

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA

Zánětlivé markery v krvi

Bakalářská práce

Autor: Jana Nahálková
Vedoucí práce: prof. MUDr. Miloš Velemínský, CSc.

Datum odevzdání: 17.08.2009

ABSTRAKT

Inflammation markers in blood

Laboratory indicators of inflammatory processes (i.e. indicators whose levels are dependent on the development of inflammation) are referred to as inflammation markers. Early diagnosis is vital for a successful therapy. Sensitive and specific signs are employed in patient monitoring. The C-reactive protein (CRP) – an acute-phase protein – is most frequently used in diagnosis. Cytokines have been playing an increasingly important role in diagnosis during the recent years. The evaluation and examination of cytokines is difficult, and only some of them have been used in practice so far.

The group examined included 148 newborns from whom umbilical blood was collected to determine the CRP, IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the blood samples. The CRP levels were measured immunoturbidimetrically on an ADVIA 1650 (Siemens) analyzer. The IL-6 levels were measured on an IMMULITE 2500 (Siemens) analyzer, whereas the IL-8 and TNF- α levels were determined on an IMMULITE (Siemens) analyzer. The two analyzers work on the chemiluminescence principle.

The practical part included evaluation of the levels of each of the markers. TNF- α was the marker which was increased most, viz. by 97.97 %. Subsequently, IL-6 and IL-8 increased: the IL-6 level was 60.81% increased, the IL-8 level was 84.46% increased. The cytokines preceded increase in the CRP level. CRP level increase was observed in 2,03 % newborns.

It is concluded that a high probability of disease in newborns is in groups 3, 4, and 5.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Zánětlivé markery v krvi vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které uvádím v přiložené bibliografii.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě/v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zdravotně sociální fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 17.08.2009

.....
podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat panu Prof. MUDr. Miloši Velemínskému, CSc. za příkladné vedení bakalářské práce. Rovněž bych ráda poděkovala paní Ing. Marii Kašparové z Laboratoře klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a.s. za pomoc, trpělivost a čas, který mi věnovala na vypracování praktické části.

ÚVOD	7
1. SOUČASNÝ STAV	9
1.1 ZÁNĚT	9
1.1.1 DEFINICE ZÁNĚTU	9
1.1.2 Příčina zánětu	9
1.1.3 Lokální a systémová zánětlivá reakce	10
1.1.4 SIRS	10
1.2 Fáze zánětlivé reakce.....	11
1.2.1 Iniciační fáze.....	11
1.2.2 Vrcholná fáze.....	11
1.2.3 Pozdní fáze.....	12
1.3 CYTOKINY	12
1.3.1 Interleukin-1 (IL-1).....	13
1.3.2 Interleukin-6 (IL-6).....	14
1.3.3 Interleukin-8 (IL-8).....	14
1.3.4 Tumor nekrotizující faktor (TNF- α)	15
1.4 Reakce akutní fáze.....	15
1.4.1 Pozitivní proteiny akutní fáze	16
1.4.1.1 CRP	16
1.4.1.2 Sérovy amyloid A.....	16
1.4.1.3 α 1-antitrypsin	17
1.4.1.4 Haptoglobin	17
1.4.1.5 Složky komplementu	17
1.4.3.6 α 2-makroglobulin	18
1.4.1.7 Ceruloplasmin	18
1.4.1.8 Fibrinogen	18
1.4.2 Negativní proteiny akutní fáze.....	19
1.4.2.1 Transferin	19
1.4.2.3 Albumin.....	19
1.4.2.4 Prealbumin.....	19
1.4.4 Charakteristika proteinů akutní fáze využívaných v diagnostice	20
1.5 NOVÉ UKAZATELE ZÁNĚTU	20
1.5.1 Elastáza neutrofilů.....	20
1.5.2 Neopterin	21
1.5.3 Prokalcitonin.....	21
1.6 ANALYTICKÉ METODY	21
1.6.1 Turbidimetrie.....	22
1.6.2 Nefelometrie.....	22
1.6.3. Systém turbidimetrie a nefelometrie	22
1.6.4 Quick Read.....	23
2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY	24
2.1 CÍL PRÁCE	24
2.2 HYPOTÉZA	24
3. METODIKA	25
3. 1 CHARAKTERISTIKA ZKOUMANÉHO SOUBORU	25
3.2 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ.....	25
3.2.1 Preanalytická fáze	25

3.2.1.1 Odběr.....	25
3.2.1.2 Separace	26
3.2.1.3 Transport.....	26
3.2.1.4 Skladování	26
3.3.2 Analytická fáze	26
3.3.3 Postanalytická fáze.....	27
3.4 PRINCIPY STANOVENÍ.....	27
3.4.1 CRP	27
3.4.2 IL-6.....	27
3.4.3 IL-8.....	28
3.4.4 TNF- α	28
3.4.4.1 Obecný princip stanovení interlekinů	28
3.5 POPIS PRÁCE.....	28
4. VÝSLEDKY	30
4.1 TABULKA NAMĚŘENÝCH HODNOT	30
5. DISKUZE	36
6. ZÁVĚR.....	38
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39
8. KLÍČOVÁ SLOVA.....	43
9. PŘÍLOHY.....	44
9.1. NAMĚŘENÉ HODNOTY ZKOUMANÉHO SOUBORU	44

ÚVOD

Laboratorní ukazatele přítomnosti zánětlivého procesu se obvykle nazývají zánětlivé markery, jejichž hladiny se mění v důsledku a vývoje zánětu. Jedná se především o proteiny akutní fáze lišící se koncentrací, velikostí molekuly a samozřejmě i svou funkcí. Existuje celá řada markerů ukazující zánětlivou reakci vždy z určitého pohledu. (20)

Počátek výzkumu proteinů akutní fáze začal v roce 1930, kdy byla objevena plasmatická bílkovina, která byla nazvána C-reaktivní protein (CRP). Během následujících desetiletí vstoupil CRP do diagnostiky a brzy následovaly další proteiny, které i když v organismu plní nejrůznější funkce, vykazují v zánětové odpovědi podobnou dynamiku. Přes četné metodologické a ekonomické otázky, které zatím nebyly vyřešeny, pronikají do diagnostiky cytokiny. Historie výzkumu cytokinu se datuje od roku 1932, kdy byla popsána první solubilní signální molekula leukocytu. Hlavní éra cytokinu začala po roce 1980. (17)

V roce 1920 byla zavedena do diagnostiky laboratorní metoda sedimentace erytrocytů, která představovala velký laboratorní pokrok. Sedimentace erytrocytů je nepřímé stanovení hladiny plazmatických proteinů a může být značně ovlivněna tvarem, velikostí a počtem erytrocytů a dalšími komponenty plazmy. Dnes, když může hladiny proteinů stanovit přímo, jeví se její použití omezené. (19)

Od optimálního zánětového ukazatele, vhodného pro rutinní stanovení a vyhovující ho z hlediska diagnostického se očekává vysoká senzitivita a specifita, možnost statimového stanovení, cenová dostupnost a snadná interpretace výsledků. S jistotou můžeme říci, že žádný parametr cytokinů a proteinů akutní fáze nesplňuje tyto kritéria beze zbytku a zejména ne ve všech klinických situacích. Volbu konkrétního markeru pak musí lékař zvážit s ohledem na daného pacienta, uvažovanou diagnózu a další doprovodná onemocnění. (17,28)

Diagnostikovat zánět může být někdy velmi složité vzhledem k nescifickému charakteru průvodních klinických příznaků. Pokud nejsou přítomny specifické příznaky nemoci, může být identifikace infekce velmi

problematická. Léčebná strategie začíná vždy na základě kombinace klinických a laboratorních nálezů. Rozlišení původu zánětu je předpokladem správného terapeutického postupu, zahájení antibiotické léčby či případného zvážení nemocniční péče. (19)

1. SOUČASNÝ STAV

1.1 Zánět

1.1.1 Definice zánětu

Zánět je fylogeneticky a ontogeneticky nejstarším obranným mechanismem vyskytujícím už u nejprimitivnějších živočichů. (7)

Jako zánět se označuje souhrn fyziologických reakcí na porušení integrity organismu a jedná se tedy o odpověď těla na poškození buněk a tkání. (7,9)

Zásadní úlohu v zánětové reakci hraje imunitní systém, není však jedinou tělní soustavou, která se v obraně organismu uplatňuje. Spolu s imunitními mechanismy sehraávají rovnocennou úlohu neuroendokrinní regulace. Ty jsou schopny identifikovat nežádoucí změny, které vycházejí z vnějšího a vnitřního prostředí. Imunitní systém je zaměřen na rozlišení potenciálně poškozujících prvků infekčního charakteru a rozpoznává nebezpečné signály, které vycházejí z vlastních buněk a tkání. (7,15)

Zánět se dělí podle různých kritérií- na obranný a poškozující, akutní a chronický, povrchový a hluboký apod. (7,16)

Obranný zánět má krátký průběh a infekce nebo jiná škodlivina se odstraní bez nežádoucího poškození a tkáň se kompletně zhojí. Pokud v průběhu zánětlivé reakce převládají nežádoucí složky, mění svůj charakter a vzniká zánět poškozující s chronickým průběhem. (9,15)

1.1.2 Příčina zánětu

Na vzniku zánětu se podílí nejrůznější příčiny. Poškození mohou vyvolat mechanické (odřeniny), chemické (jedy), fyzikální (popáleniny) faktory. K nejčastějším biologickým faktorům patří bakterie. Dalšími původci jsou viry, plísňe a prvoci. Mikroorganismy vyvolávají v těle složitou odpověď, na které se podílejí specifické a nespecifické imunitní mechanismy. (7,16,27)

1.1.3 Lokální a systémová zánětlivá reakce

Podkladem příznaků lokálního zánětu je vasodilatace a zvýšená propustnost kapilár v postiženém místě. Zánětem postižené místo v první fázi zčervená (rubor) a dochází k většímu průtoku krve. Rozšíření cév podmiňuje zduření (tumor), zvýšení místní teploty (calor) a rozvíjení bolesti (dolor). Jejich následkem může být za určitých okolností způsoben defekt tkáně (functio leasa). (16,26,27)

K systémové zánětlivé reakci různé intenzity může dojít v závislosti na rozsahu a délce trvání lokálního zánětu. Pokud dojde k masivnímu proniknutí mikroorganismů do krevního oběhu, vyvíjí se septický šok nebo dojde k aktivaci zánětotvorných elementů neinfekčního charakteru způsobujících anafylaktický šok. Při těchto šokových stavech dochází k masivní vazodilataci, která je způsobená uvolňováním zánětlivých mediátorů a dalších faktorů. Základem léčby při těchto stavech je podpora krevního oběhu a udržení cévního tonu. Dochází ke spuštění kaskády SIRS. (9,26)

1.1.4 SIRS

Na inzult systémové povahy organismus odpovídá fyziologicky celotělovou odpovědí. SIRS je systémová odezva na exogenní inzulty. Představuje akutní ohrožení organismu s komplexním narušením homeostázy ve snaze lokalizovat a eliminovat patogen infekčního a neinfekčního charakteru. SIRS může vyústit až do stavu multiorgánového selhání, kdy orgánové funkce nejsou dostačující pro udržení homeostázy. Jako sepse je označován SIRS s doloženou infekcí. Syndrom multiorgánového selhání je systémovou poruchou vedoucí k hyperperfuzi orgánů, tkáňové hypoxii, eventuelně ke smrti. (17,26,28)

SIRS se projevuje dvěma a více následujícími příznaky jako je hypotermie pod 36 °C, hypertermie nad 38 °C, tachykardie vyšší než 90/min, tachypnoe vyšší než 20/min, pCO₂ nižší než 4,3 kPa, leukocytóza nad 12·10⁹/l nebo leukopenie pod 4·10⁹/l, nebo přítomnost více než 10% nezralých forem leukocytů.(17,28)

1.2 Fáze zánětlivé reakce

V průběhu zánětové reakce těla organismus přehodnocuje své priority a přizpůsobuje se na zátěž. S tím souvisí i přestavba metabolismu. V průběhu zánětu jsou mobilizovány energetické rezervy a živiny jsou získávány odbouráváním některých tkání. Na tyto zmíněné potřeby těla reaguje neuroendokrinní systém. To se projeví změněným chováním osob a pocity únavy, malátnosti a nechutenství. Jednotlivé zánětlivé fáze se prolínají, neboť dynamika obranných fází je zcela individuální. Je určena genetickou dispozicí každého jedince a typem podnětů vedoucích k zánětlivé reakci. (15)

Cílem reakce je lokalizovat škodlivé agens, eliminovat ho a navodit opravné mechanismy, které by tkáni vrátily její fyziologickou funkci.(18,26)

Zánětlivé reakce se účastní všechny buňky imunitního systému, multienzymové systémy krevní plazmy (komplementový, hemokoagulační, fibrinolytický, kininový), prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny, proteiny akutní fáze a metabolity kyseliny arachidové a další mediátory. (6,7)

1.2.1 Iniciační fáze

Nastává bezprostředně po podnětu a je časově omezena na hodiny až dny. Ze složek imunitního systému v této fázi jednoznačně dominují mechanismy přirozené imunity.(15)

Do poškozených a infikovaných tkání se dostávají buněčné elementy, které se zachycují na povrchu endoteliálních buněk cév. Prostup fagocytů mezi endoteliálními buňkami je umožněn diapedézou a extravazací. Migrace fagocytů je zprostředkována chemotaktickými faktory. Ty zajistí, aby podle potřeb organismu došlo k akumulaci potřebných buněk v místě zánětu. Usměrněný pohyb buněk je podmíněn změnami adhezivních molekul. Fagocyty začínají na svém povrchu exprimovat antigeny a vylučovat poplachové cytokiny. (9,15)

1.2.2 Vrcholná fáze

Aktivovaná specifická imunita při vrcholné fázi je důležitá pro dokončení

obranu organismu a vytváří podmínky pro rozvoj imunologické paměti. Do sekundárních lymfatických orgánů putují dendritické buňky, které překládají antigeny T-lymfocytů v kontextu molekul HLA I. a II. třídy. Předkládány jsou pouze podněty, které byly přirozenou imunitou určeny jako nebezpečné. Th1-lymfocyty migrují do místa zánětu, kde stimulují makrofágy a jejich přeměnu v aktivované makrofágy. Ty poté zvyšují svoji fagocytární a cytotoxickou aktivitu. Stimulované B-lymfocyty realizují tvorbu protilátek. V souvislosti s eliminací podnětů dochází k utlumení proliferace lymfocytů a buněk, které se stávají nadbytečnými, hynou apoptózou.(9,15,26)

1.2.3 Pozdní fáze

Zároveň aktivací zánětlivých mechanismů dochází k reparačním procesům, které mají zajistit obnovu tkáňové integrity. Reparační procesy spočívají v eliminaci poškozených buněk fagocyty, aktivaci angiogeneze a regeneraci tkání. Proces je regulován řadou cytokinů a enzymů. Každý proces hojení je spojen s jistou mírou fibrotizace a omezení funkční kapacity tkáně. (9,15)

1.3 Cytokiny

Po narušení integrity vnitřního prostředí organismu, těsném sledu za lokálními ději dochází k aktivaci imunitního systému s produkcí sekrečních proteinů a peptidů. Hlavní úlohou těchto cytokinů je usměrnění funkce a proliferace buněk a tkání v průběhu lokální nebo systémové zánětové odpovědi. Pro normální funkci imunitního systému jsou nezbytné, pokud jsou produkovány ve správném množství ve správné době. (7,28)

Funkcí cytokinů je regulace imunitních reakcí a přenos signálů mezi imunitním systémem a ostatními orgány v těle. Regulují směr, rozsah a délku trvání imunitních reakcí, a dále utváření tkání během ontogenetického vývoje jedince. Cytokiny jsou rozpustné glykoproteiny sekretované leukocyty i jinými buňkami. Jsou obvykle složeny ze 100 až 200 aminokyselin. Působí již při velmi nízkých koncentracích a ke svému účinku potřebují specifický receptor na cílové

buňce. Společnou charakteristikou je nízká molekulární hmotnost ($M_r < 80$ kDa) a převažující autokrinní a parakrinní působení. Účinky cytokinů se překrývají a vzájemně ovlivňují. Stejně cytokiny jsou sekretovány různými typy buněk a naopak jeden typ buněk tvoří škálu cytokinů s různými účinky. Na tomto principu je založena cytokinová síť, která je zodpovědná za celkové účinky cytokinů. Jejich životnost je velmi krátká, což značně snižuje jejich možnost monitorování při patologických procesech. (9,17,28)

Prozánětlivé cytokiny představují mocnou, účelnou a cílenou odpověď určenou k obraně infekčních agens a obnově tělesných funkcí k normálu. Působí jako stresové hormony a jsou tvořeny makrofágy a monocyty. Indukují tvorbu proteinů akutní fáze, navozují horečku a fagocytární aktivitu makrofágů a neutrofilů. Při katabolických pochodech využívají periferní energetické zásoby pro pokrytí akutních metabolických potřeb v ložisku zánětu. V důsledku nepřiměřené aktivity může vzniknout kachexie, která se rozvíjí u chronických infekcí. Mezi prozánětlivé cytokiny patří $TNF\alpha$, IL-6, IL-8, IL-1. (7,28)

Finální úlohou protizánětlivých cytokinů je proliferace fibroblastů a resorpce degradačních produktů vedoucích k obnově poškozené tkáně. Protizánětlivými cytokiny jsou IL-4, IL-10 a $TGF-\beta$. (7)

1.3.1 Interleukin-1 (IL-1)

Vyskytuje se ve dvou formách. Obě tyto varianty mají stejnou molekulovou hmotnost a váží se na stejné receptory a jejich účinky jsou totožné. Dominující cirkulující formou je IL-1 β a IL-1 α je vázán na buněčné struktury. Obě tyto formy jsou tvořeny především monocyty a makrofágy, ale i fibroblasty, NK-buňkami a B-lymfoblasty. Při stimulaci bakteriálními antigeny, imunokomplexy a jinými cytokiny je produkován prakticky všemi buňkami. Buňky secernující IL-1 často samy vytváří receptor pro IL-1 a mohou se autokrinně aktivovat. Biologické účinky jsou mnohočetné a překrývají se s účinky TNF a IL-6. Vyvolává horečku, spavost, anorexii, neutrofilii a při větším množství neutropenii. Dále se podílí na aktivaci T a B lymfocytů, sekreci ACTH, ale též podporuje cytotoxický účinek na

B-buňky Langerhansových ostrůvků. IL-1 působí jako endogenní pyrogen a významnou měrou s ostatními cytokiny přispívá ke vzniku chronicky zánětlivých onemocnění, jakými jsou revmatoidní artritida, glomerulonefritida a systémový lupus erythematosus. Koncentrace IL-1 β je zvýšena při popáleninách, u pacientů s renální insuficiencí, jaterních cirhóz a Crohnovy choroby. (17,18,25,)

1.3.2 Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 je jedním z klíčových faktorů reakce akutní fáze společně s IL-1. Reguluje všechny hlavní a pozitivní proteiny akutní fáze. IL-6 působí jako víceúčelový cytokin na celou řadu buněk. Je finálním diferenciačním faktorem antigen stimulujících B-buněk, zvyšuje produkci imunoglobulinů z plasmatických buněk, podílí se na aktivaci a proliferaci thymocytů a T-buněk, indukují tvorbu IL-2 a expresi jeho receptorů. Kromě toho spolu s IL-3 a GM-CSF ovlivňují krvetvorbu. IL-6 stimuluje vyzrání megakaryocytů a erythropoetinu. Indukují proliferaci keranocytů a diferenciaci neuronů. Abnormální produkce IL-6 je spojena s řadou patologických onemocnění. Uplatňuje se v patogenezi některých nádorů, kde IL-6 produkují samotné nádorové buňky. Hladina je zvýšená při všech zánětlivých procesech a autoimunitních onemocnění, rovněž u virových a bakteriálních meningitid, kde lze vzestup prokázat i v likvoru a moči. Koncentrace se zvyšuje především u septického šoku vyvolaného gramnegativními bakteriemi a v cirkulaci se objevuje už po několika minutách. Hraje důležitou úlohu v reakci organismu na chirurgický zákrok a uvolnění kortikosteroidů při zánětu.(17,21,25)

1.3.3 Interleukin-8 (IL-8)

IL-8 má chemotaktické účinky na příslušné granulocytární buňky. Vedle tohoto základního působení stimuluje adhezi leukocytů k endoteliím. Je hlavním lokálním mediátorem zánětu, kde vyvolává migraci granulocytů z krevního řečiště do tkáně a způsobuje uvolnění enzymů z granul neutrofilů. Mezi buňky, které tvoří IL-8, patří monocyty, fibroblasty, Kupfferovy buňky a endotel. Během

SIRS může být tvořen i v hepatocyty a parakrinně modulovat syntézu proteinů akutní fáze nezávisle na plasmatických koncentrací IL-8. Podmiňuje infiltraci neutrofilů v patologických procesech při psoriáze, artritidě, pneumonii, infarktu myokardu a při rejekční reakci po transplantaci orgánů. Jeho syntézu indukuje LPS a především TNF,IL-1, A INF- γ , ne však IL-6. (17,18)

1.3.4 Tumor nekrotizující faktor (TNF- α)

Existují dvě formy, TNF- α je produkován makrofágy, astrocyty a Kupfferovými buňkami a TNF- β je produkován lymfocyty. Hlavním podnětem pro sekreci TNF je bakteriální endotoxin. TNF- α aktivuje neutrofile, B-lymfocyty, syntézu proteinů akutní fáze, endotel k tvorbě adhezivních molekul a stimuluje proliferaci vaziva. Inhibuje lipoproteinovou lipázu, při déletrvajících aktivitě vede ke kachektizaci, a má tumorocidní účinky a účinky na CNS. Je cílovým induktorem syntézy IL-1, IL-2, a IL-8. TNF α je důležitým faktorem pro optimální průběh zánětové odpovědi, ale na druhou stranu se může uplatňovat v patogenezi řady zánětvých i metabolických onemocněních. (6,18)

1.4 Reakce akutní fáze

Jednou z charakteristik eukaryotických organismů je přítomnost obranných a adaptačních systémů, které slouží k zajištění stability vnitřního prostředí. Tyto fyziologické děje obranné a reparační povahy se označují termínem reakce akutní fáze. (28)

Hlavní význam reakce akutní fáze spočívá v udržení vodní, elektrolytové a teplotní homeostázy, protiinfekčních dějích, vnímání bolestí, odstranění ireverzibilně poškozené tkáně, dostatečné nabídky energie, nabídky stavebního materiálu pro tvorbu protilátek a nabídky pro reparační a regenerační pochody. (17,28)

Je-li zánět dostatečně intenzivní, projeví se změnou koncentrace proteinů, horečkou, leukocytózou a hormonální odpovědí.(18,20)

Proteiny akutní fáze se tvoří ve zvýšené míře v buňkách jaterního

parenchymu po navození zánětlivou škodlivinou, nejde tedy pouze o vyplavení ze zásoby v jaterní tkáni. Syntéza a sekrece proteinů je primárně kontrolována prozánětlivými cytokiny a podílejí se na ní i glukokortikoidy.(18)

Plasmatické proteiny jsou často děleny v agarozovém gelu podle elektroforetické pohyblivosti do pěti frakcí. Pouze albumin tvoří relativně homogenní frakci a ostatní frakce jsou značně heterogenní. (4,20)

1.4.1 Pozitivní proteiny akutní fáze

Tyto proteiny jsou charakteristické rychlou odpovědí a jejich plasmatická hladina během zánětu stoupá. Nárůst může být až 1000 násobný oproti fyziologické hodnotě, což je charakteristické zejména pro CRP. Zvýšení hladiny o 50 % je typické pro ceruloplasminu a C3 složku. Haptoglobin, fibrinogen a α - globuliny se vyznačují tím, že jejich hladina se zvětší 2-4x během zánětlivého procesu. (8,18)

1.4.1.1 CRP

Je nazván podle schopnosti precipitovat C-polysacharid pneumokoků. Skládá se z pěti identických neglykolysovaných polypeptidických podjednotek, která může vázat Ca^{2+} Patří do skupiny pentraxinů, což je skupina proteinů, která se účastní obrany organismu. CRP aktivuje komplementový systém a váže různé ligandy např. sacharidový obal pneumokoků a fosfocholinové skupiny membránových zbytků. Oponizuje fragmenty nukleových kyselin a histonů a tím umožňuje jejich rychlejší odstranění. Tím se tak zabrání tvorbě autoprotilátek proti jaderným elementům. Stimuluje lymfocyty a aktivaci monocytů. (18,21,23)

1.4.1.2 Sérový amyloid A

Sérový amyloid A jsou malé lipoproteiny, které se během akutní fáze zánětu spojují s třetí složkou lipoproteinů o vysoké denzitě. Tato vazba zvyhodňuje vychytávání cholesterolových zbytků z fagocytujících makrofágů, tím se snižuje podíl cholesterolu transportovaný z endotelu periferních tkání do jater. Tento

marker má užitečnou funkci u akutních infekcí, kde obraňuje lipidové zbytky buněčných membrán. U chronických zánětlivých chorob, zejména TBC a systémový lupus erythematosus, může naopak velmi škodit. Důsledkem je vznik amyloidózy. (6,18)

1.4.1.3 α 1-antitrypsin

Působí jako účinný inhibitor proteináz neutrofilů a tím přispívá k regulaci jejich účinku. Chrání tak vlastní tkáň před účinkem proteolytických enzymů, zejména elastázy a kolagenázy. (4,18)

Zvýšená koncentrace doprovází akutní záněty, nádory a hepatopatie. Příčinami snížení mohou být primární plicní emfyzém, hepatitida, cirhóza a glomerulonefritida. (21,22)

1.4.1.4 Haptoglobin

Haptoglobin váže velmi pevně molekulu volného hemoglobinu. Při hemolytických onemocněních vedoucích k intravazální hemolýze jsou volné molekuly hemoglobinu navázány na haptoglobin. Vytvořený komplex je velmi rychle odstraněn z plazmy a metabolizován v retikuloendoteliálním systému. (4,18,21)

Při větší intravazální hemolýze tak dochází k poklesu až vymizení haptoglobinu z plazmy. Snížená nebo neměřitelná koncentrace je laboratorním testem, který svědčí pro intravaskulární hemolýzu. Haptoglobin se zvyšuje při zátěži, což způsobuje nemožnost vyloučení hemolýzy. (4,20)

1.4.1.5 Složky komplementu

Jako komplement se označuje komplex 30 sérových a membránových proteinů, které jsou v plazmě v neaktivní formě. Hlavními složkami je 9 sérových proteinů označované C1-C9. Jejich aktivace vede kaskádovou reakcí k lýze bakterií a jiných buněk. (6,20)

Nejčastěji se stanovují složky C3 a C4. Vzestup složek doprovází reakci

organismu na akutní zátěž. Při autoimunitních onemocněních koncentrace složek klesá z důvodu tvorby imunokomplexů. (20)

1.4.3.6 α 2-makroglobulin

Působí jako inhibitor proteináz. Je produkován zejména makrofágy. Reguluje proteolytickou rovnováhu v extracelulárních procesech uplatňujících se především při krevním srážení, fibrinolýze a zánětu. Jeho sérové hladiny se zvyšují zejména u nefrotického syndromu a atopické dermatitidy.(6,21)

Někdy je zvýšení pozorováno u hepatopatií a fyziologicky v dětském věku. Koncentrace v séru klesá při akutní pankreatitidě. (20)

1.4.1.7 Ceruloplasmin

Obsahuje ve své molekule 6 atomů mědi. Jednou z hlavních funkcí ceruloplazminu je účast při metabolismu železa. Železo, které se ve dvojmocné formě vstřebává ze střeva, musí být před navázáním na transferin, oxidováno na trojmocnou formu pomocí ceruloplazminu. (4,20,22)

Zabraňuje vzniku hydroxylového radikálu. Zvýšenou koncentraci způsobují estrogeny, provází hormonální antikoncepci a těhotenství. Snížená koncentrace může být způsobena deficitem mědi nebo poklesem produkce bílkovin při proteinové malnutrice nebo nefrotického syndromu. (2,18,20)

1.4.1.8 Fibrinogen

Fibrinogen je koagulačním faktorem. Reguluje přeměnu na fibrin, který má schopnost utěsnit trhliny způsobené poškozením cév a zabránit tak dalšímu krvácení. Další důležitou funkcí je tvorba fibrinové matrix umožňující pohyb fibroblastů. (18)

Vysoké koncentrace nacházíme u zánětlivých chorob pojiv. Pokles koncentrace je způsoben nedostatečnou syntézou u těžkých hepatopatií, fibrinolytické léčbě nebo zvýšenou spotřebou při diseminované intravaskulární koagulopatii, infarktu myokardu, nefrotického syndromu. (22,28)

1.4.2 Negativní proteiny akutní fáze

Prozánětlivé cytokiny inhibují syntézu a sekreci proteinů a koncentrace se v krevní plazmě snižuje. Na poklesu hladiny se výrazně podílí i vystupňovaný katabolismus. Patří sem transferin, prealbumin a albumin. (8,18)

1.4.2.1 Transferin

Obsahuje 2 atomy železa. Hlavní funkcí transferinu je transport trojmocných železitých iontů z enterocytů do míst, kde probíhá syntéza hemoglobinu a krvetvorba. Koncentrace transferinu určuje vazebnou kapacitu pro železo. Za normálních okolností je kapacita využita z 1/3. (4,20)

Snížené hodnoty se vyskytují u proteinové malnutrice, jaterních insuficiencí a nefrotického syndromu, vzácněji u vrozeného deficitu. Vzhledem ke krátkému poločasu se využívá transferin společně s prealbuminem k posouzení a monitorování stavu výživy. Zvýšené hodnoty se nacházejí u anémie z nedostatku železa. (4,22,28)

1.4.2.3 Albumin

Albumin se vyznačuje schopností vázat velká množství endogenních a exogenních sloučenin reverzibilní vazbou. Plasmatický albumin je jedním z parametrů celkového zdraví a má význam pro udržení acidobazické rovnováhy. Hypoalbuminémie je spojena s akutními záněty, hepatopatiemi, nádory nebo popáleninami. Kvantitativní změny molekuly albuminu u renálních onemocnění vedou k poškození nefronu. Arteficiálně dochází k poklesu při infuzní léčbě. Zvýšené hodnoty nemají větší význam a jsou důsledkem hemokoncentrace. (17,28)

1.4.2.4 Prealbumin

Prealbumin je transportní protein pro tyreoidální hormony a vytváří komplex s bílkovinou transportující vitamín A. Nízká molekulová hmotnost transportující bílkoviny brání vytvořenému komplexu ztrátám do moči. (4,20)

Pokles koncentrace je výrazem těžkých hepatopatií či proteinových malnutricí. Zvýšené koncentrace mohou nastat u hyperfunkce nadledvin a Hodgkinovy choroby. (22,28)

1.4.4 Charakteristika proteinů akutní fáze využívaných v diagnostice

Protein	Plasmatická koncentrace (g/l)	Elektroforetická pohyblivost	Mr (kDa)	Poločas eliminace (dny)
CRP	0,00-0,01	γ -globulin	110	<0,05
Sérový amyloid A	0,0-0,02	-	13	0,04
α 1-antitrypsin	1,2-2,4	α ₁ -globulin	52	3,9
Haptoglobin	0,3-3,0	α ₂ -globulin	100	2-4
Ceruloplazmin	0,2-0,4	α ₂ -globulin	135	4-10
Fibrinogen	2,0-4,0	β ₁ -globulin	340	5,1
Transferin	2,2-3,6	β ₁ -globulin	80	7-9
Albumin	35,0-50,0	albumin	67	19-20
Prealbumin	0,19-0,39	prealbumin	61	1,9-2,7
α 2-makroglobulin	1,2-2,4	α ₂ -globulin	725	7-8

Zdroj: (17)

1.5 Nové ukazatele zánětu

Diagnostické možnosti u pacientů s akutními zánětlivými stavy jsou obohacovány o stále se rozšiřující spektrum markerů. I když jsou nepochybně důležité z hlediska diagnostického i prognostického, jejich většímu rozšíření brání ekonomické důvody. (20)

1.5.1 Elastáza neutrofilů

Je to protein, který je tvořený prekurzory buněk myeloidní řady pod vlivem růstových faktorů. Při zánětovém stimulu dochází k translokaci elastázy z granul na buněčný povrch a k následné degranulaci. (17,20)

Elastáza je vysoce senzitivní marker aktivace polymorfonukleárních leukocytů. Plasmatické koncentrace elastázy stoupají z normálních hodnot (90-180 mg/l) po zánětovém stimulu na 10 násobky. Zvýšené hladiny jsou popisovány

u novorozeneckých sepsí, TBC, alergických a autoimunitních onemocnění. (17)

1.5.2 Neopterin

Je purinový derivát, který je produkován makrofágy po jejich stimulaci INF- γ , který je produkován T-lymfocyty po rozpoznání antigenu. (6,21,28)

Neopterin se nyní využívá jako pomocný ukazatel pro časnou detekci HIV infekce, kdy se hladina zvyšuje úměrně se sníženým počtem pomocných T-lymfocytů. To patří mezi hlavní znaky, podle kterých se dá určit přechod od asymptomatické fáze infekce HIV ke klinickým projevům AIDS. (6,22)

Používá se i k monitorování pacientů po transplantaci ledvin, srdce a kostní dřeni. V případě rejekce transplantátu nebo reakce štěpu proti hostiteli se zvýšené hladiny neopterinu projeví již 24-48 hod před klinickými příznaky komplikace. Plasmatická hladina za klidových podmínek se pohybuje mezi 0,3-3,0 $\mu\text{g/l}$. (17)

1.5.3 Prokalcitonin

Je bílkovina identická s prohormonem kalcitoninu. Ve zdraví je produkován C-buňkami štítné žlázy. U nemocných jsou za jeho zdroj považovány neuroendokrinní buňky plic a tenkého střeva, ale i mononukleární leukocyty. (22,28)

Referenční hodnoty v plazmě či v séru jsou pod 5 $\mu\text{g/l}$. Infekce, které jsou omezené na jeden orgán, mívají hodnoty maximálně do 5 $\mu\text{g/l}$. Hodnoty u sepsí bývají nad 10 $\mu\text{g/l}$, ale mohou dosahovat více než 500 $\mu\text{g/l}$. Proto se tedy jeví prokalcitonin jako vhodný maker, který umožňuje rozeznat infekce lokalizované od systémových. (18,22)

1.6 Analytické metody

Turbidimetrické a nefelometrické postupy jsou běžnými optickými analytickými metodami, používané v klinické biochemii ke stanovení specifických proteinů. (1)

1.6.1 Turbidimetrie

Turbidimetrie je založená na měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích. (22,24)

Jako zdroj světla využívá obvykle diodu a detektor je umístěn proti zdroji světla. (1,24)

1.6.2 Nefelometrie

Nefelometrie je založená na měření intenzity difúzně rozptýleného světla na dispergovaných částicích. (22,24)

Zdrojem světla bývá výbojka nebo laser. Detektor není umístěn proti zdroji. Velikost úhlu světla od laserového paprsku bývá rozdílná u různých systémů. (1,24)

1.6.3. Systém turbidimetrie a nefelometrie

Jak turbidimetrie tak i nefelometrie jsou uspořádány do dvou systémů. (1,10)

Prvním systémem se nazývá „end point“. Po smíchání antigenu a protilátky v pufru a polyetylenglykolu probíhá měření až po dosažení rovnovážného stavu, obvykle za 10-20 minut. Systém se nemusí vyrovnat se situací, kdy ve vzorku je velké množství měřené látky. Pak lze u koncentrovaného vzorku získat falešně nízkou hodnotu měření. Proto je systém nastaven tak, aby linearita reakce mezi antigen-protilátkou byla co největší a měření probíhalo v oblasti lineární části křivky.(1)

Druhý systém je kinetický. Kyveta je opatřena míchacím systémem a měření začíná v okamžiku, kdy se do kyvety obsahující polyetylenglykol, pufr a antigen přidá protilátka. Reakce je velmi rychlá a měří se přírůstek vzniku precipitátu v pravidelných intervalech. Program vyhodnocuje nárůst hodnot. Po dosažení rovnovážného stavu je měření ukončeno. Kinetický systém detekuje podle typu nárůstu precipitátu netypické koncentrace měřené látky. Reakce antigenu se může na závěr korigovat přidáváním naředěného antigenu nebo další

dávky protilátky a okamžitě provést dotitrování nadbytku antigenu či protilátky.(1)

1.6.4 Quick Read

Quick Read je jednoduchým turbidimetrem firmy Orion Diagnostica a je určen ke stanovení CRP v intervalu koncentrací 5–160 mg/l a ke stanovení mikroalbuminurie, zejména v ordinacích lékařů. Zdrojem světla jsou světlo emitující diody (LED). Přístroj pracuje na síťový nebo bateriový pohon a stanovení lze provést z 20 µl krve nebo séra za 4 minuty. Používají se jednoúčelové zkumavky obsahující navážku specifické protilátky a blank se měří u každého individuálně. Na magnetické kartě je software kalibrace.

(24)

2. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

2.1 Cíl práce

Cílem práce je získat přehled o laboratorních diagnostických metodách stanovení zánětlivých markerů. Osvojit si teoreticky i prakticky metody stanovení a seznámit se s jednotlivými zánětlivými markery.

2.2 Hypotéza

Hypotéza: Hodnoty CRP a cytokinů pro diagnostiku zánětu u novorozenců mají stejný vypovídající diagnostický význam.

3. METODIKA

3.1 Charakteristika zkoumaného souboru

Zkoumaný soubor tvoří 148 novorozenců, kteří byli vyšetřováni v Laboratoři klinické chemie Nemocnice České Budějovice, a. s. Novorozencům byla po porodu odebrána pupečnicková krev na oddělení Neonatologie České Budějovice, a. s.

3.2 Laboratorní vyšetření

Laboratorní vyšetření má tři fáze:

- Preanalytickou
- Analytickou
- Postanalytickou

3.2.1 Preanalytická fáze

Preanalytická část se významně podílí na správnosti laboratorního vyšetření. Až 60% chyb při laboratorním vyšetření vzniká v této fázi. Je definována jako postup a operace od indikace vyšetření po zahájení analýzy vzorku. (10,28)

3.2.1.1 Odběr

Nejčastější chyby se týkají odběru materiálu od pacienta a jeho označení. K zásadám při odběru materiálu patří především přesná a jednoznačná identifikace biologického materiálu. Je nezbytné označit vzorek čárovým kódem nebo štítkem, aby při jeho transportu a zpracování nemohlo dojít k záměně. (10,28)

Krev odebírat nejlépe vakuovým systémem. Gelové separátory plazmy, resp. séra a krevních elementů jsou tvořeny inertním gelem. Gel je silikonový anebo z polyesterových sloučenin. Viskozita gelu se při centrifugaci snižuje, gel stoupá a po centrifugaci se obnoví původní viskozita gelu. Gel vytvoří nepropustnou bariéru mezi sérem (plazmou) a sraženinou s krevními elementy.

Separáční gely by se měly pouzivat pri 20 – 25 °C, protože pri nižší teplotě se poškozují migrační vlastnosti gelu a prii vysok teplota gel dekomponuje. Již jednou centrifugovan gel se nesmí znovu centrifugovat. (28)

Zsadn chybou pri odběru je volba nevhodného protisrzlivho činidla nebo nedodrzení poměru mezi krví a protisrzlivm činidlem. (28)

3.2.1.2 Separace

Pro oddělení krevních elementů od sra je vhodn centrifugace pri 1000 a 1500 otáček po dobu 10 minut pri pokojov teplotě. Deli doba centrifugace a vti počet otáček vede k hemolýze. Plazma či sérum mají být odděleny co nejdrve, nejpozději vsak do 2 hodin po odběru. Predčasné oddělení sra mříže vést k tvorbě fibrinu. (28)

3.2.1.3 Transport

Transport materiálu musí bt šetrn, rychl a pri adekvtn teplotě. Pri delim transportu je vhodni materiál posílat v chlazenm boxu. Pokud nelze dopravit krev do požadovan doby, je vhodni zaslat do laboratore sérum nebo plazmu. (10,28)

3.2.1.4 Skladování

Pokud je vzorek zpracován do 24-48 hodin postačí uchování pri teplotě 4°C, pro dlouhodob skladování je vhodn teplota do -20°C, popř. až -80°C . Pri skladování je nutné, aby materiál byl dobre uzavren. Zabran se tm mikrobiln kontaminaci, vlivu světla, zahutn vzorku odpařovnm a metabolismu krevních elementů. (28)

3.3.2 Analytick fáze

Analytick fáze zahrnuje zpracování biologického materiálu. Je prováděna v laboratori v souladu s postupy sprvn laboratorní činnosti (extern a intern)

kontroly kvality).(20,28)

3.3.3 Postanalytická fáze

Zahrnuje interpretaci výsledků stanovení k fyziologickým hodnotám, k výsledkům dalších laboratorních vyšetření a ke klinickému obrazu pacienta. V této části je důležitá spolupráce mezi laboratoří a indikujícím lékařem. (20,28)

3.4 Principy stanovení

3.4.1 CRP

- analyzátor ADVIA 1650

Stanovení koncentrace CRP pomocí fotometrického měření je založeno na reakci antigen-protilátka mezi protilátkami proti lidskému CRP a CRP přítomným ve vzorku. Stanovení trvá 10 minut při vlnové délce 340 nm a teplotě 37°C. Výsledky se udávají v mg/l.

Vzorek: sérum nebo plazma (EDTA, heparin)

Referenční hodnoty CRP:

- koncentrace dospělí < 5 mg/l
- koncentrace novorozenci do 3 týdnů < 4,1 mg/l
- koncentrace kojenci a děti < 2,8 mg/l (2)

3.4.2 IL-6

- analyzátor IMMULITE 2500

Stanovení koncentrace IL-6 představuje sekvenční enzymem značenou chemiluminiscenční imunometrickou reakci v pevné fázi. Výsledky se udávají v pg/ml.

Vzorek: sérum nebo plazma (EDTA, heparin)

Referenční hodnoty IL-6:

koncentrace < 5,6 pg/ml (14)

3.4.3 IL-8

- analyzátor IMMULITE 1000

Stanovení koncentrace IL-8 představuje oboustrannou chemiluminiscenční imunochemickou reakci v pevné fázi. Výsledky se udávají v pg/ml. 31

Vzorek: sérum nebo plazma (heparin, EDTA)

Referenční hodnoty IL-8:

koncentrace < 60,2 pg/ml (12)

3.4.4 TNF- α

- analyzátor IMMULITE 1000

Stanovení koncentrace TNF- α představuje chemiluminiscenční imunochemickou reakci v pevné fázi. Výsledky se udávají v pg/ml.

Vzorek: sérum nebo plazma (heparin, EDTA)

Referenční hodnoty TNF- α :

koncentrace < 8,1 pg/ml (13)

3.4.4.1 Obecný princip stanovení interleukinů

Stanovení je založeno na reakci jednoho epitopu IL-6 s monoklonální protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou a druhého epitopu IL-6 s protilátkou proti IL-6 konjugovanou s biotinem v reagenčním pufovaném roztoku. Tento vzniklý komplex je navázán na polystyrenové kuličky. Reakce probíhá 60 minut při 37°C. Nenavázaný materiál se odstraní odstředivým promýváním. Přidá se substrát ester adamantyl dioxetan fosfát, který hydrolyzuje stykem s alkalickou fosfatázou za vzniku nestabilního meziproductu. Ten se ihned rozpadá za produkce záření, které se detekuje luminometrem. Intenzita záření je přímo úměrná koncentraci interleukinů ve vyšetřovaném vzorku. (11)

3.5 Popis práce

Zkumavky pro stanovení CRP a cytokinů jsem opatřila čárovým kódem a centrifugovala 5 minut při 3900 otáčkách. Poté jsem odsála sérum kapátkem do

zkumavek rovněž označených čárovým kódem. Protože zkumavky se sérem a krevními elementy se skladují. Ke stanovení stačí 2 ml séra. Spolu se stojánkem jsem zkumavky vložila do analyzátoru. Podle vyšetření, které je u každého pacienta zadáno do počítače dle žádanky, analyzátor stanoví požadované vyšetření. Výsledky jsou následně automaticky podle čárového kódu přiřazeny k pacientovi. Analyzátory jsou propojeny s laboratorním informačním systémem Staprolis.

4. VÝSLEDKY

Výsledky jsou uvedeny v podobě tabulky, sloupcových a kruhových grafů.

4.1 Tabulka naměřených hodnot

V tabulce jsou zahrnuty všechny naměřené hodnoty zkoumaného souboru. V souboru se vyskytuje 8 různých variant naměřených hodnot, které jsem označila jako skupiny.

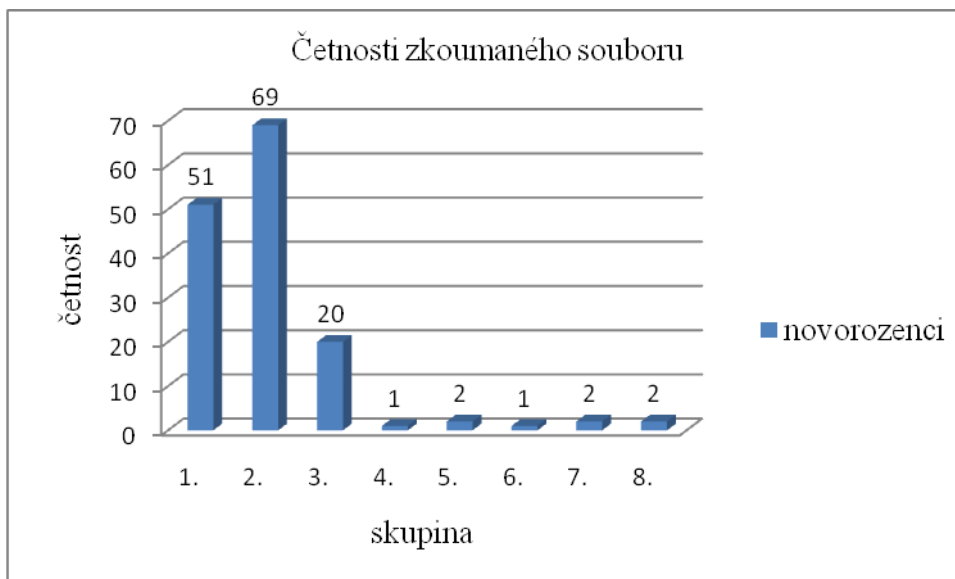
Skupina	CRP	IL-6	IL-8	TNF- α	Počet novorozenců
1.	•	•	•	↑	52
2.	•	↑	•	↑	69
3.	•	↑	↑	↑	19
4.	↑	↑	•	↑	1
5.	↑	↑	↑	↑	3
6.	•	•	↑	•	1
7.	•	•	↑	↑	2
8.	•	•	•	•	2

Zdroj: (vlastní výzkum)

Vysvětlivky k tabulce: ↑ zvýšená hodnota

• fyziologická hodnota

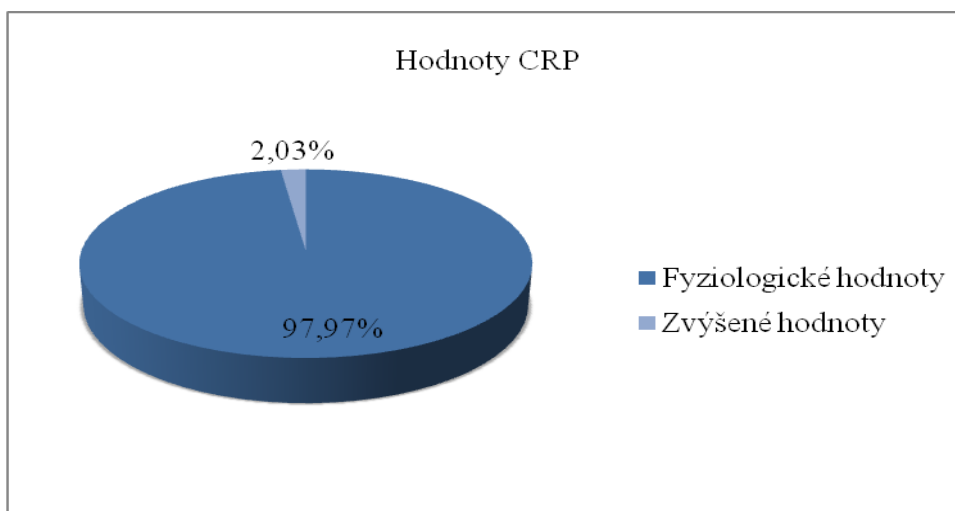
Graf 1: Znázornění četností zkoumaného souboru



Zdroj: (vlastní výzkum)

Graf 1 vychází z předešlé tabulky. Nejvíce početnou skupinu tvoří novorozenci, jejichž hodnoty IL-6 a TNF- α jsou zvýšené. CRP a IL-8 jsou v rozmezí referenčních hodnot. Jejich celkový počet je 69 (skupina 2). Další skupinu tvoří 52 novorozenců, u kterých CRP, IL-6, IL-8 jsou v referenčním rozmezí a TNF- α je zvýšené (skupina 1). Méně početná skupina je tvořena novorozenci, jejichž hodnota CRP je v rozmezí a ostatní parametry jsou zvýšené. Celkový počet je 19 (skupina 3). Počet tří novorozenců má všechny parametry zvýšené (skupina 5). Zvýšené CRP, IL-6, a TNF- α v rozmezí má jeden novorozenec (skupina 4). Pouze 2 novorozenci mají všechny hodnoty v rozmezí referenčních hodnot (skupina 8) a 2 novorozenci, u kterých jsou CRP, IL-6 v rozmezí a ostatní parametry jsou zvýšené (skupina 7). Pouze jeden novorozenec má zvýšený jen IL-8. Ostatní parametry jsou v referenčním rozmezí (skupina 6).

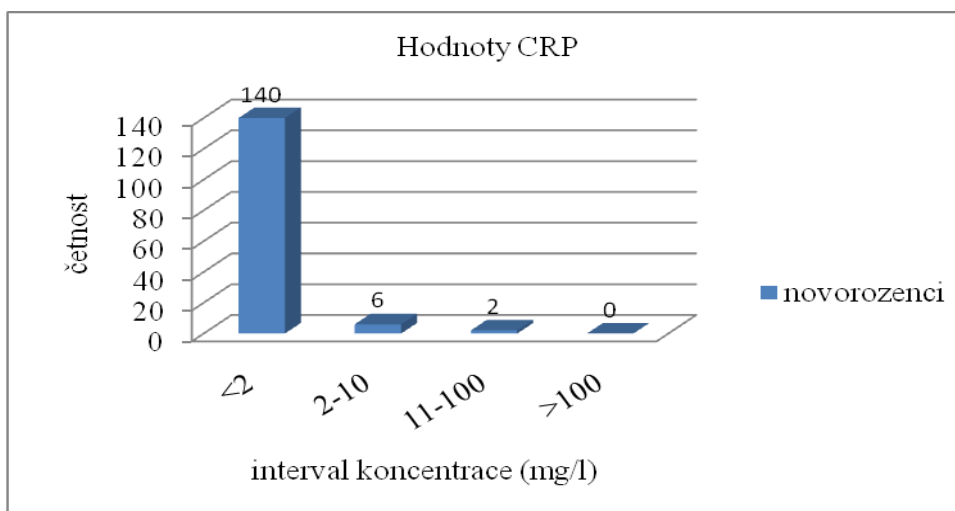
Graf 2 : Znázornění procentuálních hodnot CRP



Zdroj: (vlastní výzkum)

Celkem u 145 novorozenců (97,97%) je koncentrace CRP zvýšená, zbývajících 3 novorozenci (2,03%) mají koncentraci ve fyziologickém rozmezí.

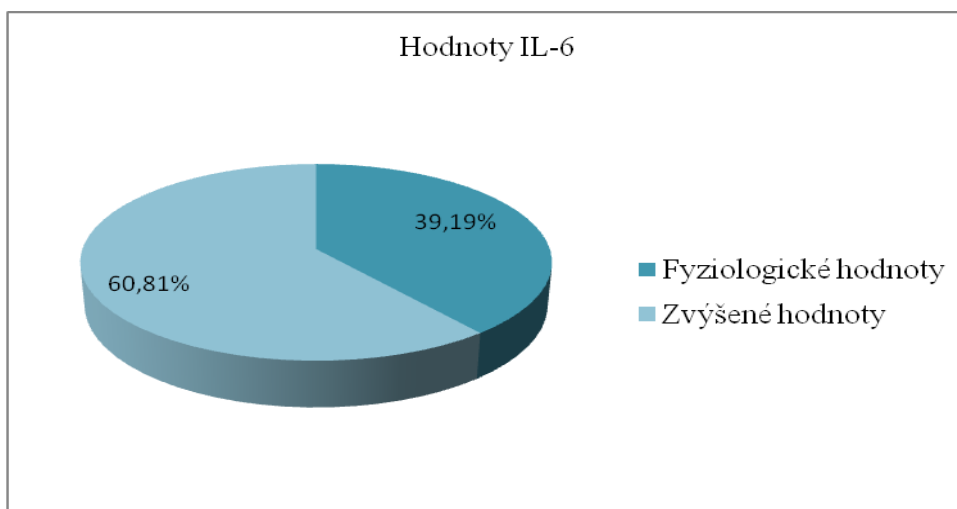
Graf 3: Znázornění intervalových hodnot CRP



Zdroj: (vlastní výzkum)

U 140 novorozenců je hodnota CRP nižší než 2 mg/l. Dalších 6 novorozenců má hodnotu CRP v intervalovém rozmezí od 2 do 10 mg/l. V rozmezí 11-100 ml/l jsou 2 novorozenci.

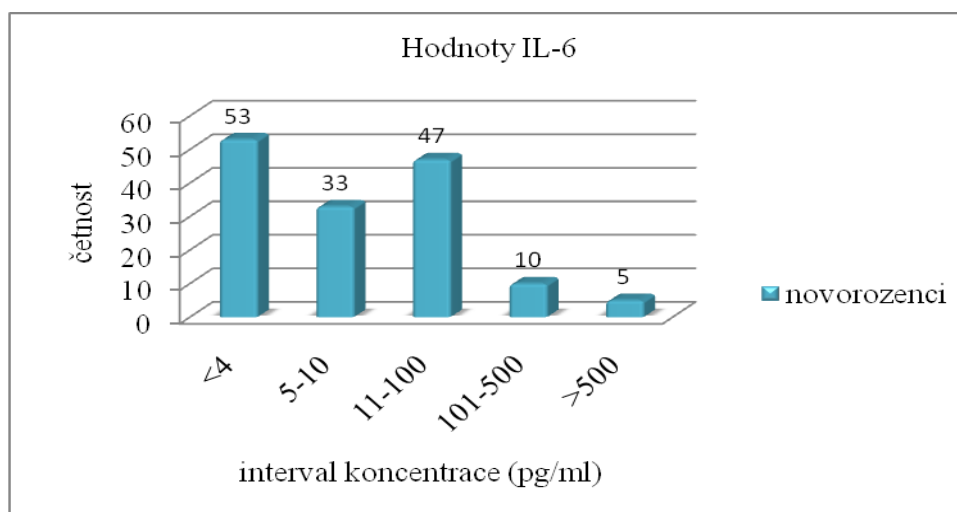
Graf 4: Znázornění procentuálních hodnot IL-6



Zdroj: (vlastní výzkum)

Celkem 58 novorozenců (39,19%) má koncentrace zvýšenou, u 90 novorozenců (60,18 %) je koncentrace ve fyziologickém rozmezí.

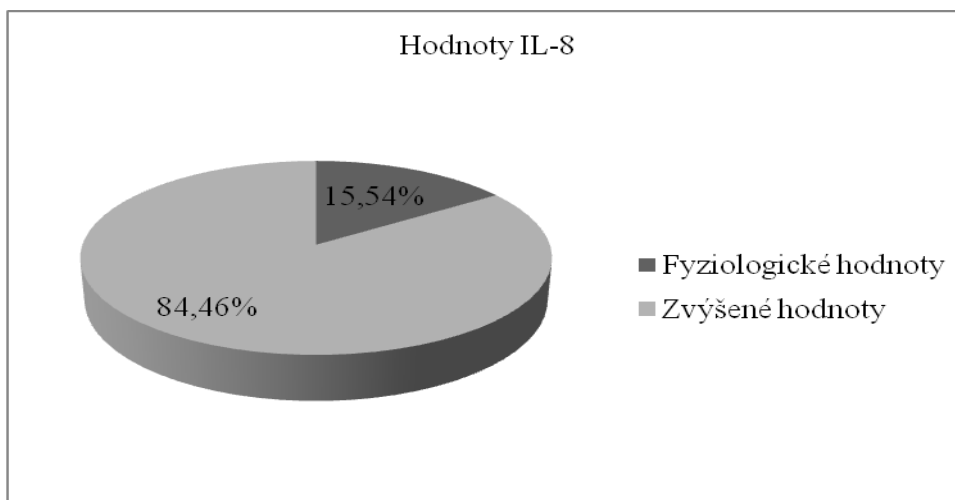
Graf 5 :Znázornění intervalových hodnot IL-6



Zdroj: (vlastní výzkum)

Koncentrace nižší jak 4 pg/ml se vyskytuje u 53 novorozenců. V intervalu 5-10 pg/ml je 33 a 47 novorozenců v intervalu 11-100 pg/ml. V dalším rozmezí 101-500 je 10 novorozenců. Hodnotu vyšší jak 500 má 5 novorozenců.

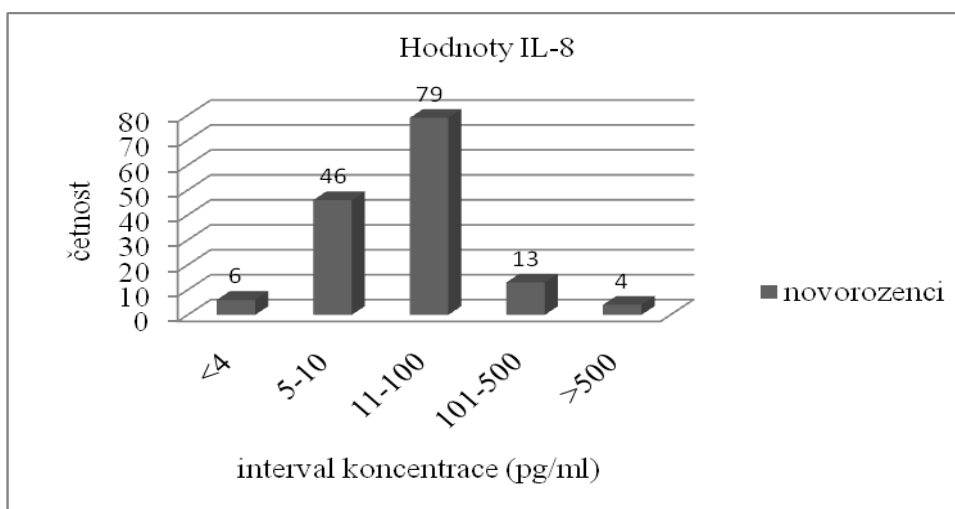
Graf 6: Znázornění procentuálních hodnot IL-8



Zdroj: (vlastní výzkum)

Celkem u 23 novorozenců (15,54%) je koncentraci IL-8 zvýšená. Zbývajících 125 novorozenců (84,46%) jsou koncentrace v rozmezí.

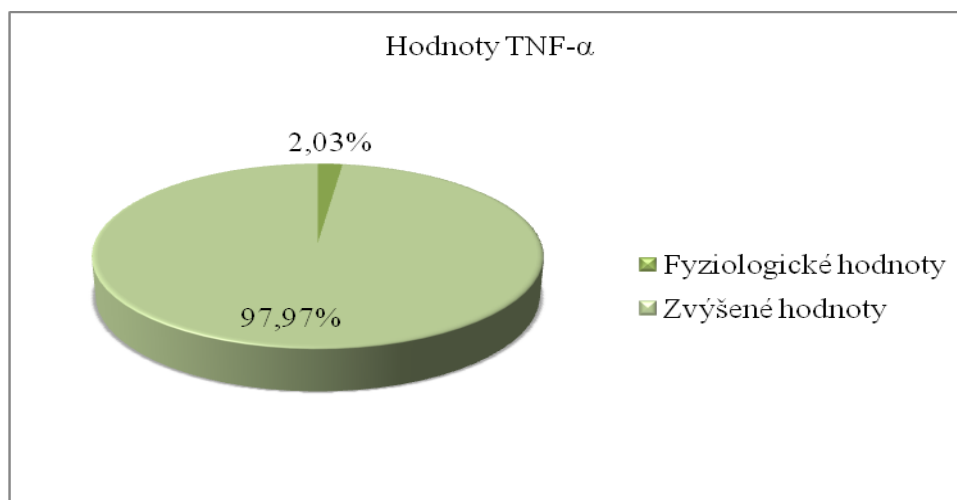
Graf 7 :Znázornění intervalových hodnot IL-8



Zdroj: (vlastní výzkum)

Koncentrace nižší jak 4 pg/ml se vyskytuje u 6 novorozenců. V intervalu 5-10 pg/ml je 46 a 79 novorozenců je intervalu 11-100 pg/ml. V rozmezí 101-500 pg/ml je 13 novorozenců. Hodnotu vyšší jak 500 pg/ml mají 4 novorozenci.

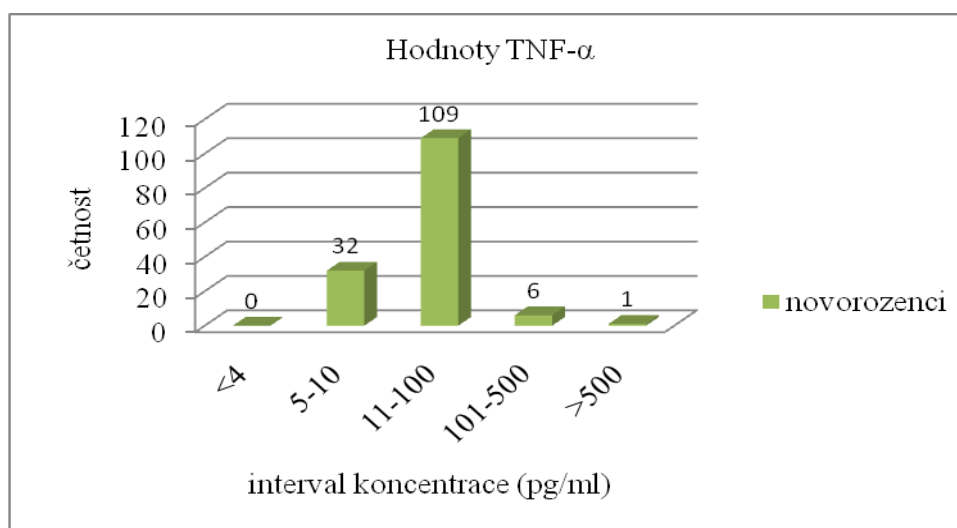
Graf 8: Znázornění procentuálních hodnot TNF- α



Zdroj: (vlastní výzkum)

145 novorozenců (97,97%) má koncentraci zvýšenou, pouze 3 novorozenci (2,03%) jsou ve fyziologickém rozmezí.

Graf 9 Znázornění intervalových hodnot TNF- α



Zdroj: (vlastní výzkum)

U 109 novorozenců je hodnota v rozmezí 11-100 pg/ml/l. Dalších 32 novorozenců má hodnotu v intervalovém rozmezí 5 - 10 pg/ml. V rozmezí 101-100 ml/l je 6 novorozenců. Hodnotu vyšší jak 500 pg/ml má pouze 1 novorozenec.

5. DISKUZE

Novorozenecká infekce je hlavní příčinou morbidity a mortality novorozenců. Výsledky a prognóza záleží na včasnosti a efektivitě antibiotické léčby. Diagnostika a léčba však může být zpožděna, protože včasném stádiu nemoci chybí typické klinické příznaky. Klinický obraz novorozenecké infekce je velmi nespecifický. U časných forem do 48 hodin je to např. porucha sání, dýchání, hypotermie, šedavý kolorit kůže, zhoršená perfúze, ikterus, změny srdeční frekvence, poruchy termoregulace, neklid či apatie. Až pozdní formy infekce se projevují orgánovým postižením, jako je např. meningitida, pneumonie, osteomyelitida, pyelonephritida apod. Zachycení infekce až v tomto stádiu snižuje procento úspěšnosti terapie. A proto je nutné v diagnostice novorozeneckých infekcí používat citlivé a specifické ukazatele schopné rozeznat již nastupující infekci. Klasické ukazatele infekce jako počet leukocytů, poměr nezralých forem a počet neutrofilních granulocytů postrádají dostatečnou senzitivitu a specifitu.

Nejčastěji používaným markerem v diagnostice je CRP. U bakteriálních infekcí dosahuje nejvyšších hodnot, zatímco u virových je nárůst hodnot malý. Podle autora (17) se hodnota CRP zvyšuje s časem a nejlepšího vrcholu dosahuje mezi 24 – 48 hodinami poté, co vzniklo podezření na infekci. A dále autor uvádí, že syntéza plasmatických proteinů u novorozenců je proti dospělým jedincům snižená, protože ještě nemusí být plně rozvinuta odpověď proteinů akutní fáze. V mých výsledcích je koncentrace CRP zvýšená z 2,03%. Proto se CRP zdá být méně užitečný jako diagnostický test časných fází neonatální infekce. Podle autora (21) CRP neprochází placentární bariérou, jeho koncentrace v plazmě novorozence není závislá na plasmatické koncentraci matky.

V posledních letech se hledáním nových diagnostických metod novorozenecké infekce obrací k cytokinům, zejména IL-6, IL-8 a TNF- α . Protože jejich vzestup v odpovědi na infekci předchází vzestupu proteinů akutní fáze. Zvýšení proteinů akutní fáze navazuje až 6-24 hodinovým zpožděním na zrychlení syntézy prozánětlivých cytokinů. Autor (18) tvrdí, že nástup plasmatické hladiny IL-6 je o několik hodin opožděnější než u TNF- α a ve fázi

vzestupu IL-6 již TNF- α mizí z cirkulace. Hladina TNF- α v mých výsledcích je zvýšená z 97,97% a hladina IL-6 z 60,81%. V případě IL-8 je to z 84,46%. Dále autor uvádí, že IL-6 předchází vzestupu IL-8, což se potvrdilo ve skupině 2 a 4.

Práce (5) zabývající se studiem IL-6 u novorozenců udává, že hladina IL-6 v pupečnickové krvi ani v krvi novorozence není ovlivněna koncentrací v krvi matky, i když podnět ke zvýšení může být shodný. IL-6 detekovatelný u dětí je výsledkem jejich vlastní tvorby a IL-6 neprochází placentární bariérou, ale podle studie (3) není tento názor tak jednoznačný. Podle autora (5), pokud je hodnota IL-6 menší než 5 pg/ml infekci prakticky vylučuje a u hodnot vyšších jak 500 pg/ml je velká pravděpodobnost infekce. V mých výsledcích mají hodnotu vyšší jak 500 pg/ml celkem 5 novorozenců.

Došla jsem k závěru, že pravděpodobně nemocní novorozenci jsou ve skupině 5, protože jejich parametry jsou všechny zvýšené. Další skupinou, u které se domnívám, že by mohla být nemocná, je skupina 3. U těchto novorozenců jsou cytokiny zvýšené. Další nemocní mohou být ve skupině 4, protože CRP, IL-6 a TNF- α jsou zvýšené. O ostatních skupinách si myslím, že by mohlo jednat o zdravé novorozence.

6. ZÁVĚR

Zjistila jsem, že hodnoty CRP a cytokinů pro diagnostiku zánětu novorozenců nemají stejný vypovídající diagnostický význam. Při posuzování výsledků jsem došla k závěru, že se cytokiny jeví jako vhodnější markery než CRP. Tudíž jsem předpokládanou hypotézu zamítnula.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

(1) **BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. a kol.** *Vyšetřovací metody v imunologii.* první vydání. Praha: Grada, 2005. 184 s.

ISBN 80-247-0691-1

(2) **BIOVENDOR,** manuál k CRP, 2004, Nemocnice České Budějovice, oddělení Laboratoř klinické biochemie, poskytnuto dne 24. 5. 2009

(3) **CHIESA, C., SIGNORE, F., ASSUMA, M., BUFFONE, E., TRAMONZTOZZI, Osborn JF, Pacifico L.:** *Serial measurements of C-reactive protein and interleukin-6 in the immediate postnatal period: reference intervals and analysis of maternal and perinatal confounders.* Clinical Chemistry; 47:6: 1016-1022. 2001

(4) **DASTYCH, M., BREINEK, P., et al.** *Klinická biochemie. bakalářský obor zdravotní laborant.* první vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2008. 232 s.

ISBN 978-80-210-4572-9

(5) **DĚDKOVÁ, A.** *Interleukin 6 a jeho využití v diagnostice novorozenecké bakteriální infekce* [online]. [cit. 2009-04-06]

Dostupné z <<http://www.tigis.cz/alergie/aler203/07dedkova.htm>>

(6) **FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., SHOENFELD, Y., MAŤHA, V.** *Ilustrovaný imunologický slovník.* první vydání. Praha: Grada, 2004. 288 s.

ISBN 80-7262-243-9

(7) **FERENČÍK, M., ROVENSKÝ, J., SHOENFELD, Y., MAŤHA, V.** *Imunitní systém, informace pro každého.* první vydání. Praha: Grada, 2005. 236 s.

ISBN 80-248-1196-6

(8) GRUYS, E., TOUSSAINT, M.J.M., NIEWOLD, T.A., KOOPMANS, S.J.:
Acute phase reaction and acute phase proteins. Journal of Zhejiang University
SCIENCE, 6B(11):1045-1056, 2005

(9) HOŘEJŠÍ, V., BATŮŇKOVÁ, J. *Základy imunologie.* třetí vydání. Praha:
Triton, 2005. 279 s.
ISBN 80-7254-686-4

(10) CHROMÝ, V., FISCHER, J. *Analytické metody v klinické chemii.* první
vydání. Brno: Masarykova univerzita. 2000. 216 s.
ISBN 80-210-2363-5

(11) IMMULITE princip CZ, Prezentace od B. Chmelíkové, 2007.
Platný email: j.nahalkova@seznam.cz od kasparo@nemcb.cz,

(12) IMMULITE/IMMULITE 1000 IL-8, *Manuál k metodice IL-8,* 2007,
Nemocnice České Budějovice, oddělení Laboratoř klinické biochemie, poskytnuto
dne 24. 5. 2009

(13) IMMULITE/IMMULITE 1000 TNF- α , *Manuál k metodice TNF- α ,* 2007
Nemocnice České Budějovice, oddělení Laboratoř klinické biochemie, poskytnuto
dne 24.5. 2009

(14) IMMULITE 2500 IL-6. *Manuál k metodice IL-6,* 2008, Nemocnice České
Budějovice, oddělení Laboratoř klinické biochemie, poskytnuto dne 24. 5. 2009

(15) KREJSEK, J., KOPECKÝ O. *Klinická imunologie.* první vydání. Hradec

Králové: Nukleus. 2004. 968 s.

ISBN 80-86225-50-X

(16) MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ J. *Patologie*. první vydání. Praha: Grada. 2004. 372 s.

ISBN 80-247-0758-3

(17) MARUNA, P. *Proteiny akutní fáze. Fyziologie, diagnostika, klinika*. první vydání. Praha: Maxdorf. 2004. 282 s.

ISBN 80-85912-05-8

(18) MASOPUST, J. *Klinická biochemie. Požadování a hodnocení biochemických vyšetření*. II. část. první vydání. Praha: Karolinum, 1998. 428 s.

ISBN 80-7184-648-1

(19) MIHÁL, V. *Význam proteinů akutní fáze a neutrofilních granulocytů při diagnostice bakteriálního zánětu*. [online]. [cit. 2009-01-06]

Dostupné z <www.pediatriepropraxi.cz/savepdfs/ped/2001/pdf.>

(20) RACEK, J., et al. *Klinická biochemie*. druhé přepracované vydání. Praha: Galén, 2006. 329 s.

ISBN 80-7262-324-9

(21) SEKK a Katedra klinické biochemie IPVZ Praha. *Encyklopedie 6 laboratorní medicíny pro klinickou praxi*. CD ROM SEKK: Pardubice 2005.

ISBN 80-238-9775-6.

(22) SCHNEIDERKA, P., a kol. *Kapitoly z klinické biochemie*. druhé doplněné a přepracované vydání. Praha: Karolinum, 2004. 365 s.

ISBN 80-246-0678-X

(23) SUOMINEN, P. *CRP klinická příručka firmy Orion diagnostica* [online]. [cit. 2009-04-06]

Dostupné z <<http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zcsk/846.pdf>>

(24) ŠTERN, P. *Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie* [online]. [cit. 2009-04-06]

Dostupné z <<http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>>

(25) ŠTERZL, I. *Cytokiny – struktura a funkce I.* [online]. [cit. 2009-03-08]

Dostupné z <<http://www.tigis.cz/alergie/ALERG299/05sterzl.htm>>

(26) VELEMÍNSKÝ, M., ŠVIHOVEC jr, P., VELEMÍSKÝ jr, M. *Infekce plodu a novorozence*. první vydání. Praha: Triton, 2005. 414 s.

ISBN 80-7254-614-7

(27) VOTAVA, M., *Lékařská mikrobiologie obecná*. druhé přepracované vydání.

Brno: Neptun, 2005. 351 s.

ISBN 80-86850-00-5

(28) ZIMA, T. *Laboratorní diagnostika*. druhé doplněné a přepracované vydání.

Praha: Galén, Karolinum, 2007. 906 s.

ISBN 978-80-7262-372-3 (Galén)

ISBN 978-80-246-1423-6 (Karolinum)

8. KLÍČOVÁ SLOVA

C-reaktivní protein

Cytokiny

Interleukin

Proteiny akutní fáze

Zánět

Key words

C-reactive protein

Cytokines

Interleukin

Acute phase proteins

Inflammation

9. PŘÍLOHY

9.1. Naměřené hodnoty zkoumaného souboru

	iniciály	CRP (mg/l)	IL-6 (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
1.	MK	0,1	705,0	279,0	29,0
2.	KM	<2	4,5	11,2	13,3
3.	VT	<2	15,2	33,9	14,2
4.	KO	<2	8,2	28,1	15,4
5.	KŠ	<2	6,8	7,7	26,3
6.	HK	<2	<1,0	6,3	11,6
7.	BT	Hemolýza <2	195,0	150,0	208,0
8.	DM	<2	3,2	6,2	10,1
9.	SS	<2	6,7	12,0	13,2
10.	KO	<2	2,5	9,8	12,4
11.	OM	<2	2,8	19,6	27,8
12.	KJ	<2	12,3	13,0	14,2
13.	CK	<2	14,6	29,9	16,1
14.	ŠA	<2	41,5	49,6	14,3
15.	PT	0,6	>1000	1433,0	26,7
16.	FL	<2	6,1	13,1	17,0
17.	JT	<2	1,4	5,7	16,9
18.	ŽL	<2	10,1	9,3	12,8
19.	DJ	<2	15,0	11,9	11,2
20.	PR	<2	1,9	7,9	11,1
21.	MS	<2	<1,0	15,0	13,8
22.	BA	<2	3,9	17,7	12,5
23.	PA	<2	29,7	26,7	13,7
24.	BV	<2	13,8	48,5	14,5
25.	LZ	<2	122	89,6	20,8
26.	LJ	<2	13,0	11,5	12,2
27.	ŠP	<2	268,0	49,7	12,5
28.	KS	<2	3,0	7,1	17,7
29.	KO	<2	6,8	13,3	16,9
30.	VR	<2	8,3	15,2	29,8
31.	KR	<2	19,3	6,3	10,8
32.	ŠA	<2	1,5	9,4	10,9
33.	SD	<2	13,4	13,8	27,8
34.	MB	<2	2,3	19,8	25,0
35.	KA	<2	6,3	10,2	13,6
36.	MJ	<2	7,1	18,1	25,1

37.	TKH	<2	25,7	70,3	9,4
38.	PM	25,5	624,0	271,0	18,8
39.	SJ	<2	8,7	12,0	10,3
40.	MM	<2	4,1	11,7	15,3
41.	BD	<2	1,5	8,3	18,7
42.	RM	<2	1,6	11,6	9,1
43.	RF	<2	10,3	50,4	15,1
44.	KA	<2	1,2	18,8	26,6
45.	ČZ	<2	6,8	8,5	15,8
46.	PS	<2	63,5	125,0	15,4
47.	BO	<2	2,5	9,2	26,2
48.	PM	<2	2,0	7,6	30,2
49.	MR	<2	57,7	97,9	17,9
50.	KL	<2	17,7	9,9	25,8
51.	RŠ	<2	7,7	16,2	8,9
52.	TH	<2	6,6	6,2	14,8
53.	BE	<2	1,1	22,2	6,2
54.	JK	<2	2,7	24,4	10,0
55.	SE	<2	2,8	69,5	9,7
56.	PA	2,7	4,8	21,9	10,0
57.	ZA	<2	3,1	10,3	11,4
58.	LJ	<2	36,4	105,0	11,6
59.	ŠL	<2	4,3	<5,0	10,6
60.	KT	<2	97,8	25,9	10,4
61.	NM	<2	1,4	6,6	7,7
62.	PA	<2	4,8	5,3	11,9
63.	KP	22,2	124,0	5,1	14,1
64.	ŠA	<2	13,2	17,1	11,9
65.	ŠJ	<2	1,4	8,6	12,2
66.	PL	<2	5,2	14,6	11,9
67.	DK	<2	13,0	33,2	16,5
68.	PM	<2	6,2	12,1	8,6
69.	HŠ	<2	4,0	21,4	12,5
70.	EJ	<2	5,1	14,4	21,5
71.	ŘV	<2	152,0	137,0	13,9
72.	DJ	<2	2,5	77,7	9,8
73.	DL	<2	2,1	95,4	7,9
74.	CN	<2	5,8	7,1	9,9
75.	LP	<2	25,2	18,2	8,8
76.	ŠM	<2	5,1	48,6	10,5
77.	VM	<2	1,0	<5,0	16,9
78.	KE	<2	1,0	8,0	10,9
79.	RV	<2	1,1	26,4	8,8

80.	NA	<2	2,1	6,8	11,4
81.	PR	<2	4,7	11,9	12,4
82.	JA	<2	18,2	29,6	13,7
83.	HK	<2	14,0	10,4	11,0
84.	MK	<2	4,4	28,6	14,6
85.	BA	0,3	23,1	16,0	14,9
86.	ŠN	<2	50,1	17,7	41,3
87.	ŠV	<2	54,7	57,4	10,7
88.	JP	<2	10,7	76,5	10,2
89.	VP	<2	61,3	69,7	13,3
90.	ŠL	<2	20,0	22,2	15,6
91.	ŠK	<2	32,3	8,2	11,0
92.	LK	<2	8,0	14,7	12,0
93.	LR	<2	1,2	6,2	12,4
94.	KK	<2	7,7	<5,0	12,9
95.	RL	<2	8,5	8,7	11,8
96.	MD	<2	7,6	12,6	11,0
97.	GS	<2	3,5	119,0	15,3
98.	MA	<2	77,5	161,0	15,0
99.	VN	2,2	83,5	59,1	65,4
100.	HF	<2	42,8	81,2	17,7
101.	LB	<2	6,4	7,2	10,1
102.	TP	<2	6,3	6,3	12,8
103.	ŠR	<2	168,0	33,7	12,9
104.	ŠS	<2	35,8	5,6	17,1
105.	PP	<2	3,2	6,0	10,6
106.	FK	<2	11,4	11,8	11,3
107.	MA	<2	1,2	5,3	13,8
108.	TH	<2	2,1	5,1	8,7
109.	BN	<2	16,4	<5,0	13,1
110.	RD	<2	2,2	6,7	13,2
111.	PK	<2	2,9	7,1	11,5
112.	KM	<2	13,5	9,5	9,3
113.	ŠF	<2	3,8	24,8	12,5
114.	KJ	<2	3,1	14,5	12,7
115.	MJ	<2	121,0	103,0	101,0
116.	ML	9,0	>1000,0	516,0	27,0
117.	PA	<2	31,0	<5,0	10,4
118.	LJ	<2	6,9	9,2	9,5
119.	HD	<2	11,0	26,4	14,6
120.	VL	<2	69,8	23,0	28,5
121.	CHA	<2	12,3	7,0	15,0
122.	HO	<2	8,3	7,6	10,7

123.	PD	1,9	>1000,0	1484,0	368,0
124.	VJ	<2	12,7	16,0	9,9
125.	SS	<2	8,6	18,5	11,7
126.	KB	<2	14,4	25,0	8,5
127.	ŠM	<2	19,3	25,4	15,9
128.	RJ	<2	9,6	21,4	9,5
129.	VM	<2	189,0	328,0	385,0
130.	RN	<2	14,2	10,7	12,0
131.	KN	<2	4,5	8,3	14,8
132.	MT	<2	6,6	13,8	16,9
133.	MV	<2	4,3	11,7	12,4
134.	TM	2,2	102,0	134,0	490,0
135.	KT	<2	4,0	12,9	11,3
136.	MT	<2	4,8	7,6	8,6
137.	KD	<2	20,1	16,9	11,0
138.	RJ	2,0	8,1	34,8	11,5
139.	BP	<2	2,7	6,1	12,3
140.	PR	<2	98,7	274,0	16,5
141.	PK	0,4	236,0	214,0	15,7
142.	ČV	<2	2,8	14,7	10,6
143.	TK	<2	18,6	71,0	21,0
144.	TA	<2	7,5	15,8	12,7
145.	KA	<2	3,2	<5,0	11,2
146.	BS	<2	32,9	44,7	15,7
147.	AP	2,0	337,0	2078,0	>1000,0
148.	MM	<2	3,9	7,9	13,6