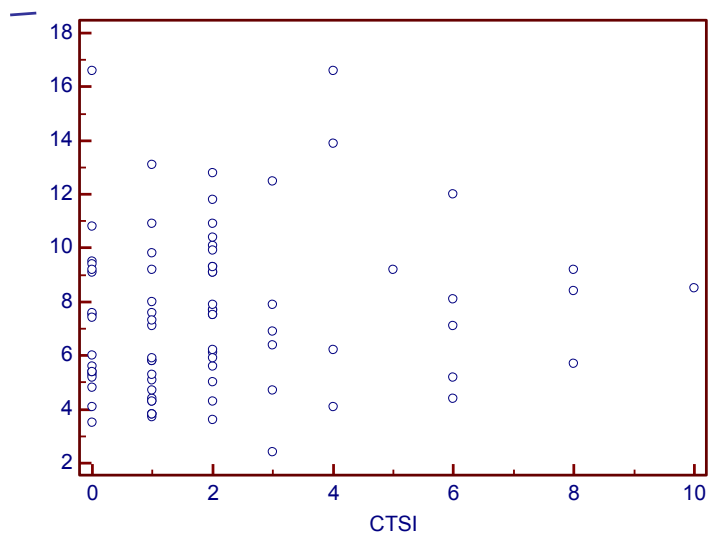
Obr. 29. Hodnoty adiponektinu u pacientů s lehkou a těžkou AP – den 1

Legenda: na ose y adiponektin v mg/l, na ose x „Těžká AP“: 1 = těžká AP; 0 = lehká AP; $p=0,266$



Obr. 30. Hodnoty adiponektinu u pacientů členěných dle kategorií CTSI – den 1

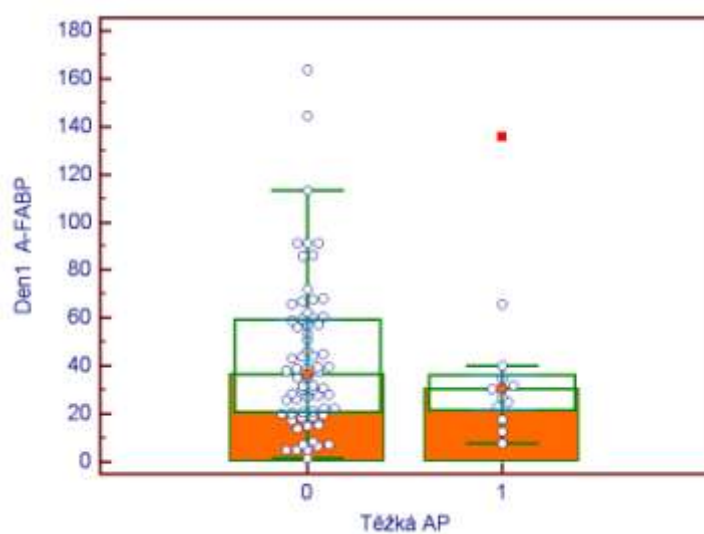
Legenda: na ose y adiponektin v mg/l, na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b. CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; $p=0,749$



Obr. 31. Korelace ADP s CTSI – den 1

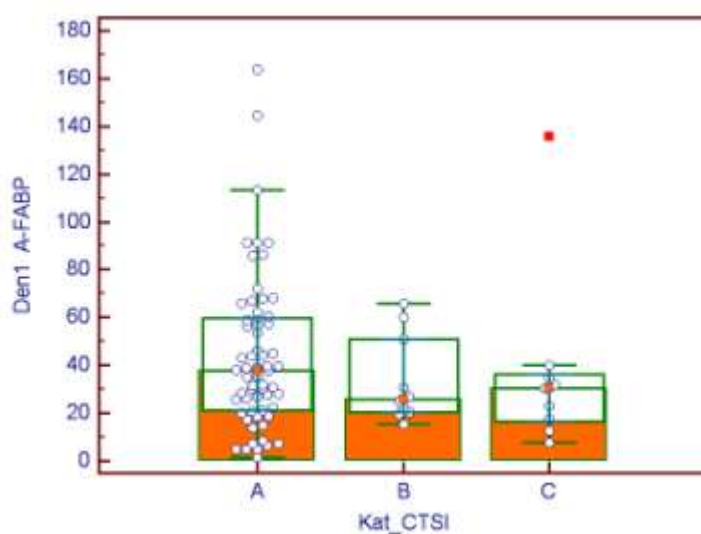
Legenda: Na ose x ADP v mg/l, na ose y CTSI skóre; $r=0,118$; $p=0,286$ ($n=81$)

A-FABP – den 1



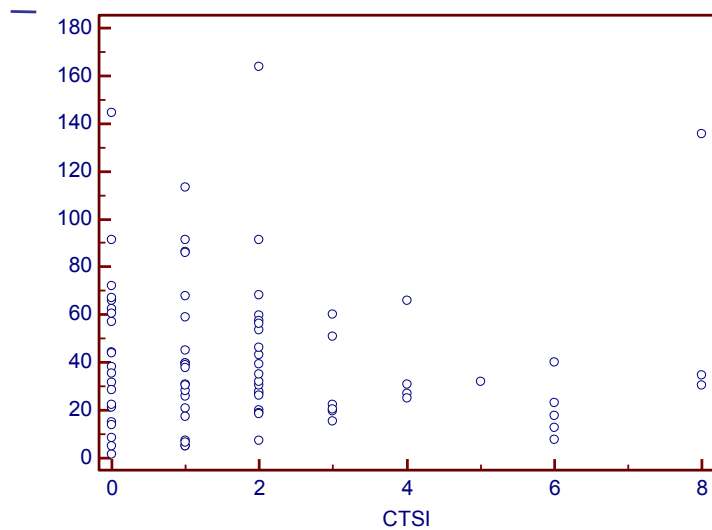
Obr. 32. Hodnoty A-FABP u pacientů s lehkou a těžkou AP – den 1

Legenda: na ose y A-FABP v $\mu\text{g/l}$, na ose x „Těžká AP“: 0 = lehká AP; 1 = těžká AP; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,389$



Obr. 33. Hodnoty A-FABP u pacientů členěných dle kategorií CTSI – den 1

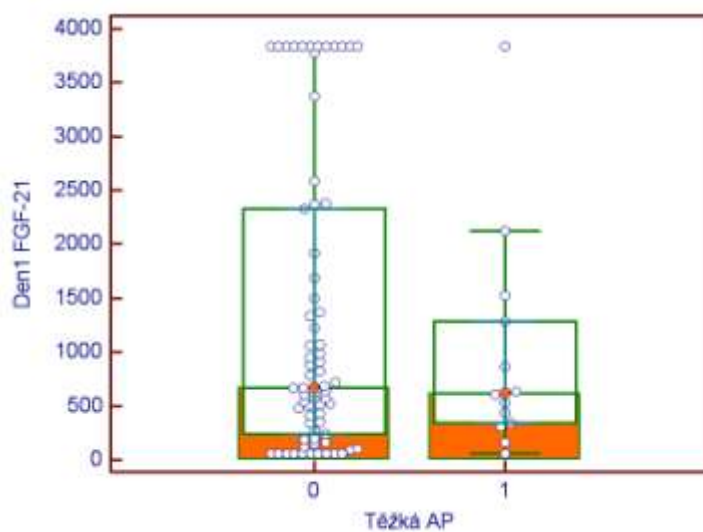
Legenda: na ose y A-FABP v $\mu\text{g/l}$, na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b. CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,416$;



Obr. 34. Korelace A-FABP s CTSI – den 1

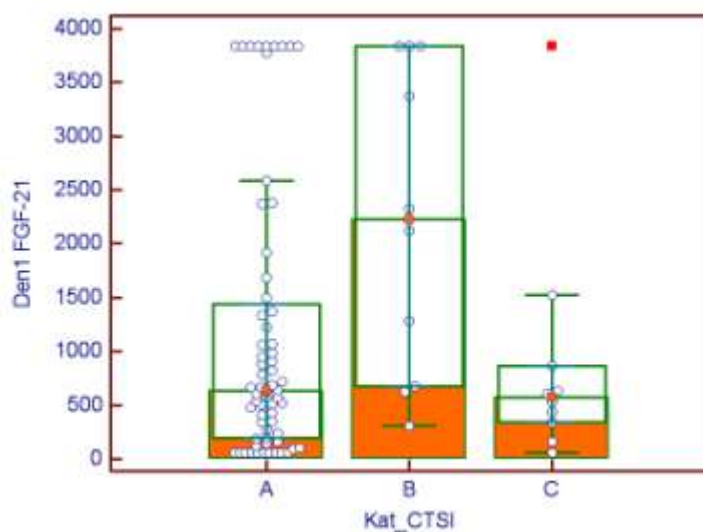
Na ose y A-FABP v $\mu\text{g/l}$; na ose x hodnoty CTSI; $r=-0,045$; $p=0,708$ ($n=81$)

FGF-21 – den 1



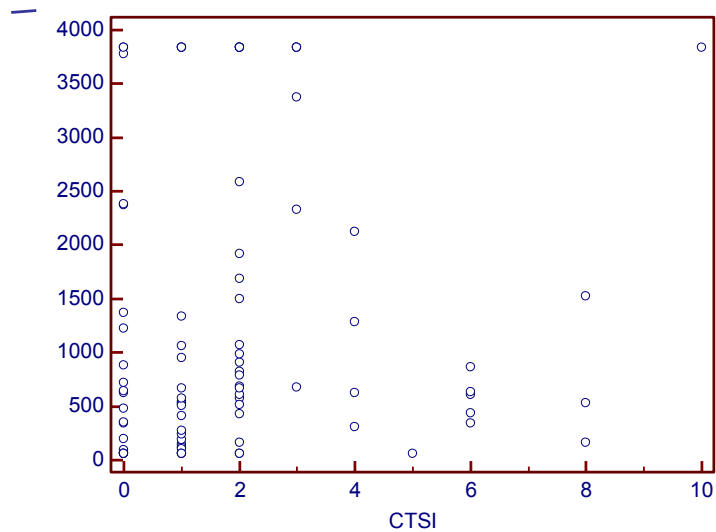
Obr. 35. Hodnoty FGF-21 u pacientů s lehkou a těžkou AP – den 1

Legenda: na ose y FGF-21 v ng/l, na ose x „Těžká AP“: 0 = lehká AP; 1 = těžká AP; $p=0,674$



Obr. 36. Hodnoty FGF-21 u pacientů podle kategorií CTSI – den 1

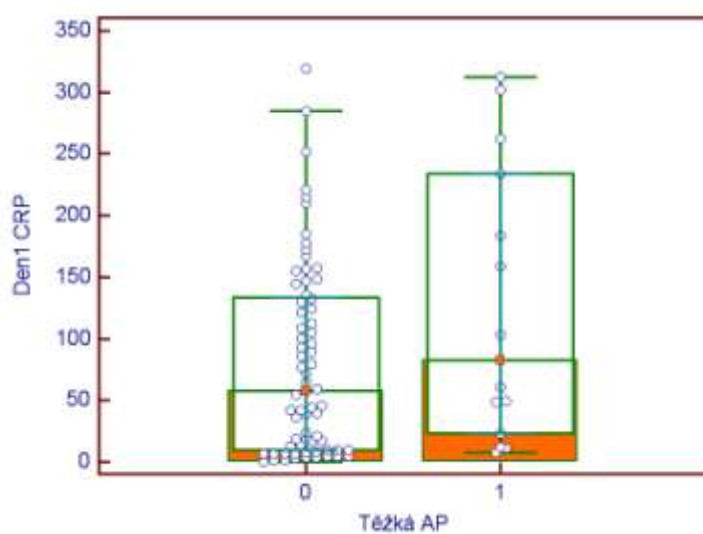
Legenda: na ose y hodnoty FGF-21 v ng/l, na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b. CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; jednotky: ng/l; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,049$; post-hoc analýza: $p<0,05$ platí pro: A vs. B, B vs. C



Obr. 37. Korelace FGF-21 s CTSI

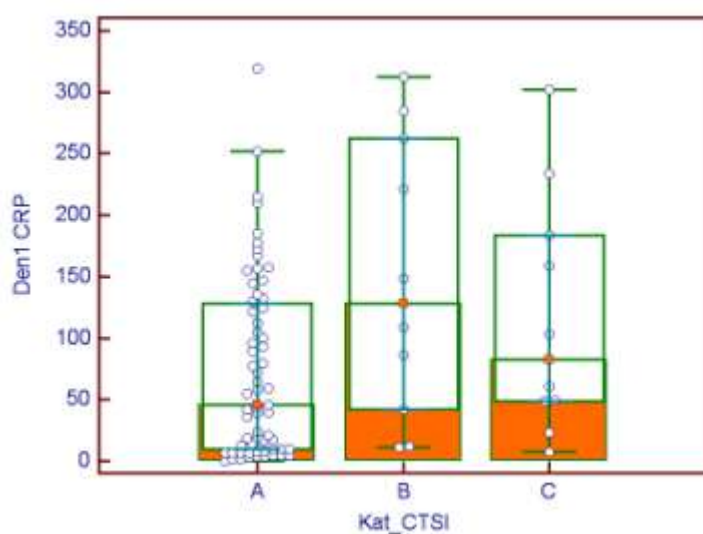
Na ose y FGF-21 v ng/l; na ose x hodnoty CTSI; $r=0,071$; $p=0,541$ ($n=84$)

Hodnoty CRP – den 1



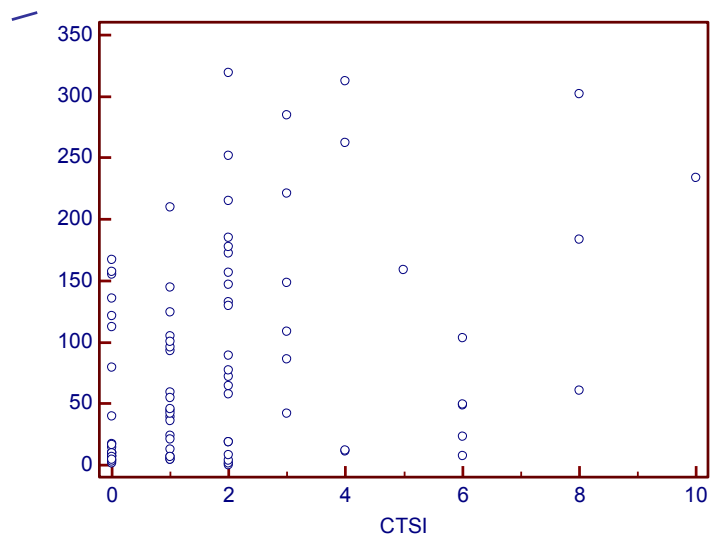
Obr. 38. Hodnoty CRP podle závažnosti AP – den 1

Legenda: na ose y CRP v mg/l, na ose x „Těžká AP“: 0 = lehká AP; 1 = těžká AP; $p=0,120$



Obr. 39. Hodnoty CRP podle kategorií CTSI – den 1

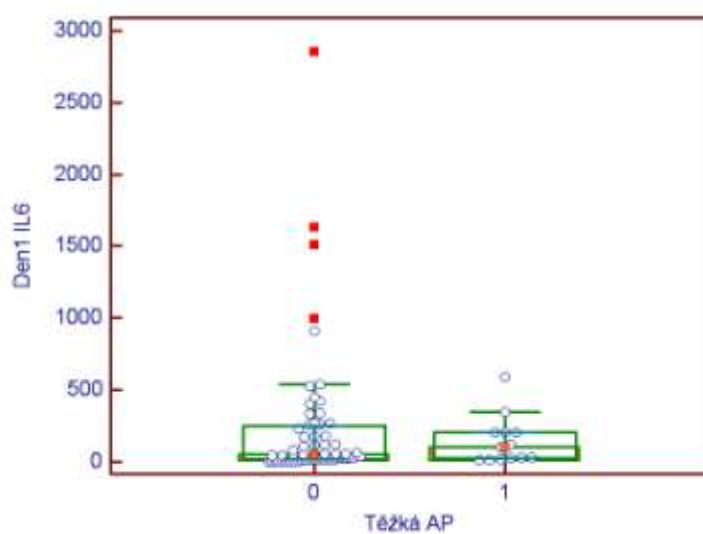
Legenda: na ose y CRP v mg/l, na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b. CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; $p=0,04$; post-hoc analýza: $p<0,05$ platí pro: A vs. B



Obr. 40. Korelace CRP s CTSI skóre – den 1

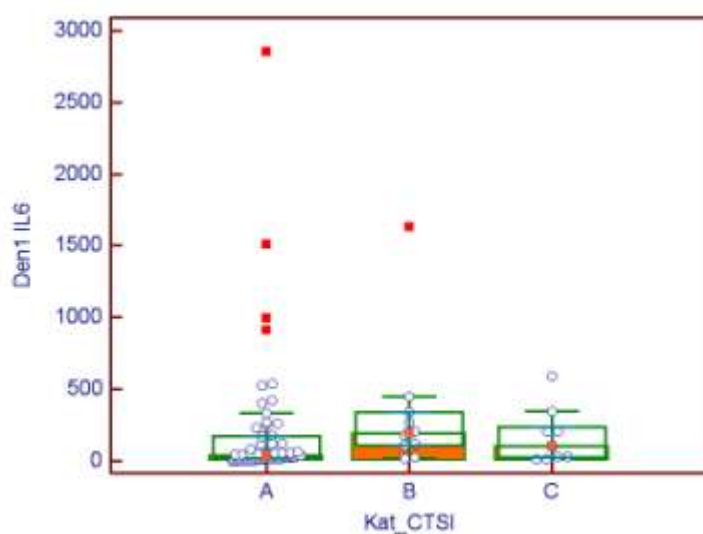
Na ose y CRP v mg/l, na ose x CTSI skóre; $r=0,341$; $p=0,002$ ($n=83$)

Hodnoty IL-6 – den 1



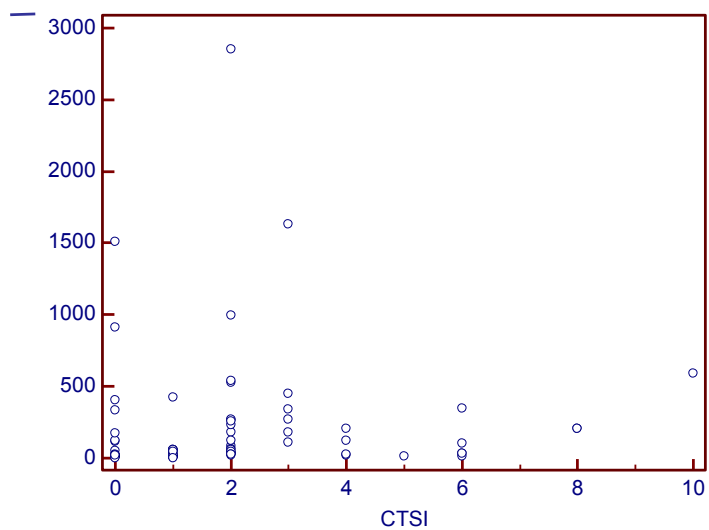
Obr. 41. Hodnoty IL-6 podle závažnosti AP – den 1

Legenda: na ose y IL-6 v ng/l, na ose x „Těžká AP“: 0 = lehká AP; 1 = těžká AP; jednotky ng/l; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,639$



Obr. 42. Hodnoty IL-6 podle kategorií CTSI – den 1

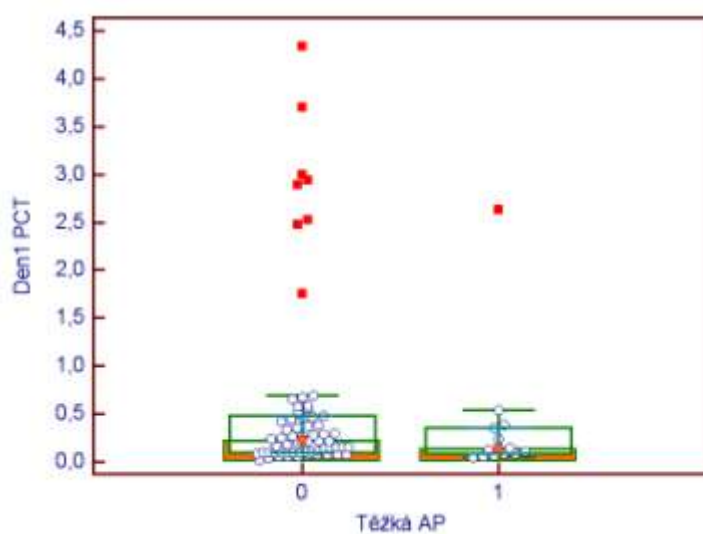
Legenda: na ose y IL-6 v ng/l; na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b. CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,083$



Obr. 43. Korelace IL-6 a CTSI skóre – den 1

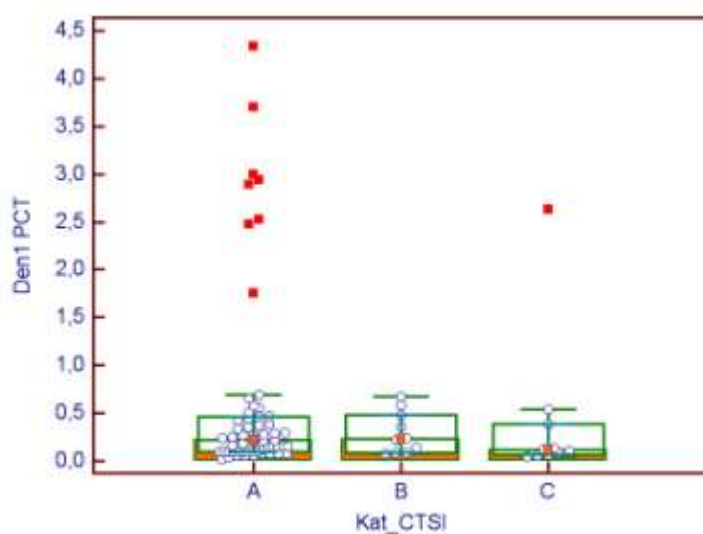
Na ose y IL-6 v ng/l, na ose x CTSI skóre; $r=0,067$; $p=0,566$ ($n=76$)

Hodnoty PCT – den 1



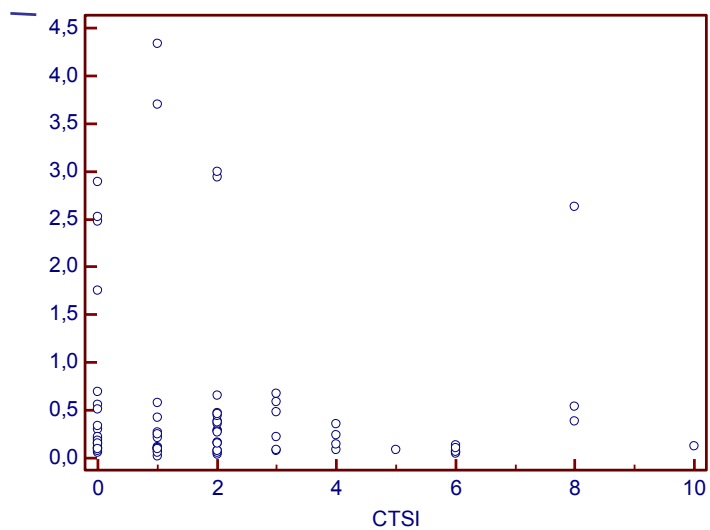
Obr. 44. Hodnoty PCT dle závažnosti AP – den 1

Legenda: na ose y PCT v $\mu\text{g/l}$; na ose x „Těžká AP“: 0 = lehká AP, 1 = těžká AP; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,161$



Obr. 45. Hodnoty PCT dle kategorií CTSI – den 1

Legenda: na ose y PCT v $\mu\text{g/l}$; na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b. CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,405$



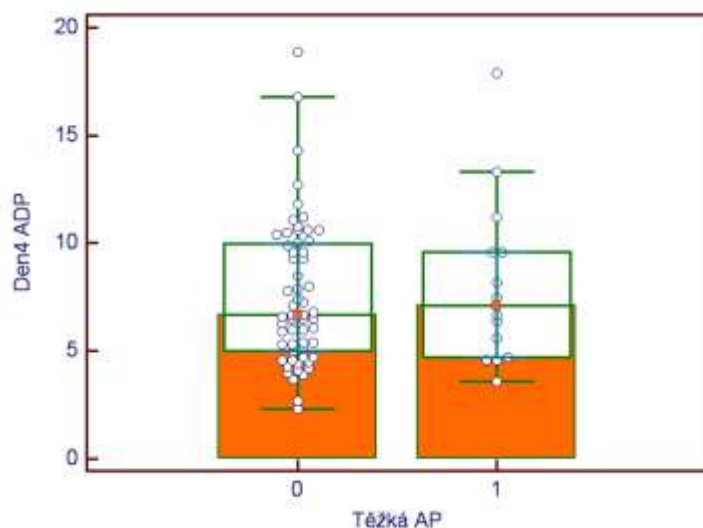
Obr. 46. Korelace PCT s CTSI skóre – den 1

Na ose y PCT v $\mu\text{g/l}$, na ose x CTSI skóre; $r=-0,078$; $p=0,502$ ($n=77$)

Adiponektin – den 4

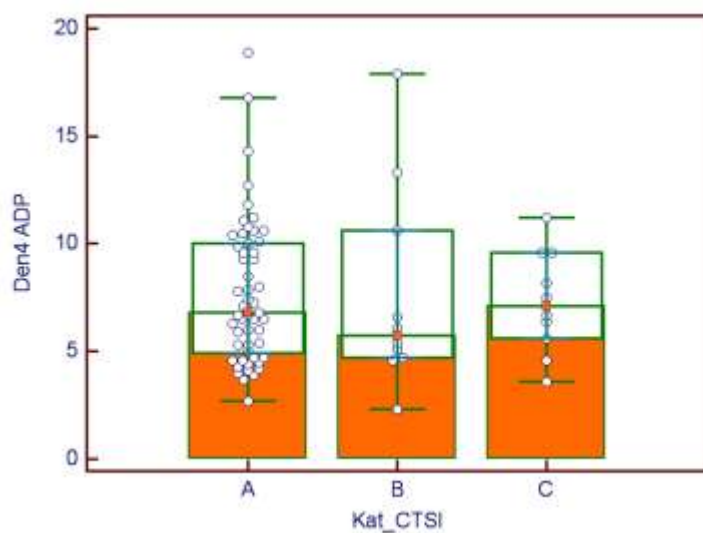
Na obr. 47, 48, 50, 51, 53, 54, 56, 57, 59, 60, 62, 63 jsou uvedeny krabicové grafy hodnot vyšetřených pacientů pro sledované laboratorní ukazatele v den 4.

Na obr. 49, 52, 55, 58, 61 a 64 jsou uvedeny grafy korelace sledovaných laboratorních ukazatelů s CTSI skóre v den 4.



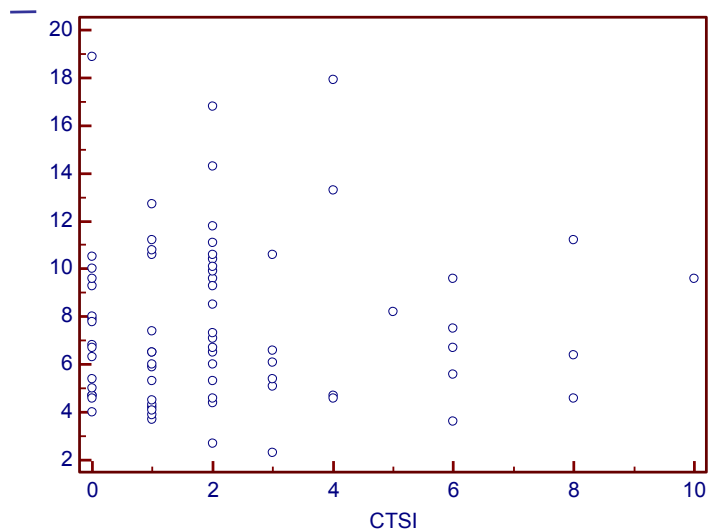
Obr. 47. Hodnoty adiponektinu u pacientů s lehkou a těžkou AP – den 4

Na ose y adiponektin v mg/l, na ose x „Těžká AP“: 0 = lehká AP, 1 = těžká AP; $p=0,742$



Obr. 48. Hodnoty adiponektinu u pacientů členěných dle kategorií CTSI – den 4

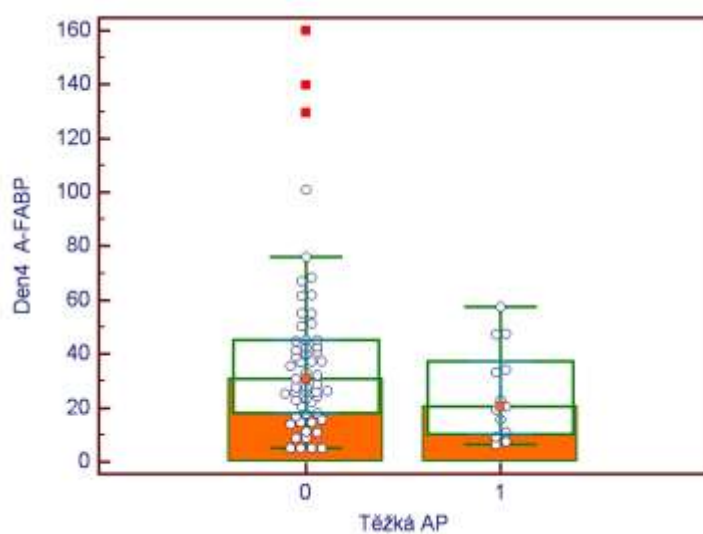
Legenda: na ose y adiponektin v mg/l, na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b. CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; $p=0,895$



Obr. 49. Korelace ADP s CTSI – den 4

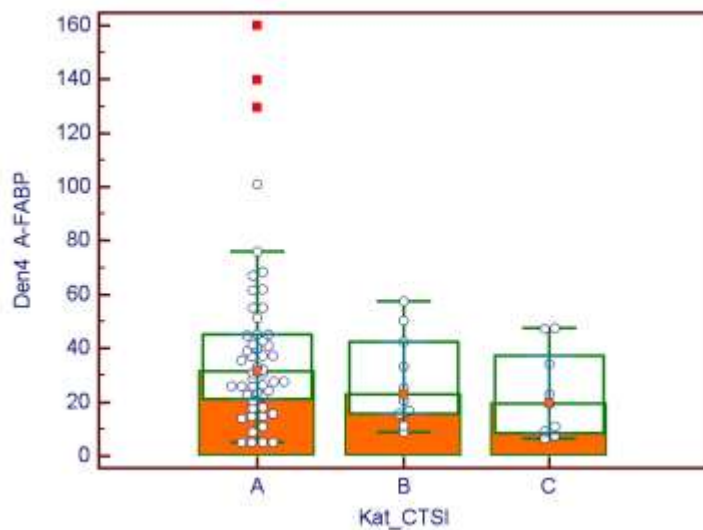
Na ose x ADP v mg/l, na ose y CTSI skóre; $r=0,028$; $p=0,811$ ($n=75$)

Hodnoty A-FABP – den 4



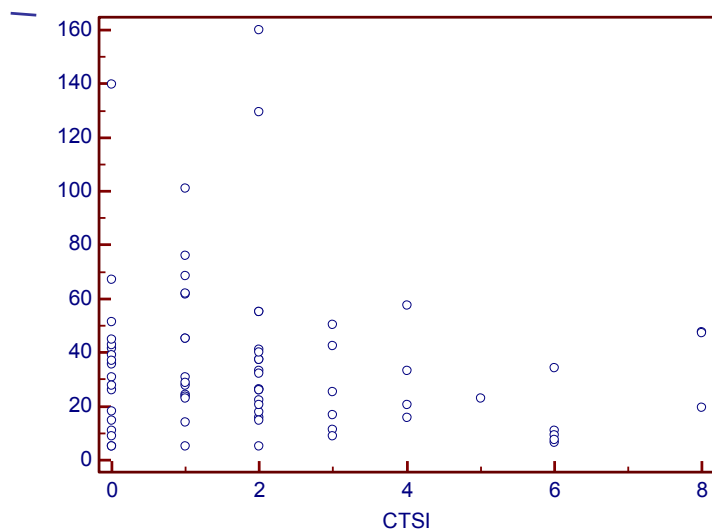
Obr. 50. Hodnoty A-FABP u pacientů s lehkou a těžkou AP – den 4

Na ose y A-FABP v $\mu\text{g/l}$, na ose x „Těžká AP“: 0 = lehká AP, 1 = těžká AP; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,162$



Obr. 51. Hodnoty A-FABP u pacientů členěných dle kategorií CTSEI – den 4

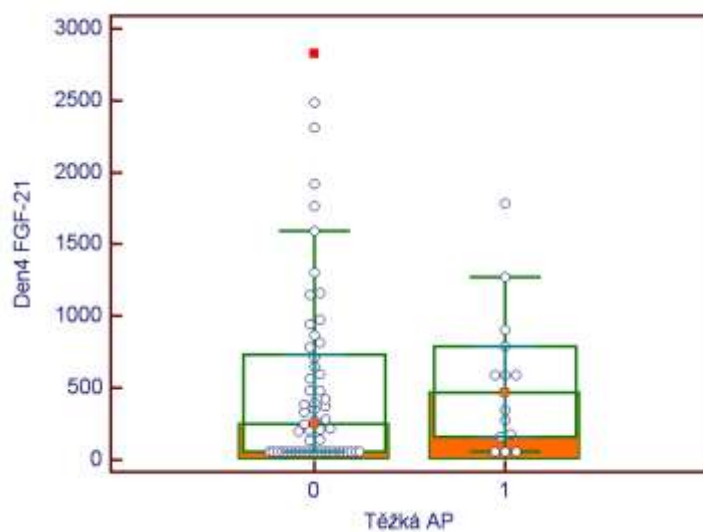
Legenda: A = 0 – 2 b. CTSEI; B = 3 – 4 b. CTSEI; C = 5 – 10 b. CTSEI; jednotky: $\mu\text{g/l}$; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,178$



Obr. 52. Korelace A-FABP s CTSI – den 4

Na ose y A-FABP v $\mu\text{g/l}$; na ose x hodnoty CTSI; $r=-0,147$; $p=0,221$ ($n=71$)

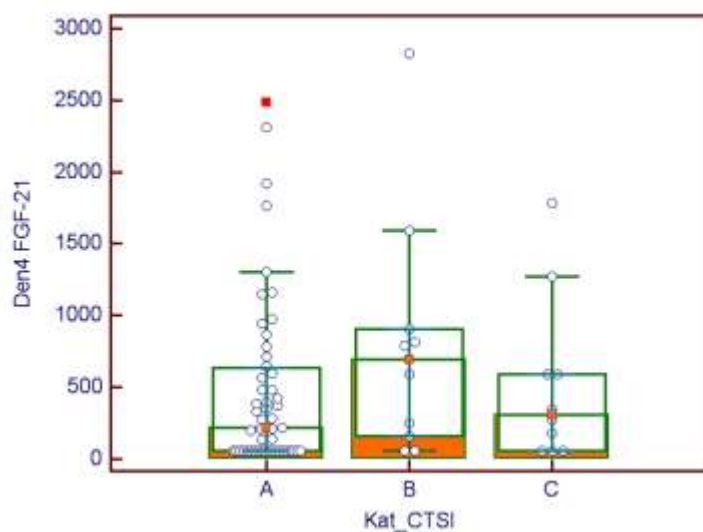
Hodnoty FGF-21 – den 4



Obr. 53. Hodnoty FGF-21 u pacientů s lehkou a těžkou AP – den 4

Legenda: na ose y FGF-21 v ng/l, na ose x „Těžká AP“: 0 = lehká AP; 1 = těžká AP;

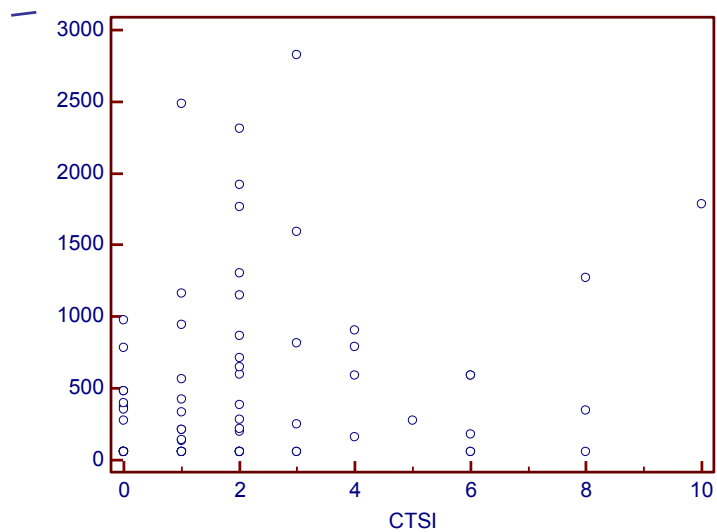
■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,400$



Obr. 54. Hodnoty FGF-21 u pacientů podle kategorií CTSI – den 4

Legenda: na ose y FGF-21 v ng/l, na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b.

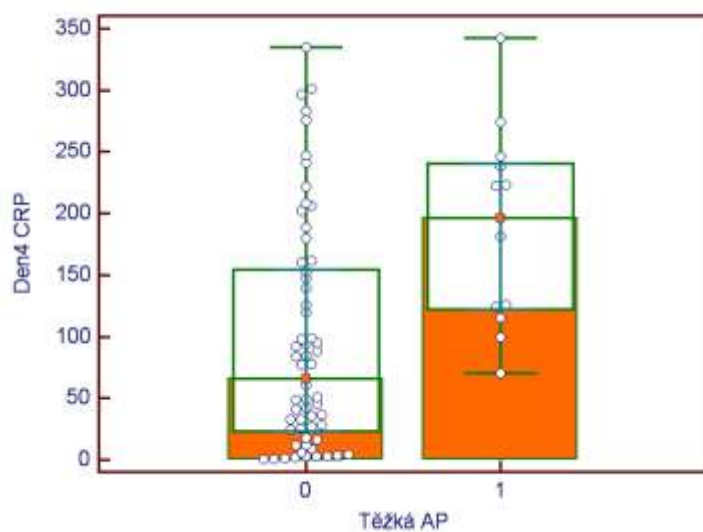
CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,344$



Obr. 55. Korelace FGF-21 s CTSI – den 4

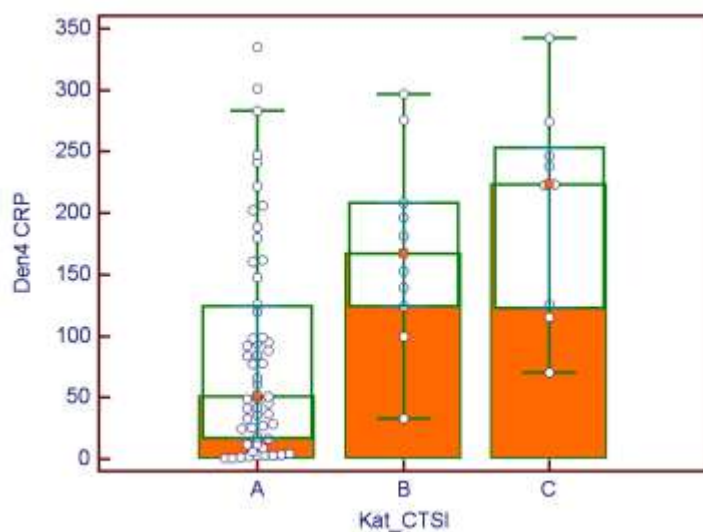
Na ose y FGF-21 v ng/l; na ose x hodnoty CTSI; $r=0,177$; $p=0,139$ ($n=71$)

Hodnoty CRP – den 4



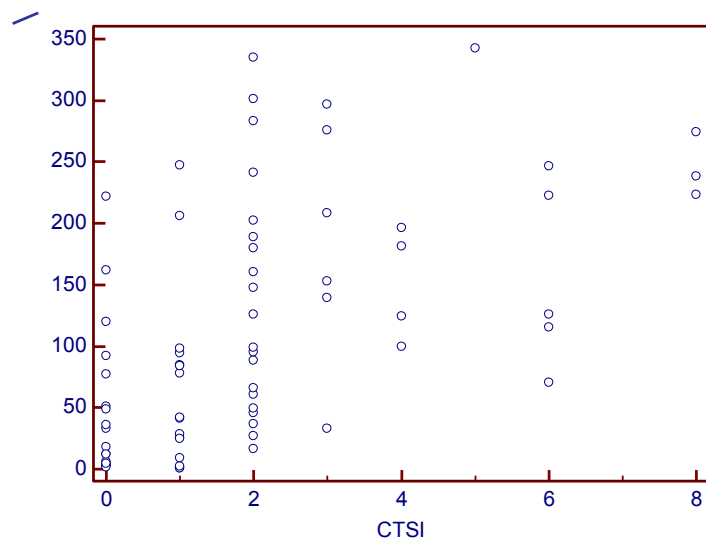
Obr. 56. Hodnoty CRP podle závažnosti AP – den 4

Legenda: na ose y CRP v mg/l, na ose x „Těžká AP“: 0 = lehká AP, 1 = těžká AP; $p=0,001$



Obr. 57. Hodnoty CRP podle kategorií CTSI – den 4

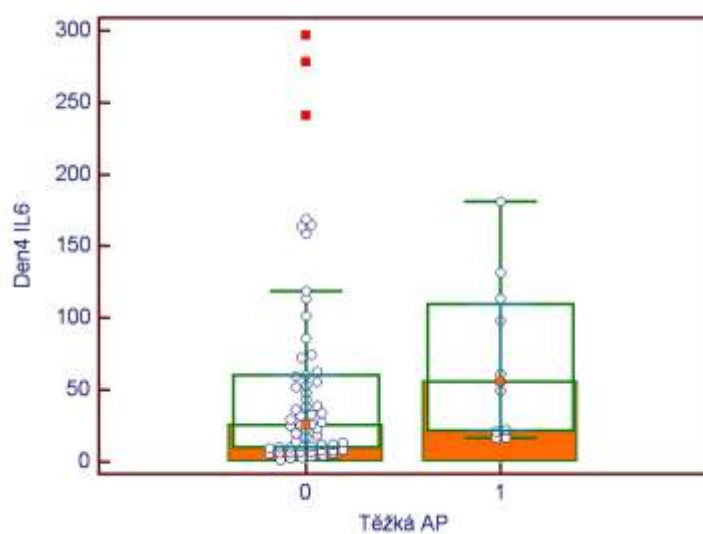
Legenda: na ose y CRP v mg/l, na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b. CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; $p<0,000$; Post-hoc analýza: $p<0,05$ platí pro: A vs. B, A vs. C



Obr. 58. Korelace CRP s CTSI – den 4

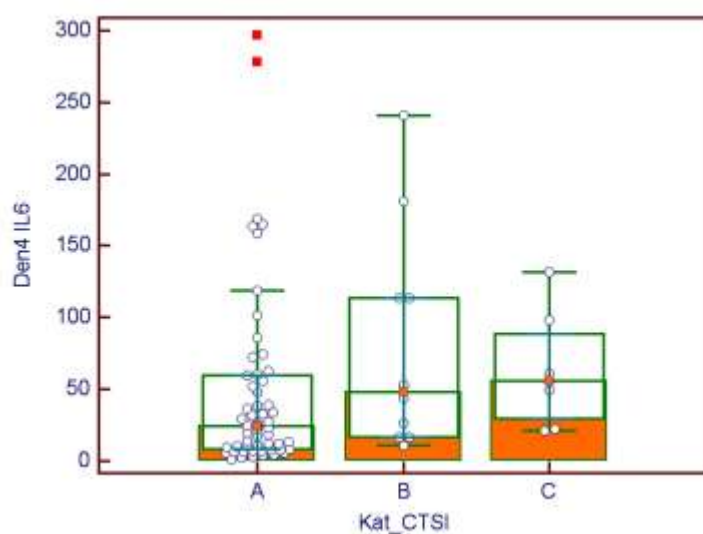
Na ose y CRP v mg/l, na ose x CTSI skóre; $r=0,543$; $p<0,000$ ($n=74$)

Hodnoty IL-6 – den 4



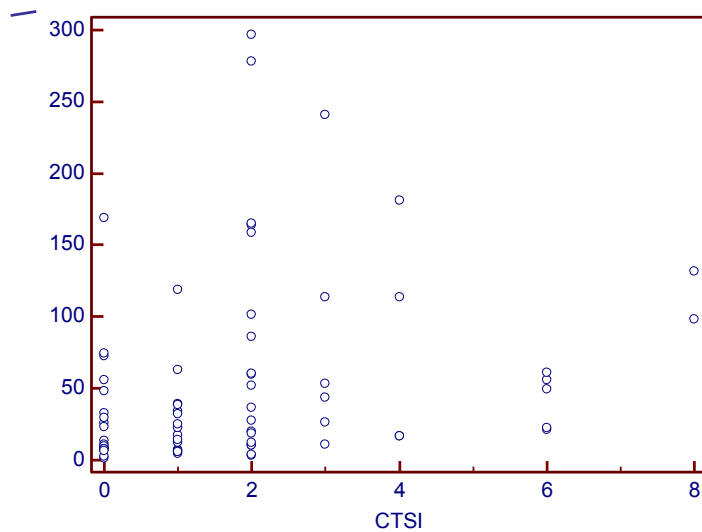
Obr. 59. Hodnoty IL-6 podle závažnosti AP – den 4

Legenda: na ose y IL-6 v ng/l, na ose x “Těžká AP”: 0 = lehká AP, 1 = těžká AP; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,080$



Obr. 60. Hodnoty IL-6 podle kategorií CTSI – den 4

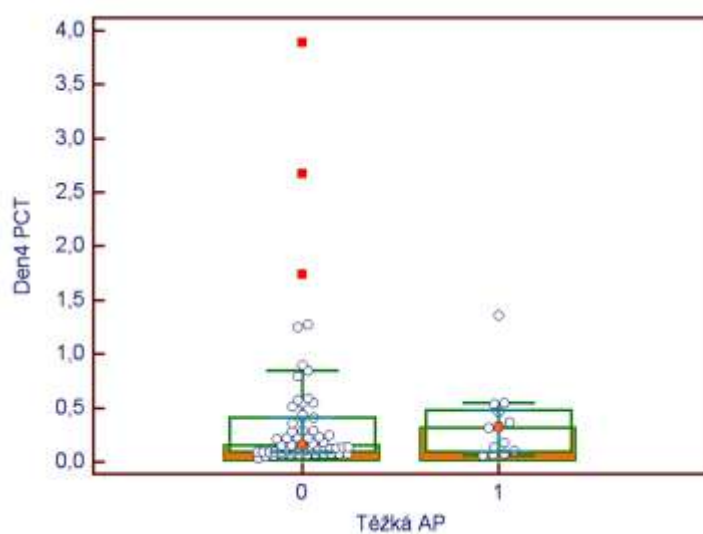
Legenda: na ose y IL-6 v ng/l, na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b. CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,072$



Obr. 61. Korelace IL-6 s CTSI skóre – den 4

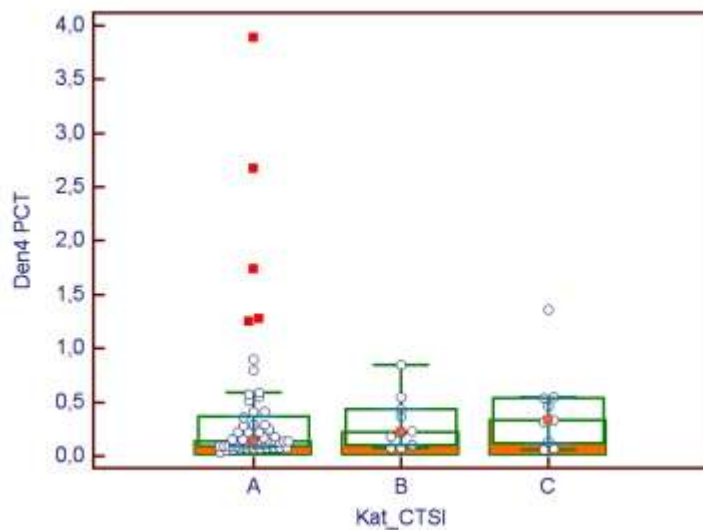
Na ose y IL-6 v ng/l, na ose x CTSI skóre; $r=0,241$; $p=0,043$ ($n=71$)

Hodnoty PCT – den 4



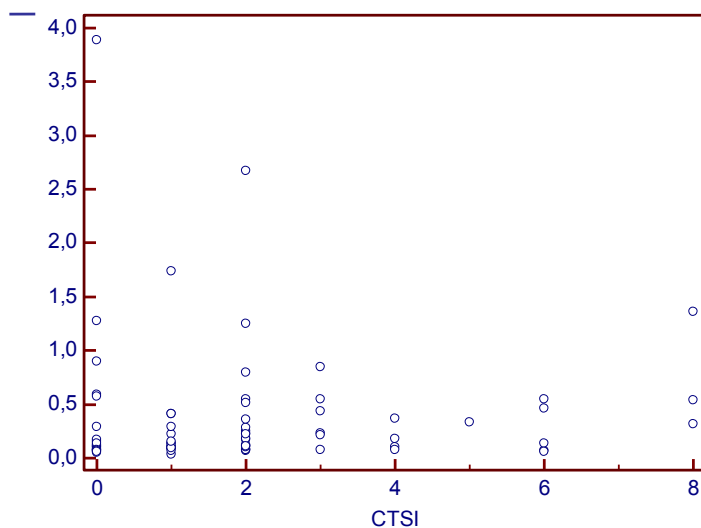
Obr. 62. Hodnoty PCT dle závažnosti AP – den 4

Legenda: na ose y PCT v $\mu\text{g/l}$, na ose x “Těžká AP”: 0 = lehká AP, 1 = těžká AP; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,598$



Obr. 63. Hodnoty PCT dle kategorií CTSI – den 4

Legenda: na ose y PCT v $\mu\text{g/l}$, na ose x kategorie CTSI: A = 0 – 2 b. CTSI; B = 3 – 4 b. CTSI; C = 5 – 10 b. CTSI; ■ značí odlehlé hodnoty; $p=0,473$



Obr. 64. Korelace PCT s CTSI skóre – den 4

Na ose y PCT v $\mu\text{g/l}$, na ose x CTSI skóre; $r=0,009$; $p=0,9415$ ($n=72$)

Tabulky

V Tabulce 13. jsou uvedeny rozdíly laboratorních charakteristik mezi dvěma skupinami rozdělenými podle klasifikace AP lehká/těžká.

Tabulka 14. prezentuje rozdíly laboratorních charakteristik mezi skupinami rozdělenými podle CTSI skóre.

Tabulka 15. uvádí korelace laboratorních ukazatelů s CTSI skóre 1. den po přijetí, Tabulka 16. totéž 4. den po přijetí.

Tabulka 13. Rozdíly laboratorních charakteristik mezi dvěma skupinami rozdělenými podle klasifikace AP lehká/těžká a uvnitř těchto skupin (porovnání dne 1 a 4)

	Lehká AP	Těžká AP	Významnost p-hodnota
Počet jedinců	70	14	-
Věk roky	58,7 ± 18,2 (45,0 – 73,0)	56,1 ± 15,8 (45,0 – 69,0)	-
Hmotnost kg	76,6 ± 14,5 (65,0 – 85,0)	88,6 ± 28,6 (75,0 – 98,0)	-
BMI kg/m ²	26,93 ± 5,45 (23,20 – 30,30)	30,40 ± 10,54 (26,00 – 31,50)	-
ADP_1 mg/l	8,0 ± 4,8 [7,4] (5,2 – 9,3)	8,5 ± 3,6 [8,3] (5,7 – 9,2)	n.s.
ADP_4 mg/l	8,1 ± 6,0 [6,7] (5,0 – 10,0)	8,1 ± 4,0 [7,1] (4,7 – 9,6)	n.s.
A-FABP_1 µg/l	48,2 ± 44,0 [37,9] (20,8 – 60,0)	52,3 ± 65,1 [30,6] (23,1 – 40,2)	n.s.
A-FABP_4 µg/l	40,6 ± 38,3 [29,8] *** (16,9 – 45,1)	41,6 ± 62,2 [21,8] * (10,8 – 47,4)	n.s.
FGF-21_1 ng/l	1315,0 ± 1384,7 [669,9] (240,0 – 2330,3)	953,7 ± 1004,9 [619,4] (257,0 – 1605,7)	n.s.
FGF-21_4 ng/l	620,5 ± 911,1 [261,7] *** (60,0 – 715,7)	547,8 ± 509,5 [468,0] (158,3 – 793,0)	n.s.
CRP_1 mg/l	86,1 ± 90,9 [58,5] (10,0 – 136,0)	126,4 ± 113,6 [82,1] (23,1 – 233,6)	n.s.
CRP_4 mg/l	90,3 ± 90,1 [51,2] (17,4 – 147,8)	213,3 ± 117,2 [209,8] * (124,7 – 246,2)	0,000
PCT_1 µg/l	2,44 ± 12,42 [0,25] (0,10 – 0,56)	0,36 ± 0,67 [0,13] (0,08 – 0,36)	n.s.
PCT_4 µg/l	1,45 ± 6,62 [0,15] ** (0,09 – 0,44)	0,64 ± 1,13 [0,33] (0,10 – 0,54)	n.s.
IL-6_1 ng/l	343,1 ± 808,8 [54,4] (18,0 – 263,0)	410,6 ± 999,6 [113,5] (24,3 – 205,6)	n.s.
IL-6_4 ng/l	53,3 ± 68,5 [25,9] *** (8,4 – 60,5)	145,0 ± 160,4 [79,5] (22,7 – 181,4)	0,005

*Data jsou vyjádřena jako průměr ± standardní odchylky, u parametrů se sešikmeným rozdělením také jako mediány [v hranatých závorkách], Hodnoty 25. a 75. percentilu jsou uvedeny v kulatých závorkách. Rozdíly v proměnných mezi skupinami byly analyzovány Mann-Whitneyho U testem. Rozdíly proměnných ve skupinách byly analyzovány Wilcoxonovým párovým testem. Významné rozdíly mezi A-FABP_1 vs. A-FABP_4, FGF21_1 vs. FGF21_4, PCT_1 vs. PCT_4, IL-6_1 vs. IL-6_4 ve skupinách: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.*

ADP_1, A-FABP_1, FGF21_1, CRP_1, PCT_1, IL-6_1 = den přijetí (den 1)

ADP_4, A-FABP_4, FGF21_4, CRP_4, PCT_4, IL-6_4 = 4. den po přijetí (den 4)

Komentář k Tabulce 13.:

K významnému poklesu mezi dnem 1 a 4 došlo u A-FABP v obou podskupinách (lehká i těžká AP), u FGF-21 byl významný pokles přítomen pouze ve skupině lehké AP, nikoli však u pacientů s těžkou AP.

U CRP došlo k významnému vzestupu pouze ve skupině pacientů s těžkou AP, u PCT byl přítomen významný rozdíl (pokles mezi dnem 1 a 4) pouze ve skupině lehké AP, u pacientů s těžkou AP došlo k nevýznamnému vzestupu. Limitem u PCT je velký rozptyl hodnot zejména ve skupině lehké AP. U IL-6 byl přítomen ve skupině lehké AP významný pokles oproti nevýznamnému poklesu ve skupině těžké AP.

Významné rozdíly mezi skupinami lehké a těžké AP u téhož marker v daný den (den 1 či 4) byly přítomny pouze u CRP a IL-6 v den 4.

Tabulka 14. Rozdíly laboratorních charakteristik mezi skupinami rozdělenými podle CTSI skóre

	CTSI A (0–2 body)	CTSI B (3–4 body)	CTSI C (5–10 bodů)	Významnost p-hodnota
Počet jedinců	64	10	10	-
Věk roky	60,4 ± 18,1 (45,5 – 74,5)	45,1 ± 11,6 (37,0 – 47,0)	58,2 ± 16,4 (46,0 – 69,0)	-
Hmotnost kg	77,0 ± 14,7 (65,5 – 85,5)	69,9 ± 14,1 (60,0 – 82,0)	97,3 ± 27,7 (82,0 – 100,0)	-
BMI kg/m ²	27,29 ± 5,52 (24,50 – 30,80)	23,85 ± 3,55 (20,6 – 25,90)	32,61 ± 11,57 (20,6 – 25,90)	-
ADP_1 mg/l	8,1 ± 4,9 [7,5] (5,3 – 9,4)	8,2 ± 4,6 [6,7] (4,7 – 12,5)	7,8 ± 2,3 [8,3] (5,7 – 9,2)	n.s.
ADP_4 mg/l	8,3 ± 6,2 [6,8] (5,0 – 10,1)	7,7 ± 4,8 [5,8] (4,7 – 10,6)	7,3 ± 2,4 [7,1] (5,6 – 9,6)	n.s.
A-FABP_1 μg/l	49,8 ± 45,4 [38,6] (21,8 – 61,5)	33,7 ± 18,3 [26,0] (20,6 – 50,7)	58,4 ± 76,5 [31,2] (17,6 – 40,2)	n.s.
A-FABP_4 μg/l	42,0 ± 39,5 [30,9] (18,0 – 46,1)	28,2 ± 16,9 [22,9] (15,8 – 42,4)	45,6 ± 73,5 [21,3] (9,1 – 47,4)	n.s.
FGF-21_1 ng/l	1158,7 ± 1296,7 [631,4] (195,0 – 1437,8)	2223,9 ± 1440,7 [2226,3] (673,1 –	900,9 ± 1110,6 [572,6] (341,7 – 868,4)	n.s.
FGF-21_4 ng/l	591,1 ± 896,3 [246,2] (60,0 – 624,0)	805,3 ± 856,0 [693,1]	522,1 ± 580,0 [310,8]	n.s.
CRP_1 mg/l	80,2 ± 89,4 [50,1] (9,7 – 131,0)	148,9 ± 114,5 [128,5]	117,2 ± 98,6 [82,1]	n.s.
CRP_4 mg/l	81,4 ± 84,9 [48,7] (12,0 – 120,1)	171,0 ± 79,2 [167,1]	238,3 ± 129,2 [230,7]	0,000
PCT_1 μg/l	2,65 ± 13,02 [0,25] (0,10 – 0,54)	0,30 ± 0,22 [0,23]	0,42 ± 0,79 [0,12]	n.s.
PCT_4 μg/l	1,56 ± 6,94 [0,14] (0,09 – 0,41)	0,31 ± 0,25 [0,22]	0,82 ± 1,31 [0,40]	n.s.

Tabulka 14. – pokračování. Rozdíly laboratorních charakteristik mezi dvěma skupinami rozdělenými podle CTSI skóre

	CTSI A (0–2 body)	CTSI B (3–4 body)	CTSI C (5–10 bodů)	Významnost p-hodnota
IL-6_1 ng/l	327,5 ± 831,4 [42,1]	334,6 ± 475,5 [190,7] (107,3)	537,7 ± 1173,7 [153,4] (29,6)	n.s.
IL-6_4 ng/l	50,5 ± 66,8 [24,2] (7,7 – 60,3)	81,7 ± 79,0 [48,4] (16,9 – 113,8)	170,1 ± 180,4 [79,5]	0,006

Data jsou vyjádřena jako průměr ± standardní odchylky, u parametrů se sešikmeným rozdělením také jako mediány [v hranatých závorkách], Hodnoty 25. a 75. percentilu jsou uvedeny v kulatých závorkách. Rozdíly v proměnných mezi skupinami byly analyzovány Kruskal-Wallisovým testem.

ADP_1, A-FABP_1, FGF21_1, CRP_1, PCT_1, IL-6_1 = den přijetí (den 1)

ADP_4, A-FABP_4, FGF21_4, CRP_4, PCT_4, IL-6_4 = 4. den po přijetí (den 4)

Komentář k Tabulce 14.:

Při rozdělení pacientů na 3 skupiny podle kategorií CTSI jsme neprokázali v rámci kategorie významný pokles u žádného z markerů při porovnání dne 1 a 4. Významné rozdíly mezi kategoriemi CTSI byly prokázány pro jednotlivé marker pouze u CRP v den 4 a IL-6 v den 4.

Tabulka 15. Korelace laboratorních ukazatelů s CTSI skóre – 1. den po přijetí

	korelační koeficient	p-hodnota
Adiponektin	0,118	n.s.
A-FABP	-0,045	n.s.
FGF-21	0,071	n.s.
CRP	0,341	0,002
PCT	-0,078	n.s.
IL-6	0,067	n.s.

Komentář k Tabulce 15.:

Statisticky významná korelace s CTSI skóre byla prokázána 1. den po přijetí pouze pro CRP.

Tabulka 16. Korelace laboratorních ukazatelů s CTSI skóre – 4. den po přijetí

	korelační koeficient	p-hodnota
Adiponektin	0,028	n.s.
A-FABP	-0,147	n.s.
FGF-21	0,177	n.s.
CRP	0,543	0,000
PCT	0,009	n.s.
IL-6	0,241	0,043

Komentář k Tabulce 16.:

Statisticky významná korelace s CTSI skóre byla prokázána 4. den po přijetí pro CRP a IL-6.

4.3.3 Analýza hladin adiponektinu, A-FABP a FGF-21 v časně fázi AP

Základní charakteristiky všech subjektů jsou uvedeny v Tabulce 17. V celé skupině jednotlivců s diagnózou AP nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi ADP a CRP ve srovnání hladin v den 1 a 4. Oproti tomu byl během 4 dní hospitalizace zjištěn významný pokles v koncentracích A-FABP, FGF-21, IL-6 ($p < 0,000$) a PCT ($p < 0,05$).

V Tabulce 19 jsou uvedeny základní charakteristiky podskupin podle Balthazarova skóre, CTSI skóre a klasifikace lehká/těžká AP. Je nutno podotknout, že podskupiny vysoce rizikových pacientů (např. Balthazar E, CTSI C a podskupina těžké AP) jsou většinou asociovány s mužským pohlavím a BMI vyšším než 30 kg/m².

Etiologie pankreatitidy podle CTSI skóre a klasifikace lehká/těžká AP všech jedinců je popsána v Tabulce 20.

Tabulka 21. ukazuje rozdíly laboratorních ukazatelů mezi dvěma skupinami rozdělenými podle BMI. Ve skupině jedinců s BMI > 25 kg/m² bylo pozorováno významné zvýšení hladin A-FABP jak v den 1, tak v den 4 ($p = 0,002$ a $p = 0,005$), ve srovnání s pacienty s BMI ≤ 25 kg/m². Koncentrace CRP a IL-6 byly vyšší pouze v den 4 ($p = 0,005$ a $p = 0,003$). Podobně jako ve skupině všech pacientů byly hladiny A-FABP, FGF-21, IL-6 a PCT (pouze u jedinců s BMI ≤ 25 kg/m²) významně nižší v den 4 v porovnání se dnem 1.

Rozdíly v laboratorních parametrech mezi dvěma skupinami rozdělenými podle klasifikace lehká/těžká AP jsou zhodnoceny v Tabulce 13. Stejně tak byly koncentrace CRP a IL-6 významně zvýšeny pouze v den 4 ve skupině pacientů s těžkou AP ve srovnání s lehkým průběhem AP ($p = 0,000$ a $p = 0,005$). Avšak ve výše zmíněných skupinách nebyly zjištěny žádné odchylky v hladinách adipokinů. V podskupině lehké AP byly výsledky podobné těm zjištěným ve skupině všech pacientů (např. A-FABP, FGF-21, IL-6 a PCT poklesly v den 4 po přijetí v porovnání se dnem 1). Oproti tomu pouze hladiny A-FABP poklesly u pacientů s těžkou AP a CRP bylo vyšší v den 4 po přijetí.

V Tabulce 14. jsou uvedeny rozdíly v laboratorních parametrech mezi 3 skupinami rozdělenými podle CTSI skóre. Analýza potvrdila výše zmíněné trendy. Jak hladiny CRP, tak IL-6 byly v den 4 mezi třemi podskupinami podle CTSI významně rozdílné, s nejnižší koncentrací ve skupině CTSI A (CRP_4 medián 48,7 mg/l, IL-6_4 medián 24,2 ng/l), následované podskupinou CTSI B (CRP_4 medián 167,1 mg/l, IL-6_4 medián 48,4 ng/l) a podskupinou CTSI C (CRP_4 medián 230,7 mg/l, IL-6_4 medián 79,5 ng/l) s hladinami významnosti: $p = 0,000$ pro CRP a $p = 0,006$ pro IL-6. Také byly pozorovány rozdíly mezi hladinami FGF-21 ($p = 0,049$), s nejvyššími hladinami v podskupině CTSI B.

Tabulka 17. Charakteristika studijní populace

Celkový počet jedinců	84 (100%)
Ženy	37 (44%)
Muži	47 (56%)
Věk roky	58,3 ± 17,8 (45,0 – 72,5)
Hmotnost kg	78,6 ± 17,9 (66,0 – 87,3)
BMI kg/m ²	27,52 ± 6,64 (24,60 – 30,50)

Data jsou uvedena jako průměr ± standardní odchylky. Hodnoty 25. a 75. percentilu jsou uvedeny v kulatých závorkách.

Tabulka 18. Porovnání hodnot laboratorních ukazatelů v den 1 a den 4

ADP_1 mg/l	8,1 ± 4,6 [7,5] (5,3 – 9,3)
ADP_4 mg/l	8,1 ± 5,7 [6,7] (5,0 – 10,0)
A-FABP_1 µg/l	48,9 ± 47,7 [35,0] (21,0 – 59,8)
A-FABP_4 µg/l	40,8 ± 42,7 [28,7] *** (15,9 – 46,1)
FGF-21_1 ng/l	1254,8 ± 1330,6 [651,4] (290,8 – 1803,8)
FGF-21_4 ng/l	608,4 ± 855,2 [278,7] *** (60,0 – 751,3)
CRP_1 mg/l	92,8 ± 95,5 [59,8] (12,6 – 147,4)
CRP_4 mg/l	111,8 ± 105,2 [84,6] (25,6 – 186,0)
PCT_1 µg/l	2,08 ± 11,3 [0,22] (0,10 – 0,50)
PCT_4 µg/l	1,31 ± 6,03 [0,17] * (0,09 – 0,49)
IL-6_1 ng/l	355,0 ± 839,0 [24,7] (18,2 – 263,0)
IL-6_4 ng/l	69,3 ± 96,6 [31,1] *** (10,5 – 80,3)

Data jsou vyjádřena jako průměr ± standardní odchylky, u parametrů se sešikmeným rozdělením také jako mediány [v hranatých závorkách]. Hodnoty 25. a 75. percentilu jsou uvedeny v kulatých závorkách. Rozdíly v proměnných mezi laboratorními charakteristikami ve skupině byly analyzovány Wilcoxonovým párovým testem. Významné rozdíly mezi A-FABP_1 vs. A-FABP_4, FGF-21_1 vs. FGF-21_4, PCT_1 vs. PCT_4, IL-6_1 vs. IL-6_4 (uvedeny tučně): * $p < 0,05$ *** $p < 0,000$.

ADP_1, A-FABP_1, FGF-21_1, CRP_1, PCT_1, IL-6_1: den 1 po přijetí; ADP_4, A-FABP_4, FGF-21_4, CRP_4, PCT_4, IL-6_4: den 4 po přijetí

Tabulka 19. Charakteristika pacientů podle Balthazarova skóre, CTSI skóre a klasifikace AP lehká/těžká

Balthazarovo skóre	Počet jedinců	Muži (%)	Věk roky	BMI kg/m ²
Balthazar A	21	48	64,0	26,7
Balthazar B	21	52	55,2	27,6
Balthazar C	26	50	59,7	27,8
Balthazar D	7	86	45,1	26,9
Balthazar E	9	78	58,7	32,6
CTSI skóre				
CTSI A (0–2 body)	64	50	60,4	27,3
CTSI B (3–4 body)	10	60	45,1	23,9
CTSI C (5–10 bodů)	10	90	58,2	32,6
Lehká/těžká AP				
Lehká AP (0–5 bodů)	70	53	58,7	25,1
Těžká AP (6–10 bodů)	14	71	56,1	28,7

Hodnoty věku a BMI jsou vyjádřeny jako průměry.

Tabulka 20. Etiologie pankreatitidy podle CTSI skóre a klasifikace AP (lehká/těžká)

	Alkohol (%)	Biliární (%)	Exacerbace CHP (%)	Idiopatická (%)	Jiné (%)
CTSI skóre					
CTSI A (0–2 body)	7	48	13	22	10
CTSI B (3–4 body)	60	20	10	10	0
CTSI C (5–10 body)	30	50	10	10	0
Lehká/těžká AP					
Lehká AP (0–5 bodů)	13	46	13	13	15
Těžká AP (6–10 bodů)	36	43	14	7	0

Tabulka 21. Rozdíly laboratorních charakteristik mezi skupinami rozdělenými podle BMI a uvnitř skupin (rozdíly mezi dnem 1 a 4)

	BMI $\leq$ 25,0 kg/m ²	BMI>25,0 kg/m ²	Významnost p-hodnota
Počet jedinců	30	54	-
Věk roky	52,4 $\pm$ 20,0 (37,0 – 69,0)	60,8 $\pm$ 15,3 (46,5 – 72,5)	-
Hmotnost kg	66,3 $\pm$ 11,5 (58,0 – 74,0)	86,2 $\pm$ 17,2 (76,0 – 95,5)	-
BMI kg/m ²	22,19 $\pm$ 2,47 (20,60 – 24,60)	30,59 $\pm$ 6,35 (26,75 – 31,85)	-
ADP_1 mg/l	7,7 $\pm$ 3,4 [6,9] (5,3 – 9,4)	8,4 $\pm$ 5,2 [7,5] (5,3 – 9,2)	0,662
ADP_4 mg/l	7,8 $\pm$ 3,7 [6,5] (5,1 – 10,2)	8,2 $\pm$ 6,6 [6,7] (4,7 – 9,8)	0,939
A-FABP_1 μ g/l	28,8 $\pm$ 19,5 [24,3] (15,4 – 39,2)	57,0 $\pm$ 53,2 [39,7] (27,3 – 66,1)	0,002
A-FABP_4 μ g/l	23,1 $\pm$ 14,1 [21,4] ** (11,3 – 30,9)	46,0 $\pm$ 44,4 [36,8] *** (21,2 – 52,7)	0,005
FGF-21_1 ng/l	1148,7 $\pm$ 1245,5 [691,6] (307,7 – 1501,4)	1216,6 $\pm$ 1314,9 [631,4] (257,0 – 1605,7)	0,962
FGF-21_4 ng/l	414,8 $\pm$ 630,9 [128,8] *** (60,0 – 428,0)	707,4 $\pm$ 962,2 [341,7] *** (63,0 – 859,7)	0,287
CRP_1 mg/l	63,8 $\pm$ 65,1 [40,9] (8,1 – 104,7)	105,4 $\pm$ 106,0 [70,9] (18,6 – 157,9)	0,051
CRP_4 mg/l	63,9 $\pm$ 72,4 [40,0] (16,5 – 88,8)	134,5 $\pm$ 112,8 [117,8] (34,9 – 207,2)	0,005
PCT_1 μ g/l	0,65 $\pm$ 1,42 [0,19] (0,09 – 0,45)	0,89 $\pm$ 2,50 [0,24] (0,10 – 0,47)	0,472
PCT_4 μ g/l	0,26 $\pm$ 0,33 [0,13]* (0,09 – 0,23)	0,53 $\pm$ 0,89 [0,22] (0,09 – 0,54)	0,052

Tabulka 21. – pokračování: Rozdíly laboratorních charakteristik mezi skupinami rozdělenými podle BMI a uvnitř skupin (rozdíly mezi dnem 1 a 4)

	BMI $\leq$ 25,0 kg/m ²	BMI>25,0 kg/m ²	Významnost p-hodnota
IL-6_1 ng/l	364,7 $\pm$ 903,4 [32,4] (18,2 – 263,0)	234,9 $\pm$ 581,0 [55,5] (21,2 – 205,6)	0,415
IL-6_4 ng/l	39,8 $\pm$ 69,0 [10,7] *** (6,6 – 48,4)	81,8 $\pm$ 106,0 [38,9] *** (19,6 – 113,5)	0,003

*Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ standardní odchylky, u parametrů se sešikmeným rozdělením také jako mediány [v hranatých závorkách]. Hodnoty 25. a 75. percentilu jsou uvedeny v kulatých závorkách. Rozdíly v proměnných mezi laboratorními charakteristikami ve skupině byly analyzovány Mann-Whitneyho U testem. Významné rozdíly mezi A-FABP_1 vs. A-FABP_4, FGF-21_1 vs. FGF-21_4, PCT_1 vs. PCT_4, IL-6_1 vs. IL-6_4 ve skupinách: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.*

4.3.4 Analýza predikce závažnosti AP s použitím hladin ADP, A_FABP a FGF-21

4. den po přijetí

Studie byla provedena s 37 muži a 47 ženami s průměrným věkem $58,3 \pm 17,8$ roků, hmotností $78,6 \pm 17,9$ kg a BMI $27,52 \pm 6,64$ kg/m². Podskupina pacientů s těžkou AP (n=14) měla významně vyšší průměrnou hmotnost ($88,6 \pm 28,6$ kg vs. $76,6 \pm 14,5$ kg, $p < 0,01$) a průměrné BMI ($30,40 \pm 10,16$ kg/m² vs. $26,93 \pm 5,41$ kg/m², $p < 0,01$) v porovnání se skupinou lehké AP (n=70).

Laboratorní ukazatelé u všech jedinců a podskupinách podle závažnosti AP 4. den po přijetí jsou uvedeny v tabulce 22. Ve skupinách těžké AP ve srovnání s lehkou formou nemoci byl pozorován 4. den významný vzestup hladin CRP ($p < 0,000$) a IL-6 ($p < 0,01$), zatímco v plazmatických hladinách adipokinů a PCT nebyly zjištěny žádné významné rozdíly. Pouze hladiny FGF-21 a PCT jeví trend k vyšším hodnotám u těžké AP.

Tabulka 22. Laboratorní ukazatelé u všech jedinců a v podskupinách podle závažnosti AP 4. den po přijetí

	Všichni pacienti (n = 84)	Lehká AP (n = 70)	Těžká AP (n = 14)	p hodnoty významnosti
ADP_4 mg/l	$8,1 \pm 5,7$ [6,7]	$8,1 \pm 6,0$ [6,7]	$8,1 \pm 4,0$ [7,1]	n.s.
A-FABP_4 μg/l	$40,8 \pm 42,7$ [28,7]	$40,6 \pm 38,3$ [29,8]	$41,6 \pm 62,2$ [21,8]	n.s.
FGF-21_4 ng/l	$608,4 \pm 855,2$ [278,7]	$620,5 \pm 911,1$ [261,7]	$547,8 \pm 509,5$ [468,0]	n.s.
CRP_4 mg/l	$111,8 \pm 105,2$ [84,6]	$90,3 \pm 90,1$ [51,2]	$213,3 \pm 117,2$ [209,8]	0,000
PCT_4 μg/l	$1,31 \pm 6,03$ [0,17]	$1,45 \pm 6,62$ [0,15]	$0,64 \pm 1,13$ [0,33]	n.s.
IL-6_4 ng/l	$69,3 \pm 96,6$ [31,1]	$53,3 \pm 68,5$ [25,9]	$145,0 \pm 160,4$ [79,5]	0,005

Data jsou vyjádřena jako průměr $\pm$ standardní odchylka a jako mediány [v závorkách], Rozdíly v proměnných mezi podskupinami s lehkou AP a těžkou AP byly analyzovány Mann-Whitneyho U testem, Pravděpodobnost $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou (tučné hodnoty).

ADP_4, A-FABP_4, FGF-21_4, CRP_4, PCT_4, IL-6_4: den 4 po přijetí.

Vyhodnocení laboratorních charakteristik mezi třemi skupinami podle CTSI skóre 4. den hospitalizace potvrdilo výše uvedené trendy. Na rozdíl od adipokinů hodnoty CRP a IL-6 byly významně odlišné mezi třemi CTSI podskupinami, s nejnižšími koncentracemi ve skupině CTSI A (CRP medián 48,7 mg/l, IL-6 medián 24,2 ng/l), následovaná podskupinou CTSI B (CRP medián 167,1 mg/l, IL-6 medián 48,4 ng/l), a podskupinou CTSI C (CRP medián 230,7 mg/l, IL-6 medián 79,5 ng/l), s hodnotami významnosti: $p=0,000$ pro CRP a $p=0,006$ pro IL-6.

Jako další krok studie jsme provedli výpočet cut-off hodnot pro CRP a IL-6 v predikci těžké AP. Adipokiny a prozánětlivé marker byly využity pro receiver-operator characteristics (ROC) analýzu. Data jsou shrnuta v Tabulce 23. a 24. Výsledná plocha pod křivkou (AUC) odhalila, že pouze CRP (AUC=0,815) a IL-6 (AUC=0,738) byly vhodné, ale nikoli vynikající, jako potenciální prediktory závažnosti nemoci 4. den po přijetí (viz Obrázky 65-67). Cut-off hodnoty stanoveny pro oba ukazatele: 100 mg/l pro CRP a 37 ng/l pro IL-6, s negativními prediktivními hodnotami 96% a 92% a pozitivními prediktivními hodnotami 39% a 29%.

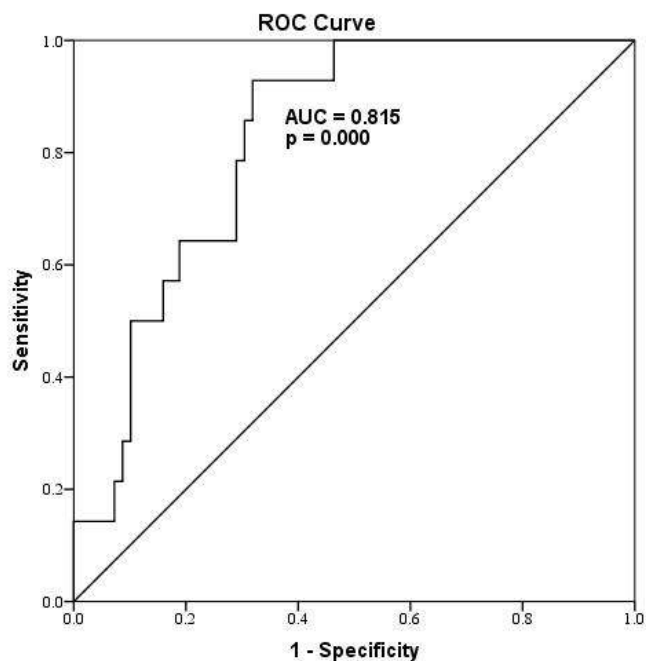
Tabulka 23. ROC analýza pro predikci těžké AP v den 4 po přijetí

	AUC	p	Senzitivita (%)	Specifická (%)
ADP 4	0,521	0,805	-	-
A-FABP 4	0,422	0,362	-	-
FGF-21 4	0,558	0,494	-	-
CRP 4	0,815	0,000	86	67
PCT 4	0,569	0,418	-	-
IL-6 4	0,738	0,005	71	61

Pravděpodobnost $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou (tučné hodnoty).

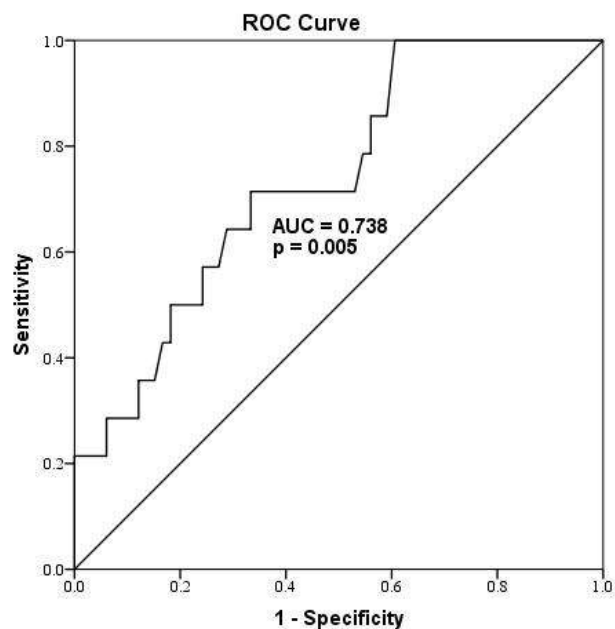
Tabulka 24. Cut-off hodnoty, PPV a NPV dle ROC analýzy pro predikci těžké AP v den 4 po přijetí

	Cut-off	PPV (%)	NPV (%)
ADP_4	-	-	-
A-FABP_4	-	-	-
FGF-21_4	-	-	-
CRP_4	100 mg/l	39	96
PCT_4	-	-	-
IL-6_4	37 ng/l	29	92



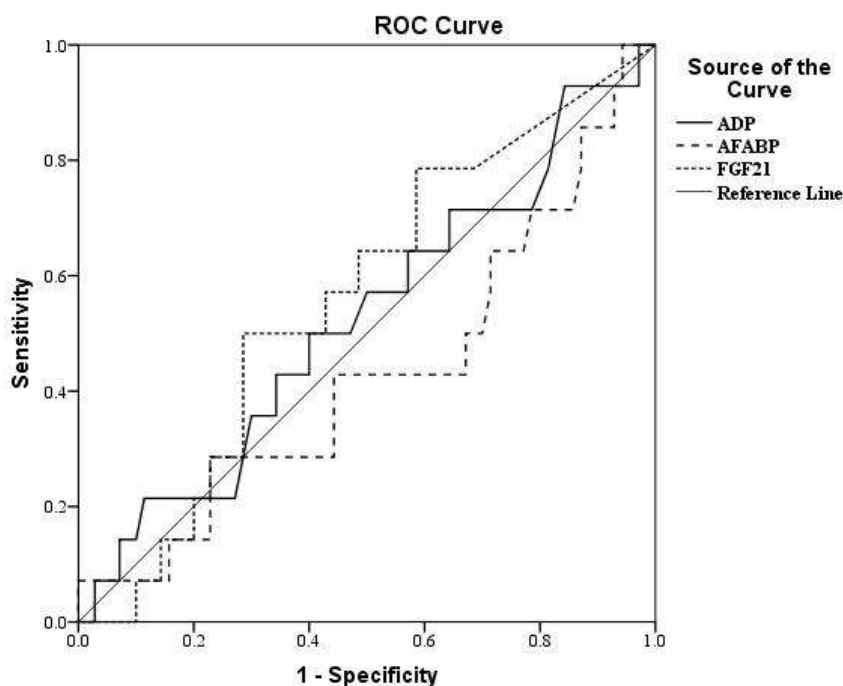
Obr. 65. ROC křivka pro CRP.

AUC=0,815 (CI = 0,716 – 0,914); p=0,000; pro cut-off hodnotu 100 mg/l činí senzitivita 71%, specificita 61%, PPV 39%, NPV 96%



Obr. 66. ROC křivka pro IL-6.

AUC=0,738 (95% CI = 0,604 – 0,871); p=0,005; pro cut-off hodnotu 37 ng/l činí senzitivita 86%, specificita 67%, PPV 29%, NPV 92%



Obr. 67. ROC křivka pro ADP, A-FABP a FGF-21.

Statistické vyhodnocení ploch pod křivkou neprokázalo statisticky významný rozdíl od referenční plochy (0,5).

4.3.5 Analýza vzájemné asociace uvedených markerů – adipokinů a zánětlivých ukazatelů – v průběhu AP metodami korelační a regresní analýzy.

V podskupinách lehké/těžké AP byly hodnoty A-FABP významně korelovány se všemi prozánětlivými ukazateli a v případě jedinců s těžkou AP také s FGF-21 (4. den po přijetí) (Tabulka 25). Pozitivní korelace FGF-21 se všemi vyšetřovanými ukazateli byla nalezena u těžké AP, zatímco v podskupině lehké AP byla zjištěna korelace pouze s CRP. Abychom ověřili nezávislou asociaci mezi vyšetřovanými ukazateli s A-FABP a FGF-21, provedli jsme vícerozměrnou regresní analýzu s hladinami adipokinů 4. den po přijetí jako závislými proměnnými a korelovanými ukazateli jako nezávislými prediktory (Tabulka 26). A-FABP byl pozitivně asociován s PCT u podskupin lehké i těžké AP a také hladiny ADP a CRP predikovaly koncentrace A-FABP u pacientů z podskupiny lehké AP. Oproti tomu FGF-21 byl pozitivně asociován s ADP a negativně s CRP, zejména v podskupině těžké AP.

Tabulka 25. Korelační analýza laboratorních charakteristik s A-FABP a FGF-21 ve skupinách pacientů v den 4

	Všichni pacienti (n = 84)		Lehká AP (n = 70)		Těžká AP (n = 14)	
	A-FABP Den 4	FGF-21 Den 4	A-FABP Den 4	FGF-21 Den 4	A-FABP Den 4	FGF-21 Den 4
ADP_4	0,110	0,135	0,123	0,105	0,084	0,557
A-FABP_4	-	0,281	-	0,228	-	0,736
FGF-21_4	0,281	-	0,228	-	0,736	-
CRP_4	0,383	0,234	0,281	0,253	0,781	0,558
PCT_4	0,474	0,064	0,532	0,049	0,944	0,791
IL-6_4	0,469	0,217	0,346	0,192	0,736	0,700

V tabulce jsou uvedeny hodnoty korelačních koeficientů

Pravděpodobnost $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou (tučné hodnoty).

Tabulka 26. Vícerozměrná regresní analýza laboratorních charakteristik A-FABP a FGF-21 jako závislými proměnnými ve skupinách v den 4

	Všichni pacienti (n = 84)		Lehká AP (n = 70)		Těžká AP (n = 14)	
	A-FABP Den 4	FGF-21 Den 4	A-FABP Den 4	FGF-21 Den 4	A-FABP Den 4	FGF-21 Den 4
ADP Den 4	1,318 0,012	26,459 0,035	1,814 0,001	23,101 0,123	-2,523 0,330	60,561 0,001
A-FABP Den 4	-	5,324 0,049	-	5,352 0,113	-	2,798 0,353
FGF-21 Den 4	0,010 0,049	-	0,008 0,113	-	0,034 0,353	-
CRP Den 4	0,106 0,043	1,930 0,121	0,142 0,059	2,789 0,086	0,100 0,228	-1,843 0,039
PCT Den 4	2,788 0,000	-12,536 0,486	2,772 0,000	15,210 0,450	38,484 0,026	171,747 0,323
IL-6 Den 4	0,081 0,215	-0,562 0,717	-0,008 0,927	-0,516 0,827	-0,069 0,476	1,471 0,066

V jednotlivých kolonkách jsou uvedeny nahoře hodnoty parciálního regresního koeficientu b , dole hodnoty významnosti p . Pravděpodobnost $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou (tučné hodnoty).

5. DISKUZE

5.1 DISKUZE – STUDIE I: IL-6 u AP

Odlišení sterilní a infikované nekrózy je zásadní otázkou při péči o pacienty s těžkou nekrotizující pankreatitidou, neboť infekce pankreatické nekrózy zhoršuje prognózu pacientů s těžkou akutní pankreatitidou a ztrojnásobuje mortalitu z 0 – 10% na >30%. Profylaktické použití antibiotik se obecně nedoporučuje z důvodu rizika vzniku pseudomembranozní kolitidy, mykotických infekcí a selekce multirezistentních kmenů bakterií. Proto je žádoucí diagnostikovat infekci pankreatické nekrózy co nejdříve, aby mohla být zahájena adekvátní antibiotická léčba. Klasická a definitivní diagnóza infikované nekrózy provedením tenkojehlové biopsie a mikrobiologickou kultivací odebraného materiálu se vždy opoždí minimálně o 3 – 4 dny od jejího vzniku. Proto existuje snaha tuto diagnostiku provést neinvazivně, za pomoci biomarkeru stanoveného z krve pacienta.

Uvedené výsledky svědčí pro dobrou diagnostickou efektivitu IL-6 jako markeru diskriminace infikované a sterilní nekrózy při akutní pankreatitidě. Cut-off 100 ng/l resp. 150 ng/l lze použít od 5. dne hospitalizace. Senzitivita cut-off 150 ng/l (vztažená k aktuálně nepřítomné IN) činila 87% při specifitě 100%, pro cut-off 100 ng/l činila senzitivita 100% při specifitě 92%. AUC pro hodnoty IL-6 5. a 6. den hospitalizace vs. infikovaná nekróza činilo 0,746.

Obdobné výsledky byly publikovány pro kombinaci PCT a IL-6. Kombinace $PCT < 2 \mu\text{g/l}$ a $IL-6 < 400 \text{ ng/l}$ v prvních 3 dnech hospitalizace identifikovala pacienty bez rizika rozvoje infikované nekrózy s negativní prediktivní hodnotou 91 %, senzitivitou 75% a specifitou 84 % (229). Existuje řada publikací, které zkoumají diagnostickou efektivitu IL-6 jako prognostického faktoru u akutní pankreatitidy (183, 184). Pro interleukin-6 literatura uvádí hodnotu cut-off 400 ng/l platnou pro první 3 dny hospitalizace (183). V naší práci však tato hypotéza jednoznačně potvrzena nebyla. Z grafů je patrný trend výrazného vzestupu první dny po přijetí s následujícím poklesem u pacientů bez IN a naopak vzestupu při přijetí, s krátkým poklesem následovaným dalším vzestupem od 5. dne hospitalizace u pacientů s infikovanou nekrózou.

PCT je vhodným prediktorem (cut-off 1,8 $\mu\text{g/l}$) infikované nekrózy a perzistujících septických komplikací po chirurgickém debridementu (181, 231). PCT je také dle literárních údajů vhodný parametr (cut-off 1,2 $\mu\text{g/l}$) pro diskriminaci sterilní a infikované pankreatické nekrózy (184,230). Z porovnání našich a literárních údajů plyne, že úloha IL-6 a PCT v diskriminaci IN a SN je podobná a markery jsou víceméně zastupitelné.

Interleukin-6 v naší retrospektivní studii prokázal statisticky významnou schopnost diskriminovat infikovanou a sterilní nekrózu u těžké akutní pankreatitidy. Pro cut-off IL-6 platný od 5. dne hospitalizace 100 ng/l bylo $p < 0,005$, pro 150 ng/l $p < 0,01$. IL-6 umožňuje diagnostikovat infikovanou nekrózu s vysokou specifitou, senzitivitou a pozitivní prediktivní hodnotou 2-5 dní před potvrzením kultivačním mikrobiologickým vyšetřením.

Senzitivita cut-off 150 ng/l (vztažená k aktuálně nepřítomné IN) činila 87% při specifitě 90%, pro cut-off 100 ng/l činila senzitivita 100% při specifitě 92%.

Uvedené poznatky jsou chirurgy a intenzivisty v Nemocnici Písek, a.s. s úspěchem aplikovány v klinické praxi cca od roku 2011 (232).

Další souvislosti byly uvedeny v teoretické části (kap. 2.2.7).

5.2 DISKUZE – STUDIE II: Adipokiny pro predikci závažnosti AP

5.2.1 Diskuze - úvod

Námi zvolené adipokiny byly vybrány z následujících důvodů:

Adiponektin patří mezi nejčastěji stanovované adipokiny, je určitým pojítkem mezi metabolickými poruchami a kardiovaskulárními onemocněními. Dále by s ohledem na souvislost mezi závažností AP a obezitou mohla být zajímavá jeho korelace s BMI. Adiponektin také patří mezi několik málo protizánětlivých adipokinů s účinky proti TNF-alfa a IL-6. Ve vztahu adiponektinu k AP byla publikována celá řada rozporupných prací.

FGF-21 byl vybrán z důvodu chybějících literárních dat o průběhu jeho hladin při AP, dále kvůli několika recentním studiím (převážně na animálních modelech) o významu jeho exprese v pankreatu při zánětu a ochraně pankreatické tkáně před fibrotickou přestavbou. FGF-21 působí jako hormonální regulátor během hladovění a ovlivňuje lipidový metabolismus. Jeho exprese je ovlivňována dráhami závislými na PPAR, které jsou v průběhu AP zesíleny. Podle studie na myším modelu (257) FGF-21 působí jakožto ochranný faktor před poškozením v průběhu AP a chrání pankreatické buňky proti působení faktoru časně růstové odpovědi 1 (prozánětlivý a profibrotický transkripční faktor). Hladiny FGF-21 jsou s tímto faktorem inverzně korelovány.

A-FABP jsme zvolili kvůli jeho roli v propojení metabolické homeostázy a zánětu (170). Jak bylo publikováno u kriticky nemocných, jeho zvýšení způsobuje inzulinovou rezistenci a slouží jako prognostický marker. A-FABP je propojen s expresí Toll-like receptorů, aktivací makrofágů a syntézou a uvolněním prozánětlivých cytokinů, zejména IL-6 a TNF-alfa, aktivací exprese cyklooxygenázy-2 a syntézou eikosanoidů. Tyto procesy vedou k inzulinové rezistenci a iniciaci a progresi zánětu a sepse. Nenasycené mastné kyseliny a jejich protizánětlivé produkty jako jsou lipoxiny, resolviny a protektiny mohou potlačit expresi A-FABP, inhibovat aktivaci makrofágů a aktivaci cyklooxygenázy-2 a snížit produkci prozánětlivých cytokinů, což ve svém důsledku vede ke snížení inzulinové rezistence a zotavení ze sepse a zánětu. Měření hladin A-FABP (a spolu s ním i dalších pro- a proti-zánětlivých markerů) tvoří nový přístup k predikci prognózy zánětlivých stavů a možná povede ke vzniku nových terapeutických strategií.

Adiponektin

Hodnoty adiponektinu 1. den a 4. den hospitalizace v našem souboru se statisticky významně nelišily při srovnání pacientů s lehkou a těžkou pankreatitidou, stejně tak nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi kategoriemi CTSI. Hodnoty adiponektinu při přijetí ani 4. den hospitalizace nekorelovaly s tíží pankreatitidy klasifikovanou podle CTSI. Hodnoty adiponektinu nekorelovaly významně s BMI ani 1., ani 4. den hospitalizace.

Podle studie Sharmy jsou nízké hladiny adiponektinu u AP asociovány s orgánovým selháním. Hodnoty adiponektinu 1. až 3. den inverzně korelovaly s BMI ($r^2=-0,49$; $p=0,002$) a byly signifikantně nižší u pacientů se SAP (medián 3,74 $\mu\text{g/l}$), než u pacientů s lehkou AP (medián 6,58 $\mu\text{g/l}$, $p=0,02$). Hodnoty adiponektinu v prvních 3 dnech (s hodnotou cut-off 4,5 mg/l) správně klasifikovaly závažnost AP u 81% pacientů. Uvedený cut-off měl senzitivitu 70%, specificitu 85%, pozitivní prediktivní hodnotu 64% a negativní prediktivní hodnotu 88% při $\text{AUC}=0,75$. Podle této práce jsou sérové hladiny adiponektinu významně nižší u pacientů s těžkou akutní pankreatitidou než u pacientů s lehkou AP a mohou být použity jako inverzní markery systémové zánětlivé odpovědi na poškození pankreatu. Tuto hypotézu však naše práce nepotvrdila, naše výsledky jsou zcela odlišné, podrobněji je tato problematika rozebrána dále. Podle Sharmy je třeba dalších studií, aby se prokázalo, zda ADP je pouze marker nízkého BMI nebo jestli se podílí na ochraně před závažnějším průběhem AP (193).

Na rozdíl od studie Sharmy ve studii Tukiainena hodnoty ADP a leptinu nekorelovaly se závažností AP, což jej vedlo k domněnce, že adipokiny neovlivňují průběh AP (194).

Podle studie Schäfflera (233) rezistin a v menším rozsahu leptin, nikoli však adiponektin (ve shodě s našimi výsledky), jsou novými potenciálními markery extrapancreatické nekrózy a závažnosti akutní pankreatitidy a měly by tudíž být zkoumány na větších kohortách pacientů.

Jiná studie dospěla k závěru, že u pacientů po adjustaci na věk, pohlaví, BMI a etiologii pankreatitidy, nekorelují hodnoty adiponektinu a leptinu při přijetí s tíží nemoci, což vede k domněnce, že adipokiny neovlivňují průběh AP (194).

Podle pilotní studie Schäfflera činily hodnoty ADP u pacientů s lehkou AP $13,5\pm 0,6$ mg/l (průměr $\pm$ SD), u pacientů s nekrotizující pankreatitidou lehčího stupně (skóre pankreatické nekrózy 1-2) $12,7\pm 1,0$ $\mu\text{g/l}$ a u pacientů s nekrotizující pankreatitidou těžšího stupně (skóre pankreatické nekrózy 3-4) $11,1\pm 0,9$ $\mu\text{g/l}$. Signifikantně významný rozdíl byl nalezen pouze při porovnání lehké AP a těžké AP se skóre 3-4 ($p=0,033$). I v této práci je patrný trend k inverzní korelaci hodnot ADP se závažností AP (195).

Stejně jako jsme nenalezli korelaci vstupních hodnot adiponektinu a závažnosti akutní pankreatitidy, bylo v literatuře opakovaně publikováno, že ani v dalším průběhu hospitalizace hodnoty adiponektinu nekorelují se závažností AP (194, 233), což potvrzují naše výsledky.

A-FABP

Hodnoty A-FABP zjištěné 1. den hospitalizace v našem souboru se statisticky významně nelišily při srovnání pacientů s lehkou a těžkou pankreatitidou, stejně tak nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi kategoriemi CTSI. Hodnoty A-FABP při přijetí nekorelovaly s tíží pankreatitidy klasifikované podle CTSI stejně jako tomu bylo u adiponektinu a FGF-21. Nalezli jsme však statisticky významnou korelaci mezi hodnotami A-FABP a BMI a to u celého souboru pacientů ($p < 0,0001$), u pacientů s lehkou AP ($p < 0,0001$) a u pacientů kategorie CTSI A ($p < 0,0001$) a C ($p = 0,0342$).

Podobně statisticky významná data byla nalezena pro korelaci A-FABP a BMI 4. den hospitalizace: celý soubor ($p = 0,0005$), pro pacienty s lehkou AP ($p = 0,0005$), pro těžkou AP ($p = 0,0003$), pro CTSI kategorie A ($p = 0,0017$), CTSI kategorie C ($p < 0,0001$). Korelace A-FABP se závažností AP vyjádřenou jako CTSI jevila reverzní závislost ($r = -0,147$), která však nedosáhla statistické významnosti ($p = 0,2213$).

Hodnoty A-FABP 4. den hospitalizace nedokázaly statisticky významně rozlišit pacienty s lehkou a těžkou pankreatitidou ani jednotlivé kategorie CTSI.

V literatuře experimentální data o korelaci hladin A-FABP a závažnosti akutní pankreatitidy při přijetí i v dalším průběhu hospitalizace chybějí.

FGF-21

Hodnoty FGF-21 zjištěné 1. den hospitalizace v našem souboru se statisticky významně nelišily při srovnání pacientů s lehkou a těžkou pankreatitidou. Významný rozdíl ($p < 0,05$) byl však nalezen pro kategorie CTSI A vs. B a B vs. C.

Korelace hodnot FGF-21 při přijetí s BMI nebyla statisticky významná. V literatuře experimentální data o korelaci vstupních hladin FGF-21 a závažnosti akutní pankreatitidy chybějí.

Hodnoty FGF-21 4. den hospitalizace se statisticky významně nelišily mezi pacienty s lehkou a těžkou AP ani mezi jednotlivými kategoriemi CTSI. Statisticky významná závislost byla nalezena pouze pro korelaci FGF-21 a BMI u kategorie pacientů CTSI A ($r = 0,354$; $p = 0,0127$).

Publikace o FGF-21 ve vztahu k AP jsou kromě naší práce (197) pouze z experimentálních studií. V práci Johnsona redukoval FGF-21 závažnost ceruleinem indukované AP u myší. Tato byla porovnávána mezi „wild-type“ myšmi a myšmi s nadprodukcí FGF-21. Po indukci AP došlo ke zvýšení exprese FGF-21 acinárními buňkami pankreatu. Závažnost AP inverzně korelovala s expresí FGF-21 (198). Tato práce podporuje domněnku nové funkce FGF-21 jakožto bezprostřední reakce genově podmíněné protekce pankreatických ostrůvků proti zánětu.

Další adipokiny

V práci Schöfflera z roku 2010 predikovaly hodnoty rezistinu při přijetí závažnost AP, hodnoty rezistinu byly významně vyšší u pacientů s vyšším podílem pankreatické i extrapancreatické nekrózy. Podle ROC analýzy predikovaly vstupní hodnoty rezistinu při použití cut-off 11,9 µg/l rozsah peripankreatické nekrózy s PPV 89% (AUC=0,8; p=0,002; senzitivita 80%; specifická 70%) (199).

V práci Lesniowského zaměřené na rezistin (200) nebyla nalezena žádná korelace mezi adipokiny a BMI, slabá korelace byla mezi rezistinem a CRP. Podle této práce může rezistin představovat časný marker zánětlivé odpovědi u AP.

Daniel (201) našel významnou korelaci mezi CRP a rezistinem ($r=0,43$; $p<0,05$) a domnívá se, že rezistin může být časným markerem u edematózní AP.

V další práci Schöfflera z roku 2011 hodnoty visfatinu při přijetí významně pozitivně korelovaly se závažností AP (APACHE-II skóre a Ransonovo skóre) a s klinickými ukazateli jako úmrtí a potřeba intervence. Hodnoty visfatinu při přijetí byly významně zvýšeny u pacientů s vyšším skóre pankreatické a extrapancreatické nekrózy. Podle ROC byla PPV visfatinu pro predikci rozsahu peripankreatické nekrózy při použití cut-off hodnoty 1,8 µg/l 93,3% (AUC=0,89; $p<0,001$, senzitivita 93,3%, specifická 81,8%). Visfatin podle této práce jeví potenciál jako nový diagnostický marker u AP (202).

Podle již zmíněné pilotní studie Schöfflera činily hodnoty leptinu u pacientů s lehkou AP $5,4\pm1,0$ µg/l, u pacientů s nekrotizující pankreatitidou lehčího stupně $19,7\pm3,1$ µg/l a u pacientů s nekrotizující pankreatitidou těžšího stupně $26,2\pm3,5$ µg/l. Signifikantně významný rozdíl byl nalezen pouze při porovnání lehké AP a těžké AP se skóre 3-4 ($p<0,0001$) (195).

Práce Konturka (203) byla zaměřena jednak na leptin u ceruleinem indukované AP u potkanů, jednak na leptin v průběhu AP u lidí. U potkanů se lišily hladiny leptinu kontrolní skupiny 0,14 (0,03-0,3) µg/l (medián; interkvartilové rozpětí) a potkanů s ceruleinem indukovanou pankreatitidou (CIP) 0,56 (0,2-3,2) µg/l. CIP byla spojena s upregulací mRNA a proteinu pro leptin v pankreatu. Podání exogenního leptinu významně redukovalo hmotnost pankreatu, histologické projevy AP, plazmatické hladiny TNF-alfa a expresi mRNA pro iNOS v pankreatické tkáni. Stanovení hladin leptinu ukázalo významně vyšší hodnoty u pacientů s AP 7,5 (4,3-18,4) µg/l než u zdravých kontrol 2,1 (1,0-11,8) µg/l. Transkripční upregulace leptinu v pankreatu ukazuje, že zanícený pankreas může být zdrojem lokální produkce leptinu. Exogenní podání leptinu potkanům chrání jejich pankreas proti rozvoji CIP a jedním z možných mechanismů účinku leptinu může být aktivace dráhy oxidu dusnatého. V práci autorů Duarte-Rojo a kol. leptin neprokázal statisticky významnou korelaci se závažností AP. Pozitivní korelace byla nalezena pouze mezi BMI a leptinem ($r=0,476$; $p<0,001$). Výsledky svědčí proti možné roli leptinu jakožto prozánětlivého signálu u AP, ani jakožto protizánětlivého mediátoru. Také se zdá, že není ani spojovacím článkem mezi obezitou a vyšším výskytem komplikací u AP, ani prognostickým markerem (204).

Karpavicius se ve své přehledné práci z roku 2012 zaměřil na studie zjišťující hodnoty adipokinů u pacientů s AP. Do ní zahrnul 9 humánních a 3 experimentální studie, avšak vzhledem ke značné heterogenitě v metodologii jednotlivých studií uzavírá, že je problematické generalizovat jejich závěry (205).

CRP

Hodnoty CRP 1. den hospitalizace se statisticky významně nelišily mezi skupinami lehké a těžké AP, avšak statisticky významný rozdíl byl zjištěn mezi kategoriemi CTSI A vs. B ($p=0,04$). Závislost hodnot CRP 1. den a CTSI skóre byla statisticky významná ($p=0,0016$).

Ještě významnější závislost byla nalezena pro hodnoty CRP 4. den hospitalizace a závažnosti AP: hodnoty skupin lehké a těžké AP se lišily s $p=0,0009$, statisticky významný rozdíl byl nalezen i mezi kategoriemi CTSI A vs. B a A vs. C ($p=0,0002$). Z toho lze usuzovat, že již od 4. dne hospitalizace začínají přetrvávající zvýšené hodnoty CRP signalizovat závažnější průběh AP. Korelace hodnot CRP 4. den hospitalizace a CTSI skóre byla statisticky významná ($r=0,543$; $p<0,0001$).

Naše výsledky potvrzují pro CRP data z řady studií a to, že CRP je levným markerem, který dokáže v dalším průběhu hospitalizace predikovat závažnost AP (30,75,180,184,189).

IL-6

Hodnoty IL-6 1. den hospitalizace se významně nelišily mezi pacienty s lehkou a těžkou AP ani mezi kategoriemi CTSI. Nebyla nalezena statisticky významná korelace vstupních hodnot IL-6 a CTSI. Tato data jsou v korelaci s výsledky naší studie I a to, že IL-6 v úvodu hospitalizace jeví u pacientů s AP výrazný vzestup relativně nezávislý na budoucím průběhu AP, avšak jsou v rozporu s řadou studií, které přikládají IL-6 v úvodu hospitalizace schopnost predikovat závažnost AP (189,190,194,241).

4. den hospitalizace již byl u IL-6 zaznamenán určitý, ale ještě statisticky nevýznamný, trend k rozlišení pacientů s lehkou a těžkou AP ($p=0,08$) a mezi kategoriemi CTSI ($p=0,072$). Tento den již byla korelace hodnot IL-6 a CTSI skóre statisticky významná ($r=0,241$; $p=0,043$). I tyto výsledky jsou v souladu s naší předchozí studií (studie I), kde byla schopnost diskriminace vážných komplikací nalezena od 5. dne hospitalizace.

IL-6 lze s úspěchem používat jako diskriminační parametr v diagnostické praxi u stavů spojených se zánětem. Jeho dynamika s časnějším vzestupem jej favorizuje oproti CRP např. u perakutně probíhajících stavů jako jsou náhlé příhody břišní (perforační příhody, difúzní peritonitidy apod.). Nevýhodou je bohužel vysoká cena (cca desetinásobná oproti CRP) a omezená možnost statimového stanovení z důvodu regulace zdravotních pojišťoven – výkon je omezen na imunologické laboratoře, které nefungují v nepřetržitém provozu.

PCT

Hodnoty PCT nediskriminovaly pacienty s lehkou vs. těžkou AP ani jednotlivé kategorie CTSI statisticky významně ani 1. ani 4. den hospitalizace, stejně tak nekorelovaly se závažností AP vyjádřenou pomocí CTSI skóre. PCT se jeví v tomto světle jako relativně hrubý ukazatel, jehož schopnosti jsou zejména v diskriminaci sterilní a infikované nekrózy v pozdějším průběhu AP (30,113,116,173,186-190,192,234).

5.2.2 Diskuze – STUDIE II: Adipokiny a zánětlivé markery v časně fázi AP

5.2.2.1 Diskuze – zánětlivé markery v časně fázi AP

CRP bylo navrženo jako užitečný prediktor v časně fázi AP (173,194). V souhlasu s těmito recentními studiemi bylo CRP významně zvýšeno u pacientů s “high-risk status”, např. s obezitou, těžkou AP a vyšším CTSI skóre, ale pouze v den 4. Analýza odhalila vyšší hodnoty CRP v den 4 v porovnání se dnem 1 pouze v podskupině těžké AP.

Jak IL-6, tak PCT byly navrženy pro diferenciální diagnózu pacientů s vysokým rizikem rozvoje těžké a/nebo nekrotické formy AP (189,192,193). Podobně jako u CRP, ale na rozdíl od PCT, byly vysoké hladiny IL-6 v den 4 asociovány s jedinci s těžkou formou AP. Výsledky potvrzují možné diagnostické použití CRP a IL-6 k rozlišení mezi lehkou a těžkou formou AP.

5.2.2.2 Adipokiny v časně fázi AP

Na obezitu může být pohlíženo jako chronický prozánětlivý stav mírného stupně a tuková tkáň je vysoce aktivní jak endokrinně, tak jako prozánětlivý a imunitní orgán. Protože rozsah nekrózy peripankreatické tukové tkáně určuje závažnost pankreatitidy, mohly by časné změny adipocyt-specifických ukazatelů včetně adipokinů sloužit jako prediktor klinického průběhu (167). Rozsáhlé nekrózy viscerální tukové tkáně způsobují masivní uvolnění adipokinů, chemokinů a cytokinů z adipocytů v průběhu AP. Tento fenomén může být užitečný pro vysvětlení metabolických změn, orgánové dysfunkce a inzulinové rezistence během AP.

Prezentovaná studie neodhalila žádné rozdíly mezi hladinami adiponektinu v porovnání dne 1 a dne 4 ani ve skupině všech pacientů, stejně tak v podskupinách rozdělených podle BMI, závažnosti AP a CTSI skóre. Také byly pozorovány podobné koncentrace ADP v porovnání výše zmíněných podskupin jak v den 1, tak v den 4 po přijetí. Výsledky jsou v souhlasu s recentními klinickými studiemi (200,201), kde adiponektin neměl žádný potenciál pro klinické využití ani v predikci závažnosti AP, ani v predikci rozsahu peripankreatických nekróz. Přestože adiponektin má tendenci k nižším hodnotám u pacientů s těžkou AP a experimentální studie podporuje protektivní roli ADP u ceruleinem indukované

AP na modelu myši krmených stravou s vysokým obsahem tuku (242), přesná role ADP v průběhu AP musí být objasněna dalším výzkumem.

Jak je zmíněno výše, úloha A-FABP u AP nebyla dosud popsána. Nicméně A-FABP může sloužit jako potenciální prognostický marker u kriticky nemocných pacientů se sepsí (171). A-FABP jakožto marker asociovaný s obezitou může být spojen s aktivací makrofágů a syntézou a uvolněním prozánětlivých cytokinů interleukinu-6 a tumor necrosis faktoru alfa, procesy ovlivňujícími iniciaci a progresi zánětu a sepse. Tudíž stanovení jeho sérových hodnot může napomoci v monitorování průběhu a prognózy AP. V naší studii nebyly nalezeny žádné rozdíly mezi podskupinami vytvořenými na základě závažnosti AP a CTSI skóre. V souladu s naším očekáváním měli pacienti s BMI>25 kg/m² významně vyšší hladiny A-FABP. Tento fenomén byl potvrzen dalšími statistickými analýzami, kde A-FABP koreloval s BMI v celé skupině a pacienti s lehkou (ale nikoli těžkou) AP v den 1 i den 4. Sledování průběhu hodnot A-FABP odhalilo významný pokles jeho hodnot ve všech podskupinách mezi dnem 1 a 4, který byl podobný poklesu hodnot FGF-21 a IL-6.

Následující vícerozměrná regresní analýza s A-FABP jako závisle proměnnou ukázala, že jeho hodnoty byly asociovány pouze s PCT u pacientů s lehkou i těžkou AP. Zdá se tedy pravděpodobné, že A-FABP, jakožto parameter s prozánětlivým účinkem determinant hodnot IL-6, nebyl použitelný v naší studii v predikci a monitorování závažnosti AP.

Již dříve byl FGF-21 detekován v tukové tkáni a svaích. Navíc byl FGF-21 označen jako nový hepatokin, adipokin a myokin (243,244). Několik recentních studií odhalilo přítomnost FGF-21 v exokrinním pankreatu a beta-buňkách ve významně vyšších hladinách než v játrech, tukové tkáni a svalu, avšak mechanismus jeho exprese a regulace v pankreatu není dosud znám. Zdá se vysoce pravděpodobné, že játra, pankreas a tuková tkáň jsou hlavními cíly FGF-21. FGF-21 je také přítomen v pankreatických acinárních buňkách a in vivo je chráněn proti poškození během AP omezením tkáňového zánětu a fibrózy (172,245). Prezentovaná studie neukázala žádné významné rozdíly mezi hladinami FGF-21 v porovnání podskupin podle BMI a závažnosti AP. Pouze pacienti v podskupině CTSI B měli vyšší koncentrace FGF-21 v porovnání s podskupinami CTSI A a CTSI B, ale spekulujeme v tomto případě o náhodné příčině. Nicméně stejně jako u A-FABP, byl pozorován pokles koncentrací FGF-21 ve všech skupinách během prvních čtyř dnů po přijetí, i když ne vždy významně. Výše zmíněná experimentální studie Johnsona et al. ukázala, že exprese FGF-21 z acinárních buněk výrazně stoupla během prvních minut po vyvolání pankreatitidy, jejíž závažnost inverzně korelovala s expresí FGF-21 (172). FGF-21 pravděpodobně vede k zeslabení exprese faktoru časné růstové odpovědi 1 (EGR-1), transkripčního faktoru, který podporuje expresi prozánětlivých a profibrotických genů (246). Tato zjištění mohou svědčit pro novou funkci FGF-21 v ochraně pankreatické tkáně proti akutnímu poškození při pankreatitidě. Tudíž vyšší hladiny FGF-21 v den 1 mohou odrážet jeho působení v časné fázi AP, kde FGF-21 slouží jako bezprostřední odpověď během poškození pankreatu, které může

stimulovat reakce, jež omezují tkáňový zánět a fibrózu. Avšak data z klinických studií v recentní literatuře chybějí a tato spekulace musí být potvrzena dalším výzkumem.

Žádná asociace nebyla pozorována mezi FGF-21 a A-FABP a IL-6 napříč všemi podskupinami. Tento fenomén může naznačovat nezávislé chování všech tří parametrů v průběhu časné fáze AP.

5.2.3. Diskuze – STUDIE II: Adipokiny a zánětlivé markery v den 4

5.2.3.1 Adipokiny v den 4

Již dříve jsme vyhodnotili hodnoty ADP, A-FABP a FGF-21 při přijetí v porovnání se 4. dnem u pacientů s AP. Zatímco jsme nepozorovali žádné rozdíly u ADP, u hodnot A-FABP a FGF-21 jsme našli významný pokles během prvních čtyř dnů. Tudíž byla prezentovaná práce zaměřena na zjištění potenciálu prediktivních hodnot zejména A-FABP a FGF-21 společně s prozánětlivými ukazateli 4. den po přijetí, aby bylo možno rozlišit mezi lehkou a těžkou formou AP. Podobný přístup byl použit v několika studiích, nikoli však s A-FABP a FGF-21.

Studie Sharmy et al. odhalila, že sérové hodnoty ADP od 4. do 7. dne byly významně nižší u pacientů s těžkou AP než u pacientů s lehkou formou AP a mohly by být použity jako inverzní ukazatel systémové zánětlivé odpovědi na poškození pankreatu (199). Na rozdíl od toho koncentrace adiponektinu a leptinu nekorelovaly s tíží AP při přijetí a během prvního týdne nemoci v jiné studii (200) a neměly žádný potenciál pro rutinní klinické použití v predikci jak závažnosti AP, tak rozsahu nekróz v peripankreatické tukové tkáni (201). Podobně prezentovaná práce neodhalila žádný významný rozdíl mezi hodnotami ADP ve srovnání pacientů s lehkou a těžkou AP 4. den po přijetí. Ale pozorování experimentálního modelu vede k domněnce, že ADP hraje protektivní úlohu u ceruleinem indukované AP myši krmených dietou s vysokým obsahem tuku (242) a přesná role ADP v průběhu AP by měla být ověřena dalším výzkumem (251).

A-FABP je považován za klíčový prozánětlivý mediátor spojující obezitu s kardiovaskulárními chorobami u člověka (252). Plazmatické hladiny A-FABP byly identifikovány jako nezávislý rizikový faktor cévního zánětu (253) a pozitivně korelovaly s několika prozánětlivými ukazateli včetně CRP a IL-6 a inverzně korelovaly s ADP v experimentálních studiích (93).

Vztah A-FABP k AP nebyl zkoumán ani v animálních ani v humánních studiích. Nicméně zkoumání prognostické hodnoty A-FABP v průběhu AP by mohlo být užitečné, kvůli jeho schopnosti propojení metabolické homeostázy se zánětem. A-FABP může být asociován s expresí Toll-like receptorů, aktivací makrofágů, syntézou a uvolněním prozánětlivých cytokinů (včetně IL-6), aktivací exprese cyklooxygenázy-2 a syntézy eikosanoidů. Tyto faktory mohou způsobit inzulinovou rezistenci a iniciaci a progresi zánětu a sepse. Ve studii Huang et al. byly zvýšeny sérové koncentrace A-FABP u kriticky

nemocných pacientů a korelovaly s tíží nemoci (171). Kromě toho byla nalezena pozitivní korelace cirkulujícího A-FABP s TNF-alfa a prokalcitoninem a žádná asociace s BMI. V naší studii se hodnoty A-FABP 4. den u jedinců s těžkou AP nelišily významně od těch s lehkou AP, což podporuje jejich špatnou schopnost dikriminovat závažnost AP. Tento fenomén byl potvrzen následnou ROC analýzou, kde se průměrné hodnoty A-FABP ukázaly nevhodnými pro identifikaci pacientů s těžkou AP. U obou forem nemoci A-FABP pozitivně korelovalo s PCT a také s IL-6 a CRP, na rozdíl od výše zmíněných studií (171). Vícenásobná regresní analýza laboratorních charakteristik s A-FABP jako závisle proměnnou ukázala pozitivní asociace s prokalcitoninem v obou podskupinách, navzdory nebakteriálnímu zánětlivému původu AP. Tudíž jsme prokázali, že A-FABP byl v naší studii během časné fáze AP úzce spjat s prozánětlivými faktory, bez ohledu na závažnost onemocnění. Pozitivní asociace s ADP u jedinců s lehkou AP byla překvapivá a nenalezli jsme žádné relevantní vysvětlení tohoto fenoménu.

FGF-21 je považován za nový hepatokin, adipokin a myokin (243,244). Několik studií popsalo přítomnost FGF-21 v exokrinním pankreatu a beta-buňkách ve významně vyšších hladinách než v játrech, tukové tkáni a svalech. Přesný mechanismus jeho exprese a regulace v pankreatu však dosud není znám. Byla popsána přítomnost FGF-21 v pankreatických acinárních buňkách a také bylo pozorováno jeho protektivní působení proti poškození během AP (245). Zdá se pravděpodobné, že indukce FGF-21 je omezena na časnou fázi zánětu, na rozdíl od exprese jiných faktorů rodiny FGF, které jsou produkovány během regenerace pankreatu. Nová zjištění vedou k domněnce, že FGF-21 působí jako důležitý regulátor v adaptaci na stres a mohou redukovat jeho progresi během rozličných okolností nemocí (250). V současné době nejsou dostupné žádné informace z humánních klinických studií týkající se role FGF-21 v počáteční fázi AP. Stejně jako u A-FABP jsme nenalezli žádné signifikantní rozdíly mezi průměrnými plazmatickými koncentracemi FGF-21 mezi studijními skupinami v den 4. FGF-21 inklinoval k vyšším hodnotám u pacientů s těžkou formou AP. Nicméně pro FGF-21 byla vypočtena AUC = 0.558 a FGF-21 tedy neprokázal významné výsledky v ROC analýze. V dalším kroku korelační analýza odhalila těsnější vazby mezi FGF-21 a všemi měřenými parametry u těžké AP, ale většina z nich ztratila významnost při vícenásobné regresní analýze; FGF-21 byl u pacientů s těžkou AP negativně asociován s CRP a pozitivně s ADP. Ve studii Garianiho et al. (249) měli pacienti se sepsí významnou elevaci hladin FGF-21 ve srovnání s pacienty, kteří měli SIRS neinfekčního původu a zdravými jedinci. U tří pacientů se sepsí prokázala sériová měření FGF-21 jeho pokles a zároveň zlepšení klinického stavu. Tento pokles byl setrvalý od prvního do přibližně desátého dne. Autoři spekulují, že FGF-21 by mohl být markerem závažnosti zánětlivé odpovědi s podobným průběhem jako proteiny akutní fáze. Naše výsledky jsou konzistentní s těmito pozorováními – u pacientů s poklesem FGF-21 byl pozorován lehčí klinický průběh. Tudíž by FGF-21 mohl být markerem přítomnosti a

závažnosti buněčného poškození přítomného v zánětlivých stavech jako je AP, SIRS a sepsy. Avšak ze všech 84 pacientů v naší studii u 9ti nedošlo k žádným významným změnám v průběhu 4 dnů a dalších 10 mělo při přijetí vyšší hodnoty FGF-21 při přijetí nezávisle na závažnosti AP. Tudíž je k objasnění průběhu FGF-21 u AP třeba další výzkum.

Ve studii Liho et al. (254), byly sérové hladiny FGF-21 u nově diagnostikovaných pacientů s diabetem mellitem 2. typu pozitivně a nezávisle asociovány s hladinami CRP. Podobně byla nalezena pozitivní korelace s CRP ve studii pacientů s chronickým onemocněním ledvin (255). Negativní asociace s CRP pravděpodobně odráží průběh obou parametrů v prvních čtyřech dnech AP v naší studii. Zatímco průměrné hladiny FGF-21 významně poklesly u těžké AP, byla 4. den nalezena elevace CRP oproti jedincům s lehkou formou AP. Tento fenomén může odrážet průběh klinických komplikací u těžké AP. V experimentálním modelu autoři demonstrovali, že ADP je mediátorem systémových účinků FGF-21 na inzulinovou senzitivitu a energetický metabolismus (256). ADP má mnoho funkčních a regulačních podobností s FGF-21. Silná pozitivní asociace FGF-21 s ADP pouze u těžké AP pozorovaná v naší studii musí být objasněna v dalším výzkumu.

5.2.3.2 Prozánětlivé ukazatele v den 4

CRP bylo navrženo jako užitečný predictor závažnosti v časně fázi AP (194,173). V prezentované studii bylo CRP 4. den po přijetí v podskupinách pacientů s těžkou AP a vyšším CTSI skóre významně zvýšeno. Pro cut-off hodnotu CRP 100 mg/l byla zjištěna vysoká NPV (96%). Jak je ukázáno na Obrázku 82, průběh křivky není ideální a pozitivní predikce tíže AP je problematická. Tudíž vybraná hodnota plazmatické hladiny CRP mohla vyloučit těžkou formu AP s uspokojivou senzitivitou a specificitou. Podobná NPV s nižší hodnotou AUC byla dosažena ve studii Fisica et al. (194), ale pro hodnotu cut-off CRP 214 mg/l, která byla stanovena pro 3. den po přijetí k diskriminaci pacientů se systémovými komplikacemi choroby. CRP bylo testováno jako prediktor závažnosti AP v průběhu prvních 48 hodin v nedávných studiích (173,248), s vyššími mezními hodnotami pro predikci závažnosti onemocnění. IL-6 a PCT byly navrženy pro diferenciální diagnostiku pacientů s rizikem rozvoje těžké a/nebo nekrotické formy AP (192,241,248). Na rozdíl od PCT, byly v naší práci zvýšené hodnoty IL-6 asociovány s těžkými formami AP v den 4. Mezní hodnota IL-6 37 ng/l vyloučila těžkou AP s NPV 92%, ale PPV byla pouze 29%. Tyto hodnoty jsou podobné těm z výše zmíněné studie (194), kde měření plazmatických hladin IL-6 byla provedena v den 1. Tudíž naše výsledky mohou naznačovat diagnostickou použitelnost jak CRP, tak IL-6 k vyloučení těžké formy AP s vysokou negativní prediktivní hodnotou 4. den po přijetí.

5.2.4 Diskuze - omezení studie

Hlavním omezením studie je malý počet subjektů zejména v podskupině těžké AP subgroup, který může snížit statistickou sílu významu pozorovaných vztahů. Nicméně toto představuje častý problém vzhledem k malému počtu pacientů s těžkou AP obecně. Jsou potřeba další prospektivní studie s větším rozsahem studovaného souboru k určení role zejména FGF-21 a A-FABP v průběhu AP.

Dalším omezením je vyšetření uvedených markerů pouze 1. a 4. den hospitalizace, tzn. že chybějí hodnoty ze dne 2 a 3, které by jistě mohly také přinést řadu zajímavých poznatků. Příčinou byly hlavně omezené finanční prostředky, které jsme měli k dispozici na nákup souprav ke stanovení adipokinů. Náklady na jejich pořízení jsou vzhledem ke stále spíše výzkumnému a nikoli rutinnímu použití velmi vysoké.

6. ZÁVĚRY

1. V naší práci bylo zjištěno, že **hladiny interleukinu-6 od 5. dne hospitalizace dokážou rozlišit sterilní a infikovanou nekrózu**. ROC analýza prokázala hodnotu AUC pro IL-6 v 5. den = 0,774, v 7. den = 0,781. Pro cut-off hodnotu IL-6 v diskriminaci sterilní a infikované nekrózy 100 ng/l platnou od 5. dne hospitalizace bylo $p < 0,005$, senzitivita 87%, specifická 90%, PPV 78%, NPV 77%; pro 150 ng/l bylo $p < 0,01$, senzitivita 100%, specifická 92%, PPV 100%, NPV 76%. Dle výsledků naší práce by mohl IL-6 diagnostikovat infikovanou nekrózu s vysokou senzitivitou, specificitou a pozitivní prediktivní hodnotou 2-5 dní před potvrzením kultivačním mikrobiologickým vyšetřením. CRP na rozdíl od IL-6 tuto diskriminační schopnost (odlišení sterilní a infikované nekrózy) nemá, jeho hladiny jsou od 2. dne výrazně zvýšeny, statisticky významný rozdíl u pacientů se sterilní nekrózou vs. infikovanou nekrózou není přítomen.
2. V celé skupině jednotlivců s diagnózou AP nebyly zjištěny žádné významné rozdíly mezi ADP a CRP ve srovnání hladin v den 1 a 4. Oproti tomu byl během 4 dní hospitalizace zjištěn významný pokles v koncentracích A-FABP, FGF-21, IL-6 ($p < 0,000$) a PCT ($p < 0,05$). Podobně jako ve skupině všech pacientů byly hladiny A-FABP, FGF-21, IL-6 a PCT (pouze u jedinců s $BMI \leq 25 \text{ kg/m}^2$) významně nižší v den 4 v porovnání se dnem 1.
3. Adiponektin, fibroblastový růstový faktor 21 ani adipocytární vazebný protein pro mastné kyseliny neprokázaly schopnost predikovat závažnost akutní pankreatitidy. Pouze u fibroblastového růstového faktoru byl patrný určitý trend ke schopnosti diskriminace mezi některými kategoriemi závažnosti akutní pankreatitidy. Oproti zánětlivým markerům tedy adipokiny nelze prozatím pro predikci závažnosti AP využít. Nicméně je nutný další výzkum k posouzení jejich dynamiky v dalším průběhu AP. Zejména pro FGF-21, který je exprimován v metabolicky aktivních tkáních, tedy i v pankreatu, existuje málo studií a s ohledem na určitý trend diskriminace kategorií CTSI v naší práci je nutno jej brát v potaz. Podle našich znalostí je naše studie první, kde byly zjišťovány hodnoty A-FABP a FGF-21 v časně fázi AP. Nenalezli jsme žádné rozdíly mezi skupinami. Nicméně významný pokles byl zjištěn v podskupinách mezi 1. a 4. dnem po přijetí (společně, ale nezávisle na poklesu hladin IL-6). FGF-21 byl výrazně zvýšen v den 1, což potvrzuje výsledky animálních studií, kde jeho gen naznačuje potenciální úlohu v bezprostřední odpovědi na poškození pankreatu stimulací redukce tkáňového zánětu a fibrózy. ADP, A-FABP a FGF-21 neposkytly významný výsledek v ROC analýze naznačující chabý potenciál pro diskriminaci závažnosti onemocnění v den 4. **Možnost predikce závažnosti AP jsme potvrdili u CRP 1. den hospitalizace pouze**

pro část pacientů (kategorie CTSI A vs. B). V prezentované studii bylo CRP 4. den po přijetí v podskupinách pacientů s těžkou AP a vyšším CTSI skóre významně zvýšeno. Pro cut-off hodnotu CRP 100 mg/l byla zjištěna vysoká NPV (96%), pozitivní predikce je však problematická. Na rozdíl od PCT, byly v naší práci zvýšené hodnoty IL-6 asociovány s těžkými formami AP v den 4. Mezní hodnota IL-6 37 ng/l vyloučila těžkou AP s NPV 92%, ale PPV byla pouze 29 %. Tudíž naše výsledky mohou naznačovat diagnostickou použitelnost jak CRP, tak IL-6 k vyloučení těžké formy AP s vysokou negativní prediktivní hodnotou 4. den po přijetí. Tato studie přinesla další evidenci diagnostického využití plazmatických koncentrací CRP a IL-6 k vyloučení těžké formy AP s vysokou negativní prediktivní hodnotou ve čtvrtém dnu po přijetí. Vybraná cut-off hodnota pro IL-6 může být použita i při přijetí pro prognózu závažnosti a systémových komplikací AP.

4. **Použitím vícenásobné regresní analýzy jsme demonstrovali úzké propojení A-FABP s procalcitoninem během časně fáze AP bez ohledu na tíži onemocnění. Negativní asociace FGF-21 s CRP pravděpodobně odráží průběh těchto parametrů v prvních čtyřech dnech těžké AP.** Objasnění v dalším výzkumu je nezbytné pro silnou pozitivní asociaci FGF-21 s ADP. Žádná asociace nebyla pozorována mezi FGF-21 a A-FABP a IL-6 napříč všemi podskupinami. Tento fenomén může naznačovat nezávislé chování všech tří parametrů v průběhu časně fáze AP. Vícenásobná regresní analýza laboratorních charakteristik s A-FABP jako závisle proměnnou ukázala pozitivní asociaci s procalcitoninem v obou podskupinách, navzdory nebakteriálnímu zánětlivému původu AP. **Prokázali jsme, že A-FABP byl v naší studii během časně fáze AP úzce spjat s prozánětlivými faktory, bez ohledu na závažnost onemocnění.** Pozitivní asociace s ADP u jedinců s lehkou AP byla překvapivá a nenalezli jsme žádné relevantní vysvětlení tohoto fenoménu.

7. SEZNAM PRACÍ VZTAHUJÍCÍCH SE K DISERTACI

Publikace

1. **Malina P**, Cejp V, Jabor A. Těžká akutní pankreatitida – laboratorní monitorování zaměřené na rozlišení sterilní a infikované nekrózy. *Klin Biochem Metab* 2012; 20:244–247.
2. Novotný D, Karásek D, Vavrková H, **Malina P**. HDL: funkce, dysfunkce a laboratorní metody stanovení. *Klin Biochem Metab* 2013; 21:122–128.
3. **Malina P**, Novotný D, Krumpholcová P, Tozzi I, Procházka V. Možnost predikce závažnosti akutní pankreatitidy stanovením adipokinů (adiponektinu, FGF-21 a A-FABP) při přijetí. *Klin Biochem Metab* 2014; 22:16–21.
4. Novotny D, Vavrkova H, Karasek D, Lukes J, Slavik L, **Malina P**, Orsag J. Evaluation of total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in individuals with metabolic syndrome. *Physiol. Res.* 2014; 63: 219-228. IF=1,487
5. Novotny D, Vavrkova H, Karasek D, **Malina P**. Genetic variants of apolipoprotein A5 T-1131C and apolipoprotein E common polymorphisms and their relationship to features of metabolic syndrome in adult dyslipidemic patients. *Clin. Biochem.* 2014; 47: 1015-1021. doi 10.1016/j.clinbiochem.2014.03.015. IF=2,229
6. Novotný D, **Malina P**, Krumpholcová P, Tozzi I, Procházka V. The acute pancreatitis severity prediction using adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in day 4 after admission. *Klin. Biochem. Metab.* 2015; 1, přijato do tisku
7. Novotny D, **Malina P**, Krumpholcova P, Tozzi I. Total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, fibroblast growth factor 21 and proinflammatory marker levels during the early stage of acute pancreatitis- a pilot study. *Clin. Lab.*, v recenzním řízení. IF=1,084

Přednášky, postery:

1. **Malina P**, Cejp V. Využití interleukinu-6 u těžké akutní pankreatitidy; XXVII. mezikrajské dny klinických biochemiků v Sezimově Ústí, Květen 2008 (přednáška).
2. **Malina P**, Cejp V, Jabor A. Využití interleukinu-6 u těžké akutní pankreatitidy; Sborník Sjezdu České společnosti klinické biochemie 20.-22.9.2009, in: Klin Biochem Metab 2009; 17:195.
3. **Malina P**, Cejp V, Jabor A. poster „Interleukin-6 jako marker infekce nekrózy u těžké akutní pankreatitidy“ - 1. cena na XIII. Postgraduálním kurzu „Sepse a MODS“, leden 2010, Ostrava.
4. **Malina P**. Těžká akutní pankreatitida - laboratorní monitorování se zaměřením na rozlišení sterilní a infikované nekrózy. XIV. Postgraduální kurz „Sepse a MODS“, leden 2011, Ostrava.
5. , Karásek D, Vaverková H, Jackuliaková E, **Malina P**. The Relationship of Adiponectin, Fibroblast Growth Factor 21 and Adipocyte Fatty Acid Binding Protein Levels To Dyslipidemic Phenotypes- Pilot Study, IFCC – WorldLab – EuroMedLab Berlin 2011 – Berlin, 15-19 May 2011; Clin Chem Lab Med 2011; 49, Special Suppl.
6. **Malina P**, Cejp V, Jabor A. Interleukin-6 as a necrosis infection marker in severe acute pancreatitis. IFCC – WorldLab – EuroMedLab Berlin 2011 – Berlin, 15-19 May 2011; Clin Chem Lab Med 2011; 49, Special Suppl.
7. **Malina P**, Cejp V, Jabor A. Laboratorní diagnostika akutní pankreatitidy. Sborník Sjezdu České společnosti klinické biochemie 20.-22.9.2009, in: Klin Biochem Metab 2011; 19:174.
8. Novotný D, **Malina P**. Prozánětlivý HDL cholesterol. Pracovní den ČSKB, Olomouc 15.2.2012.
9. **Malina P**. Akutní stavy a jejich diagnostika. Nejedlého Kladno, 11.4.2012.
10. **Malina P**, Franeková J. Markery srdeční dysfunkce v sepsi. XVIII. Postgraduální kurz „Sepse a MODS“, 30.1.2015, Ostrava.

8. LITERATURA

1. Mitchell RMS, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet* 2003; 361:1447–55.
2. Peery AE, Dellon ES, Lund J et al. Burden of gastrointestinal diseases in the United States: 2012 Update. *Gastroenterology* 2012; 143:1179–87.
3. Fagenholz PJ, Fernandez-del Castillo C, Harris NS et al. Direct medical costs of acute pancreatitis hospitalizations in the United States. *Pancreas* 2007; 35:302–7.
4. Fagenholz PJ, Castillo CF, Harris NS et al. Increasing United States hospital admissions for acute pancreatitis, 1988-2003. *Ann Epidemiol* 2007; 17:491–7.
5. Yadav D, Lowenfels AB. Trends in the epidemiology of the first attack of acute pancreatitis: a systemic review. *Pancreas* 2006; 33:323–30.
6. Kiriyama, Gabata T, Takada T et al. New diagnostic criteria of acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2010; 17:24–36.
7. Lippi G, Valentino M, Cervellin G. Laboratory diagnosis of acute pancreatitis: in search of the Holy Grail. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2012; 49:18–31.
8. Marshall JC, Cook DJ, Christou NV et al. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of complex clinical outcome. *Crit Care Med* 1995; 23:1638–52.
9. Banks PA . Epidemiology, natural history, and predictors of disease outcome in acute and chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2002; 56:226–30.
10. Jiang K , Huang W , Yang XN et al. Present and future of prophylactic antibiotics for severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18:279–84.
11. Trikudanathan G , Navaneethan U , Vege SS. Intra-abdominal fungal infections complicating acute pancreatitis: a review. *Am J Gastroenterol* 2011; 106:1188–92.
12. Bollen TL , Singh VK , Maurer R et al. Comparative evaluation of the modified CT severity index and CT severity index in assessing severity of acute pancreatitis. *Am J Roentgenol* 2011; 197:386–92.
13. Stimac D, Miletic D, Radic M et al. The role of non enhanced magnetic resonance imaging in the early assessment of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:997–1004.
14. Tenner S. Initial management of acute pancreatitis: critical decisions during the first 72 hours . *Am J Gastroenterol* 2004; 99:2489–94.
15. Banks PA, Freeman ML. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2006 ; 101:2379–400.
16. Freeman MF, Werner J, van Santvoort HC et al. Interventions for necrotizing pancreatitis. Summary of a multi-disciplinary consensus conference. *Pancreas* 2012 ; 8:1176–94.
17. Perez A, Whang EE, Brooks DC et al. Is severity of necrotizing pancreatitis increased in extending necrosis and infected necrosis? *Pancreas* 2002; 25:229–33.
18. Ranson JH, Pasternack BS. Statistical methods for quantifying the severity of clinical acute pancreatitis. *J Surg Res* 1977; 22:79–91.

19. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP et al. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13:818 – 29.
20. Wu BU, Johannes RS, Sun X et al. The early prediction of mortality in acute pancreatitis: a large population-based study. *Gut* 2008; 137:129-35.
21. Papachristou GI, Muddana V, Yadav D et al. Comparison of BISAP, Ranson's, APACHE-II, and CTSI scores in predicting organ failure, complications, and mortality in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:435–41.
22. Wu BU, Johannes RS, Sun X et al. Early changes in blood urea nitrogen predict mortality in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2009; 137:129–35.
23. Mounzer R et al. Comparison of existing clinical scoring systems to predict persistent organ failure in patients with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2012; 142:1476–82.
24. Maruna P, *Proteiny akutní fáze*, 1. vydání, Praha: MAXDORF 2004, 282 s. ISBN 8085912058.
25. Racek J et al. *Klinická biochemie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2006. 329 s. s. 71. ISBN 8072623249.
26. Zima T et al. *Laboratorní diagnostika*. 2. vydání. Praha : Galén a Karolinum, 2007. 906 s. ISBN 9788024614236.
27. Kessler S. *Laboratorní diagnostika*. 1. vydání. Praha: Scientia medica, 1993. 252 s. Memorix; s. 52. ISBN 8085526123.
28. Morley JJ, Kushner I. Serum C reactive protein levels in disease. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 389:406–418.
29. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340:448–454.
30. Hatherill M, Tibby SM, Sykes K, Turner Ch, Murdoch IA. Diagnostic markers of infection: comparison of procalcitonin with C reactive protein and leucocyte count. *Arch Dis Child* 1999; 81:417–421.
31. Barton BE. IL-6: Insights into novel biological activities. *Clin. Immunol Immunopathol* 1997; 85:16–20.
32. Begley CG, Nicola NA. Resolving conflicting signals: Cross inhibition of cytokine signaling pathways. *Blood* 1999; 93:1443–1447.
33. de Vries, JE. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:165–9.
34. Gillis S, Williams DE. Cytokine therapy: lessons learned and future challenges. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:501–3.
35. Heymann D, Guicheux J, Gouin F, Passuti N, Daculsi G. Cytokines, growth factors and osteoclasts. *Cytokine* 1998; 10:155–168.
36. Kalinkovich A, Weisman Z, Bentwich Z. Chemokines and chemokine receptors: role in HIV infection. *Immunol Letters* 1999; 68:281–287.

37. Kim ChH, Broxmeyer HE. Chemokines: signal lamps for trafficking of T and B cells for development and effector function. *J Leukoc Biol* 1999; 65:6–15.
38. Liu KD, Gaffen SL, Goldsmith M.. JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:271-278.
39. Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338:436–445.
40. Mantovani, A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999; 20:254–257.
41. McKay DM, Baird AW. Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut* 1999; 44:283–289.
42. Piarčíková M, Filka J, Uher M, Kurák M, Barlová E, Kovářová M, Molokáčová M, Šašinka . Čes slov Pediat 2001; 56:510–515.
43. Aldrich MB, Sevick-Muraca E. Cytokines are systemic effectors of lymphatic function in acute inflammation. *Cytokine* 2013; 64:362–369.
44. Philip AGS, Hewitt JR. Early diagnosis of neonatal sepsis. *Pediatrics* 1980; 65:1036.
45. Bloos F, Reinhart K. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence* 2014; 5:154–160.
46. Lankisch PG, Schirren CA. Increased body weight as a prognostic parameter for complications in the course of acute pancreatitis. *Pancreas* 1990; 5:262–269.
47. Porter KA, Banks PA. Obesity as a predictor of severity in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1991; 10:247–52.
48. Schäffler A, Schölmerich J, Büchler C. Adipocytokines and visceral adipose tissue. Emerging role in intestinal and mesenteric diseases. *Nat Clin Prac* 2005; 2:103–11.
49. Smitka K. Adipokiny a hormonální funkce tukové tkáně; Česká kinantropologie 2011; 15: 9–14.
50. Wozniak SE, Gee IL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: The new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci* 2009; 54:1847–1856.
51. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11:327–32.
52. Arner P. Regional differences in protein production by human adipose tissue. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:72–5.
53. Scherer PE, Williams S, Fogliano M. et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1990; 270:26746–26749.
54. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH et al. (Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 1990; 120:803–812.
55. Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin – journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005; 257:167–75.

56. Hotta K, Punuhashi T, Arita Y et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1595–1599.
57. Pajvani UB, Du X, Combs TP et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolit regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003; 278:9073–9085.
58. Li FY, Cheng KK, Lam KS, Vanhoutte PM, Xu A. Cross-talk between adipose tissue and vasculature: role of adiponectin. *Acta Physiol (Oxf)* 2011; 203:167–80.
59. Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M et al. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1492:203–206.
60. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X et al. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Molecular Endocrinology* 2010; 24:2050–2064.
61. Woo YC, Xu A, Wang Y, Lam KSL, Fibroblast Growth Factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives; *Clinical Endocrinology* 2013; 78:489–496.
62. Zhang X, Yeung DC, Karpisek M et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 2008; 57:1246–1253.
63. Chen C, Cheung BM, Tso AW et al. High plasma level of fibroblast growth factor 21 is an Independent predictor of type 2 diabetes: a 4-year population-based prospective study in Chinese subjects. *Diabetes Care* 2011; 34:2113–2115.
64. Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z et al. Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity. *Clinical endocrinology (Oxford)* 2009; 71:369–375.
65. Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ et al. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* 2010; 59:2781–2789.
66. Inagaki T, Dutchak P, Zhao G et al. Endocrine regulation of the fasting response by PPAR- α -mediated induction of fibroblast growth factor 21. *Cell Metabolism* 2007; 5:415–425.
67. Dutchak PA, Katafuchi T, Bookout AL et al. Fibroblast growth factor-21 regulates PPAR γ activity and the antidiabetic actions of thiazolidinediones. *Cell* 2012; 148:556–567.
68. Kharitonov A et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest.* 2005; 115:1627–1635.
69. Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, Kharitonov A. Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 2008; 149:6018–6027.

70. Dostalova I, Haluzikova D, Haluzik M. Fibroblast Growth Factor 21: A Novel Metabolic Regulator With Potential Therapeutic Properties in Obesity/Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiol Res* 2009; 58:1–7.
71. Huating L, Jing Z, Weiping J. Fibroblast growth factor 21: a novel metabolic regulator from pharmacology to physiology. *Front Med* 2013; 7:25–30.
72. Iglesias P, Selgas R, Romero S, Díez J: Biological role, clinical significance, and therapeutic possibilities of the recently discovered metabolic hormone fibroblastic growth factor 21. *Eur J Endocrinol* 2012; 167:301–309.
73. Makowski L, Hotamisligil GS. Fatty acid binding proteins – the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J Nutr* 2004; 134:2464–2468.
74. Xu A, Wang Y, Xu JY, Stejskal D, Tam S, Zhang J, Wat NM, Wong WK, Lam KS. Adipocyte fatty acid-binding protein is a plasma biomarker closely associated with obesity and metabolic syndrome. *ClinChem* 2006; 52:405–13.
75. Horakova D, Pastucha D, Stejskal D, Kollarova H, Azeem K, Janout V. Adipocyte fatty acid binding protein and C-reactive protein levels as indicators of insulin resistance development. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Rep* 2011; 155:355–359.
76. Park SE, Rhee EJ, Lee WY, Kim WJ, Yoo SH, Bae JC, Choi ES, Park CY, Oh KW, Park SW, Kim SW. The role of serum adipocyte fatty acid-binding protein on the development of metabolic syndrome is independent of pro-inflammatory cytokines. *Nutr Metab Cardiovascular Dis* 2012; 22:525–532.
77. Pelton PD, Zhou L, Demarest KT, Burriss TP. PPAR-gamma activation induces the expression of the adipocyte fatty acid binding protein gene in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261:456–458.
78. Fu Y, Luo N, Lopes-Virella MF, Garvey WT. The adipocyte lipid binding protein (ALBP/aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2002; 165:259–269.
79. Kazemi MR, McDonald CM, Shigenaga JK, Grunfeld C, Feingold KR. Adipocyte fatty acid-binding protein expression and lipid accumulation are increased during activation of murine macrophages by toll-like receptor agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1220–1224.
80. Bernlohr DA, Simpson MA, Hertzell AV, Banaszak LJ. Intracellular lipid-binding proteins and their genes. *Annu Rev Nutr* 1997; 17:277–303.
81. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; 318:1–14.
82. Matarese V, Bernlohr DA. Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein. *J Biol Chem* 1988; 263:14544–14551.

83. Veerkamp JH, van Moerkerk HT, Prinsen CF, van Kuppevelt TH. Structural and functional studies on different human FABP types. *Mol Cell Biochem* 1999;192:137–142.
84. Amri EZ, Bertrand B, Ailhaud G, Grimaldi P. Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *J Lipid Res* 1991; 32:1449–1456.
85. Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B et al. Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 2002; 22:5114–5127.
86. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7:489–503.
87. Jenkins-Kruchten AE, Bennaars-Eiden A, Ross JR, Shen WJ, Kraemer FB, Bernlohr DA. Fatty acid-binding protein-hormone-sensitive lipase interaction. Fatty acid dependence on binding. *J Biol Chem* 2003; 278:47636–47643.
88. Smith AJ, Sanders MA, Thompson BR, Londos C, Kraemer FB, Bernlohr DA. Physical association between the adipocyte fatty acid-binding protein and hormone-sensitive lipase: a fluorescence resonance energy transfer analysis. *J Biol Chem* 2004; 279:52399–52405.
89. Newberry EP, Kennedy SM, Xie Y, Luo J, Davidson NO. Diet-induced alterations in intestinal and extrahepatic lipid metabolism in liver fatty acid binding protein knockout mice. *Mol Cell Biochem* 2009; 326:79–86.
90. Stejskal D, Karpisek M. Adipocyte fatty acid binding protein in a Caucasian population: a new marker of metabolic syndrome? *Eur J Clin Invest* 2006; 36:621–625.
91. Engl J, Ciardi C, Tatarczyk T, Kaser S, Laimer M, Laimer E, et al. A-FABP—a biomarker associated with the metabolic syndrome and/or an indicator of weight change? *Obesity* 2008; 16:1838–1842.
92. Hsu BG, Chen YC, Lee RP, Lee CC, Lee CJ, Wang JH. Fasting serum level of fatty-acid-binding protein 4 positively correlates with metabolic syndrome in patients with coronary artery disease. *Circ J* 2010; 74:327–331.
93. Xu A, Tso AW, Cheung BM, Wang Y, Wat NM, Fong CH, et al. Circulating adipocyte-fatty acid binding protein levels predict the development of the metabolic syndrome: a 5-year prospective study. *Circulation* 2007; 115:1537–1543.
94. Haider DG, Schindler K, Bohdjalian A, Prager G, Luger A, Wolzt M, et al. Plasma adipocyte and epidermal fatty acid binding protein is reduced after weight loss in obesity. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9:761–763.
95. Hoo RC, Yeung CY, Lam KS, Xu A. Inflammatory biomarkers associated with obesity and insulin resistance: a focus on lipocalin-2 and adipocyte fatty acid-binding protein. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2008; 3:29–41.
96. Damcott CM, Moffett SP, Feingold E, Barmada MM, Marshall JA, Hamman RF, et al. Genetic variation in fatty-acid-binding protein-4 and peroxisome proliferator-activated

receptor gamma interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. *Metabolism* 2004; 53:303–309.

97. Tuncman G, Erbay E, Hom X, De Vivo I, Campos H, Rimm EB, et al. A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:6970–6975.

98. Nogueiras R, Novelle MG, Vazquez MJ, Lopez M, Dieguez C. Resistin: regulation of food intake, glucose homeostasis and lipid metabolism. *Endocr Dev* 2010; 17:175–84.

99. Barnes KM, Miner JL. Role of resistin in insulin sensitivity in rodents and humans. *Curr Protein Pept Sci* 2009; 10:96–107.

100. Steppan CM, Lazar MA. The current biology of resistin. *J Intern Med* 2004; 255:439–47.

101. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Fève B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006; 17:4–12.

102. Haluzik M, Haluzikova D. The role of resistin in obesity-induced insulin resistance. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7:306–11.

103. Adeghate E. Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Curr Med Chem* 2008; 15:1851–62.

104. Stephens JM, Vidal-Puig AJ. An update on visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor, an ubiquitously expressed, illusive cytokine that is regulated in obesity. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17:128–31.

105. Bełtowski J. Apelin and visfatin: unique "beneficial" adipokines upregulated in obesity? *Med Sci Monit* 2006; 12:112–9.

106. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H. et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 2005; 307:426–30.

107. Saddi-Rosa P, Oliveira CSV, Giuffrida FMA., Reis AF. Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2010; 2:21.

108. Mantzoros ChS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, Hamnvik O-PR, Koniaris A. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301:E567–E584.

109. Dardeno TA, Chou SH, Moon HS, Chamberland JP, Fiorenza ChG, Mantzoros ChS. Leptin in Human Physiology and Therapeutics. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31:377–393.

110. Carter S, Caron A, Richard D, Picard F. Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients. *Clin Interv Aging* 2013; 8:829–844.

111. Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 297:E1247–E1259.

112. Kazda A et al. Prokalcitonin: Vývoj názorů na interpretaci. *Sjezd ČSKB* 2009, in: *Klin Biochem Metab* 2009; 17:18–19.

113. Schuetz P, Albrich W, Mueller B. Procalcitonin for diagnosis of infection and guide to antibiotic decisions: past, present and future. *BMC Med* 2011; 9:107.
114. Schuetz P, Albrich W, Christ-Crain M, Chastre J, Mueller B. Procalcitonin for guidance of antibiotic therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8:575–87.
115. Schuetz P, Amin DN, Greenwald JL. Role of procalcitonin in managing adult patients with respiratory tract infections. *Chest* 2012; 141:1063–73.
116. Schuetz P, Chiappa V, Briel M, Greenwald JL. Procalcitonin algorithms for antibiotic therapy decisions: a systematic review of randomized controlled trials and recommendations for clinical algorithms. *Arch Intern Med* 2011; 171:1322–31.
117. Kopterides P, Siempos II, Tsangaris I, Tsantes A, Armaganidis A. Procalcitonin-guided algorithms of antibiotic therapy in the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care Med* 2010; 38:2229–41.
118. Schuetz P, Müller B, Christ-Crain M, Stolz D, Tamm M, Bouadma L, Luyt CE, Wolff M, Chastre J, Tubach F, Kristoffersen KB, Burkhardt O, Welte T, Schroeder S, Nobre V, Wei L, Bhatnagar N, Bucher HC, Briel M. Procalcitonin to initiate or discontinue antibiotics in acute respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 9:CD007498.
119. Novotný D, Karásek D, Vaverková H, Malina P. HDL: funkce, dysfunkce a laboratorní metody stanovení. *Klin Biochem Metab* 2013, 21:122–128.
120. Navab M et al. The double jeopardy of HDL. *Ann Med* 2005, 37: 173–178.
121. Von Eckardstein A et al.: HDL and arteriosclerosis role of cholesterol efflux and reverse transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21:13–27.
122. Movva R et al. Laboratory assesment of HDL heterogeneity and function. *Clin Chem* 2008, 54:788–800.
123. Dodani S et al. Is HDL function as important as HDL quantity in the coronary artery disease risk assessment? *J Clin Lipidol* 2009; 3:70–77.
124. Navab M et al. HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8:222–232.
125. Shao B et al. Myeloperoxidase- an inflammatory enzyme for generating dysfunctional high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* 2006; 21:322–328.
126. Navab M et al. Mechanisms of disease: proatherogenic HDL- an evolving field. *Nature Clinical Practice* 2006; 9:504–511.
127. Navab M et al. A cell-free assay for detecting HDL that is dysfunctional in preventing the formation of or inactivating oxidized phospholipids. *J Lipid Res* 2001; 42:1308–1317.
128. Arrol S et al. High-density lipoprotein associated enzymes and the prevention of low-density lipoprotein oxidation. *Eur J Lab Med* 1996; 4:33–38.
129. James RW et al. Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis* 1998; 139:77–82.

130. Haas MJ, Mooradian AD. Inflammation, high-density lipoprotein and cardiovascular dysfunction. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2011; 24:265–272.
131. Skaggs BJ, Hahn BH, Sahakian L et al. Dysfunctional, pro-inflammatory HDL directly upregulates monocytes PDGF β , chemotaxis and TNF α production. *Clin Immunol* 2010; 137:147–156.
132. Vaisar T, Mayer P, Nilsson E et al. HDL in humans with cardiovascular disease exhibits a proteomic signature. *Clin Chim Acta* 2010; 411:972–979.
133. De Waele JJ. Acute pancreatitis. *Curr Opin Crit Care* 2014; 20:189–95.
134. Mitchell RMS, Byrne MF, Baillie J. Pancreatitis. *Lancet* 2003; 361:1447–55.
135. Sandberg AA, Borgström A. Early prediction of severity in acute pancreatitis. Is this possible? *JOP* 2002; 3:116–25.
136. Tenner S, Baillie J, DeWitt J, Vege SS. American College of Gastroenterology guideline: management of acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2013; 108:1400–1416.
137. Zadák Z, Havel E: *Intenzivní medicína na principech vnitřního lékařství*. Praha: Grada; 1. vydání, 2007. ISBN 9788024720999.
138. UK guidelines for the management of acute pancreatitis. *Gut* 2005; 54: 1–9.
139. Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P et al. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl:S15-39.
140. Working Group IAP/APA Acute Pancreatitis Guidelines. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. *Pancreatol*. 2013; 13(Suppl 2):E1-15.
141. Shah AM, Eddi R, Kothari ST et al. Acute pancreatitis with normal serum lipase: a case series. *JOP* 2010; 11:369–72.
142. Clavien PA, Robert J, Meyer P et al. Acute pancreatitis and normoamylasemia. Not an uncommon combination. *Ann Surg* 1989; 210:614–20.
143. Papachristou GI, Whitcomb DC. Predictors of severity and necrosis in acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2004; 33:871–90.
144. Winslet M, Hall C, London NJM. Relation of diagnostic serum amylase levels to aetiology and severity of acute pancreatitis. *Gut* 1992; 33:982–6.
145. De Campos T, Cerqueira C, Kuryura L, Parreira JG, Soldá S, Perlingeiro JA, Assef JC, Rasslan S. Morbimortality indicators in severe acute pancreatitis. *JOP* 2008; 9:690–7.
146. Špičák J. Acute pancreatitis - new developments in treatment. *Vnitr Lek* 2013; 59:597–605.
147. Cruz-Santamaría DM, Taxonera C, Giner M. Update on pathogenesis and clinical management of acute pancreatitis. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2012; 3:60–70.
148. Petrov MS, Chong V, Windsor JA. Infected pancreatic necrosis: not necessarily a late event in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2011; 17:3173–6.

149. Papachristou GI, Whitcomb DC. Predictors of severity and necrosis in acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2004; 33:871–90.
150. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, Tsiotos GG, Vege SS. Classification of acute pancreatitis-2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus; Acute Pancreatitis Classification Working Group. *Gut* 2013; 62:102–11.
151. Bollen TL, van Santvoort HC, Besselink MG et al. Dutch Acute Pancreatitis Study Group. The Atlanta Classification of acute pancreatitis revisited. *Br J Surg* 2008; 95:6–21.
152. Sarr MG. 2012 revision of the Atlanta Classification of acute pancreatitis. *Pol Arch Med Wewn* 2013; 123:118–124.
153. Sarr MG, Banks PA, Bollen TL, et al. The new revised classification of acute pancreatitis 2012. *Surg Clin North Am* 2013; 93:549–62.
154. Sakorafas GH, Tsiotos GG, Sarr MG. Extrapaneatritic necrotizing pancreatitis with viable pancreas: a previously under- appreciated entity. *J Am Coll Surg* 1999; 188:643–648.
155. Bakker OJ, van Santvoort HC, Besselink MG, et al. Dutch Pancreatitis Study Group. Extrapaneatritic necrosis without pancreatic parenchymal necrosis: a separate entity in necrotizing pancreatitis? *Gut* 2013; 62:1475–80.
156. Besselink MG, van Santvoort HC, Boermeester MA, et al. Dutch Acute Pancreatitis Study Group. Timing and impact of infections in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2009; 96:267–273.
157. Balthazar E.J. Acute pancreatitis: assessment of severity with clinical and CT evaluation. *Radiology* 2002; 223:603–13.
158. Balthazar EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JH. Acute pancreatitis: value of CT in establishing prognosis. *Radiology* 1990; 174:331–336.
159. Vriens PW, van de Linde P, Slotema ET, Warmerdam PE, Breslau PJ. Computed tomography severity index is an early prognostic tool for acute pancreatitis. *J Am Coll Surg* 2005; 201:497–502.
160. De Nuzzo D, Miconi A, Pierantognetti P. Management of suspected acute inflammatory pancreatopathies in a "real-world" setting: a single-centre observational study. *JOP* 2014; 15:175–81.
161. Knoepfli AS, Kinkel K, Berney T, Morel P, Becker CD, Poletti PA. Prospective study of 310 patients: can early CT predict the severity of acute pancreatitis? *Abdom Imaging* 2007; 32:111–115.
162. Leung TK, Lee CM, Lin SY, Chen HC, Wang HJ, Shen LK, Chen YY. Balthazar computed tomography severity index is superior to Ranson criteria and APACHE II scoring system in predicting acute pancreatitis outcome. *World J Gastroenterol* 2005; 11:6049–6052.

163. Vriens PW, van de Linde P, Slotema ET, Warmerdam PE, Breslau PJ. Computed tomography severity index is an early prognostic tool for acute pancreatitis. *J Am Coll Surg* 2005; 201:497–502.
164. Triantopoulou C, Lytras D, Maniatis P, Chrysovergis D, Manes K, Siafas I, Papailiou J, Dervenis C. Computed tomography versus Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score in predicting severity of acute pancreatitis: a prospective, comparative study with statistical evaluation. *Pancreas* 2007; 35:238–242.
165. Mortelé KJ, Mergo PJ, Taylor HM, Wiesner W, Cantisani V, Ernst MD, Kalantari BN, Ros PR. Peripancreatic vascular abnormalities complicating acute pancreatitis: contrast-enhanced helical CT findings". *Eur J Radiol* 2004; 52:67–72.
166. Vriens P.W., van de Linde P., Slotema E.T., Warmerdam P.E., Breslau P.J. Computed tomography severity index is an early prognostic tool for acute pancreatitis. *J Am Coll Surg* 2005; 201:497–502.
167. Schäffler A., Schölmerich J. The role of adiponectin in inflammatory gastrointestinal diseases. *Gut* 2009; 58:317–22.
168. Frossard J.L., Lescuyer P., Pastor C.M. Experimental evidence of obesity as a risk factor for severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol.* 2009; 15:5260-5.
169. Pons N.F., Gea-Sorlí S., Closa D. Release of inflammatory mediators by adipose tissue during acute pancreatitis. *The journal of pathology.* 2010, 2: 175–182.
170. Das U. N. Serum adipocyte fatty acid-binding protein in the critically ill. *Crit Care* 2013;17:121.
171. Huang C.L., Wu Y.W., Hsieh A.R., Hung Y.H., Chen W.J., Yang W.S. Serum adipocyte fatty acid-binding protein levels in patients with critical illness are associated with insulin resistance and predict mortality. *Crit Care* 2013;17:R22.
172. Johnson C.L., Weston J.Y., Chadi S.A., Fazio E.N., Huff M.W., Kharitononkov A., Köester A., Pin C.L. Fibroblast growth factor 21 reduces the severity of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 2009; 137:1795-804.
173. Khanna AK, Meher S, Prakash S, Tiwary SK, Singh U, Srivastava A, Dixit VK. Comparison of Ranson, Glasgow, MOSS, SIRS, BISAP, APACHE-II, CTSI Scores, IL-6, CRP, and Procalcitonin in Predicting Severity, Organ Failure, Pancreatic Necrosis, and Mortality in Acute Pancreatitis. *HPB Surg.* 2013; 2013:367581.
174. Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF et al. Objective early identification of severe acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1974; 61:443–51.
175. Ranson JH., Rifkind KM, Roses DF, Fink SD, Eng K, Spencer FC. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1974; 139:69–81.
176. Wahab S, Khan RA, Ahmad I, Wahab A. Imaging and clinical prognostic indicators of acute pancreatitis: a comparative insight. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2010; 40:283–7.

177. Gates LK Jr. Severity scoring for acute pancreatitis: where do we stand in 1999? *Curr Gastroenterol Rep* 1999; 1:134–8.
178. Chatzicostas C, Roussomoustakaki M, Vardas E, Romanos J, Kouroumalis EA. Balthazar computed tomography severity index is superior to Ranson criteria and APACHE II and III scoring systems in predicting acute pancreatitis outcome. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36:253–60.
179. Uhl W, Büchler M, Malfertheiner P, Martini M, Beger HG. PMN-elastase in comparison with CRP, antiproteases, and LDH as indicators of necrosis in human acute pancreatitis. *Pancreas* 1991; 6:253–9.
180. De la Peña J, De las Heras G, Galo Peralta F, Casafont F, Pons Romero F. Prospective study of the prognostic value of C reactive protein, alpha 1-antitrypsin and alpha 1-acid glycoprotein in acute pancreatitis. *Rev Esp Enferm Dig* 1991; 79:337–40.
181. Lassen A, Berling R, Ohlsson K. CRP predicts complications in pancreatitis and peritonitis. *Prog Clin Biol Res* 1989; 308:725–9.
182. Puolakkainen PA. Early assessment of acute pancreatitis. A comparative study of computed tomography and laboratory tests. *Acta Chir Scand* 1989; 155:25–30.
183. Leese T, Shaw D, Holliday M. Prognostic markers in acute pancreatitis: can pancreatic necrosis be predicted? *Ann R Coll Surg Engl* 1988; 70:227–32.
184. Büchler M, Malfertheiner P, Schoetensack C, Uhl W, Beger HG. Sensitivity of antiproteases, complement factors and C-reactive protein in detecting pancreatic necrosis. Results of a prospective clinical study. *Int J Pancreatol* 1986; 1:227–35.
185. Büchler M, Malfertheiner P, Schoetensack C, Uhl W, Scherbaum W, Beger HG. Value of biochemical and imaging procedures for the diagnosis and prognosis of acute pancreatitis-results of a prospective clinical study. *Z Gastroenterol* 1986; 24:100–9.
186. Muller C, Uhl W, Printzen G, Gloor B, Bischofberger H, Tcholakov O, Buchler M. Role of procalcitonin and granulocyte colony stimulating factor in the early prediction of infected necrosis in severe acute pancreatitis. *Gut* 2000; 46:233–238.
187. Rau B, Steinbach G, Gansauge F, Mayer J, Grunert A, Beger H. The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut* 1997; 41:832–840.
188. Rau B, Steinbach G, Baumgart K, Gansauge F, Grünert A, Beger HG. The clinical value of procalcitonin in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Intensive Care Med* 2000; 26 Suppl 2:159–64.
189. Riché FC, Cholley BP, Laisné MJ, Vicaut E, Panis YH, Lajeunie EJ, Boudiaf M, Valleur PD. Inflammatory cytokines, C reactive protein, and procalcitonin as early predictors of necrosis infection in acute necrotizing pancreatitis. *Surgery* 2003; 133:257–62.

190. Mándi Y, Farkas G, Takács T, Boda K, Lonovics J. Diagnostic relevance of procalcitonin, IL-6, and sICAM-1 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 2000; 28:41–9.
191. Dambrauskas Z, Pundzius J, Barauskas G. Predicting development of infected necrosis in acute necrotizing pancreatitis. *Medicina (Kaunas)* 2006; 42:441–9.
192. Mofidi R, Suttie SA, Patil PV, Ogston S, Parks RW. The value of procalcitonin at predicting the severity of acute pancreatitis and development of infected pancreatic necrosis: systematic review. *Surgery* 2009; 146:72–81.
193. Aoun E, Chen J, Reighard D, Gleeson FC, Whitcomb DC, Papachristou GI. Diagnostic accuracy of interleukin-6 and interleukin-8 in predicting severe acute pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreatology* 2009; 9:777–85.
194. Fisic E, Poropat G, Bilic-Zulle L, Licul V, Milic S, Stimac D. The Role of IL-6, 8, and 10, sTNF α , CRP, and Pancreatic Elastase in the Prediction of Systemic Complications in Patients with Acute Pancreatitis. *Gastroenterol Res Pract* 2013; 20:282645.
195. Botoi G, Andercou A. Interleukin 17-prognostic marker of severe acute pancreatitis. *Chirurgia (Bucur)* 2009; 104:431–8.
196. Mentula P, Kylänpää ML, Kemppainen E, Jansson SE, Sarna S, Puolakkainen P, Haapiainen R, Repo H: Early prediction of organ failure by combined markers in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 2005; 92:68–75.
197. Porter KA, Banks PA. Obesity as a predictor of severity in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1991; 10:247–52.
198. Johnson CD, Toh SKC, Campbel MJ. Combination of APACHE-II score and an obesity score (APACHE-O) for the prediction of severe acute pancreatitis. *Pancreatology* 2002; 4:1–6.
199. Sharma A, Muddana V, Lamb J, Greer J, Papachristou GI, Whitcomb DC. Low serum adiponectin levels are associated with systemic organ failure in acute pancreatitis. *Pancreas* 2009; 38:907–912.
200. Tukiainen E, Kylanpaa ML, Ebeling P, Kemppainen E, Puolakkainen P, Repo H. Leptin and adiponectin levels in acute pancreatitis. *Pancreas* 2006; 32:211–4.
201. Schäffler A, Landfried K, Völk M, Fürst A, Büchler C, Schölmerich J, Herfarth H. Potential of adipocytokines in predicting peripancreatic necrosis and severity in acute pancreatitis: pilot study. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22:326–34.
202. Novotny D, Vaverkova H, Karasek D, Lukes J, Slavik L, Malina P, Orsag J. Evaluation of total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in individuals with metabolic syndrome. *Physiol Res*. 2014 Jan 8. [Epub ahead of print] PMID: 24397811.

203. Malina P, Novotný D, Krumpholcová P, Tozzi I, Procházka V. Možnost predikce závažnosti akutní pankreatitidy stanovením adipokinů (adiponektinu, FGF-21 a A-FABP) při přijetí. *Klin Biochem Metab* 2014; 22:16–21.
204. Johnson CL, Weston JY, Chadi SA, Fazio EN, Huff MW, Kharitonov A, Köester A, Pin CL. Fibroblast growth factor 21 reduces the severity of cerulein-induced pancreatitis in mice. *Gastroenterology* 2009; 137:1795–804.
205. Schäffler A, Hamer O, Dickopf J, Goetz A, Landfried K, Voelk M, Herfarth H, Kopp A, Büchler C, Schölmerich J, Brännler T. Admission resistin levels predict peripancreatic necrosis and clinical severity in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:2474–84.
206. Leśniowski B, Kumor A, Jasińska A, Daniel P, Pietruczuk M, Małecka-Panas E. Resistin: a new laboratory marker useful in diagnosis of acute pancreatitis? *Pol Merkur Lekarski* 2007; 22:385–387.
207. Daniel P, Leśniowski B, Mokrowiecka A, Jasińska A, Pietruczuk M, Małecka-Panas E. Circulating levels of visfatin, resistin and pro-inflammatory cytokine interleukin-8 in acute pancreatitis. *Pancreatol* 2010; 10:477–82.
208. Schäffler A, Hamer OW, Dickopf J, Goetz A, Landfried K, Voelk M, Herfarth H, Kopp A, Buechler C, Schölmerich J, Brännler T. Admission visfatin levels predict pancreatic and peripancreatic necrosis in acute pancreatitis and correlate with clinical severity. *Am J Gastroenterol* 2011; 106:957–67.
209. Konturek PC, Jaworek J, Maniatoglou A, Bonior J, Meixner H, Konturek SJ, Hahn EG. Leptin modulates the inflammatory response in acute pancreatitis. *Digestion* 2002; 65:149–160.
210. Duarte-Rojo A, Lezama-Barreda A, Ramirez-Iglesias MT, Peláez-Luna M, Robles-Díaz G. Is leptin related to systemic inflammatory response in acute pancreatitis? *World J Gastroenterol* 2006; 12:4392–4396.
211. Karpavicius A, Dambrauskas Z, Sileikis A, Vitkus D, Strupas K. Value of adipokines in predicting the severity of acute pancreatitis: comprehensive review. *World J Gastroenterol* 2012; 18:6620–7.
212. Ranson JH. The timing of biliary surgery in acute pancreatitis. *Ann Surg* 1979; 189:654–63.
213. Schutte K, Malfertheiner P. Markers for predicting severity and progression of acute pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; 22:75–90.
214. Carroll JK, Herrick B, Gipson T, Lee SP. Acute pancreatitis: diagnosis, prognosis, and treatment. *Am Fam Physician* 2007; 75:1513–1520.
215. Blamey SL, Imrie CW, O'Neill J, Gilmour WH, Carter DC. Prognostic factors in acute pancreatitis. *Gut* 1984; 25:1340–1346.
216. Singh VK, Wu BU, Bollen TL, Repas K, Maurer R, Johannes RS, et al. A prospective evaluation of the bedside index for severity in acute pancreatitis score in assessing mortality

- and intermediate markers of severity in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104:966–971.
217. Park JY, Jeon TJ, Ha TH, Hwang JT, Sinn DH, Oh TH, Shin WC, Choi WC. Bedside index for severity in acute pancreatitis: comparison with other scoring systems in predicting severity and organ failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2013; 12:645–50.
218. Gravante G, Garcea G, Ong SL, Metcalfe MS, Berry DP, Lloyd DM, Dennison AR. Prediction of mortality in acute pancreatitis: a systematic review of the published evidence. *Pancreatology* 2009; 9:601–14.
219. Wilson C, Heath DI, Imrie CW. Prediction of outcome in acute pancreatitis: a comparative study of acute pancreatitis, clinical assessment and multiple factor scoring systems. *Br J Surg* 1990; 77:1260–4.
220. Werner J, Hartwig W, Uhl W, Muller C, Buchler MW. Useful markers for predicting severity and monitoring progression of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2003; 3:115–27.
221. Targarona J, Barreda L, Barreda C. Evaluation and validation of surgical indications in acute pancreatitis with necrosis, at the National Hospital Edgardo Rebagliati Martins. *Rev Gastroenterol Peru* 2012; 32:257–61.
222. Miller SV; Vinnik IuS; Tepliakova OV. The results of the practical use of the destructive peritonitis' standartized treatment. *Khirurgiia (Mosk)* 2012; 5:24–30.
223. van Brunschot S, Bakker OJ, Besselink MG, Bollen TL, Fockens P, Gooszen HG, van Santvoort HC. Treatment of necrotizing pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; 10:1190–201.
224. Fogel EL. Endoscopic pancreatic necrosectomy. *J Gastrointest Surg* 2011; 15:1098–100.
225. Milian JW, Portugal SJ, Laynez ChR, Rodríguez AC, Targarona J, Barreda C L. Necrotic acute pancreatitis in the intensive care unit: a comparison between conservative and surgical medical treatment. *Rev Gastroenterol Peru* 2010; 30:195–200.
226. Sakorafas GH, Lappas C, Mastoraki A, Delis SG, Safioleas M. Current trends in the management of infected necrotizing pancreatitis. *Infect Disord Drug Targets* 2010; 10:9–14.
227. Amano H, Takada T, Isaji S, Takeyama Y, Hirata K, Yoshida M, Mayumi T, Yamanouchi E, Gabata T, Kadoya M, Hattori T, Hirota M, Kimura Y, Takeda K, Wada K, Sekimoto M, Kiriya S, Yokoe M, Hirota M, Arata S. Therapeutic intervention and surgery of acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2010; 17:53–9.
228. Wada K, Takada T, Hirata K, Mayumi T, Yoshida M, Yokoe M, Kiriya S, Hirota M, Kimura Y, Takeda K, Arata S, Hirota M, Sekimoto M, Isaji S, Takeyama Y, Gabata T, Kitamura N, Amano H. Treatment strategy for acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2010; 17:79–86.
229. Bradley EL, Dexter ND. Management of severe acute pancreatitis: a surgical odyssey. *Ann Surg* 2010; 251:6–17.

230. Harrison S, Kakade M, Varadarajula S, Parden J, Morgan D, Christein J. Characteristics and outcomes of patients undergoing debridement of pancreatic necrosis. *J Gastrointest Surg* 2010; 14:245–51.
231. Seewald S, Ang TL, Teng KC, Soehendra N. EUS-guided drainage of pancreatic pseudocysts, abscesses and infected necrosis. *Dig Endosc* 2009; 21 Suppl(1):61–5.
232. Muddana V, Whitcomb DC, Papachristou GI. Current management and novel insights in acute pancreatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 3:435–44.
233. Hasibeder WR, Torgersen C, Rieger M., Dünser M. Critical care of the patient with acute pancreatitis. *Anaesth Intensive Care* 2009; 37:190–206.
234. Mandi Y, Farkas G, Takacs T, Boda K, Lonovics J. Diagnostic relevance of , IL-6, and s-ICAM in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 2000; 28:41–9.
235. Mettu SR, Wig JD, Khullar M, Singh G, Gupta R. Efficacy of serum nitric oxide level estimation in assessing the severity of necrotizing pancreatitis. *Pancreatol* 2003; 3:506–14.
236. Gloor B, Muller CA, Worni M, Stahel PF, Redaelli C, Uhl W, Buchler MW. Pancreatic infection in severe pancreatitis the role of fungus and multiresistant organisms. *Arch Surg* 2001; 136:592–6.
237. Kazda A. Prokalcitonin u akutních pankreatitid a v septických stavech. *Klin Biochem Metab* 2002; 10:32–37.
238. Malina P, Cejp V, Jabor A. Těžká akutní pankreatitida – laboratorní monitorování zaměřené na rozlišení sterilní a infikované nekrózy. *Klin Biochem Metab* 2012; 20:244–247.
239. Novotný D, Vaverková H, Karásek D, Halenka M. Adiponektin – parametr s protizánětlivým a protiaterogenním potenciálem. *Klin Biochem Metab* 2008; 16:171–177.
240. Novotny D, Vaverkova H, Karasek D, Lukes J, Slavik L, Malina P, Orsag J. Evaluation of total adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein and fibroblast growth factor 21 levels in individuals with metabolic syndrome. *Physiol Res* 2014 Jan 8. [Epub ahead of print] PMID: 24397811.
241. Lesina M, Wörmann SM, Neuhöfer P, Song L, Algül H. Interleukin-6 in inflammatory and malignant diseases of the pancreas. *Semin. Immunol.*, 2014, 26, p. 80-87.
242. Araki H, Nishihara T, Matsuda M et al. Adiponectin plays a protective role in caerulein-induced acute pancreatitis in mice fed a high-fat diet. *Gut*, 2008, 57, p. 1431-1440.
243. Izumiya Y, Bina HA, Ouchi N, Akasaki Y, Kharitononkov A, Walsh K. FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Lett.*, 2008, 582(27), p. 3805-3810.
244. Kharitononkov, A., Larsen, P. FGF21 reloaded: challenges of a rapidly growing field. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2011, 22(3), p. 81-86.
245. I H. A novel role for the fibroblast growth factor 21 in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2009;137(5):1577-9

246. Cho SJ, Kang MJ, Homer RJ, Kang HR, Zhang X, Lee PJ, et al. Role of early growth response-1 (Egr-1) in interleukin-13-induced inflammation and remodeling. *J Biol Chem* 2006;281:8161-68.
247. Novovic S, Andersen AM, Ersboll AK, Nielsen OH, Jorgensen LN, Hansen MB. Proinflammatory cytokines in alcohol or gallstone induced acute pancreatitis. A prospective study. *J Pancreas* 2009;10:256-62.
248. Nieminen A, Maksimow M, Mentula P, Kyhala L, Kylanpaa L, Puolakkainen P, et al. Circulating cytokines in predicting development of severe acute pancreatitis. *Crit Care* 2014;18: R104. DOI:10.1186/cc13885.
249. Gariani K, Drifte G, Dunn-Siegrist I, Pugin J, Jornayvaz FR. Increased FGF21 plasma levels in humans with sepsis and SIRS. *Endocr Connect* 2013;2:146-53.
250. Kim KH, Lee MS. FGF21 as a Stress Hormone: The Roles of FGF21 in Stress Adaptation and the Treatment of Metabolic Diseases. *Diabetes Metab. J.* 2014, 38: 245-251.
251. Kishida K, Funahashi T, Shimomura I. Adiponectin as a routine clinical biomarker. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2014, 28:119-130.
252. Xu A, Vanhoutte PM. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*, 2012, 302: 1231-1243.
253. Yoo HJ, Kim S, Park MS et al. Serum adipocyte fatty acid-binding protein is associated independently with vascular inflammation: analysis with (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2011, 96: E488–E492.
254. Li X, Fan X, Ren F et al. Serum FGF21 levels are increased in newly diagnosed type 2 diabetes with nonalcoholic fatty liver disease and associated with hsCRP levels independently. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2011, 93(1):10-16.
255. Lin Z, Zhou Z, Liu Y et al. Circulating FGF21 levels are progressively increased from the early to end stages of chronic kidney diseases and are associated with renal function in Chinese. *PLoS One*, 2011, 6(4), e18398. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018398>.
256. Lin Z, Tian H, Lam KSL et al. Adiponectin Mediates the Metabolic Effects of FGF21 on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Mice. *Cell Metab.*, 2013, 17: 779-789.
257. Charis LJ et al. Fibroblast Growth Factor 21 Reduces the Severity of Cerulein-Induced Pancreatitis in Mice. *Gastroenterology* 2009;137:1795–1