

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A
BIOCHEMICKÝCH VĚD

HODNOCENÍ OXIDAČNÍHO STRESU
U PACIENTŮ S HRUDNÍMI EMPYÉMY
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR: Lenka Kobylková
VEDOUCÍ: doc. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.
KONZULTANT: RNDr. Ing. Petr Kelbich, Ph.D.

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

**DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND
BIOCHEMICAL SCIENCES**

**EVALUATION OF OXIDATION STRESS IN
PATIENTS WITH THORACIC EMPYEMA**

BACHELOR THESIS

AUTHOR: Lenka Kobylková

SUPERVISOR: doc. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D.

CONSULTANT: RNDr. Ing. Petr Kelbich, Ph.D.

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lenka Kobyilková**
Osobní číslo: **C13339**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Hodnocení oxidačního stresu u pacientů s hrudními empyémy**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se teoreticky i prakticky s problematikou laboratorního vyšetřování extravaskulárních tělních tekutin.
2. Seznamte se teoreticky s problematikou oxidačního stresu.
3. Zhodnoťte úroveň a význam oxidačního stresu u pacientů s hrudními empyémy ve formě přehledné práce.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **RNDr. Ing. Petr Kelbich, Ph.D.**

Krajská zdravotní, a. s., Masarykova nemocnice v Ústí nad Labem

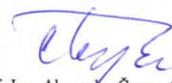
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Cegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 19.6.2017

Lenka Kobylková

Poděkování:

V první řadě bych chtěla věnovat veliké poděkování panu RNDr. Ing. Petru Kelbichovi, PhD. coby specialistovi na vyšetřování extravaskulárních tělních tekutin, který mě s obecnou problematikou seznámil. Velice děkuji za poskytnutí fotografií, pečlivé řízení, podporu, vstřícnost a cenné rady během naší dlouhodobé spolupráce.

Dále bych chtěla poděkovat mému vedoucímu panu doc. Mgr. Romanu Kand'árovi, PhD. za vedení a odborný dohled.

Na závěr věnuji poděkování mému příteli a své rodině za veškerou podporu a trpělivost během tvorby této práce i během celého studia.

ANOTACE

Významnou příčinou oxidačního stresu je zánětlivý proces. Lze předpokládat, že se zátěž organismu oxidačním stresem zvyšuje úměrně nárůstu intenzity zánětlivé odpovědi. Největší zátěž očekáváme v případě razantních zánětů s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů, zejména pak zánětu purulentního charakteru. Jeho podstatou je oxidační vzplanutí neutrofilních granulocytů s hojnou produkcí kyslíkových radikálů. Tyto vysoce reaktivní sloučeniny bývají příčinou strukturálního poškození tkáně.

V první fázi je naším cílem na základě cytologicko-energetického vyšetření hrudních výpotků rozdělit dostatečně velký soubor pacientů podle charakteru zánětlivé odpovědi v dutině hrudní. Porovnáním katalytických aktivit aspartátaminotransferasy v hrudních výpotcích v jednotlivých skupinách pacientů pak zjistíme poškozující dopad zánětu příslušného charakteru na přilehlou tkáň.

Práce se tak stává důležitým východiskem pro další fázi naší studie. Jejím hlavním obsahem bude měření a hodnocení příslušných parametrů oxidačního stresu a antioxidačních mechanismů v hrudních výpotcích u pacientů s hrudními empyémy v různých stádiích postižení.

KLÍČOVÁ SLOVA

Hrudní výpotky, cytologicko-energetická analýza, aspartátaminotransferasa, hrudní empyém, oxidační stres.

ANNOTATION

An inflammation suggests a significant reason of the oxidative stress. We suppose that the oxidative stress grows in accordance with the intensity of the inflammatory response. Therefore we anticipate the most oxidative stress in cases of intense inflammations with oxidative burst of the professional phagocytes, especially in case of their purulent type. The principle of the purulent inflammation is suggested by an oxidative burst of the neutrophil granulocytes with high production of reactive oxygen radicals. These compounds usually cause serious tissue damage.

Our first aim is to divide the group of our patients into subgroups in accordance with inflammation type in their chest cavity, which was found by the cytological-energy investigation of their pleural effusions. We specify a damaging impact of the particular inflammation type in accordance with catalytic activities of the aspartate aminotransferase in the pleural effusion of the particular subgroups of our patients.

This study provides an important way out for our further research. Its main topic will suggest evaluation of the oxidative stress parameters and observation of the antioxidative processes in pleural effusions from the patients with thoracic empyema in different periods of their impairment.

KEYWORDS

Pleural effusion, cytological-energy analysis, aspartate aminotransferase, thoracic empyema, oxidative stress.

OBSAH

1	ÚVOD	12
2	Hrudní dutina	13
3	Imunitní odpověď.....	14
3.1	Oxidační stres.....	16
3.2	Rezervoár extravaskulární tělní tekutiny.....	16
3.3	Purulentní zánětlivý proces	17
3.4	Hrudní empyém.....	17
4	Cytologicko-energetický princip vyšetřování hrudních výpotků.....	19
4.1	Koeficient energetické bilance	22
4.2	Dva modely energetických poměrů v hrudní dutině	23
4.3	Čtyři energetické stavy v rezervoáru hrudního punktátu	24
5	Cytologické vyšetření hrudních výpotků	26
6	Cytologicko-energetické hodnocení hrudních výpotků	28
6.1	Imunokompetentní buňky v hrudním výpotku.....	28
6.1.1	Lymfocytární elementy	28
6.1.2	Monocytárně-makrofagické elementy.....	29
6.1.3	Neutrofilní granulocyty	30
6.1.4	Eosinofilní granulocyty	31
6.2	Detekce strukturálního poškození tkáně v hrudní dutině	32
7	Materiál a metody	33
7.1	Použitý materiál	33
7.1.1	Přístrojové vybavení a pomůcky	33
7.1.2	Použité chemikálie pro přípravu trvalého cytologického preparátu hrudního výpotku.....	33

7.1.3	Software	33
7.1.4	Metodika	33
7.2	Preanalytická fáze	34
7.3	Vyšetření počtu jaderných elementů a erytrocytů v hrudním výpotku	34
7.4	Příprava trvalého cytologického preparátu z hrudního výpotku	34
7.5	Odečet cytologického preparátu hrudního výpotku	35
8	Stanovení humorálních parametrů biochemickým analyzátelem Cobas 6000® c501.....	36
9	Experimentální část.....	38
10	Výsledky	42
10.1	Hodnocení katalytické koncentrace AST v hrudních výpotcích podle převažujících imunokompetentních elementů	42
10.2	Hodnocení katalytické koncentrace AST v hrudních výpotcích podle energetických poměrů.....	43
11	Diskuse.....	45
11.1	Zhodnocení oxidačního stresu u pacientů s hrudními empyémy	48
12	ZÁVĚR	50
13	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADP	adenosindifosfát
AST	aspartátaminotransferasa
ATP	adenosintrifosfát
CD4+	povrchový glykoprotein pomocných T-lymfocytů (Th)
CD8+	povrchový glykoprotein cytotoxických T-lymfocytů (Tc)
G-6-P	glukosa-6-fosfát
HK	hexokinasa
IFN- γ	interferon γ
IL-1	interleukin 1
KEB	koeficient energetické bilance
K-W test	Kruskal-Wallisův test
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NK-buňky	natural killers (přirození zabíječi)
TGF- β	transformující růstový faktor
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α

1 ÚVOD

Dutina hrudní je vystavena různým škodlivým faktorům, které vyvolávají její poškození. Imunitní systém proti těmto tendencím působí a snaží se je zničit. Pokud ale škodlivé látky působí nad určitou úroveň imunitního systému, nastanou různá postižení. V našem případě se jedná o fibropurulentní zánět (výpotek = empyém), kde podstatou bývá oxidační vzplanutí neutrofilních granulocytů coby zástupců nespecifické imunity. Naším cílem je tento výpotek detekovat a určit jeho intenzitu a charakter poškození orgánů dutiny hrudní. Správné určení charakteru zánětu pak umožňuje přesnější specifikaci či vymezení užšího okruhu příčin postižení orgánů dutiny hrudní. Při vyšetřování hrudních výpotků používáme cytologicko-energetický princip.

2 Hrudní dutina

Hrudní dutina je vymezena kostrou, představovanou žebry přisedajícími k páteři a bránici, která jí odděluje od dutiny břišní. Hrudní dutina představuje prostor, ve kterém jsou umístěny především dva životně důležité orgány, srdce a plíce. Hlavní úlohou plic je výměna vzduchu mezi vnějším prostředím a krví, srdce se podílí na dopravě kyslíku krví do tkání a oxidu uhličitého zpět do plic (*Dylevský, 2009; Cheirsilp et al., 2015; Mačák a Mačáková, 2004*).

3 Imunitní odpověď

Organismus je vystaven působení různých vnějších i vnitřních faktorů, které mohou vést k porušení jeho integrity. Proti těmto tendencím působí imunitní systém. Pokud aktivita imunitního systému překročí určitou úroveň, hovoříme o zánětlivém procesu. Imunitní systém představuje nesmírně složitou morfologickou i funkční strukturu. Velmi zjednodušeně jej lze rozdělit na část buněčnou a humorální a na složky nespecifické a specifické imunity (Šterzl, 1993; Hořejší a Bartůňková, 2009; Krejsek et al., 2016). Za buněčnou část imunitního systému považujeme především imunokompetentní buňky. Těmi jsou jednak buňky myeloidní vývojové řady a lymfoidní elementy. Mezi myeloidní buňky řadíme neutrofilní, eosinofilní a basofilní granulocyty a také buňky monocytárně-makrofagického systému. Za lymfoidní elementy považujeme lymfocyty a NK buňky (natural killers), tzv. přirozené zabíječe. Fungování imunitního systému ale nestojí výhradně na účinkování imunokompetentních buněk. Více či méně aktivně se na něm podílí i další buněčné struktury lidského organismu. Velmi angažované jsou v tomto ohledu např. trombocyty, cévní endotel, buňky výstelky tělních dutin a orgánových systémů atd. (Ferenčík et al., 2005; Hořejší a Bartůňková, 2009; Krejsek et al., 2016; Fox et al., 2010).

Humorálními složkami imunitního systému jsou rozmanité působky, které se přímo podílí na imunitních, resp. zánětlivých, reakcích v organismu. Jsou jimi imunoglobuliny, proteiny akutní fáze, složky komplementu, cytokiny, růstové faktory atd. (Krejsek a Kopecký, 2004; Hořejší a Bartůňková, 2009).

Z hlediska pochopení fylogeneze a funkce imunitního systému je užitečné jeho rozdělení na část specifické a nespecifické imunity. Fylogeneticky starší je jednoznačně nespecifická imunita, odvíjející se od vyčlenění buněk specializovaných na fagocytosu cizorodých částí již u nejprimitivnějších mnohobuněčných organismů. V lidském organismu jsou jejími dominujícími představiteli neutrofilní granulocyty, jejichž význam vnímáme především s ohledem na fagocytosu extracelulárních bakterií. Tyto buňky jsou však schopné pohltnout i viry či substrát podstatně větších rozměrů, např. erytrocyty při posthemoragické úklidové reakci. Důležitou vlastností neutrofilních granulocytů je též schopnost jejich oxidačního vzplanutí. Ta spočívá v aktivaci NADPH-oxidasy lokalizované v jejich povrchových membránách, která vede k produkci vysoce reaktivních sloučenin s cílem zahubit a strávit fagocytované bakterie a také zničit bakterie v extracelulárním prostředí (Krejsek a Kopecký, 2004; Hořejší a Bartůňková, 2009; Janeway et al., 2001).

Dalšími buňkami nespecifické imunity jsou eosinofilní granulocyty, původně určené k eliminaci mnohobuněčných parazitů v gastrointestinálním traktu. Aktuálně ale vnímáme význam těchto buněk v daleko širších souvislostech, příznivých i nepříznivých. Eosinofilní granulocyty jsou významnými producenty transformujícího růstového faktoru β (TGF- β), čímž se významně zapojují do reparačních a regeneračních procesů v organismu (Ferenčík *et al.*, 2005). Zároveň ale také v řadě případů stojí za alergickými záněty.

Basofilní granulocyty a jejich tkáňová forma, žírné buňky, hrají významnou úlohu především v rozpoznání cizorodých agens v organismu a volbě obranné strategie.

Humorální složku nespecifické imunity tvoří rozmanité působky, vesměs proteinové povahy, které se aktivně podílejí na imunitní odpovědi či obraně organismu před jejími dopady. Jako příklad lze uvést proteiny akutní fáze, komplement, antioxidanty, inhibitory proteinas atd. (Krejsek a Kopecký, 2004; Hořejší a Bartůňková, 2009).

Na pomezí specifické a nespecifické imunity se nachází buňky monocytárně-makrofagického systému. Ty fagocytují exogenní i endogenní substrát a předkládají jej ve vhodné formě buňkám specifické imunity. Tímto způsobem udržují imunitní systém v neustálé pohotovosti (Lochmanová, 2015).

Imunokompetentními buňkami specifické imunity jsou lymfocyty. Funkční rozmanitost tohoto morfologicky poměrně uniformního typu buněk je dána především specifickými povrchovými receptory a také produkovánými působky (Krejsek a Kopecký, 2004; Hořejší a Bartůňková, 2009). Rámcově lze tyto buňky rozdělit na B lymfocyty a T lymfocyty. T lymfocyty dále dělíme na Th lymfocyty, které nesou povrchovou antigenní strukturu CD4 a Tc lymfocyty s povrchovým znakem CD8. B lymfocyty, především ve formě plasmocytů, jsou producenty protilátek. T lymfocyty tvoří podstatu tzv. buněčné imunity. CD8⁺ Tc lymfocyty jsou nositelé cytotoxické zánětlivé reakce. CD4⁺ Th lymfocyty mají především funkci regulační, a to jak ve vztahu k protilátkové, tak buněčné imunitní odpovědi. Další diference CD8⁺ Tc lymfocytů i CD4⁺ Th lymfocytů na příslušné buněčné subtypy pak odpovídá jejich cytokinovým profilům (Krejsek a Kopecký, 2004; Hořejší a Bartůňková, 2009).

Humorální složku specifické imunity tvoří imunoglobuliny (protilátky). Jsou produkovány B lymfocyty, především pak jejich vrcholným aktivačním stádiem, tzv. plasmocytů. Funkce imunoglobulinů spočívá jednak v opsonizaci, kdy se váží

na specifické antigenní struktury a tím je zpřístupňují eliminačnímu působení komplementu a fagocytů. Imunoglobuliny ale mohou též svojí specifickou vazbou na mikrobiální agens či příslušné buněčné receptory znemožnit již samotný vstup těchto patogenních agens do organismu (*Ferenčík et al., 2005; Šterzl, 1993; Krejsek a Kopecký, 2004; Hořejší a Bartůňková, 2009*).

3.1 Oxidační stres

Oxidační stres vzniká v organismu v důsledku nadprodukce volných kyslíkových radikálů a porušení rovnováhy při působení antioxidačních mechanismů. Oxidační stres přispívá ke vzniku různých onemocnění a urychluje stárnutí (*Hybertson, 2011; Chen a Junger, 2012*).

Volné kyslíkové radikály jsou nestabilní a vysoce reaktivní atomy nebo molekuly. Příčinou jejich vysoké reaktivity jsou nepárové elektrony. Jsou jimi superoxid ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (HO^{\cdot}), peroxy (ROO^{\cdot}), alkoxy (RO^{\cdot}) a hydroperoxy (HO_2^{\cdot}). Mezi reaktivní formy kyslíku jsou dále řazeny sloučeniny kyslíku, které nemají nepárový elektron, a tudíž nemají charakter radikálů. Mohou však být jejich zdrojem. Jsou jimi peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná ($HClO$), ozon (O_3) a singletový kyslík 1O_2 (*Jakuš, 2000; Wu a Cederbaum, 2003*).

Volné kyslíkové radikály jsou běžnou součástí normálních metabolických procesů. Tvoří se při látkové přeměně, při obraně organismu před infekčními agens, při expozici ultrafialovým nebo ionizujícím zářením atd. (*Holeček a Racek, 1997*). K dalšímu zvýšení produkce pak přispívají některá onemocnění, nadměrná expozice znečištěnému životnímu prostředí, kouření a fyzická i psychická zátěž (*Jurašková et al., 2000*).

Volné radikály způsobují poškození buněk. Pro udržení života je proto nezbytná jejich eliminace. K tomu slouží antioxidační obranné mechanismy (*Kelvin, 2000; Racek et al., 1997; Rahman et al., 2012*).

3.2 Rezervoár extravaskulární tělní tekutiny

Extravaskulární tělní tekutiny se vyskytují buď v permanentních, nebo nově vznikajících rezervoárech. Příkladem tekutiny vyplňující permanentní rezervoár je mozkomíšní mok, nitrooční tekutina, synoviální tekutina atd. Nově se rezervoáry tvoří zpravidla v souvislosti s patologickým procesem v příslušné lokalitě (*Kopcinovic, 2016*).

V obou případech se do extravaskulární tělní tekutiny promítají imunitní a metabolické procesy doprovázející postižení souvisejícího orgánového systému, mohou se zde vyskytnout alterované elementy z přilehlé tkáně, včetně nádorové, kumulují se zde produkty uvolněné z rozpadajících se buněk a tím pádem se místo stává významným zdrojem informací o dané lokalitě.

3.3 Purulentní zánětlivý proces

Podstatou purulentního zánětlivého procesu je oxidační vzplanutí neutrofilních granulocytů, čili dominujících buněk nespecifické imunity. Neutrofilní granulocyty obsahují ve svých povrchových membránách enzymový komplex NADPH-oxidasu. Zpravidla po fagocytose extracelulárních bakterií dochází k jeho aktivaci a oxidačnímu vzplanutí. NADPH-oxidasu katalyzuje reakci $\text{NADPH} + \text{H}^+$ s kyslíkem za vzniku oxidované formy NADP^+ a superoxidového aniontu (*Kelbich et al., 2013a; Joffre et al., 2016*). Ze superoxidového aniontu vznikají další reaktivní kyslíkové meziprodukty, jmenovitě singletový kyslík, peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Všechny tyto látky působí jako velmi silná oxidační činidla, která narušují strukturu biopolymerů mikroorganismů, ruší aktivitu enzymů a poškozují DNA (*Roháčová, 2006*). Peroxid vodíku dále reaguje za katalytického působení enzymu myeloperoxidasy s chloridovými anionty za vzniku baktericidních chlornanových aniontů (ClO^-). Baktericidní látky produkované fagocyty se navíc mohou uvolňovat do okolních tkání a poškozovat je (*Hořejší a Bartůňková, 2009; Hopp et al., 2017; Jin et al., 2010; Chavakis, 2012*).

3.4 Hrudní empyém

Hrudní empyém představuje nahromadění purulentního zánětlivého výpotku v hrudní dutině. Vždy se jedná o sekundární postižení. Vyvolávajícími agens jsou zpravidla extracelulární bakterie (*Marel et al., 1995; Ahmed, 2010*).

Nejčastěji hrudní empyém vzniká jako komplikace při infekci dolních cest dýchacích. V takovém případě se jedná o empyém parapneumonický nebo metapneumonický (*Burgos et al., 2013*). Při parapneumonickém empyému dochází ke kontaminaci hrudního výpotku infekčním materiálem. K metapneumonickým empyémům dochází v případě, že se v důsledku obstrukce bronchů tvoří subpleurální pneumatokély, které praskají a infikují pleurální dutinu (*Hájek, 1995*). Méně častou příčinou je zanesení infekce do pleurální dutiny

při punkci, drenáži, operaci nebo při poranění hrudníku. Nejméně častá příčina je pak hematogenní infekce pohrudniční dutiny (*Fila, 2001; Fila, 2007; Lee et al., 2010; Hyeon, 2011; Strítěský, 1996; Strítěský, 2001*).

Průběh postižení lze rozdělit na 3 stádia:

- 1. Exsudativní stádium**, během něhož se tvoří řídký pleurální výpotek. Plíce jsou volné a schopné reexpanze.
- 2. Fibropurulentní stádium**, během kterého dochází ke kumulaci imunokompetentních buněk a zahušťování výpotku. Výpotek se opouzdřuje, fixuje plíce a zabraňuje jejich reexpanzi.
- 3. Fibroproliferativní stádium** výrazně „purulentního“ charakteru. Výpotek je hustý a obsahuje až 75 % sedimentu. Po 4 až 6 týdnech přechází do chronicity.

Klinickými příznaky hrudního empyému jsou dušnost, bolest na hrudi, pocit tlaku na postižené straně, kašel, horečka, zimnice, hubnutí, zvýšená tepová frekvence, příp. systémová seps (*Marel, 2007*).

Nástroji pro diagnostiku hrudních empyémů jsou zobrazovací metody, zejména počítačová tomografie (CT), příp. též rentgen či sonografie dutiny hrudní. Stále většího významu nabývají laboratorní vyšetření se zaměřením na postiženou lokalitu. Jejich význam spočívá vedle samotné diagnostiky též v monitorování průběhu léčby hrudního empyému umožňujícím flexibilní korekci terapeutických postupů (*Šimánek et al., 2005; Teřl et al., 2005; Jakubec et al., 2008*).

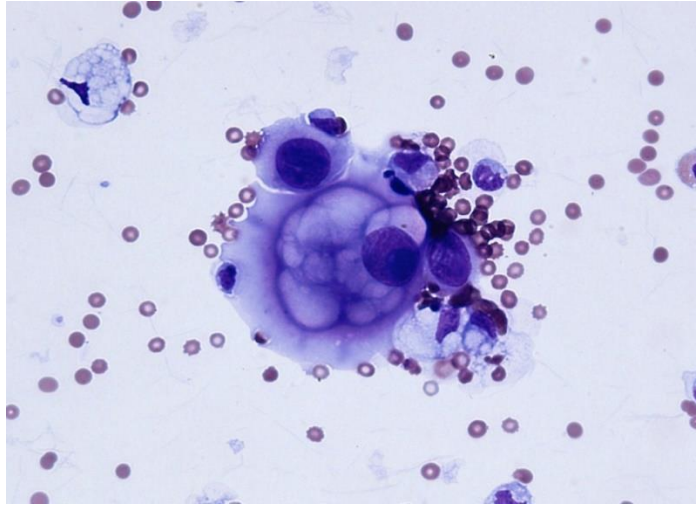
Strategií léčby je poskytnutí úlevy pacientovi, následné odstranění empyému a umožnění terapie základního onemocnění (*Hytych et al., 2007*).

4 Cytologicko-energetický princip vyšetřování hrudních výpotků

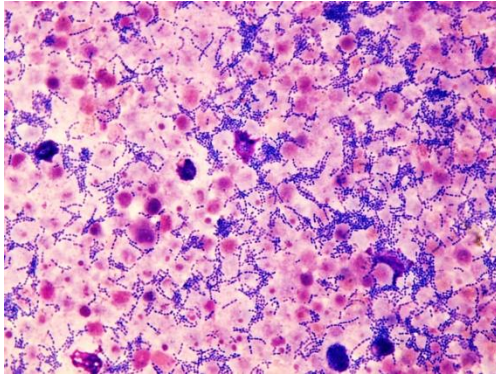
Hrudní punktát lze považovat za extravaskulární tělní tekutinu vznikající *de novo* v hrudní dutině v souvislosti s patologickým procesem.

Orgány dutiny hrudní jsou vystaveny působení faktorů, které mohou vést k porušení jejich integrity. Proti těmto tendencím působí imunitní systém. Pokud aktivita imunitního systému překročí určitou úroveň, hovoříme o zánětlivé odpovědi. Lokální zánětlivá odpověď v dutině hrudní se zpravidla promítá do složení hrudního výpotku. Cílem je výpotek vyšetřit, zánětlivou odpověď detekovat a určit její intenzitu a charakter. Správné určení charakteru zánětlivé odpovědi pak umožňuje přesnější specifikaci či vymezení užšího okruhu příčin postižení orgánů dutiny hrudní (*Kelbich et al., 2011; Kelbich et al., 2012a,b; Kelbich et al., 2013a,b; Kelbich et al., 2014a,b; Kelbich et al., 2015; Kelbich et al., 2017*).

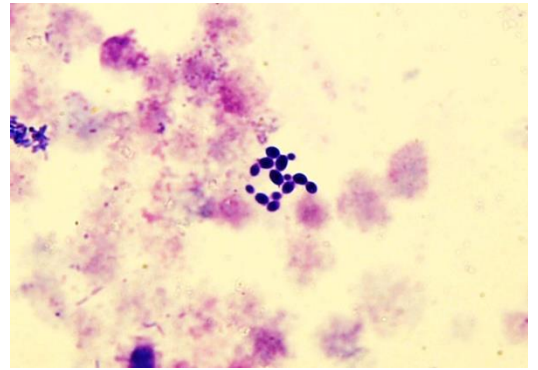
Na pracovištích Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem se používá tzv. cytologicko-energetický způsob vyšetřování extravaskulárních tělních tekutin, včetně hrudních výpotků. Nejprve se provede cytologické vyšetření hrudního výpotku. Řada objektů v mikroskopickém obraze hrudního výpotku může napovědět mnohé o situaci v hrudní dutině. Např. přítomnost nádorových elementů (Obr. 1) svědčí pro nádorové postižení orgánů dutiny hrudní. Nález bakterií (Obr. 2) či kvasinek (Obr. 3) prokazuje infekci hrudní dutiny příslušným mikrobiálním agens a nález pěnitých buněk (Obr. 4) obvykle svědčí pro zvýšený buněčný rozpad staršího data v hrudní dutině. Na základě přítomnosti erytrofágů s čerstvě fagocytovanými erytrocyty či erytrocyty v různém stupni dekolorace (Obr. 5) a produktů metabolické přeměny hemoglobinu, tzn. hemosiderinu či hematoidinu (Obr. 6) lze získat nejen informaci o přítomnosti krvácení v dutině hrudní, ale také o její dynamice v čase (*Sobek et al., 2009*).



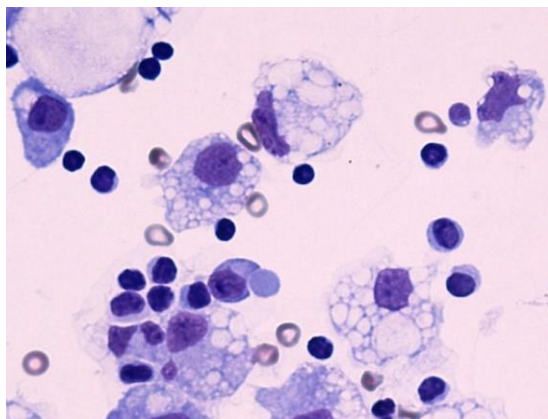
Obr. 1: Nádorové buňky v hrudním výpotku – adenokarcinom



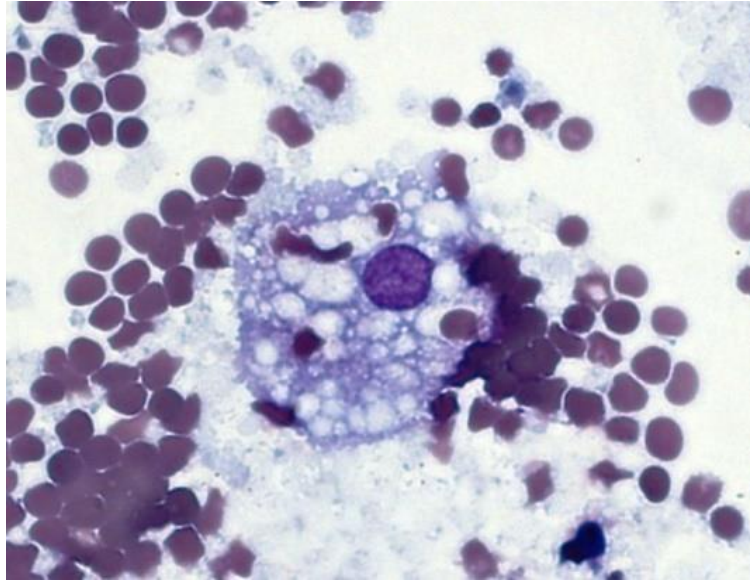
Obr. 2: Bakterie v hrudním výpotku



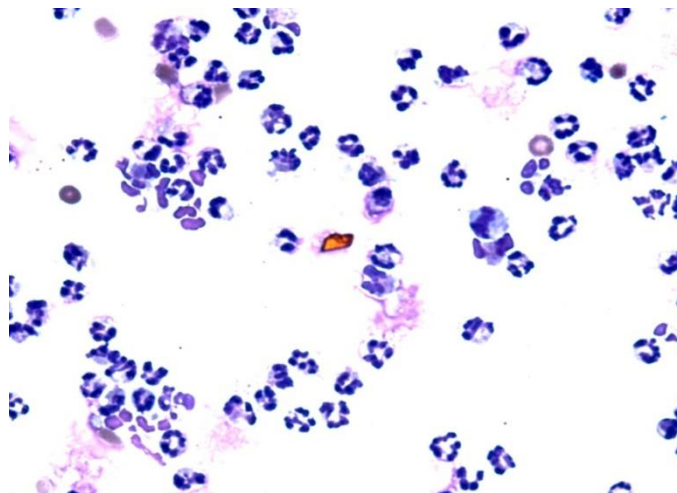
Obr. 3: Kvasinky v hrudním výpotku



Obr. 4: Pěnité buňky v hrudním výpotku



Obr. 5: Erytrofág-čerstvě fagocytované i dekolorované erythrocyty v hrudním výpotku



Obr. 6: Žlutý krystal hematoidinu v hrudním výpotku

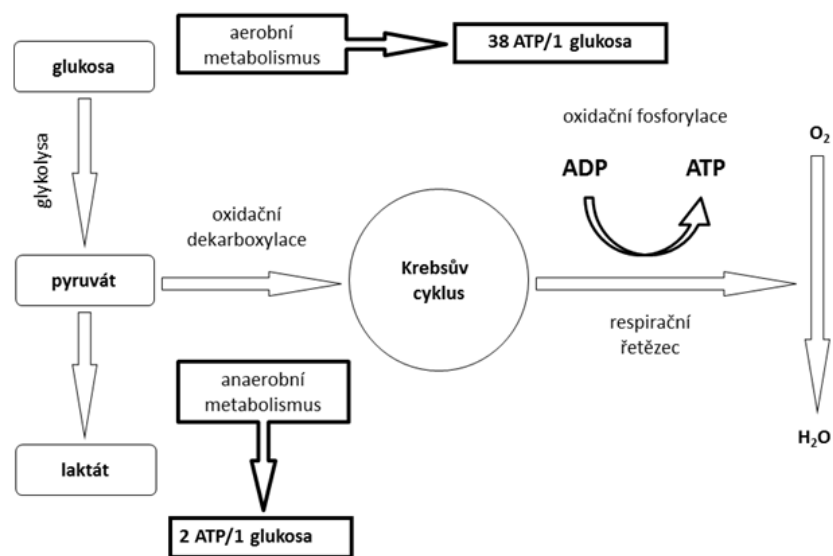
Samotná kumulace příslušných imunokompetentních buněk v dutině hrudní však spolehlivou informaci o přítomnosti a charakteru zánětlivé odpovědi v hrudní dutině neposkytuje. Výhradně na základě morfologických parametrů totiž obvykle nejsme schopni rozlišit úroveň aktivace přítomných imunokompetentních buněk (*Fila, 2001*). Do vyšetřovacího schématu je proto třeba zahrnout též parametry funkční. Na pracovištích Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem jsou s úspěchem využívány parametry energetického metabolismu glukosy. Pro tyto potřeby slouží především koeficient energetické

bilance (KEB). Ten se vypočítává z aktuálních látkových koncentrací glukosy a laktátu v hrudním punktu. Je definován jako teoretická produkce adenosintrifosfátu (ATP) z 1 molekuly glukosy za aktuálních energetických poměrů v příslušném rezervoáru extravaskulární tělní tekutiny (Kelbich et al., 1998; Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2009; Kelbich et al., 2014a; Kelbich et al., 2015; Kelbich et al., 2016; Kelbich et al., 2017).

4.1 Koeficient energetické bilance

Koeficient energetické bilance byl odvozen na základě 3 axiomů popisujících metabolismus glukosy (Obr. 7) (Karlson, 1981; Murray et al., 1998):

1. Aerobní produkce 38 molekul ATP z 1 molekuly glukosy.
2. Anaerobní produkce 2 molekul ATP z 1 molekuly glukosy.
3. Anaerobní produkce 2 molekul laktátu z 1 molekuly glukosy.



Obr. 7: Zjednodušené schéma metabolické přeměny glukosy

Pro odvození KEB nejdříve definujeme x jako látkovou koncentraci glukosy a y jako látkovou koncentraci laktátu v příslušné extravaskulární tělní tekutině:

$$x = [\text{glukosa}][\text{mmol.l}^{-1}]; y = [\text{laktát}][\text{mmol.l}^{-1}]$$

Vychází se ze skutečnosti, že počet molekul glukosy (6 uhlíkových atomů v 1 molekule) odpovídá polovičnímu množství laktátu (3 uhlíkové atomy v 1 molekule) vyprodukovaného za anaerobních podmínek (Kelbich et al., 1998; Kelbich et al., 2014a):

$$x_{\text{anaerobní}} = \frac{y}{2}$$

Z jakéhokoliv látkového množství glukosy v likvorovém kompartmentu se tedy anaerobně vyprodukuje dvojnásobné látkové množství laktátu, které je identické s vyprodukovaným množstvím ATP, tedy $[\text{ATP}_{\text{anaerobní}}] = y$. Zbývající množství glukosy v likvorovém kompartmentu je metabolisováno aerobní cestou s produkcí 38 ATP na její 1 molekulu:

$$x_{\text{aerobní}} = x - x_{\text{anaerobní}} = \left(x - \frac{y}{2}\right)[\text{ATP}_{\text{aerobní}}] = 38 \left(x - \frac{y}{2}\right)$$

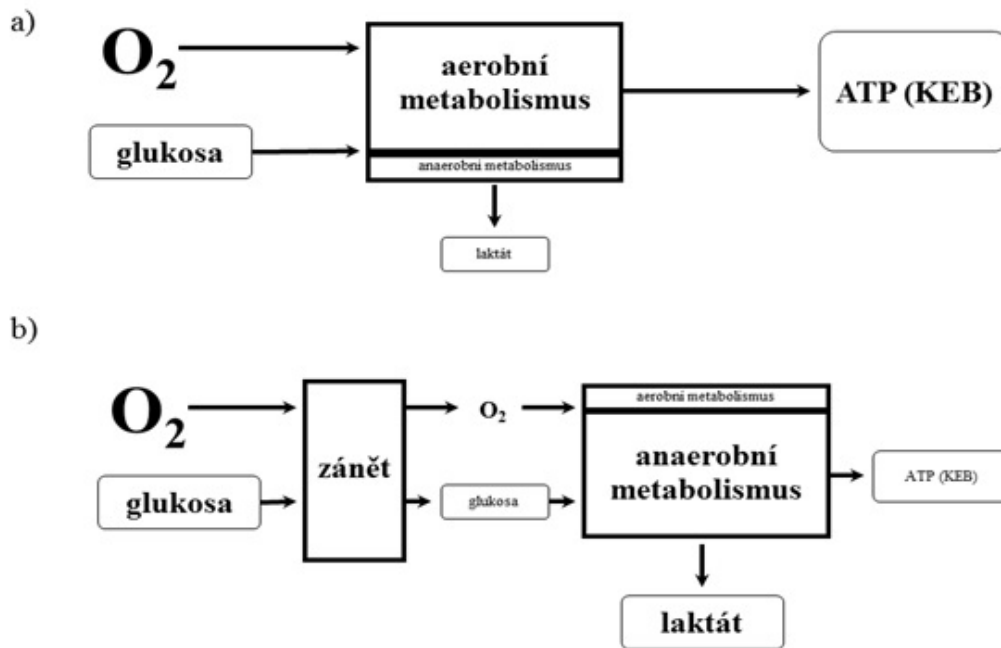
Celková produkce ATP odpovídá součtu jeho aerobní a anaerobní produkce. Lze ji tedy vyjádřit jako $[\text{ATP}] = [\text{ATP}_{\text{aerobní}}] + [\text{ATP}_{\text{anaerobní}}]$ a průměrná produkce ATP pak představuje koeficient energetické bilance, $\text{KEB} = \frac{[\text{ATP}]}{x}$. Po dosazení předešlých vztahů do čitatele dostaneme tento finální tvar pro KEB:

$$\text{KEB} = \frac{y + 38 \left(x - \frac{y}{2}\right)}{x} = 38 - 18 \frac{x}{y}$$

$$\text{KEB} = 38 - 18 \frac{[\text{laktát}]}{[\text{glukosa}]}$$

4.2 Dva modely energetických poměrů v hrudní dutině

Za normálních podmínek je v rezervoáru hrudního výpotku dostatek kyslíku k tomu, aby mohly metabolické procesy probíhat převážně aerobním způsobem, tzn. za značné produkce adenosintrifosfátu (ATP), čili při vysoké hodnotě KEB (Obr. 8a).



Obr. 8: Dva modely energetické přeměny glukosy v rezervoáru hrudního výpotku:

- a. Za normálního stavu.
- b. Při zánětlivé odpovědi v dutině hrudní.

Pokud se v hrudní dutině vyskytne nějaký patologický proces (Obr. 8b), jehož příčinou, podstatou či následkem je zánět, tak dojde k aktivaci imunokompetentních buněk. Aktivované imunokompetentní buňky mají zvýšené energetické nároky. Spotřeba glukosy lokálně narůstá a zvyšuje se též spotřeba kyslíku. To má za následek rozvoj anaerobního metabolismu v rezervoáru hrudního výpotku. Ten je z energetického pohledu značně neefektivní. Produkce energie v podobě ATP tedy klesá, což se v našem modelu projevuje snižující se hodnotou KEB (Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2014a; Kelbich et al., 2017).

4.3 Čtyři energetické stavy v rezervoáru hrudního punktátu

1. Hodnoty KEB > 28,0 představují normální energetické poměry v rezervoáru hrudního punktátu a jsou charakteristické buď pro absenci patologického procesu nebo pro mírné serosní zánětlivé změny v hrudní dutině.
2. Hodnoty KEB = 15,0 až 28,0 představují zvýšené energetické nároky aktivovaného imunitního systému při serosních zánětlivých změnách v hrudní dutině.

3. Hodnoty KEB = 10,0 až 15,0 představují hraniční oblast mezi záněty serosního charakteru a razantními záněty s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů.
4. Hodnoty KEB < 10,0 představují vysoký rozsah anaerobního metabolismu v rezervoáru hrudního výpotku na úrovni obvykle odpovídající přítomnosti razantního zánětlivého procesu s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů v dutině hrudní.

5 Cytologické vyšetření hrudních výpotků

Při cytologickém vyšetření hrudních výpotků vycházíme z principu osvědčeného při cytologickém vyšetření mozkomíšního moku. Prvním krokem tedy je kvantitativní vyšetření spočívající ve zjištění počtu buněk v hrudním výpotku. To se provádí spočítáním jaderných elementů a erytrocytů ve 3 μ l materiálu ve Fuchsově-Rosenthalově komůrce (Obr. 15). Dle Biomedicínského centra Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem je za normální považován počet jaderných elementů v hrudním výpotku do 500/3 μ l. Tento stav s ohledem na výsledky kvalitativního cytologického obrazu hrudního výpotku hodnotíme buď jako normální nález nebo jako patologickou oligocytosu v případě nálezu indicií patologického procesu v lokalitě odběru. Přívlastek patologické oligocytosy pak obvykle volíme s ohledem na převažující buněčnou linii, příp. s ohledem na nález nádorových buněk (*Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2009; Kelbich et al., 2013a; Sobek et al. 2009; Sobek et al., 2012; Felgenhauer, 1998*).

V případě počtu buněk převyšující 500/3 μ l je nález označován jako pleiocytosa, opět s přívlastkem odpovídajícím dominující buněčné linii či nálezu nádorových elementů (*Sobek et al., 2009; Kelbich et al., 2011*).

Kvalitativní cytologický obraz hrudního punktátu se získá zhodnocením trvalého cytologického preparátu. Jeho příprava se provádí buď cytosedimentací (Obr. 9) nebo cytocentrifugací (Obr. 10), kdy se buňky a další pozorovatelné objekty z hrudního punktátu soustředí do omezené oblasti na podložním skle. Následuje aplikace příslušného cytologického barvení, řádné vysušení, zamontování do balzámu a prohlížení světelným mikroskopem (*Sobek et al., 2009; Sobek et al., 2012*).



Obr. 9: Cytosedimentační komůrka



Obr. 10: Cytocentrifuga StatSpin Cytofuge 2

6 Cytologicko-energetické hodnocení hrudních výpotků

6.1 Imunokompetentní buňky v hrudním výpotku

6.1.1 Lymfocytární elementy

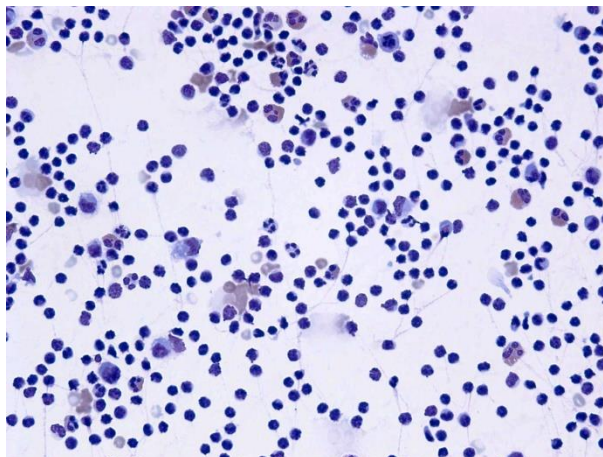
Lymfocytární elementy (Obr. 11) jsou v hrudních výpotcích běžně přítomné. Jedná se o morfologicky poměrně uniformní buňky, které jsou ale z funkčního hlediska velmi rozmanité. Rámcově lze odlišit B lymfocyty s tendencí k protilátkové produkci, T lymfocyty s řadou regulačních funkcí a schopností cytotoxické zánětlivé reakce a NK buňky rovněž sledující cytotoxickou zánětlivou reakci (*Hořejší a Bartůňková, 2009; Krejsek et al., 2016*).

Nález neaktivovaných nebo pouze mírně aktivovaných lymfocytárních elementů při normálních energetických poměrech v oblasti odběru hrudního punktátu vyjádřených hodnotami KEB > 28,0 není obrazem patologických změn v hrudní dutině.

Naproti tomu přítomnost plasmatických buněk v hrudním výpotku je již hodnocena jako projev lokální zánětlivé odpovědi s protilátkovou produkcí. Energetické poměry zjištěné analýzou hrudního výpotku pak odpovídají intenzitě lokálního zánětlivého procesu. V případě serosních zánětů obecně, včetně těch s protilátkovou produkcí, nacházíme buď normální energetické poměry v rezervoáru hrudního výpotku vyjádřené hodnotami KEB > 28,0 nebo mírně až středně zvýšený rozsah anaerobního metabolismu v téže lokalitě vyjádřené hodnotami KEB v rozmezí od 15,0 do 28,0 (*Kelbich et al. 2007; Kelbich et al., 2013a; Kelbich et al., 2014a; Kelbich et al., 2015*).

Dominující výskyt lymfocytárních elementů v hrudním výpotku v kombinaci s vysokým rozsahem anaerobního metabolismu v oblasti jeho odběru vyjádřeným hodnotami KEB < 10,0 obvykle odpovídá přítomnosti razantního zánětu s oxidačním vzplanutím makrofágů. Příčinou zánětu tohoto charakteru obvykle bývá infekce intracelulárními bakteriemi, mykotickými agens nebo nádorový proces (*Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2011; Kelbich et al., 2013a; Kelbich et al., 2014a*). Mechanismus tohoto zánětu se odvíjí od makrofágové fagocytózy příslušného agens. Neaktivovaný makrofág ale zpravidla nedokáže fagocytovaný substrát popsaného charakteru účinně zlikvidovat. Pro zásadní zvýšení mikrobicidního či tumor eliminujícího účinku je nezbytná jeho aktivace působením interferonu γ (IFN- γ) produkovaným CD4⁺ Th1 lymfocyty, cytotoxickými CD8⁺ Tc lymfocyty nebo NK (natural killer) buňkami. Aktivovaný makrofág se pak

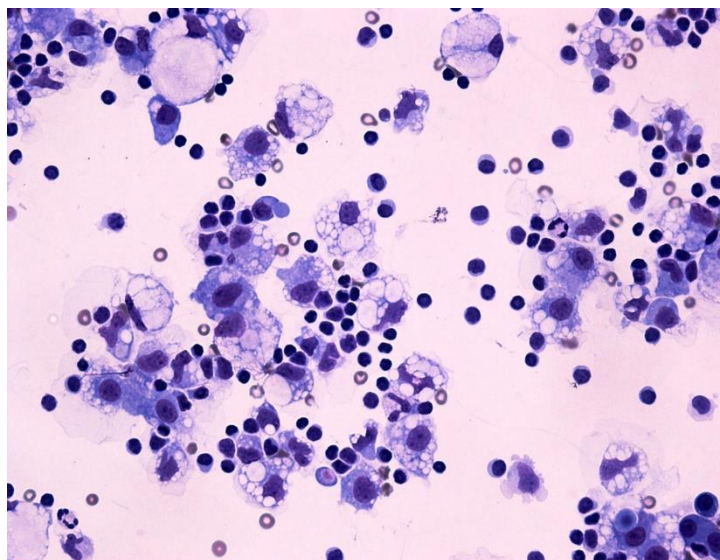
vyznačuje hojnou produkci prozánětlivých cytokinů interleukinu 1 (IL-1) a tumor-nekrotizujícího faktoru α (TNF- α).



Obr. 11: Převaha lymfocytárních buněk v hrudním výpotku

6.1.2 Monocytárně-makrofagické elementy

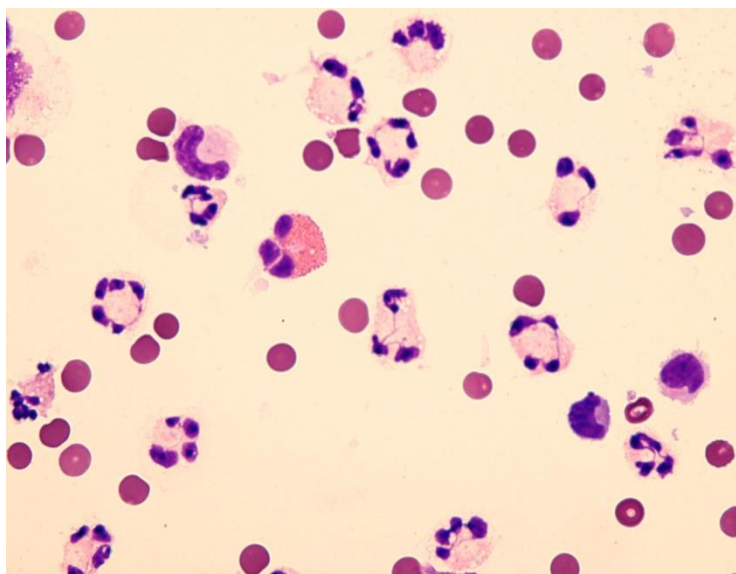
Monocytárně-makrofagické elementy (Obr. 12) stojí na rozhraní nespecifické a specifické imunity. Jejich důležitou úlohou je udržovat imunitní systém v neustálé pohotovosti. Přírodním prostředím těchto buněk je tkáň. Jejich zvýšenou přítomnost v hrudním výpotku lze obvykle zaznamenat v souvislosti s tzv. úklidovou reakcí doprovázející různé procesy, včetně lokálního zánětu, strukturálního poškození tkáně, krvácení atd. Aktuální energetické poměry při dominující přítomnosti monocytárně-makrofagických elementů v hrudním výpotku obvykle odpovídají zánětu doprovázejícímu příslušný patologický proces v dutině hrudní. Reaktivní či serosní zánětlivé změny různé příčiny se tak projevují normálními energetickými poměry ($KEB > 28,0$) či relativně mírně zvýšeným rozsahem anaerobního metabolismu ($15,0 < KEB \leq 28,0$) v této lokalitě. Jak již bylo uvedeno, razantní záněty s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů se vyznačují velmi vysokými rozsahy anaerobního metabolismu vyjádřenými velmi nízkými hodnotami $KEB < 10,0$). Na základě dalších indicií je pak nutné diferencovat mezi úklidovou reakcí doprovázející purulentní zánětlivý proces v předmětné lokalitě, nebo již zmíněným razantním zánětem s oxidačním vzplanutím makrofágů, na němž se tyto elementy podílejí aktivně (Krejsek a Kopecký, 2004; Krejsek et al., 2016; Hořejší a Bartůňková, 2009; Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2013a; Kelbich et al., 2014a; Kelbich et al., 2015).



Obr. 12: Četné monocytárně-makrofagické elementy v hrudním výpotku

6.1.3 Neutrofilní granulocyty

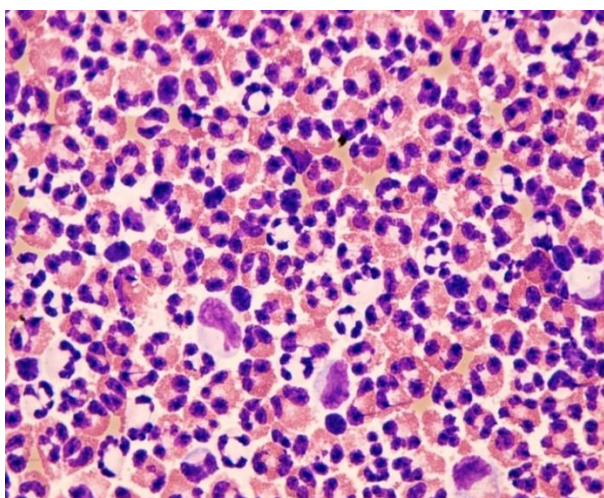
Neutrofilní granulocyty jsou buňky nespecifické imunity (Obr. 13). K jejich kumulaci v hrudním výpotku obvykle vedou více či méně závažné lokální komplikace, které vyžadují bezprostřední reakci imunitního systému. Těmito komplikacemi obvykle bývají infekce extracelulárními bakteriemi, strukturální poškození tkáně, krvácení atd. Společné hodnocení přítomnosti neutrofilních granulocytů a úrovně energetických poměrů v hrudním výpotku je pro správné zhodnocení aktuálního stavu velmi důležité. Umožňuje totiž diferencovat mezi relativně pasivní přítomností těchto elementů v hrudní dutině při normálních energetických poměrech ($KEB > 28,0$) nebo při relativně mírně zvýšeném rozsahu anaerobního metabolismu ($15,0 < KEB < 28,0$) v hrudní dutině, které nazýváme jako stav preventivní protekce a vysokým stupněm jejich aktivace ve smyslu oxidačního vzplanutí, které nazýváme purulentním zánětem, který se vyznačuje vysokým rozsahem anaerobního metabolismu v předmětné lokalitě ($KEB < 10,0$) (Krejsek a Kopecký, 2004; Krejsek et al., 2016; Kelbich et al., 2007; Hořejší a Bartůňková, 2009; Kelbich et al., 2013a; Kelbich et al., 2014a; Kelbich et al., 2015; Hořejší a Bartůňková, 2009; Schauer et al., 2014).



Obr. 13: Převaha neutrofilních granulocytů v hrudním výpotku

6.1.4 Eosinofilní granulocyty

Eosinofilní granulocyty jsou rovněž buňky nespecifické imunity (Obr. 14). Obvykle bývají zmiňovány v souvislosti s obranou organismu proti parazitům v gastrointestinálním traktu a alergickými záněty. Eosinofilní granulocyty jsou též významným producentem transformujícího růstového faktoru β (TGF- β), nezbytného pro průběh reparačních procesů. To je také důvod, proč se přítomnost eosinofilních granulocytů v hrudních výpotcích posuzuje především ve vztahu k reparaci a regeneraci poškozené tkáně (Krejsek a Kopecký, 2004; Krejsek et al., 2016; Hořejší a Bartůňková, 2009; Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2015).



Obr. 14: Převaha eosinofilních granulocytů v hrudním výpotku

6.2 Detekce strukturálního poškození tkáně v hrudní dutině

Pro detekci a určení rozsahu destrukce tkáně v dutině hrudní se na pracovištích Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem využívá obecně dostupné a levné vyšetření koncentrace katalytické aktivity aspartátaminotransferasy (AST) v hrudním výpotku (*Matuchová, 2014*).

7 Materiál a metody

7.1 Použitý materiál

Studovaným biologickým materiálem byly vzorky hrudních výpotků od pacientů z oddělení hrudní chirurgie a plicního oddělení Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem.

7.1.1 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Modulární analytický systém Cobas 6000[®] c501 (Roche Diagnostics, Švýcarsko)
- Centrifuga Universal 30F (Schoeller Instruments, Německo)
- Cytocentrifuga StatSpin Cytofuge 2 (Iris Sample Processing, USA)
- Fuchsova-Rosenthalova komůrka
- Mikroskop BX40 (Olympus, Japonsko)
- Podložní a krycí skla pro přípravu cytologického preparátu hrudního výpotku
- Automatické pipety, špičky, zkumavky a další běžný spotřební laboratorní materiál

7.1.2 Použité chemikálie pro přípravu trvalého cytologického preparátu hrudního výpotku

- Hemacolor[®] (Merck, Německo)
- Entellan[®] (Merck, Německo)
- demineralizovaná voda

7.1.3 Software

- Software pro Cobas 6000[®] c501 (Roche Diagnostics, Švýcarsko)
- Laboratorní informační systém OpenLims (Stapro, ČR)
- Nemocniční informační systém FONS Enterprise (Stapro, ČR)

7.1.4 Metodika

Na oddělení klinické biochemie Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem jsem se teoreticky i prakticky seznámila se způsobem vyšetřování hrudních výpotků. Z obdržených výsledků vyšetření příslušných laboratorních parametrů hrudních výpotků jsme vytvořili databázi.

7.2 Preanalytická fáze

Vzorky hrudních výpotků byly odebrány do čistých zkumavek bez aditiv. Zkumavky byly patřičně označeny a co nejrychleji dopraveny na oddělení klinické biochemie Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem. Zde byly vzorky okamžitě zpracovány. Část vzorku byla použita k vyšetření počtu jaderných elementů a erytrocytů v hrudním výpotku a přípravě trvalého cytologického preparátu. Zbytek vzorku byl centrifugován ($1500 \times g$, 10 minut, laboratorní teplota). Supernatant jsme použili k vyšetření humorálních parametrů a jeho zbylou část jsme uskladnili v chladicím boxu při teplotě 4 až 8 °C.

7.3 Vyšetření počtu jaderných elementů a erytrocytů v hrudním výpotku

Do Fuchsovy-Rosenthalovy komůrky (Obr. 15) o objemu 3,2 μl jsme nanесли příslušný objem nativního vzorku hrudního výpotku. V tomto vzorku jsme stanovili počet jaderných elementů a erytrocytů. Výsledné hodnoty obou parametrů jsou udávány v podobě „počet jaderných elementů/3 μl “ „počet erytrocytů/3 μl “.



Obr. 15: Fuchsova-Rosenthalova komůrka pro vyšetření počtu jaderných elementů a erytrocytů v hrudním výpotku

7.4 Příprava trvalého cytologického preparátu z hrudního výpotku

Nejprve jsme centrifugací separovali buněčné složky od tekuté složky hrudního výpotku ($55 \times g$, 8 minut, laboratorní teplota). Po zaschnutí buněk sedimentovaných na podložním skle jsme ve všech případech použili pro rychlé barvení krevních nátěrů modifikaci cytologického barvení dle Maye-Grünwalda, Hemacolor[®] (Merck).

Po barvení jsme cytologický preparát opláchli demineralizovanou vodou a po zaschnutí zamontovali Entellanem a krycím sklíčkem.

7.5 Odečet cytologického preparátu hrudního výpotku

Odečet a zhodnocení cytologických preparátů hrudního výpotku provedl ve všech případech kvalifikovaný laboratorní pracovník na světelném mikroskopu Olympus BX40 při zvětšení 400x.

8 Stanovení humorálních parametrů biochemickým analyzátořem Cobas 6000[®] c501

Ve všech vzorcích jsme stanovili látkové koncentrace glukosy a laktátu, katalytickou koncentraci AST a vypočítali hodnotu *KEB*.

Metody měření, jejich principy, pracovní roztoky, kalibrátory, kontrolní materiál a související výpočty

Reagencie – pracovní roztoky pro stanovení látkové koncentrace glukosy v hrudních výpotcích (Roche Diagnostics, Švýcarsko)

- Roztok 1 - MES pufr o koncentraci 5 mmol/l a pH 6,0; Mg²⁺ ionty o koncentraci 24 mmol/l; ATP: ≥ 4,5 mmol/l; NADP⁺: ≥ 7,0 mmol/l; konzervans
- Roztok 2 - hexokinasa (EC 2.7.1.1; z kvasinky): ≥ 300 μkat/l; glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (EC 1.1.1.49; z *E. coli*): ≥ 300 μkat/l; konzervans
- Roztok 3 - HEPES pufr o koncentraci 200 mmol/l a pH 8,0; Mg²⁺ ionty o koncentraci 4 mmol/l

Reagencie – pracovní roztoky pro stanovení látkové koncentrace laktátu v hrudních výpotcích (Roche Diagnostics, Švýcarsko)

- Roztok 1 - NADH+H⁺ o koncentraci 1,75 mmol/l; askorbát oxidasa (EC 1.10.3.3; z okurky): 501 μkat/l; pufr, konzervans
- Roztok 2 - 4-aminoantipyrin o koncentraci 5 mmol/l; laktát oxidasa EC 1.1.3.2; mikrobiální): 251 μkat/l; křenová peroxidasa (EC 1.11.1.7): 410 μkat/l; pufr, konzervans

Reagencie - pracovní roztoky pro stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotranferasy v hrudních výpotcích (Roche Diagnostics, Švýcarsko)

- Roztok 1 - TRIS pufr o koncentraci 264 mmol/l a pH 7,8 (37 °C), L-aspartát o koncentraci 792 mmol/l; malátdehydrogenasa (EC 1.1.1.37; mikrobiální): ≥ 24 μkat/l; laktátdehydrogenasa EC 1.1.1.27; mikrobiální): ≥ 48 μkat/l; 0,25% roztok hovězího albuminu; konzervans

- Roztok 2 - Pyridoxalfosfát o koncentraci 730 $\mu\text{mol/l}$; konzervans
- Roztok 3 - NADH (z kvasinky): $\geq 1,7 \text{ mmol/l}$; 2-oxoglutarát o koncentraci 9 mmol/l ; konzervans

Kalibrační soupravy pro analytický systém Cobas 6000[®] c501

Kalibrátor (Roche Diagnostics, Švýcarsko) – lyofilizované lidské sérum se známými koncentracemi vybraných analytů.

Kontrolní materiál pro analytický systém Cobas 6000[®] c501 (Roche Diagnostics, Švýcarsko)

- Kontrolní materiál ClinChem Multi 1 - lyofilizované lidské sérum se známými koncentracemi vybraných analytů
- Kontrolní materiál ClinChem Multi 2 - lyofilizované lidské sérum se známými koncentracemi vybraných analytů

Principy metod

Stanovení látkové koncentrace glukosy v hrudních výpotcích

Glukosa je fosforylována za katalýzy hexokinasou (HK) v přítomnosti ATP a iontů hořčnatých za vzniku glukosa-6-fosfátu (G-6-P) a ADP. Za katalýzy glukosa-6-fosfátdehydrogenasy se G-6-P oxiduje na glukonát-6-fosfát za souběžné redukce NAD^+ na $\text{NADH}+\text{H}^+$, který absorbuje při 340 nm.

Stanovení látkové koncentrace laktátu v hrudních výpotcích

Laktát je za katalýzy laktát oxidasou oxidován na pyruvát, dále vzniká peroxid vodíku. Koncentrace vzniklého peroxidu vodíku je přímo úměrná koncentraci laktátu. Vzniklý peroxid vodíku se využije k oxidační kopulaci 4-aminoantipyrinu s fenolem na chinoniminové barvivo absorbující při 548 nm. Reakce je katalyzována peroxidasou.

Stanovení katalytické koncentrace AST v hrudních výpotcích

AST katalyzuje přenos aminoskupiny z L-aspartátu na 2-oxoglutarát za vzniku oxalacetátu a L-glutamátu. Oxalacetát je za katalýzy malátdehydrogenasou redukován na malát za souběžné oxidace $\text{NADH}+\text{H}^+$ na NAD^+ . Rychlost úbytku koncentrace $\text{NADH}+\text{H}^+$, který absorbuje při 340 nm, je úměrná aktivitě AST.

9 Experimentální část

Provedli jsme cytologicko-energetické vyšetření 1491 vzorků hrudních výpotků doplněné o stanovení katalytické koncentrace AST u pacientů s různým postižením orgánů dutiny hrudní z oddělení hrudní chirurgie a z plicního oddělení Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem. Naším cílem bylo specifikovat charakter zánětlivého procesu, který způsobuje nejrozsáhlejší poškození tkáně. Charakter zánětu jsme určili na základě cytologicko-energetického principu vyšetření extravaskulárních tělních tekutin (*Kelbich et al., 1998; Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2013a,b; Kelbich et al., 2014a,b; Kelbich et al., 2015; Kelbich et al., 2016; Kelbich et al., 2017*). Rozsah strukturálního poškození tkáně jsme určili na základě katalytické koncentrace AST v hrudních výpotcích (*Pecháň, 1989; Matuchová, 2014*).

Soubor vyšetřených vzorků hrudních výpotků jsme rozdělili do 16 skupin podle dominujících imunokompetentních buněk, tzn. neutrofilních granulocytů, eosinofilních granulocytů, lymfocytů a monocytárně-makrofagických elementů a lokálních rozsahů anaerobního metabolismu vyjádřených hodnotami KEB (Tab. 1). Hodnoty KEB < 10,0 představují vysoký rozsah anaerobního metabolismu v oblasti odběru, obvykle odpovídající přítomnosti razantního zánětlivého procesu s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů v předmětné lokalitě, hodnoty KEB = 10,0 až 15,0 tvoří hranici mezi razantními zánětlivými procesy s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů a záněty mírnějšího charakteru, které souhrnně označujeme jako záněty serosní. Hodnoty KEB = 15,0 až 28,0 odpovídají zvýšeným energetickým nárokům aktivovaného imunitního systému při serosních zánětlivých změnách v oblasti odběru hrudního výpotku a hodnoty KEB > 28,0 odpovídají normálním energetickým poměrům v předmětné lokalitě (*Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2011; Kelbich et al., 2013a; Kelbich et al., 2014a; Kelbich et al., 2016; Kelbich et al., 2017*).

Zmíněné skupiny hrudních výpotků jsme charakterizovali mediány a rozptily katalytické koncentrace AST a provedli jsme jejich porovnání neparametrickým Kruskal-Wallisovým (K-W) testem ($p < 0,05$) s post-hoc vícenásobným porovnáním p-hodnot. Testovali jsme nulovou hypotézu H_0 , že se distribuční funkce jednotlivých výběrů neliší proti alternativní hypotéze H_1 , že se jejich distribuční funkce liší a pleurální výpotky s různou úrovní katalytické koncentrace AST pocházejí z odlišných základních souborů.

Tab. 1: Mediány katalytické koncentrace AST v hrudních výpotcích rozdělených do skupin s ohledem na převažující imunokompetentní buňky a energetické poměry

AST [$\mu\text{kat.l}^{-1}$]	KEB < 10,0	$10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$	$15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$	KEB > 28,0
převažující imunokompetentní buňky	počet vzorků medián AST (rozsah; $\mu\text{kat/l}$)	počet vzorků medián AST (rozsah; $\mu\text{kat/l}$)	počet vzorků medián AST (rozsah; $\mu\text{kat/l}$)	počet vzorků medián AST (rozsah; $\mu\text{kat/l}$)
neutrofilní granulocyty	n = 352 2,16 (0,05 – 100,17)	n = 31 1,00 (0,17 – 3,78)	n = 117 1,10 (0,13 – 15,39)	n = 126 0,33 (0,04 – 4,11)
eosinofilní granulocyty	n = 5 0,91 (0,27 – 9,81)	n = 0	n = 10 0,54 (0,24 – 1,18)	n = 22 0,32 (0,15 – 0,79)
lymfocyty	n = 56 0,75 (0,16 – 28,20)	n = 15 0,51 (0,17 – 2,31)	n = 145 0,43 (0,08 – 3,17)	n = 415 0,26 (0,05 – 3,55)
monocyty	n = 43 0,94 (0,12 – 9,31)	n = 6 0,54 (0,25 – 1,61)	n = 29 0,48 (0,09 – 1,64)	n = 119 0,23 (0,02 – 3,31)

Legenda:

KEB = koeficient energetické bilance

AST = aspartátaminotransferasa

n = počet analyzovaných vzorků hrudních výpotků

Tab. 2: Porovnání katalytických koncentrací AST ve vzorcích hrudních výpotků rozdělených podle převažujících imunokompetentních buněk na různých energetických hladinách neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem ($p < 0,05$)

statisticky významný rozdíl: $p < 0,05$	eosinofilní granulocyty (hodnoty p)	lymfocyty (hodnoty p)	monocyty (hodnoty p)
KEB < 10,0			
neutrofilní granulocyty	0,550	< 0,001	< 0,001
eosinofilní granulocyty	---	1,000	1,000
lymfocyty	1,000	---	1,000
$10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$			
neutrofilní granulocyty	---	0,032	0,344
eosinofilní granulocyty	---	---	---
lymfocyty	---	---	1,000
$15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$			
neutrofilní granulocyty	0,073	< 0,001	< 0,001
eosinofilní granulocyty	---	1,000	1,000
lymfocyty	1,000	---	1,000
KEB > 28,0			
neutrofilní granulocyty	1,000	0,005	< 0,001
eosinofilní granulocyty	---	0,559	0,036
lymfocyty	0,559	---	0,056

Legenda:

KEB = koeficient energetické bilance

Tab. 3: Porovnání katalytických koncentrací AST mezi různými energetickými hladinami ve vzorcích hrudních výpotků rozdělených podle převažujících imunokompetentních buněk neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem ($p < 0,05$)

statisticky významný rozdíl: $p < 0,05$	$10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$ (hodnoty p)	$15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$ (hodnoty p)	$\text{KEB} > 28,0$ (hodnoty p)
neutrofilní granulocyty			
KEB < 10,0	0,003	< 0,001	< 0,001
$10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$	---	1,000	0,001
$15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$	1,000	---	< 0,001
eosinofilní granulocyty			
KEB < 10,0	---	1,000	0,094
$10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$	---	---	---
$15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$	---	---	0,078
lymfocyty			
KEB < 10,0	1,000	0,006	< 0,001
$10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$	---	1,000	0,003
$15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$	1,000	---	< 0,001
monocyty			
KEB < 10,0	1,000	0,083	< 0,001
$10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$	---	1,000	0,065
$15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$	1,000	---	< 0,001

Legenda:

KEB = koeficient energetické bilance

10 Výsledky

10.1 Hodnocení katalytické koncentrace AST v hrudních výpotcích podle převažujících imunokompetentních elementů

Nejprve jsme porovnali katalytickou koncentraci AST na příslušných energetických úrovních vyjádřených odpovídajícími hodnotami KEB ve skupinách hrudních výpotků rozdělených podle dominujících imunokompetentních buněk.

Na úrovni vysokých rozsahů anaerobního metabolismu vyjádřených hodnotami $KEB < 10,0$ jsme zjistili Kruskal-Wallisovým testem (K-W) na 5% hladině významnosti statisticky významně vyšší katalytickou koncentraci AST v hrudních výpotcích s dominujícím výskytem neutrofilních granulocytů oproti hrudním výpotkům s dominující přítomností lymfocytárních elementů a hrudním výpotkům s dominující přítomností monocytárně-makrofagických elementů. Mezi ostatními skupinami hrudních výpotků jsme statisticky významné rozdíly nenalezli (Tab. 2).

Na energetické úrovni odpovídající přechodu mezi razantními záněty s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů a méně intenzivními serosními záněty vyjádřené hodnotami $10,0 \leq KEB < 15,0$ jsme zjistili K-W testem na 5% hladině významnosti statisticky významně vyšší katalytickou koncentraci AST v hrudních výpotcích s dominujícím výskytem neutrofilních granulocytů oproti hrudním výpotkům s dominující přítomností lymfocytárních elementů. Mezi ostatními skupinami hrudních výpotků jsme statisticky významné rozdíly nenalezli (Tab. 2).

Na energetické úrovni odpovídající zvýšeným energetickým nárokům aktivovaného imunitního systému při serosních zánětlivých změnách v hrudní dutině vyjádřené hodnotami $15,0 \leq KEB < 28,0$ jsme zjistili K-W testem na 5% hladině statisticky významně vyšší katalytickou koncentraci AST v hrudních výpotcích s dominujícím výskytem neutrofilních granulocytů oproti hrudním výpotkům s dominující přítomností lymfocytárních elementů a oproti hrudním výpotkům s dominující přítomností monocytárně-makrofagických elementů. Mezi ostatními skupinami hrudních výpotků jsme statisticky významné rozdíly nenalezli (Tab. 2).

Na úrovni odpovídající normálním energetickým poměrům v hrudní dutině vyjádřené hodnotami $KEB > 28,0$ jsme zjistili K-W testem na 5% hladině statisticky významně vyšší

katalytickou koncentraci AST v hrudních výpotcích s dominujícím výskytem neutrofilních granulocytů oproti hrudním výpotkům s dominující přítomností lymfocytárních elementů a oproti hrudním výpotkům s dominující přítomností monocytárně-makrofagických elementů a dále pak statisticky významně vyšší katalytickou koncentraci AST v hrudních výpotcích s dominujícím výskytem eosinofilních granulocytů oproti hrudním výpotkům s dominující přítomností monocytárně-makrofagických elementů. Mezi ostatními skupinami hrudních výpotků jsme statisticky významné rozdíly nenalezli (Tab. 2).

10.2 Hodnocení katalytické koncentrace AST v hrudních výpotcích podle energetických poměrů

Další hodnocení katalytické koncentrace AST jsme provedli s ohledem na dominující výskyt příslušných imunokompetentních buněk v hrudních výpotcích podle měnících se energetických poměrů vyjádřených příslušnými hodnotami KEB.

U hrudních výpotků s dominujícím výskytem neutrofilních granulocytů jsme zjistili K-W testem na 5% hladině statisticky významně vyšší katalytickou koncentraci AST v případech vysokých rozsahů anaerobního metabolismu vyjádřených hodnotami KEB $< 10,0$ oproti hraničním energetickým poměrům mezi razantními záněty s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů vyjádřeným hodnotami $10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$, oproti zvýšeným energetickým nárokům aktivovaného imunitního systému při serosních zánětlivých změnách vyjádřeným hodnotami $15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$ a oproti normálním energetickým poměrům vyjádřeným hodnotami KEB $> 28,0$ (Tab. 3). U hrudních výpotků s dominujícím výskytem neutrofilních granulocytů jsme dále zjistili statisticky významně vyšší katalytickou koncentraci AST ve skupině hraničních energetických poměrů mezi razantními záněty s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů vyjádřenými hodnotami $10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$ a normálními energetickými poměry vyjádřenými hodnotami KEB $> 28,0$ a také statisticky významně vyšší katalytickou koncentraci AST v případě vyšších rozsahů anaerobního metabolismu odpovídajících vyšším energetickým nárokům aktivovaného imunitního systému při serosních zánětlivých změnách vyjádřených hodnotami $15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$ oproti normálním energetickým poměrům vyjádřeným hodnotami KEB $> 28,0$ (Tab. 3). Mezi hrudními výpotky s dominujícím výskytem neutrofilních granulocytů a hodnotami $10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$ a hodnotami $15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$ jsme statisticky významné rozdíly v katalytické koncentraci AST neprokázali (Tab. 3).

U hrudních výpotků s dominujícím výskytem eosinofilních granulocytů jsme mezi různými energetickými úrovněmi vyjádřenými hodnotami $KEB < 10,0$, $15,0 \leq KEB \leq 28,0$ a $KEB > 28,0$ při testování K-W testem statisticky významné rozdíly nezjistili (Tab. 3).

U hrudních výpotků s dominujícím výskytem lymfocytárních elementů jsme při testování K-W testem zjistili statisticky významně vyšší katalytickou koncentraci AST ve skupině vysokých rozsahů anaerobního metabolismu odpovídajících přítomnosti razantního zánětu s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů vyjádřených hodnotami $KEB < 10,0$ oproti skupinám s nižším rozsahem anaerobního metabolismu vyjádřených hodnotami $15,0 \leq KEB \leq 28,0$ a $KEB > 28,0$ (Tab. 3). Dále jsme zjistili statisticky významně vyšší katalytickou koncentraci AST ve skupině hraničních rozsahů anaerobního metabolismu mezi razantními záněty s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů a serosními záněty vyjádřených hodnotami $10,0 \leq KEB < 15,0$ a také ve skupině serosních zánětů vyjádřených hodnotami $15,0 \leq KEB \leq 28,0$ oproti normálním energetickým poměrům vyjádřených hodnotami $KEB > 28,0$ (Tab. 3). Mezi ostatními energetickými hladinami jsme statisticky významné rozdíly nenalezli (Tab. 3).

U hrudních výpotků s dominujícím výskytem monocytárně-makrofagických elementů jsme při testování K-W testem zjistili statisticky významně zvýšenou katalytickou koncentraci AST u hrudních výpotků s vysokými rozsahy anaerobního metabolismu na úrovni razantních zánětů s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů vyjádřených hodnotami $KEB < 10,0$ a u pleurálních výpotků se zvýšenými rozsahy anaerobního metabolismu na úrovni odpovídající zvýšeným energetickým nárokům aktivovaného imunitního systému při serosních zánětlivých změnách vyjádřených hodnotami $15,0 \leq KEB \leq 28,0$ oproti pleurálním výpotkům s normálními energetickými poměry vyjádřenými hodnotami $KEB > 28,0$ (Tab. 3).

11 Diskuse

Na základě cytologicko-energetického rozboru 1491 vzorků hrudních výpotků charakterizujeme procesy v hrudní dutině:

1. Převažující výskyt neutrofilních granulocytů a vysoký rozsah anaerobního metabolismu (KEB < 10,0).

Nositeli zánětlivé reakce jsou neutrofilní granulocyty. Vysoký rozsah anaerobního metabolismu v hrudním výpotku odpovídá jejich oxidačnímu vzplanutí. Tento stav je označován jako purulentní zánětlivý proces a jeho obvyklou příčinou je infekce extracelulárními bakteriemi. Katalytická koncentrace AST v hrudních výpotcích významně převyšuje všechny ostatní skupiny a odpovídá tak významné tendenci purulentního zánětu poškozovat tkáň (*Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2011; Kelbich et al., 2014a; Krejsek a Kopecký, 2004; Krejsek et al., 2016; Hořejší a Bartůňková, 2009; Matuchová, 2014*).

Právě do této skupiny náleží všechny případy plnohodnotných hrudních empyémů.

2. Převažující výskyt neutrofilních granulocytů a rozsah anaerobního metabolismu na úrovni přechodu mezi razantními záněty s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů a serosními záněty v hrudní dutině ($10,0 \leq \text{KEB} < 15,0$).

Nositeli zánětlivé reakce jsou opět neutrofilní granulocyty. Její intenzita je ale nižší a tvoří přechod mezi mírnými serosními záněty ve smyslu preventivní protekce se zvýšeným rizikem vzplanutí purulentního zánětu a plnohodnotným purulentním zánětem. Nižší intenzitě zánětu pak odpovídá v porovnání s 1. skupinou podstatně nižší rozsah poškození tkáně vyjádřený statisticky významně nižší katalytickou koncentrací AST.

3. Převažující výskyt neutrofilních granulocytů a zvýšený rozsah anaerobního metabolismu na úrovni zvýšených energetických nároků aktivovaného imunitního systému při serosních zánětlivých změnách v hrudní dutině ($15,0 \leq \text{KEB} \leq 28,0$).

V porovnání s výše popsanými skupinami se jedná o zánětlivý proces nižší intenzity. Setkáváme se zde jednak s případy mobilizace neutrofilních granulocytů ve smyslu preventivní protekce, tzn. zvýšeného rizika vzplanutí purulentního zánětu, nebo s regredujícími záněty, které svými parametry již nesplňují kritéria purulentního zánětu (*Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2017*). Rovněž v této skupině dosahuje katalytická

koncentrace AST v hrudních výpotcích v porovnání se skupinou purulentních zánětů významně nižších úrovní, což odpovídá podstatně nižším rozsahům destrukce tkáně v hrudní dutině.

4. Převažující výskyt neutrofilních granulocytů a normální energetické poměry v hrudní dutině (KEB > 28,0).

Tuto skupinu lze charakterizovat jako absenci zánětlivých změn, příp. jako mírné lokální serosní zánětlivé změny v hrudní dutině. Zvýšená přítomnost neutrofilních granulocytů reprezentuje mobilizaci nespecifické imunity a obvykle je označována jako preventivní protekce se zvýšeným rizikem vzplanutí purulentního zánětu (*Kelbich et al., 2007; Kelbich et al., 2017*). Absence výraznějších zánětlivých změn koreluje s nízkou katalytickou koncentrací AST, která nenasvědčuje významnějšímu poškození tkáně v předmětné lokalitě.

5. Převažující výskyt eosinofilních granulocytů v celém rozsahu energetických poměrů od výrazně anaerobního metabolismu (KEB < 10,0) až po normální energetické poměry (KEB > 28,0) v hrudní dutině.

V našem souboru vyšetřených hrudních výpotků nehrají ani při dominujícím zastoupení eosinofilní granulocyty přesvědčivou úlohu efektorových buněk zánětu, ale spíše imunokompetentních buněk podílejících se zásadním způsobem na reparaci a regeneraci tkáně (*Krejsek a Kopecký, 2004*). Z toho vyplývá, že pozorované energetické změny nejdou na vrub eosinofilních granulocytů, ale spíše buněk, které jsou nositeli příslušného zánětlivého procesu. Vzhledem k malému počtu případů s převahou eosinofilních granulocytů v našem souboru vyšetřených hrudních výpotků jsme neprokázali statisticky významný rozdíl katalytické koncentrace AST mezi žádnou z energetických úrovní. Přesto je ale trend zvyšujícího se rozsahu tkáňového poškození spolu s narůstající intenzitou lokálního zánětlivého procesu patrný i v těchto případech.

6. Převažující výskyt lymfocytárních elementů a vysoký rozsah anaerobního metabolismu v hrudní dutině (KEB < 10,0).

Lymfocyty lze považovat za efektorové buňky zánětlivého procesu. Na úrovni světelné mikroskopie jsou morfologicky uniformní, ale funkčně tvoří rozmanitou skupinu

imunokompetentních buněk. Jejich převažující výskyt v hrudních výpotcích při současném vysokém rozsahu anaerobního metabolismu lze interpretovat jako amplifikované a aktivované CD4+ Th1 lymfocyty produkující interferon γ s vyústěním v razantní zánět s oxidačním vzplanutím makrofágů s obvyklou účastí intracelulárních bakterií, mykotických agens či nádorového procesu v patogenezi. Na rozdíl od purulentního zánětu nenabývá co do počtu buněk oxidační vzplanutí makrofágů takového rozsahu, což se projevuje na podstatně menším lokálním poškození tkáně s významně nižšími hodnotami katalytické koncentrace AST v hrudních výpotcích.

7. Převažující výskyt lymfocytárních elementů a zvýšený rozsah anaerobního metabolismu na úrovni zvýšených energetických nároků aktivovaného imunitního systému při serosních zánětlivých změnách v hrudních výpotcích ($15,0 \leq \text{KEB} < 28,0$).

Zpravidla se jedná o protilátkovou zánětlivou odpověď, v níž hrají klíčovou úlohu B lymfocyty, nebo o cytotoxickou zánětlivou reakci s významným postavením cytotoxických elementů, tzn. NK buněk či CD8+ Tc lymfocytů. O tom, že tyto záněty probíhají s podstatně menší razancí a menším negativním dopadem na tkáň, svědčí významně nižší rozsahy lokální destrukce tkáně reprezentované významně nižší katalytickou koncentrací AST v hrudních výpotcích, zejména při porovnání s případy razantních zánětů s oxidačním vzplanutím profesionálních fagocytů.

8. Převažující výskyt lymfocytárních elementů a normální energetické poměry v hrudních výpotcích ($\text{KEB} > 28,0$).

Zpravidla se jedná o normální laboratorní obraz hrudních výpotků, přes reaktivní změny až po mírnou a energeticky nenáročnou zánětlivou odpověď protilátkového či cytotoxického charakteru. Absenci či nízké intenzitě zánětu odpovídá nízká katalytická koncentrace AST nenasvědčující výraznějšímu lokálnímu poškození tkáně.

9. Převažující výskyt monocytárně-makrofagických elementů v celém rozsahu energetických poměrů od výrazně anaerobního metabolismu ($KEB < 10,0$) až po normální energetické poměry ($KEB > 28,0$) v hrudních výpotcích.

Mezi případy s převažujícím výskytem lymfocytárních a monocytárně-makrofagických elementů v hrudních výpotcích lze konstatovat značnou podobnost. Na žádné energetické úrovni nebyl mezi těmito skupinami zjištěn statisticky významný rozdíl v katalytické koncentraci AST, který by svědčil pro výraznější odlišnosti v lokálním dopadu probíhajících imunitních procesů na tkáň. Ve skupině serosních zánětů ($15,0 \leq KEB \leq 28,0$) a ve skupině normálních energetických poměrů ($KEB > 28,0$) v hrudní dutině předpokládáme účast monocytárně-makrofagických elementů především na úklidové reakci, ale nikoliv na samotné zánětlivé odpovědi.

Ve skupině vysokých rozsahů anaerobního metabolismu ($KEB < 10,0$, příp. $10,0 \leq KEB < 15,0$), jde hojná účast monocytárně-makrofagických elementů částečně na vrub postinflamatorní úklidové reakce. V těchto případech nelze považovat tyto imunokompetentní buňky za příčinu energetických změn a ani tkáňového poškození. Významnou část případů ale tvoří již zmiňované razantní záněty s oxidačním vzplanutím makrofágů s obvyklou účastí intracelulárních bakterií, mykotických agens či nádorového procesu v patogenezi. Časnější fáze zánětu bývají reprezentovány hojnou přítomností $CD4^+$ Th1 lymfocytů v hrudních výpotcích. S postupem času se ale do extravaskulární tekutiny uvolňují z tkáně aktivované monocytárně-makrofagické elementy, které plní úlohu efektorových buněk zánětu a které jsou příčinou pozorovaných energetických změn a poškození tkáně (Krejsek a Kopecký, 2004; Hořejší a Bartůňková, 2009; Kelbich et al., 2013a; Kelbich et al., 2014a).

11.1 Zhodnocení oxidačního stresu u pacientů s hrudními empyémy

Završením této studie mělo být měření vybraných parametrů oxidačního stresu v hrudních výpotcích pacientů s hrudními empyémy. Jednalo se především o ukazatele lipoperoxidace, tedy malondialdehyd, 4-hydroxy-2-nonenal, případně formaldehyd, acetaldehyd a propionaldehyd a některé antioxidanty, zejména glutathion/glutathiondisulfid, kyselinu močovou, kyselinu askorbovou, α -tokoferol a β -karoten (Ayala et al., 2014; Catalá, 2009; Gutteridge, 1995).

V průběhu práce se ale vyskytly technické problémy v preanalytické fázi, které znemožnily spolehlivé provedení těchto měření. Jednalo se především o nedostatky při striktní stabilizaci vzorků hrudních výpotků bezprostředně po odběru a dále pak při jejich odpovídajícím zajištění během dopravy z Masarykovy nemocnice v Ústí nad Labem na Chemicko-technologickou fakultu University Pardubice.

Navzdory zmíněným nedostatkům považujeme studii za přínosnou, neboť se stala zásadním podnětem pro změnu organizace práce se vzorky hrudních punktátů bezprostředně po jejich odběru, pro podstatně lepší zajištění při jejich dlouhodobějším uchování a pro jejich patřičné zajištění během dopravy z Ústí nad Labem do Pardubic.

Dále jsme v rámci studie charakterizovali cytologicko-energetickým vyšetřením 1491 hrudních výpotků zánětlivé změny v dutině hrudní a zhodnotili jejich poškozující dopad na přilehlou tkáň. Tím jsme na základě provedeného experimentu jasněji definovali východiska pro následný výzkum v této oblasti.

12 ZÁVĚR

V rámci studie jsme provedli cytologicko-energetické vyšetření a stanovení katalytické koncentrace aspartátaminotransferasy u 1491 vzorků hrudních výpotků od pacientů s postižením orgánů dutiny hrudní. Na základě získaných výsledků jsme charakterizovali zánětlivé procesy v dutině hrudní a specifikovali jejich poškozující dopad na přilehlou tkáň. Nejnepříznivější dopad jsme zjistili u razantního zánětu s oxidačním vzplanutím neutrofilních granulocytů, tedy u zánětu purulentního charakteru dominujícího v patogenezi hrudních empyémů. Tím jsme experimentálně potvrdili předpoklad nepříznivého dopadu tohoto zánětu s největší produkcí vysoce reaktivních kyslíkových radikálů na organismus. Z technických důvodů v preanalytické fázi jsme ale nebyli schopni měření úrovně vybraných parametrů oxidačního stresu v hrudních výpotcích u pacientů s hrudními empyémy provést. Přesto považujeme pro další výzkum v oblasti oxidačního stresu u pacientů s hrudními empyémy výsledky této studie za velmi významné. Na jejich základě jsme nyní schopni patřičně korigovat nedostatky v preanalytické fázi a technickém zabezpečení projektu a dále pak přesněji definovat skupiny pacientů pro další výzkum v této oblasti:

1. Pacienti s purulentními záněty v hrudní dutině.
2. Pacienti s významnou přítomností neutrofilních granulocytů, ale s málo intenzivními záněty tzv. serosního charakteru či reaktivními změnami v hrudní dutině.
3. Pacienti s razantními záněty s oxidačním vzplanutím makrofágů v hrudní dutině.
4. Pacienti s významnou přítomností lymfocytárních či monocytárně-makrofagických elementů, ale s málo intenzivními záněty tzv. serosního charakteru či reaktivními změnami v hrudní dutině.

13 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1 Ahmed A. E. H., Yacoub T. E. (2010): Empyema thoracis. *Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*, **4**, 1-8.
- 2 Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. (2014): Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-31.
- 3 Burgos J., Falcó V., Pahissa A. (2013): Narůstající incidence empyému. *Current Opinion on Pulmonary Medicine*, **10**, 67-72.
- 4 Catalá A. (2009): Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids*, **157**, 1-11.
- 5 Chavakis T. (2012): Leucocyte recruitment in inflammation and novel endogenous negative regulators thereof. *European Journal of Clinical Investigation*, **42**, 686-691.
- 6 Cheirsilp R., Bascom R., Allen T. W., Higgins W. E. (2015): Thoracic cavity definition for 3D PET/CT analysis and visualization. *Computers in Biology and Medicine*, **62**, 222-238.
- 7 Chen Y., Junger W. G. (2012): Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods in Molecular Biology*, **844**, 115-124.
- 8 Clark R. A. (1999): Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *The Journal of Infectious Diseases*, **179**, S309-S317.
- 9 Davies K. J. A. (2000): Oxidative stress, antioxidant defenses and damage removal, repair and replacement systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, **50**, 279-289.
- 10 Dylevský Ivan. (2009): Funkční anatomie. Praha: Grada Publishing, a.s. 544 stran. ISBN 978-80-247-3240-4.
- 11 Felgenhauer K. (1998): Laboratory diagnosis of neurological diseases. *Clinical Laboratory Diagnostics*, 1308-1326.

- 12 Ferenčík M., Rovenský J., Mařha V., Shoenfeld Y. (2005): Imunitní systém: informace pro každého. Praha: Grada Publishing, a.s. 236 stran. ISBN 80-247-1196-6.
- 13 Fila L., Marel M., Pekárek Z. (2001): Význam biochemických vyšetření pleurální tekutiny v diagnostice a léčbě pleurálních výpotků. *Lékařské listy*, **15**, 25-27.
- 14 Fila L. (2007): Pleurální výpotky. *Interní medicína pro praxi*, **9**, 490-494.
- 15 Fox S., Leitch A. E., Duffin R., Haslett C., Rossi A. G. (2010): Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *Journal of Innate Immunity*, **2**, 216-227.
- 16 Gutteridge J. M. C. (1995): Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, **41**, 1819-1828.
- 17 Hájek M. (1995): Chirurgie pro praktického lékaře. Praha: Grada Publishing, a.s. 223 stran. ISBN 80-7169-108-9.
- 18 Holeček V., Racek J. (1997): Kritický přístup k teorii vzniku aterosklerózy účinkem volných radikálů na lipoproteiny. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **5**, 80-85.
- 19 Hopp S., Nolte M. W., Stetter C., Kleinschnitz C., Sirén A.-L., Albert-Weissenberger C. (2017): Alleviation of secondary brain injury, posttraumatic inflammation and brain edema formation by inhibition of factor XIIa. *Journal of Neuroinflammation*, **14**, 1-10.
- 20 Hořejší V., Bartůňková J. (2009): Základy imunologie. Praha: Triton. 316 stran. ISBN 978-80-7387-280-9.
- 21 Hybertson B. M., Gao B., Bose S. K., McCord J. M. (2011): Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*, **32**, 234-246.
- 22 Hyeon Y. M. D. (2011): Management of pleural effusion, empyema and lung abscess. *Seminars in Interventional Radiology*, **28**, 75-86.
- 23 Hytych V., Vernerová A., Horažďovský P. (2007): Pleurální výpotky. *Časopis pro lékaře v 1. linii*, **10**, 11-13.

- 24 Jakubec P., Palatka K., Jakubcová T., Kolek V. (2008): Úvod do laboratorní diagnostiky pleurálního výpotku. *Vnitřní lékařství*, **54**, 265-272.
- 25 Jakuš V. (2000): Úloha hyperglykémie, zvýšené tvorby AGE produktů a oxidačního stresu v patogeneze diabetických komplikací. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **8**, 91-98.
- 26 Janeway C. A. J., Travers P., Walport M., Shlomchik M. J. (2001): Macrophage activation by armed CD4 TH1 cells. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science. ISBN 10 0-8153-3642-X.
- 27 Jin R., Yang G., Li G. (2010): Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*, **87**, 779-789.
- 28 Joffre C., Rey C., Nadjar A., Layé S. (2016): Role of n-3 pufas in inflammation via resolvin biosynthesis. *Oilseeds & fats Crops and Lipids*, **23**, 1-6.
- 29 Jurašková B., Zadák Z., Solichová D., Vávrová J., Kohout P., Crhová Š., Půlpán Z., Hyšpler R. (2000): Změny antioxidační rovnováhy při infekci *Helicobacter pylori*. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **8**, 108-113.
- 30 Karlson P. (1981): *Základy biochemie*. Praha: Academia. 504 stran. ISBN 104-21-852.
- 31 Kelbich P., Slavík S., Jasanská J., Adam P., Hanuljaková E., Jermanová K., Řepková E., Šimečková M., Procházková J., Gajdošová R., Sobek O., Zeman D., Nekola P. (1998): Hodnocení energetických poměrů v likvorovém kompartmentu pomocí vyšetřování vybraných parametrů metabolismu glukosy v CSF. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **6**, 213-225.
- 32 Kelbich P., Šimečková M., Adam P., Válková R., Henuljaková E., Sobek O., Táborský L., Chmelíková V., Zeman D., Žáčková A. (2002): Likvorové nálezy u pacienta s bakteriální meningitidou - kazuistika. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **10**, 54-68.
- 33 Kelbich P., Koudelková M., Machová H., Tomaškovič M., Vachata P., Kotalíková P., Chmelíková V., Hanuljaková E. (2007): Význam urgentního vyšetření mozkomíšního moku pro včasnou diagnostiku neuroinfekcí. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, **13**, 9-20.

- 34 Kelbich P., Adam P., Sobek O., Koudelková M., Procházka J., Hanuljaková E., Válková R., Tomaškovič M., Krušina M. (2009): Základní vyšetření likvoru v diagnostice postižení centrálního nervového systému. *Neurologie pro praxi*, **10**, 285-289.
- 35 Kelbich P., Procházka J., Sameš M., Hejčl A., Vachata P., Hušková E., Peruthová J., Hanuljaková E., Špička J. (2011): Principy a zvláštnosti neurochirurgické a neurointenzivistické likvorologie (1.část: Úvod do problematiky). *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **19**, 223-228.
- 36 Kelbich P., Procházka J., Sameš M., Hejčl A., Vachata P., Hušková E., Peruthová J., Hanuljaková E., Špička, J. (2012a): Principy a zvláštnosti neurochirurgické a neurointenzivistické likvorologie (2.část: Kauzistika). *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **20**, 11-16.
- 37 Kelbich P., Hejčl, A., Procházka, J., Hanuljaková, E., Peruthová, J., Špička, J. (2012b): Cytologie a energetika jako důležité atributy vyšetření likvoru. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **20**, 17-24.
- 38 Kelbich P., Hejčl A., Procházka J., Čuchran P., Hanuljaková E., Peruthová J., Koudelková M. (2013a): Koeficient energetické bilance jako užitečný pomocník v likvorové diagnostice zánětlivých postižení centrálního nervového systému. *Neurologia*, **8**, 123-128.
- 39 Kelbich P., Hejčl A., Procházka J., Selke Krulichová I., Peruthová J., Hanuljaková E., Špička J. (2013b): Buněčnost likvoru, energetické poměry v likvorovém kompartmentu a intenzita zánětlivé odpovědi v centrálním nervovém systému. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **21**, 6-12.
- 40 Kelbich P., Hejčl A., Krulichová I., Procházka J., Hanuljaková E., Peruthová J., Koudelková M., Sameš M., Krejsek, J. (2014a): Coefficient of energy balance a new parameter for basic investigation of the cerebrospinal fluid. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **52**, 1009-1017.
- 41 Kelbich P., Svítlová E., Bitterová Z. (2014b): Cytologicko-energetická detekce lokální zánětlivé odpovědi v břišní dutině u pacientů na peritoneální dialýze. *Aktuality v nefrologii*, **20**, supplementum 1, 18.

- 42 Kelbich P. (2015): Principy neurochirurgické a neurointenzivistické likvorologie. Disertační práce, Lékařská fakulta v Hradci Králové University Karlovy v Praze, Česká republika.
- 43 Kelbich P., Hejčl A., Procházka J., Sameš M., Krejsek J. (2016): Comment on the study cerebrospinal fluid lactate: measurement of an adult reference interval by Sally D Slack, Paul Turley, Victoria Allgar and Ian B Holbrook. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, **53**, 180-182.
- 44 Kelbich P., Hejčl A., Staněk I., Svítlová E., Sameš M. (2017): Principles of the cytological-energy analysis of the extravascular body fluids. *Biochemistry & Molecular Biology Journal*, **3**, 1-3.
- 45 Kopicinovic L. M., Vogrinc Z., Kocijan I., Culej J., Aralica M., Jokic A., Antoncic D., Bozovic M. (2016): Laboratory testing of extravascular body fluids in Croatia: a survey of the working group for extravascular body fluids of the croatian society of medical biochemistry and laboratory medicine. *Biochemia Medica*, **26**, 395-407.
- 46 Krejsek J., Kopecký O. (2004): Klinická imunologie. Hradec Králové: Nucleus HK. 942 stran.
- 47 Krejsek J., Andrýs C., Krčmová I. (2016): Imunologie člověka. Hradec Králové: Garamon s.r.o. 496 stran. ISBN 978-80-86472-74-4.
- 48 Lee S. F., Lawrence D., Booth H., Morris-Jones S., Macrae B., Zumla A. (2010): Empyém hrudníka-súčasně názory na medikamentóznou a chirurgickou liečbu. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, **7**, 25-30.
- 49 Lochamnová A. (2015): Fagocytóza a technické aspekty jejího stanovení. *Alergie*, **17**, 202-207.
- 50 Mačák J., Mačáková J. (2004): Patologie. Praha: Grada. 347 stran. ISBN 80-247-0785-3.
- 51 Marel M., Šťastný B., Melínová L. (1995): Diagnosis of pleural effusions-experience with clinical studies. *Chest*, **108**, 1598-1603.
- 52 Marel M. (2007): Novinky v diferenciální diagnostice pleurálních výpotků. *Lékařské listy-příloha Zdravotní Noviny*, **56**, 23-26.

- 53 Matuchová, I. (2014): Stanovení aspartátaminotransferasy v likvoru pro detekci destrukce tkáně centrálního nervového systému. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. Fakulta potravinářské a biochemické technologie. Ústav biochemie a mikrobiologie, 59 stran. Vedoucí bakalářské práce Ing. Vojtěch Škop, Ph.D.
- 54 Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. (1998): Harperova biochemie. Praha: H&H. 872 stran. ISBN 80-85787-38-5.
- 55 Pecháň I. (1989): Perspektivy enzymologie cerebrospinálního likvoru. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, **52**, 11-21.
- 56 Racek J., Eiselt J., Holeček V., Veselá E., Krejčová I., Třeška V., Opatrný K., Valenta J. (1997): Volné radikály a onemocnění ledvin. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, **5**, 92-97.
- 57 Rahman T., Hosen I., Islam M. M. T., Shekhar H. U. (2012): Oxidative stress and human health. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **3**, 997-1019.
- 58 Roháčová H. (2006): Hnisavé a nehnisavé záněty centrální nervové soustavy. *Neurologie pro praxi*, **3**, 128-130.
- 59 Schauer C., Janko C., Munoz L., Zhao Y., Kienhöfer D., Frey B., Lell M., Manger B., Rech J., Naschberger E., Holmdahl R., Krenn V., Harrer T., Jeremic I., Bilyy R., Schett G., Hoffmann M., Herrmann M. (2014): Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nature medicine*, **20**, 511-519.
- 60 Sobek O., Adam P., Kelbich P., Koudelková M., Doležil D., Kasík J., Hajduková L., Krušina M., Hybel'ová M. (2009): Vyšetření likvoru-současné možnosti. *Neurologie pro praxi*, **10**, 261-265.
- 61 Sobek O., Adam P., Koudelková M., Štourač P., Mareš J. (2012): Algoritmus vyšetření likvoru v návaznosti na doporučení sekce neuroimunologie a likvorologie české neurologické společnosti JEP. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, **75/108**, 159-163.
- 62 Stříteský J. (1996): Patologie: Pro 2. ročník středních zdravotnických škol. Praha: Scientia. ISBN 80-85526-44-1.
- 63 Stříteský J. (2001): Patologie. Olomouc: Epava. ISBN 80-86297-06-03.

- 64 Šimánek V., Třeška V., Klečka J., Špidlen V., Vodička J. (2005): Empyém hrudníku. *Interní medicína pro praxi*, **7-8**, 357-358.
- 65 Šterzl J. (1993): Imunitní systém a jeho fyziologické funkce. Praha: Česká imunologická společnost. 480 stran.
- 66 Teřl M., Pešek M., Tauchman A. (2005): Pleurální výpotek v interní praxi. *Vnitřní lékařství*, **51**, 430-437 stran.
- 67 Wu D., Cederbaum A. I. (2003): Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Research & Health*, **27**, 277-284.