

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Studijní program: Biochemie a patobiochemie
Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Klára Bořecká

**Biochemické parametry energetického metabolismu
v mozkomíšním moku
u zánětlivých a nezánnětlivých onemocnění CNS**

*Biochemical parameters of energy metabolism in cerebrospinal fluid
in inflammatory and non-inflammatory CNS diseases*

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: MUDr. Lenka Fialová, CSc.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu *Theses.cz* za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 15. 5. 2020

Klára Bořecká

Identifikační záznam:

BOŘECKÁ, Klára. Biochemické parametry energetického metabolismu v mozkomíšním moku u zánětlivých a nezářtlivých onemocnění CNS. [Biochemical parameters of energy metabolism in cerebrospinal fluid in inflammatory and non-inflammatory CNS diseases]. Praha, 2020. 125 s., 3 příl. Disertační práce, Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky. Vedoucí práce Fialová, Lenka.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce MUDr. Lence Fialové, CSc. za její všestrannou pomoc, konzultace a cenné připomínky, shovívavé vedení, čas a nekonečnou trpělivost s mými neznalostmi a nedokonalostmi. Její pomoci si velmi vážím.

Dále bych ráda poděkovala doc. MUDr. Pavlovi Adamovi, CSc. a MUDr. Ondřejovi Sobkovi, CSc. za uvedení do zajímavého tématu a poskytnutí souboru dat ke zpracování. Také RNDr. Ing. Petrovi Kelbichovi, Ph.D. za cenné odborné konzultace v začátcích studia.

Velké poděkování si zaslouží RNDr. Věra Lánská, CSc. za pomoc se statistickým zpracováním a také pochopením výsledků tohoto zpracování.

V neposlední řadě bych ráda upřímně poděkovala své rodině a svým nejbližším přátelům za nekonečnou trpělivost, podporu a lásku, bez které bych tuto práci nikdy nedokončila.

Děkuji Vám všem.

Seznam zkratek

ABC přenašeč	ATP-Binding Cassette, ATP-vazebný kazetový přenašeč
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADP	adenosindifosfát
AGEs	Advanced Glycation End products, produkty pokročilé glykace
AMK	aminokyseliny
AMP	adenosinmonofosfát
AMT	Adsorptive-Mediated Transcytosis, adsorpce zprostředkovaná transcytóza
Apo	apolipoprotein
ATP	adenosintrifosfát
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein, protein rezistence karcinomu prsu
CB	celková bílkovina
CBF	Cerebral Blood Flow, průtok krve mozkem
CD	Cluster of Differentiation, diferenciační znak
CK	kreatinkináza
CKC	cyklus kyseliny citronové, Krebsův cyklus, citrátový cyklus
CMR _{glc}	Cerebral Metabolic Rate of glucose, metabolický obrat glukózy v mozku
CMR _{O₂}	Cerebral Metabolic Rate of oxygen, metabolický obrat kyslíku v mozku
CNS	centrální nervový systém
CoA	koenzym A
CRP	C-reaktivní protein
CSF	Cerebrospinal Fluid, mozkomíšní mok
DAMP	Damage/Danger-Associated Molecular Patterns, signály „vnitřního poškození“
DHA-P	dihydroxyacetonfosfát
ECT	extracelulární tekutina
FAD	oxidovaná forma flavinadeninukleotidu
FADH ₂	redukovaná forma flavinadeninukleotidu
FATP	Fatty Acid Transport Protein, přenašeč mastných kyselin

FcR	receptor pro Fc fragment imunoglobulinu
Fru-6-P	fruktóza-6-fosfát
G-3-P	glyceraldehyd-3-fosfát
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GDP	guanosindifosfát
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein, gliální fibrilární kyselý protein
GIT	gastrointestinální trakt
Glc	glukóza
Glc-1-P	glukóza-1-fosfát
Glc-6-P	glukóza-6-fosfát
Gln	glutamin
GLP	gluko-laktátový poměr
Glu	glutamát
GLUT	Glucose Transporter, přenašeč glukózy
GLUT1DS	Glucose Transporter-1 Deficiency Syndrome, syndrom GLUT-1 deficiencie
GO	granulocytární oligocytóza
GP	granulocytární pleocytóza
GPDH	glycerol-3-fosfát dehydrogenáza
GPR	G-Protein coupled Receptor, receptor spřažený s G-proteinem
GTP	guanosintrifosfát
HEB	hemato-encefalická bariéra
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 α , hypoxický indukibilní faktor 1 α
HK	hexokináza
HLA	Human Leukocyte Antigen, lidský leukocytární antigen
HLB	hemato-likvorová bariéra
IGF	Insulin-like Growth Factor, inzulinu podobný růstový faktor
IL	interleukin
ILC	Innate Lymphoid Cells, přirozené lymfoidní buňky
INF	interferon

KAR	Killer Activation Receptor, receptory typu lektinových bílkovin vázající sacharidy
KEB	Koeficient energetické bilance
KIR	Killing Inhibitory Receptor, receptor pro HLA molekuly, při obsazení ligandem aktivitu buňky inhibují
K_m	Michaelisova konstanta
LGP	lakto-glukózový poměr
LD	laktátdehydrogenáza
LO	lymfocytární oligocytóza
LP	lymfocytární pleocytóza
MAS	Malate-Aspartate Shuttle, malátový člunek
MBP	Myelin Basic Protein, bazický protein myelinu
MCT	MonoCarboxylic acid Transporter, přenašeč monokarboxylových kyselin
MDH	malátdehydrogenáza
MGG	May-Grünwald + Giemsa-Romanowski barvení
MK	mastné kyseliny
mLOC	mitochondrial Lactate Oxidation Complex, mitochondriální komplex oxidace laktátu
MMI	maligní meningeální infiltrace
MO	monocytární oligocytóza
MP	monocytární pleocytóza
NAD^+	oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADH	redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
$NADP^+$	oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NADPH	redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NČLP	Národní číselník laboratorních položek
NK buňky	Natural Killer cells, přirození zabíječi
NKT buňky	Natural Killer T-lymfocyty, T-lymfocyty – přirození zabíječi
NSE	neuron-specifická enoláza
OSP	oxidativní fosforylace

PAG	fosfátem aktivovaná glutamináza
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns, signály „vnějšího nebezpečí“
pCO ₂	parciální tlak CO ₂
PCr	fosfokreatin, kreatinfosfát
PDH	pyruvátdehydrogenáza
PFK-1	fosfofruktokináza-1
PNS	periferní nervový systém
PPP	Pentose Phosphate Pathway, pentózofosfátová dráha
PRR	Pattern Recognition Receptors, receptory rozeznávající molekulové vzory
PSA	Polar Surface Area, polární povrch
r	korelační koeficient Pearsonův
R ²	koeficient determinace
r _s	korelační koeficient Spearmanův
RMT	Receptor-Mediated Transcytosis, receptorem zprostředkovaná transcytoza
SAK	subarachnoidální krvácení
SGLT	Sodium-Glucose Transporter, přenašeč sodíku a glukózy
SLC	Solute Carriers, specifické přenašeče solutů
SLE	systémový lupus erythematoses
TAM	Tumor-Associated Macrophage, makrofág asociovaný s nádorem
TGF	Transforming Growth Factor, transformující růstový faktor
TLR	Toll-Like Receptors, receptor podobný genu Toll
TNF	Tumor Necrosis Factor, faktor nádorové nekrózy
TO	tumorózní oligocytóza
TP	tumorózní pleocytóza
UCP	Uncoupling Protein, rozpojovací protein
VKR	volné kyslíkové radikály

Obsah

Poděkování	4
Seznam zkratk.....	5
Obsah.....	9
1 Abstrakt	11
2 Abstract	12
3 Úvod.....	13
3.1 Metabolismus sacharidů	13
3.1.1 Glykolýza	13
3.1.2 Pentózový cyklus.....	17
3.1.3 Glukoneogeneze	18
3.1.4 Metabolismus glykogenu.....	18
3.2 Citrátový cyklus	19
3.3 Respirační řetězec a oxidativní fosforylace.....	20
3.3.1 Rozpojení oxidace a fosforylace.....	22
3.3.2 Kreatinfosfát.....	23
3.3.3 Přenos redukčních ekvivalentů do mitochondrie.....	24
3.4 Energetická výtěžnost glykolýzy.....	26
3.5 Zajištění energetických potřeb na úrovni celého organismu	28
3.6 Energetický metabolismus mozku.....	30
3.7 Bariéry mezi krví, likvorem a tkání CNS.....	37
3.7.1 Hemato-encefalická bariéra.....	39
3.7.2 Hemato-likvorová bariéra.....	40
3.7.3 Encefalo-likvorová bariéra	40
3.7.4 Transport přes HEB.....	41
3.8 Imunitní reakce.....	44
3.8.1 Imunitní reakce v CNS	49
3.9 Vyšetření likvoru	50
3.9.1 Cytologické vyšetření likvoru	50
3.9.2 Biochemické vyšetření likvoru.....	54
4 Cíle	63
5 Materiál a metody.....	65
5.1 Data	65
5.2 Metodika provedených vyšetření	65
5.2.1 Teoreticko-metodická východiska.....	65

5.2.2	Vlastní metodický algoritmus.....	66
6	Výsledky.....	69
6.1	Hodnocení KEB ve vztahu k cytologickým skupinám.....	69
6.2	Srovnání KEB s dalšími energetickými parametry v likvoru.....	74
7	Diskuze.....	93
7.1	Hodnocení KEB ve vztahu k cytologickým skupinám.....	93
7.2	Rozbor KEB	96
7.3	Srovnání KEB s dalšími energetickými parametry v likvoru.....	101
8	Závěry.....	110
9	Citovaná literatura	113

1 Abstrakt

Základní vyšetření likvoru poskytuje v diagnostickém algoritmu onemocnění CNS rychlou orientaci o charakteru patologického procesu. Současné hodnocení cytologie a biochemických parametrů metabolismu glukózy přináší informaci o přítomných buňkách a zároveň o úrovni jejich aktivace.

Cílem práce bylo prozkoumat vztah biochemického a cytologického nálezu v likvoru ve velkém souboru dat ($n = 8\ 178$), resp. potvrdit hypotézu výrazné alterace Koeficientu energetické bilance (KEB) u cytologických tříd typicky doprovázejících oxidační vzplanutí fagocytů. KEB byl podroben analýze a srovnání s dalšími energetickými parametry (lakto-glukózovým poměrem, glukó-laktátovým poměrem, koncentrací laktátu a glukózy v likvoru). Byly zkoumány vztahy mezi koncentrací glukózy a laktátu v krvi a likvoru.

Hodnoty KEB byly statisticky významně odlišné u cytologických skupin, které odráží purulentní zánět, nádorové postižení nebo infekci potenciálními intracelulárními patogeny, hypotéza byla potvrzena. Další energetické parametry vyjma glykorachie odlišují tyto cytologické skupiny stejně jako KEB. V odvození a výkladu KEB jsou nepřesnosti, KEB však dosáhl největšího rozpětí hodnot, může tak stratifikovat mezi vrstvami patologického vychýlení lépe než všechny ostatní srovnávané parametry. Byla popsána závislost glykorachie, kvocientu glukózy (Q_{glu}) a KEB na glykémii. Při interpretaci energetických parametrů obsahujících glykorachii, je vhodné znát aktuální glykémii a adjustovat na ni cut-off. Závislost mezi koncentrací laktátu a glukózy v likvoru, ani mezi koncentrací laktátu v likvoru a krvi nebyla prokázána.

Výsledky práce významným způsobem potvrdily krucální potřebu cyto-energetického principu interpretace likvorologických výsledků.

Klíčová slova: cytologie, glukóza, glykémie, glykolýza, Koeficient energetické bilance, laktát, likvor, oxidační vzplanutí.

2 Abstract

The basic examination of the cerebrospinal fluid provides a quick orientation in the diagnostic algorithm of CNS diseases about the nature of the pathological process. The current evaluation of cytology and biochemical parameters of glucose metabolism reports about the cells present and at the same time about the level of their activation.

The aim of the work was to investigate the relationship between biochemical and cytological findings in cerebrospinal fluid in a large data set ($n = 8\ 178$), or confirm the hypothesis of a significant alteration in the Coefficient of Energy Balance (CEB) in cytological classes typically accompanying oxidative burst of phagocytes. CEB was subjected to analysis and comparison with other energy parameters (lacto-glucose ratio, gluco-lactate ratio, concentration of lactate and glucose in cerebrospinal fluid). The relationships between blood and cerebrospinal fluid glucose and lactate concentrations were investigated.

CEB values were statistically significantly different in cytological groups, which reflected purulent inflammation, tumor involvement or infection by potential intracellular pathogens, the hypothesis was confirmed. Other energy parameters excluding glycorrhachia distinguish these cytological groups as well as CEB. There are inaccuracies in the derivation and interpretation of CEB, but CEB has reached the largest range of values, so it can stratify between layers of pathological deviation better than all other parameters compared. The dependence of glycorachia, glucose quotient (Q_{glu}) and CEB on glycaemia has been described. When interpreting energy parameters containing glycorrhachia, it is useful to know the current glycaemia and adjust the cut-off for it. The relationship between the concentration of lactate and glucose in cerebrospinal fluid and between the concentration of lactate in cerebrospinal fluid and blood has not been proven.

The results of the work significantly confirmed the crucial need for the cyto-energetic principle of interpretation of cerebrospinal fluid results.

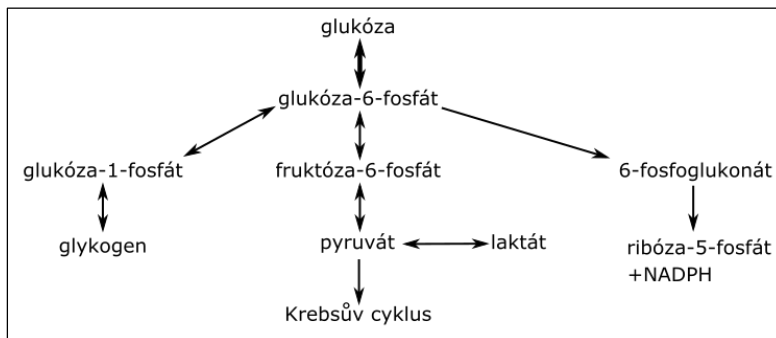
Key words: cerebrospinal fluid, Coefficient of Energy Balance, cytology, glucose, glycaemia, glycolysis, lactate, oxidative burst.

3 Úvod

3.1 Metabolismus sacharidů

Vyšší heterotrofní organismy získávají energii oxidací komplexních molekul – sacharidů, tuků a proteinů z potravy. Hlavní složkou potravy lidí jsou sacharidy. Homeostáza glykémie patří mezi jeden z nejlépe zajištěných mechanismů, na kterém se podílejí játra i extrahepatální tkáň. Nalačno je udržována koncentrace glukózy (Glc) v krvi v relativně úzkém rozmezí cca 3,5 až 5,5 mmol/l, u zdravého člověka nestoupne glykémie ani po příjmu potravy s vysokým obsahem sacharidů na více než 10 mmol/l (Holeček M., 2006).

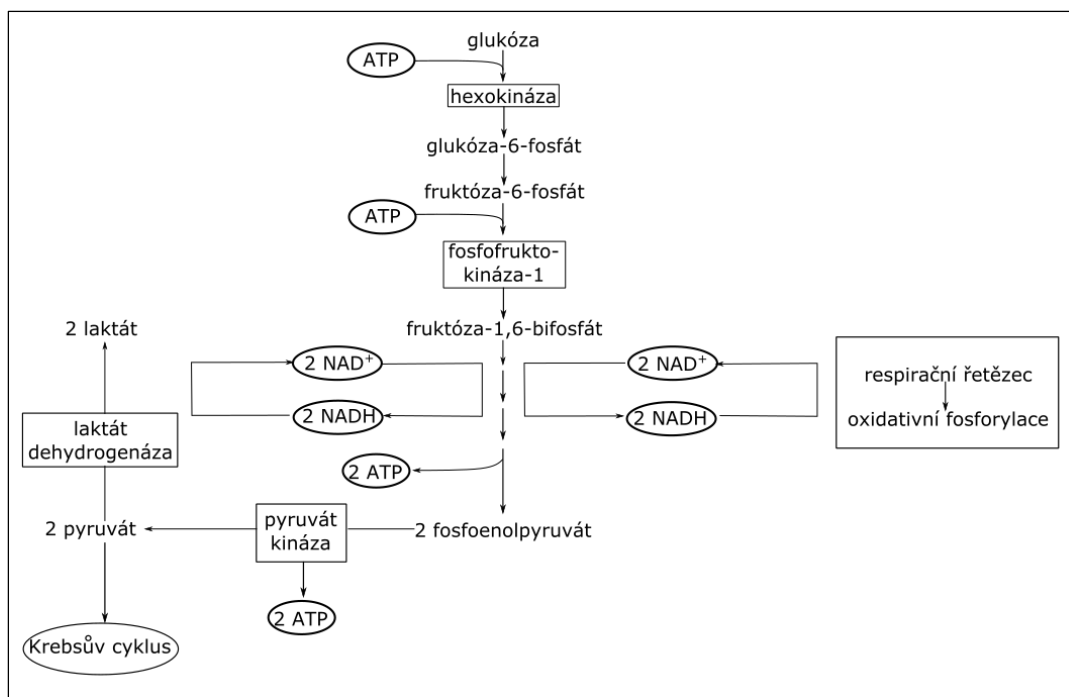
Důležitou spojkou několika metabolických drah sacharidů (glykolýzy, pentózafosfátové dráhy, glukoneogeneze, glykogenolýzy a glykogeneze) je glukóza-6-fosfát (Glc-6-P) (Murray R. K., 2012), viz obr. č. 1. Hlavní metabolickou cestou odbourávání glukózy je glykolýza.



Obrázek č. 1: Osud glukózy v buňce

3.1.1 Glykolýza

Glykolýza probíhá v cytosolu všech savčích buněk. Ve sledu deseti reakcí se přeměňuje glukóza na pyruvát za současné tvorby ATP a redukovaných koenzymů. V I. fázi buňka investuje vlastní energii a metabolity povyšuje do energeticky výhodnějšího stavu (fosforylace na Glc-6-P a následně na fruktóza-1,6-bisfosfát). Ve II. fázi dochází ke štěpení šestiuhlíkaté fosforylované sloučeniny na dvě tříuhlíkaté (glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát) a ve III. fázi se přeměňuje glyceraldehyd-3-fosfát (G-3-P) na pyruvát za tvorby ATP (energie je produkována). Zjednodušené schéma glykolýzy viz obr. č. 2.



Obrázek č. 2: Zjednodušené schéma glykolýzy – převzato a upraveno podle (McKenna M. C. et al., 2006)

Hexokináza (HK) katalyzuje vstupní reakci glykolýzy, fosforylaci glukózy na Glc-6-P za hydrolyzy ATP. Má vysokou afinitu pro glukózu ($K_m \sim 0,05 \text{ mmol/l}$), tj. je substrátem saturována a zajišťuje konstantní rychlostí dostupnost Glc-6-P i při nízkém obsahu glukózy v krvi (Wilson J. E., 2003).

Hexokináza existuje ve čtyřech izoformách. *HK I* je vázaná k mitochondriím, *HK II* a *HK III* je v cytosolu, avšak *HK II* může být dle potřeby translokována k mitochondriím. Rozdílná subcelulární lokalizace je asociována s rozdílnou metabolickou cestou glukózy, navázání ovlivňuje kinetické vlastnosti enzymu a inhibiční vliv Glc-6-P. Vázaná izoforma podporuje glykolýzu (katabolickou cestu), cytosolová glykogenezi (anabolickou cestu). Podíl vázané izoformy se zvyšuje při poklesu poměru ATP/ADP. ATP tedy funguje jako substrát i allosterický regulátor *HK*. Tak je umožněna preference fosforylace glukózy v soutěži o ATP. Souhrn těchto mechanismů umožňuje jemné ladění aktivity iniciálního enzymu glykolýzy v odpovědi na změny složení intracelulárního prostředí. *HK I* se vyskytuje převážně v mozku a erytrocytech, *HK II* v kosterním a srdečním svalu a adipocytech. V játrech je exprimován izoenzym *glukokináza (HK IV)*, který je inducibilní, není inhibován Glc-6-P a s rostoucí glykemií zvyšuje fosforylaci glukózy ($K_m \sim 10 \text{ mmol/l}$) (John S. et al., 2011).

Glykolýza je velmi přesně regulována. Vhodnými místy regulace jsou exergonické reakce, tj. reakce katalyzované *HK*, *fosfofruktokinázou (PFK)* a *pyruvátkinázou*. *HK* je inhibována

Glc-6-P a glukagonem a aktivována inzulinem; *PFK-1* je aktivována AMP a inhibována ATP, citrátem (citrát signalizuje zásobu biosyntetických prekurzorů) a H^+ .

Glykolýza je zcela unikátní v tom, že může pomocí přeměny pyruvátu na laktát katalyzované *laktátdehydrogenázou (LD)* probíhat i za stavů, kdy nelze v dostatečné míře pyruvát dále metabolizovat citrátovým cyklem (CKC) a oxidativní fosforylací (OXF) v mitochondriích. Redukce pyruvátu na laktát umožní regeneraci NAD^+ , pokračování glykolýzy a získání energie za cenu omezeného množství ATP na mol oxidované glukózy.

Tradiční pojetí dělilo glykolýzu na „aerobní“ a „anaerobní“ např. (Murray R. K., 2012; Holeček M., 2006). Opakovaná experimentální pozorování však prokazují, že laktát se tvoří i spotřebovává také za zcela aerobních podmínek (Kane D. A., 2014; Brooks G. A., 2018; Proia P. et al., 2016). Dnes není laktát chápán jen jako odpadní produkt anaerobního metabolismu, nýbrž jako významný energetický pufr a substrát, dokonce jako signální a regulační molekula (Magisretti P. L., Allaman I., 2018).

Další přeměna pyruvátu je závislá na aktuálním stavu a potřebě buňky (Murray R. K., 2012).

3.1.1.1 Utilizace pyruvátu v mitochondriích

Za standardních podmínek je pyruvát přenesen do mitochondrie speciálním přenašečem ve vnitřní mitochondriální membráně. Další osud pyruvátu v mitochondrii je závislý na aktuálních poměrech: může být oxidativně dekarboxylován systémem *pyruvátdehydrogenázy (PDH)* na acetyl-CoA, NADH a CO_2 , nebo karboxylován *pyruvátkarboxylázou* na oxalacetát. Komplex *PDH* je lokalizován na vnitřní straně mitochondriální membrány, sestává ze tří enzymových složek a vyžaduje přítomnost pěti koenzymů a kofaktorů: thiamindifosfátu, lipové kyseliny, CoA, FAD a NAD^+ . Aktivita *PDH* je modifikována jak allostericky (inhibována produkty acetyl-CoA a NADH a aktivována pyruvátem), tak kovalentně (fosforylací je inaktivována a defosforylací aktivována) na základě aktuálních poměrů $[ATP/ADP]$, $[acetyl-CoA/CoA]$ a $[NADH/NAD^+]$ v buňce. Reakce katalyzovaná *PDH* je nevratná, tzn., že mastné kyseliny (MK) ani ketolátky pro syntézu glukózy nemohou být použity. Nadbytek acetyl-CoA naopak aktivuje *pyruvátkarboxylázu*. Reciproční allosterická regulace *PDH* a *pyruvátkarboxylázy* vlivem acetyl-CoA umožňuje přesmyk metabolismu z odbourávání sacharidů na oxidaci mastných kyselin, resp. šetření cukry (omezení oxidace pyruvátu a stimulaci glukoneogeneze) při hladovění.

Pokud metabolismus acetyl-CoA pokračuje citrátovým cyklem a dýchacím řetězcem a dochází k finální oxidaci na CO_2 a vodu, vzniká až 32 ATP na 1 molekulu glukózy.

3.1.1.2 Přeměna pyruvátu na laktát

Za podmínek, kdy reoxidace NADH není možná v dostatečné míře v dýchacím řetězci, je pokračování glykolýzy a zisk ATP, resp. regenerace NAD^+ umožněna reverzibilní přeměnou pyruvátu na laktát pomocí *LD*.

Při glykolýze k laktátu vznikají pouze 2 ATP na substrátové úrovni, viz kap. 3.4. Na druhou stranu je rychlost tvorby ATP vzhledem k omezenému počtu reakčních kroků až 100x vyšší než při OXP (22 reakčních kroků vs. 170 při kompletní oxidaci glukózy) (Dienel G. A., 2018). Pokud buňky spotřebovávají ATP rychle, regenerují jej převážně glykolýzou na úroveň laktátu. Např. bílá svalová vlákna (IIB), schopná rychlé kontrakce a pouze krátkodobého úsilí, neobsahují téměř žádné mitochondrie a málo myoglobinu, naopak jsou bohatá na glykogen a enzymy glykolýzy. Obdobně ve fagocytech dochází k metabolickému přesmyku k vysokému obrátu glykolýzy na úkor OXP, což umožňuje velmi rychlé spuštění energeticky náročného oxidačního vzplanutí.

Metabolická úloha laktátu

Dnes je již zřejmé, že laktát má velmi významnou roli v intermediárním metabolismu. Slouží jako metabolický pufr umožňující regeneraci NAD^+ , v řadě tkání také jako energetický substrát, jak pro oxidaci v mitochondriích, tak pro glukoneogenezi (Brooks G. A., 2018; Chatham J. C. et al., 2001; Gladden L. B., 2004). Některé práce dokonce označují laktát (nikoliv pyruvát) za univerzální konečný produkt glykolýzy z důvodu termodynamické výhodnosti (konverze pyruvátu na laktát uvolňuje energii), chemické výhodnosti (regenerace NAD^+ umožní cyklickou glykolýzu) a prostorového uspořádání (lokalizace mitochondriální *LD* v blízkosti enzymů CKC) (Schurr A., 2006; Rogatzki M. J. et al., 2015). Existence mLOC (mitochondriálního komplexu oxidace laktátu) ve vnitřní mitochondriální membráně, který zahrnuje MCT (přenašeč monokarboxylových kyselin), chaperon basigin, *cytochrom c-oxidázu* a *LD*, byla potvrzena ve svalech, játrech, mozku a dalších tkáních (Brooks G. A., 2018). Široké uplatnění laktátu je umožněno transportem mezi organelami, tkáněmi a orgány prostřednictvím MCT v rámci intra- a intercelulárních člunků (Brooks G. A., 2018; Proia P. et al., 2016; Schurr A., 2006). Mezi tkáně, které produkují větší množství laktátu, patří kosterní sval, erytrocyty, zažívací ústrojí, dřevň ledvin, mozek, kůže a sítnice. U zdravého normoxického jedince je celková produkce laktátu cca 1 300 mmol/den (Sečník P., Merta D., 2016). Ke vzestupu koncentrace laktátu v krvi dochází za různých fyziologických i patologických situací.

Při intenzivním cvičení, kdy krev nestačí zásobit svaly kyslíkem, je laktát tvořen ve značném množství glykolytickými svalovými vlákny (typ IIA a IIB). Prediktor sportovní výkonnosti,

tzv. *laktátový (anaerobní) práh*, je taková intenzita cvičení, která vede k nepoměru mezi kapacitou OXP a glykolýzy a ke vzestupu laktátu v krvi. Avšak koncept příčinného vztahu akumulace laktátu a svalové únavy je dnes již zpochybněn (Pedersen T. H. et al., 2004; Schurr A., 2006). Po cvičení je nadbytek laktátu velmi rychle odstraněn: 65–70 % laktátu metabolizují játra (glukoneogenezí, v menší míře oxidací přes pyruvát na CO₂ a H₂O), cca 5 % metabolizují ledviny, dále oxidativní vlákna (typ I) kosterních svalů, myokard, kůra ledvin a mozek (*intercelulární laktátový člunek*) (Kane D. A., 2014; Van Hall G. et al., 2009). *Intracelulární laktátový člunek* v rámci téže buňky umožňuje laktátu produkovanému v cytosolu vstupovat do matrix mitochondrií a peroxisomů, kde je oxidován (viz výše).

Za patologických stavů může dojít k disproporčnímu vystupňování glykolýzy a vyčerpání kapacity CKC a OXP nebo člunků přenášejících redukční ekvivalenty do mitochondrií (zánět a hojení, aktivace sympato-adrenálního systému, vážný katabolický stav u kriticky nemocných) nebo k blokádě enzymů *PDH*, *CKC* a *OXP* (endotoxin, deficit thiaminu, ionty arsenu a rtuti, dědičné defekty enzymů). Pak se mohou významnými producenty laktátu stát i tkáně, které za normálních okolností laktát spotřebovávají. Koncentrace laktátu v krvi je významným nezávislým prognostickým faktorem mortality, markerem „kritičnosti stavu“ jak u infekcí (Shapiro N. I. et al., 2005), tak jiných vážných onemocnění (Jansen T. C. et al., 2010).

Laktát jako regulační a signální molekula

V poslední době se diskutuje o signální a regulační úloze laktátu, který je chápán spíše jako hormon. Byl popsán specifický receptor pro laktát, GPR81, spřažený s G-proteinem (Lauritzen K. H. et al., 2014). Intracelulární hladina laktátu ovlivňuje genovou expresi, mj. přenašečů *MCT*, *cytochrom c-oxidázy* a dalších enzymů oxidativního procesu; může regulovat také mobilizaci mastných kyselin z tukové tkáně. Terapeutické podání laktátu působí pozitivně u řady závažných stavů, jako je ischemie a trauma mozku, další neurologická a psychiatrická onemocnění, srdeční selhání, záněty a další (Brooks G. A., 2018; Riske L. et al., 2017). Laktát má imunomodulační protizánětlivé účinky (inhibuje migraci monocytů a produkci IL-1 β , IL-6 a TNF, funkce NK buněk, a produkci cytokinů i T-lymfocyty) (Brooks G. A., 2018). Je tedy otázkou, zda zvýšená koncentrace laktátu u závažných onemocnění a kriticky nemocných není částečně regulační reakcí organismu, nejen metabolickým důsledkem.

3.1.2 Pentózový cyklus

Pentózafosfátová dráha (pentózový cyklus, hexózamonofosfátový zkrat, fosfoglukonátová dráha, PPP) je alternativní cesta metabolismu glukózy. Nevede k tvorbě ATP, avšak generuje NADPH a ribózu. Pentózový cyklus probíhá v cytosolu obdobně jako glykolýza. V 1. oxidační

ireverzibilní fázi se vytváří NADPH (tři molekuly Glc-6-P vedou ke vzniku tří pětiuhlíkových zbytků, tři molekul CO_2 a šesti NADPH). 2. vratná neoxidační fáze poskytuje ribózu, resp. produkty této fáze cyklu se mění podle potřeb buňky: tři pětiuhlíkové zbytky jsou přeuspořádány za opětovného vzniku Glc-6-P a G-3-P; protože 2 molekuly G-3-P mohou regenerovat Glc-6-P, může být touto cestou glukóza zcela oxidována na CO_2 a H_2O . NADPH je nutný pro redukční syntézy (lipogeneze, steroidogeneze a syntéza aminokyselin) a je koenzymem *glutathionreduktázy*, která regeneruje oxidovaný glutathion. Ribóza-5-fosfát je nezbytná pro syntézu nukleotidů a nukleových kyselin. Pentózový cyklus je aktivní především v játrech (kde je za normálního stavu glukóza oxidována v PPP asi z 30 %), tukové tkáni, kůře nadledvin, štítné žláze, leukocytech, erytrocytech, varlatech, mozku a v laktující mléčné žláze. Tato metabolická cesta má velkou rezervní kapacitu pro up-regulaci za určitých fyziologických a patologických situací, např. při zvýšené potřebě redukce glutathionu v rámci oxidačního stresu (Dienel G. A., 2018).

3.1.3 Glukoneogeneze

Glukoneogeneze je proces syntézy glukózy z nesacharidových prekurzorů. Nejvýznamnějšími tkáněmi schopnými glukoneogeneze jsou játra a ledviny, při lačnění také tenké střevo. Substráty glukoneogeneze jsou aminokyseliny (tzv. glukogenní aminokyseliny, tj. všechny přítomné v živočišných bílkovinách kromě leucinu a lysinu), laktát, glycerol a propionát. Glukogenní aminokyseliny tvoří po transaminaci nebo deaminaci buď pyruvát, nebo jiné meziproducty citrátového cyklu a vstupují do glukoneogeneze přes oxalacetát, laktát se zapojuje po přeměně na pyruvát a karboxylaci na oxalacetát. Glycerol je fosforylován a redukován na dihydroxyacetonfosfát (DHA-P).

Při glukoneogenezi probíhají v opačném pořadí stejné reakce jako při glykolýze, vyjma tří termodynamicky nerovnovážných reakcí, kdy nelze obrátit sled reakce a je třeba dalších enzymů a dodání energie získané oxidací mastných kyselin.

Glukoneogeneze je značně energeticky náročný proces, je spotřebováno o 2 ATP a 2 GTP navíc oproti přímému zvratu glykolýzy, celkem 6 ATP+GTP. Přeměna nadbytku laktátu po intenzivní zátěži glukoneogenezí k obnově glykogenu vede ke zvýšenému metabolickému obratu a nárůstu spotřeby kyslíku (kyslíkový dluh) (Murray R. K., 2012; Hale T., 2008).

3.1.4 Metabolismus glykogenu

Glykogen je u živočichů hlavní zásobní formou sacharidů. Rozvětvená struktura glykogenu poskytuje velký počet míst pro odbourávání a umožňuje rychlé uvolnění glukóza-1-fosfátu

(Glc-1-P). Glykogen se vyskytuje ve všech buňkách, především však v játrech a v kosterních svalech, v menší míře v srdci a tukové tkáni.

Jaterní glykogen slouží k udržování stálé koncentrace glukózy v krvi mezi jídly, po 12–18 hodinách hladovění je téměř úplně vyčerpán (Murray R. K., 2012). Ve svalech slouží glykogen pro získání ATP glykolýzou pro svalovou kontrakci.

Syntéza glykogenu (glykogeneze) vychází z Glc-6-P, který je přeměňován na Glc-1-P, viz obr. č. 1. Je zajímavé, že po příjmu většího množství sacharidů není dominantní reakce:

glukóza → glukóza-6-P → glukóza-1-P → glykogen,

nýbrž sled reakcí:

glukóza → laktát → pyruvát → glukóza-6-P → glukóza-1-P → glykogen.

Tento fenomén byl nazván glukózový paradox (Holeček M., 2006).

Odbourávání glykogenu (glykogenolýza) není obrácenou glykogenezí, ale samostatnou metabolickou drahou. Odbouráváním glykogenu vzniká 90 % Glc-1-P a 10 % glukózy.

3.2 Citrátový cyklus

Citrátový cyklus (Krebsův cyklus, cyklus trikarboxylových kyselin, cyklus kyseliny citrónové) je konečnou metabolickou drahou sacharidů, lipidů i bílkovin prostřednictvím oxidace společného metabolitu, acetyl-CoA. V cyklickém sledu reakcí je rozložen citrát, regeneruje se oxalacetát, uvolňují se 2 CO₂ a redukují se koenzymy. Redukované koenzymy jsou následně reoxidovány v respiračním řetězci za tvorby ATP ve spřažené oxidativní fosforylaci. CKC je aerobní děj – kyslík je nutný pro závěrečnou oxidaci redukovaných koenzymů. Je lokalizován v mitochondriích v sousedství enzymů dýchacího řetězce a OXP.

Na každou molekulu acetyl-CoA se v průběhu jedné otáčky citrátového cyklu tvoří 3 molekuly NADH a 1 molekula FADH₂. Jejich reoxidací v respiračním řetězci vzniká 9 molekul ATP, 1 ATP vzniká fosforylací na substrátové úrovni. Celkový zisk na jednu otáčku citrátového cyklu je tedy 10 molekul ATP na jednu molekulu acetyl-CoA (Murray R. K., 2012).

Acetyl-CoA je hlavním stavebním kamenem pro syntézu mastných kyselin s dlouhým řetězcem, která probíhá v cytosolu. Mitochondriální membrána je pro acetyl-CoA neprostupná, acetyl-CoA je v cytosolu dostupný z citrátu transportovaného tzv. citrátovým člunkem a následně rozštěpeného *ATP-citrátlyázou* (Joseph J., Gibson G. E., 2007).

Aktivita citrátového cyklu je závislá na dostupnosti NAD⁺, resp. ADP, tedy na rychlosti spotřeby ATP. Respirační kontrola prostřednictvím dýchacího řetězce a OXP je hlavním

řídícím mechanismem aktivity CKC. Dále jsou regulovány samotné enzymy, především katalyzující nerovnovážné reakce. Ve tkáních, které jsou závislé převážně na sacharidech jako zdroji acetyl-CoA (např. mozek), se řízení uskutečňuje na úrovni *PDH*.

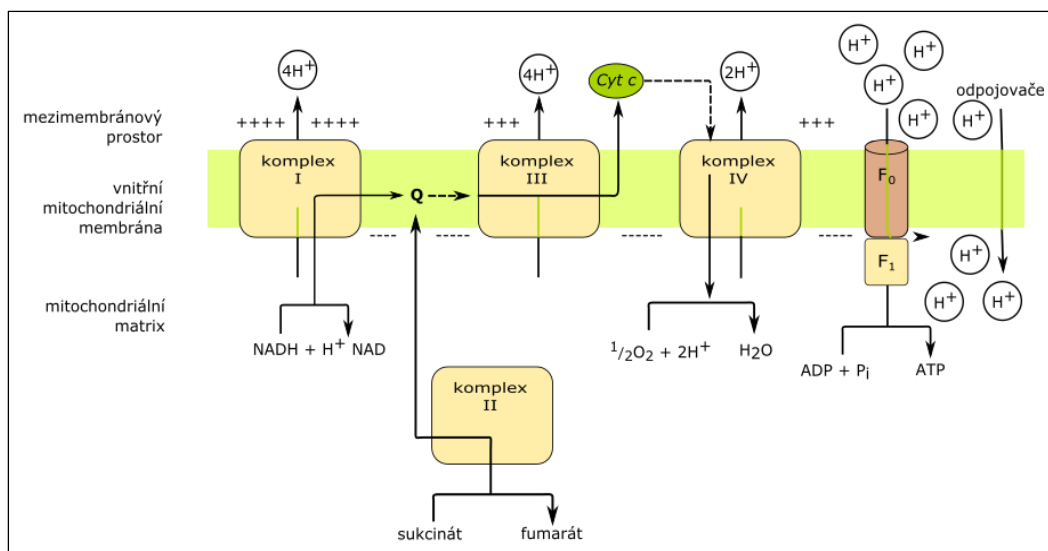
3.3 Respirační řetězec a oxidativní fosforylace

V respiračním řetězci elektrony proudí přes jednotlivé proteinové komplexy ve vnitřní mitochondriální membráně podle redoxního spádu (*NADH-Q-oxidoreduktáza* = komplex I, *Q-cytochrom c-oxidáza* = komplex III a *cytochrom c-oxidáza* = komplex IV) ke konečné reakci s kyslíkem za vzniku vody. Molekuly kyslíku zůstávají pevně vázány na komplex IV, dokud není kyslík úplně redukován, tak je minimalizován únik škodlivých volných kyslíkových radikálů (VKR). Přesto cca 3–5 % VKR může při OXP unikat. Některé substráty mají větší redoxní potenciál než NAD^+/NADH (např. sukcinát) a přecházejí na ubichinon (koenzym Q) přes *sukcinát-Q-reduktázu* = komplex II. Komplexy I, III a IV pracují jako protonové pumpy, tok elektronů vede k čerpání protonů z matrix mitochondrie přes vnitřní membránu do mezimembránového prostoru.

ATP-syntáza

Napříč vnitřní mitochondriální membránou prochází *ATP-syntáza*. Část F_1 vyčnívá do matrix a obsahuje fosforylační mechanismus, části F_0 překlenuje membránu a tvoří kanál pro protony. Tok protonů přes F_0 zpět do matrix mitochondrie vede k rotaci F_0 a řídí tvorbu ATP v F_1 pravděpodobně mechanismem vazebné konformační změny. *ATP-syntáza* tedy působí jako rotační motor využívající energii protonového gradientu, resp. hnací sílu protonů pro syntézu ATP z ADP a P_i . Tímto způsobem je oxidace těsně spřažena s fosforylací. Viz obr. č. 3.

Za extrémních podmínek však může *ATP-syntáza* fungovat zcela odlišným způsobem. Při nedostatku kyslíku je nejdůležitějším procesem živočišných buněk zachovat membránový potenciál a integritu. Za takového stavu může *ATP-syntáza* fungovat jako *ATPáza*, která „pumpuje“ protony z matrix mitochondrie, ačkoliv tato funkce je limitována inhibicí části F_1 změnou pH (Berg J. M. et al., 2002).



Obrázek č. 3: Respirační řetězec a oxidativní fosforylace – převzato a upraveno podle (Murray R. K., 2012)

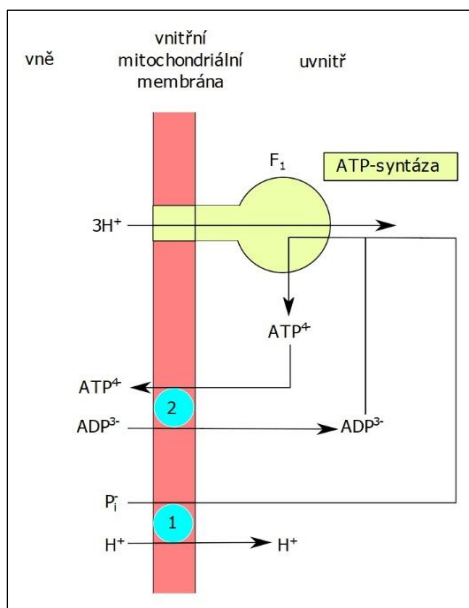
Q = koenzym Q neboli ubichinon, cyt = cytochrom

Během transportu dvou elektronů z jednoho NADH (komplexy I, III a IV) na kyslík je pumpováno do mezimembránového prostoru přibližně 10 protonů, zatímco z 1 FADH₂ přes ubichinon (komplex II) pouze 6 protonů. *ATP-syntáza* vyžaduje nejméně 3 protony k fosforylaci 1 ADP na ATP, tedy maximální možný P : O poměr (molární poměr mezi syntetizovaným ATP = „P“ a tvořenou vodou = „O“) je 3 pro NADH, resp. 2 pro FADH₂. To znamená maximální výnos až 38 ATP na 1 mol glukózy, pokud je využit pouze malátový člunek. Nicméně podrobným studiem mechanismu OXP v průběhu času došlo k úpravě udávané maximální čisté produkce ATP. V případě více podjednotek F₁ části *ATP-syntázy* je totiž potřeba více protonů na vznik 1 ATP (na 12 podjednotek minimálně 5 protonů). Kromě toho část protonů není využita pro *ATP-syntázu*, ale k transportu, dále se mohou uplatnit tzv. rozpojovače (viz níže), a nepochybně existuje také únik protonů přes vnitřní mitochondriální membránu (Divakaruni A. S., 2011; Dienel G. A., 2018).

Přenašeče

Vzhledem k tomu, že vnitřní mitochondriální membrána je pro ionty neprostupná, je transport negativně nabitých metabolitů do mitochondriální matrix možný pouze pomocí přenašečů. Tyto jsou také poháněny protonovým gradientem, který je tak snižován. Adeninové nukleotidy jsou přenášeny speciálním transportérem, *ATP-ADP translokázou* (nazývanou také adeninnukleotidový přenašeč), která představuje až 14 % proteinů ve vnitřní mitochondriální membráně. Umožňuje antiport ATP a ADP: ADP vstupuje do mitochondriální matrix, pouze pokud ATP vystupuje a *vice versa* (ATP nemůže být přeneseno z matrix, dokud není na cytosolové straně navázána molekula ADP). Dostupnost ADP tak reguluje rychlost OXP.

Životní důležitost *translokázy* spočívá v tom, že umožňuje transport ATP z mitochondrií k extramitochondriálnímu využití a návrat ADP do mitochondrií k tvorbě ATP. Druhou stranou mince však je, že membránový potenciál a tudíž i proton-hybná síla se snižují v důsledku výměny ATP za ADP (z mitochondrií jsou odstraněny čtyři záporné náboje za každé tři přijaté, tedy dochází k čistému přenosu jednoho negativního náboje z matrix). Asi čtvrtina výtěžku energie z přenosu elektronů respiračním řetězcem se spotřebuje k regeneraci membránového potenciálu, výměna ATP - ADP je tedy energeticky značně nákladná (Berg J. M. et al., 2002). K tvorbě ATP z ADP je také potřeba P_i . Ten je přenášén přes vnitřní mitochondriální membránu H^+/P symportem, který také snižuje membránový potenciál, viz obr. č. 4.



Obrázek č. 4: Spojení přenašeče fosfátu s adeninnukleotidovým přenašečem – převzato a upraveno podle (Murray R. K., 2012)

1 = přenašeč fosfátu, H^+/P_i symport je ekvivalentní antiportu P_i/OH , 2 = adeninnukleotidový přenašeč

Celkové množství ATP spotřebovaného různými transportními systémy může dosahovat až $\frac{2}{3}$ protonového gradientu. Nověji jsou P : O kvocienty pro oxidaci NADH a $FADH_2$ deklarovány jako 2,5, resp. 1,5, a reálný výtěžek 30–32 ATP na 1 molekulu glukózy. Tato hodnota však také není konstantní a může kolísat podle aktuálního stavu buňky (Koolman J., Roehm K. H., 2005; Stettner A. I., 2004; Hertz L., 2007).

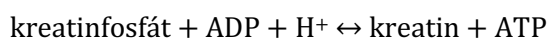
3.3.1 Rozpojení oxidace a fosforylace

Funkční rozpojení oxidace a fosforylace v respiračním řetězci může být způsobené buď mechanickým poškozením vnitřní mitochondriální membrány nebo tzv. rozpojovači (Uncoupling Proteins, UCPs). Rozpojovače regulují utilizaci metabolické energie tím, že přenášejí protony přes membránu zpět do matrix bez zapojení *ATP-syntázy* (energie je

uvolněna ve formě tepla, současně dochází ke snížení doprovodné produkce VKR). Toxickým exogenním rozpojovačem je například 2,4-dinitrofenol, přirozeně se vyskytující rozpojovač v hnědé tukové tkáni je termogenin (UCP-1), další UCPs jsou převážně v jiných tkáních. Dosud bylo popsáno pět homologních rozpojovacích proteinů (Nelson D. L., Cox M. M., 2013; Townsend K. L., Yu-Hua T., 2014). UCP-2 a UCP-3 se spíše než termogeneze účastní snižování oxidačního stresu a inzulínové citlivosti (Busiello R. A. et al., 2015; Nabben N. et al., 2011; Pecqueur C. et al., 2001; Cadenas S., 2018). UCP-2 je vysoce exprimován v makrofázích, slezině a plicích, jedna z rolí UCP-2 je regulace produkce VKR při zánětlivé odpovědi. Byla popsána down-regulace UCP-2 v imunitních buňkách během jejich aktivace v časném stadiu odpovědi na bakteriální patogeny (vysoká produkce ATP a VKR) a up-regulace exprese UCP-2 v pozdním stadiu zánětu k ochraně buněk proti oxidačnímu stresu (Nübel T., Ricquier D., 2006; Emre Y., Nübel T., 2009; Cadenas S., 2018).

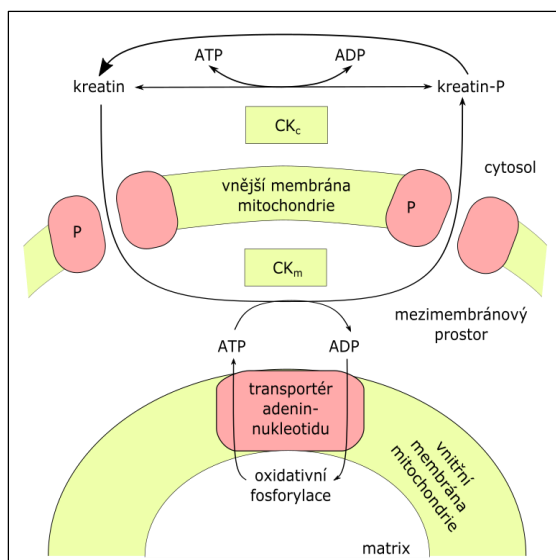
3.3.2 Kreatinfosfát

Kreatinfosfát (PCr) slouží jako zásoba vysokoenergetických fosfátů, protože může velmi rychle i za anaerobních podmínek poskytovat fosfátovou skupinu ADP. Naopak při odpočinku se energie fosfátů ukládá ve formě PCr v reakci katalyzované *kreatinkinázou* (CK):



PCr tedy funguje jako energetická rezerva, ale také jako acidobazický pufr vyvazující H^+ vzniklé při zátěži.

Kromě toho kreatinfosfátový člunek usnadňuje dopravu vysokoenergetického fosfátu z mitochondrií ve tkáních s vysokou a kolísavou potřebou energie (srdce, kosterní sval, mozek, fotoreceptory sítnice a další). Mitochondriální izoenzym CK katalyzuje přenos vysokoenergetického fosfátu z ATP, dostupného v mezimembránovém prostoru z adeninnukleotidového přenašeče, na kreatin. PCr je pak rychle transportován proteinovými póry ve vnější mitochondriální membráně do cytosolu pro tvorbu extramitochondriálního ATP, viz obr. č. 5. PCr člunek umožňuje rychlé „pendlování“ vysokoenergetického fosfátu z mitochondrie do cytosolu, a tak jak časovou, tak prostorovou rezervu ATP. Odčerpáním ATP z mezimembránového prostoru PCr reguluje mitochondriální respiraci (Ferreira L. G., 2013).



Obrázek 5: Kreatinfosfátový člunek – převzato a upraveno podle (Murray R. K., 2012)
 CK_m = mitochondriální izoenzym CK, CK_c = cytosolový izoenzym CK

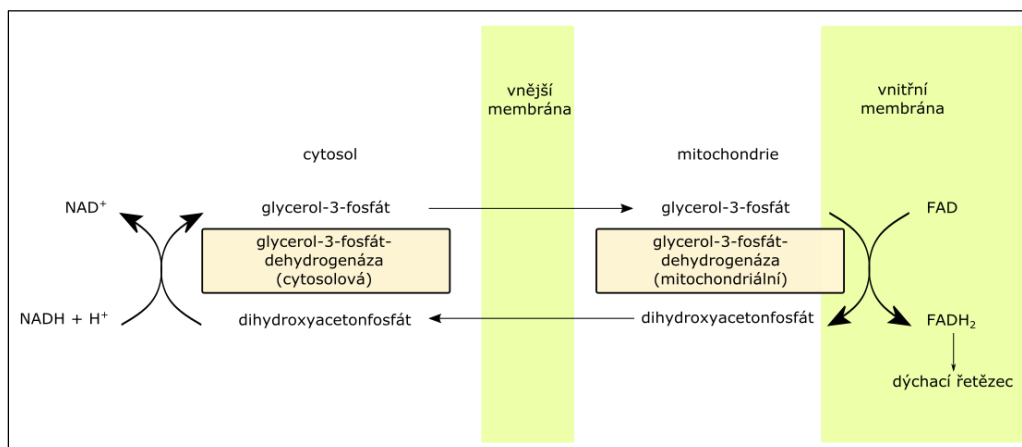
3.3.3 Přenos redukčních ekvivalentů do mitochondrie

NADH nemůže volně pronikat z cytosolu, kde je nepřetržitě vyráběn, do mitochondrie, neboť vnitřní mitochondriální membrána je pro NADH a NAD^+ neprostupná. Přenos elektronů z NADH je možný mechanismem tzv. člunků, které propojují metabolické cesty v cytosolu a mitochondrii a umožňují využití energie redukčních ekvivalentů. Pomocí člunků je regenerováno NAD^+ a udržován nízký redoxní poměr ($NADH/NAD^+$), nutný pro pokračování glykolýzy. Činnost člunků vyžaduje přítomnost substrátových párů a příslušných dehydrogenáz na obou stranách vnitřní mitochondriální membrány.

Glycerol-3-fosfátový člunek

U glycerol-3-fosfátového člunku je substrátovým párem G-3-P a DHA-P a enzymem *glycerol-3-fosfát dehydrogenáza (GPDH)* – viz obr. 6. Nejprve je pomocí cytosolové *GPDH* přenesen pár elektronů z NADH na DHA-P, glykolytický meziprodukt, za vzniku G-3-P a oxidace NADH na NAD^+ . G-3-P je regenerován na DHA-P za redukce FAD na $FADH_2$ mitochondriální *GPDH*, vázanou na vnějším povrchu vnitřní mitochondriální membrány. Následný přenos elektronů na ubichinon (komplex II) umožňuje vstoupit přímo do respiračního řetězce, vzniká tedy pouze 1,5 mol ATP na molekulu vytvořené vody. Zapojení FAD umožňuje transport elektronů z cytosolového NADH do mitochondrií proti koncentračnímu gradientu NADH, cenou za to je snížení výtěžku energie o jednu molekulu ATP na dva elektrony. Glycerol-3-fosfátový člunek je hojně zastoupen ve tkáních, kde jsou koncentrace NADH v cytosolu značně nižší než v mitochondrii (např. v kosterních svalech – především v bílých vláknech, mozku, varlatech, β -buňkách pankreatu, hnědé tukové tkáni), kde udržuje vysokou

míru oxidativní fosforylace na úkor nižšího energetického výtěžku (Berg J. M. et al., 2002; Murray R. K., 2012).



Obrázek č. 6: Glycerol-3-fosfátový člunek – převzato a upraveno podle (Murray R. K., 2012)

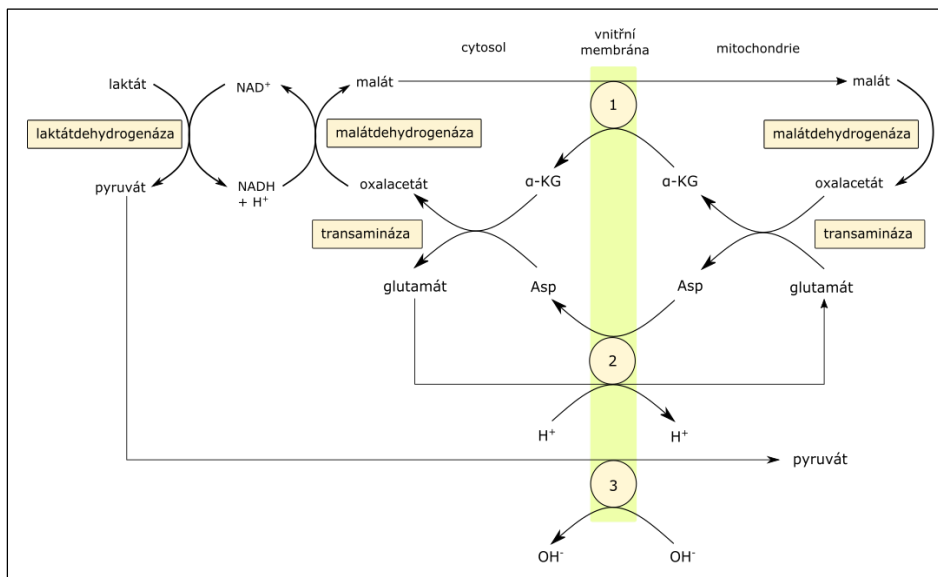
Malátový člunek

Malátový člunek (MAS) je více rozšířený a komplexnější, viz obr. č. 7. Elektrony jsou přenášeny z cytosolového NADH na oxalacetát pomocí cytosolové *malátdehydrogenázy* (*MDH*) za tvorby malátu. Malát prostupuje přes vnitřní mitochondriální membránu a je reoxidován mitochondriální *MDH* na oxalacetát za tvorby NADH z NAD^+ . Vnitřní mitochondriální membrána je však neprostupná i pro oxalacetát, ten je proto transaminován na aspartát, který do cytosolu může být přenesen (za současné přeměny glutamátu na α -ketoglutarát *transaminázou*). V cytoplasmě je pak aspartát přeměněn na oxalacetát a cyklus se znovu spustí. Elektrony z cytosolového NADH mohou být transportovány do mitochondrií MAS pouze v tkáních, kde je poměr NADH/NAD^+ v cytosolu vyšší než v mitochondriální matrix, tedy po koncentračním spádu NADH (obvykle v játrech, ledvinách a srdečním svalu) (Berg J. M. et al., 2002). Transport přenašečem aspartát/glutamát se jeví jako limitující. Je stimulován Ca^{2+} , který se váže na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány (Satrústegui J., Bak L. K., 2015; Satrústegui J. et al., 2007).

Laktátový člunek

V poslední době se uvažuje také o zapojení laktátu do systému kyvadlového přenosu redukčních ekvivalentů přes vnitřní mitochondriální membránu. Intracelulární kompartmentalizace izoformem *LD* (původně považované pouze za cytoplazmatický enzym) byla pomocí moderních metod již prokázána (Elustondo P. A. et al., 2013; Jacobs R. A. et al., 2013). Cytosolová forma *LD* upřednostňuje tvorbu laktátu, zatímco mitochondriální preferuje oxidaci laktátu. Tento posun reakční rovnováhy je umožněn lokalizací mitochondriální *LD* na vnějším povrchu vnitřní

mitochondriální membrány v blízkosti přenašeče pyruvátu, který kontinuálně odčerpává pyruvát do matrix mitochondrie. Laktát z cytosolu volně difunduje přes vnější mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru, kde může být oxidován *LD* na pyruvát (a ten přenesen pyruvátovým přenašečem do matrix mitochondrie) za redukce NAD^+ . NAD^+ je v mezimembránovém prostoru regenerováno *MDH*, což je již součástí malátového člunku. Vzhledem k úzké spolupráci laktátového intracelulárního člunku s MAS především v buňkách s vysokým stupněm oxidativního metabolismu, Kane navrhuje oba člunky spojit do jednoho laktát-malát-aspartátového člunku (Kane D. A., 2014), viz obr. č. 7. Uvádí, že přeměna pyruvátu na laktát na konci glykolýzy je potřebná pro dostatečnou tvorbu ATP i za dostatku kyslíku, a to při překročení kapacity MAS v důsledku vystupňované glykolýzy a požadavků na regeneraci cytosolového NAD^+ . Je tak možné, že laktát je tvořen kontinuálně bez ohledu na metabolický stav, a oxidace laktátu v mitochondrii je pak závislá na kapacitě MAS (Kane D. A., 2014; Dienel G. A., Cruz N. F., 2003).



Obrázek č. 7: Laktát-malát-aspartátový člunek – převzato a upraveno podle (Kane D. A., 2014; Murray R. K., 2012)

1 = přenašeč dikarboxylových kyselin, 2 = přenašeč glutamát/aspartát – symport protonu s glutamátem
3 = přenašeč monokarboxylových kyselin – antiport s OH^-

3.4 Energetická výtěžnost glykolýzy

Syntéza ATP může v buňce probíhat oxidativní fosforylací na úrovni dýchacího řetězce nebo fosforylací na substrátové úrovni. Energetickou výtěžnost glykolýzy je třeba posuzovat v souvislosti s navazujícími procesy. Pokud vychází z volné glukózy, pak se fosforylací spotřebují 2 ATP, a zisk činí 4 ATP. Celková bilance je tedy $4 - 2 = 2$ ATP. Pokud je výchozím substrátem glykogen, resp. glukóza-1-fosfát uvolněný z glykogenu, ušetří se 1 ATP (přeměna

Glc-1-P na Glc-6-P nevyžaduje energii), celková bilance glykolýzy je $4 - 1 = 3$ ATP a výtěžek energie je tedy o 50 % vyšší.

Spojení glykolýzy s CKC a dýchacím řetězcem umožní maximální možný zisk energie uložené v molekule glukózy. Další energie je získána zpracováním 2 NADH v dýchacím řetězci: je-li NADH přeneseno do mitochondrií malátovým člunkem (2,5 ATP na 1 NADH), je celková bilance $4 + 5 - 2 = 7$ ATP, při využití glycerol-3-fosfátového člunku (1,5 ATP na 1 NADH) je celková bilance $4 + 3 - 2 = 5$ ATP, viz tab. č. 1. Při kompletní oxidaci pyruvátu na CO_2 a vodu v CKC dochází k tvorbě dalších redukovaných koenzymů NADH a FADH_2 a zisku dalších 25 ATP. Celkový energetický zisk tedy činí 32 molekul ATP na jednu molekulu spotřebované glukózy (při předpokladu přenosu NADH pouze malátovým člunkem a vstupu volné glukózy, ne Glc-1-P, jako substrátu). Při vyšším podílu glycerol-3-fosfátového člunku na přenosu NADH do mitochondrií zisk ATP na jednu molekulu glukózy klesá.

Starší publikace, např. Harper's Biochemistry až do 27. vydání v roce 2006 (Murray R. K., Granner D. K., 2006) uvádějí odlišnou energetickou výtěžnost glykolýzy, resp. zisk až 38 ATP. Rozdíl je v množství molekul ATP získaných reoxidací redukovaných koenzymů v dýchacím řetězci, je uváděn zisk 3 ATP na oxidaci jedné molekuly NADH a 2 ATP při oxidaci jedné molekuly FADH_2). Příčina tohoto rozdílu je vysvětlena v kap. 3.3.

Glykolýzou k laktátu jsou získány pouze 2, případně 3 molekuly ATP, energetický výtěžek je tedy výrazně nižší. Aby buňka touto cestou dosáhla zisku potřebného množství energie, musí v konečném důsledku přeměnit mnohem více glukózy (tzv. Pasteurův efekt).

Metabolická dráha	Enzym katalyzující reakci	Způsob tvorby ATP	Počet ATP/mol glukózy	Počet ATP/mol glukózy – starší publikace
Glykolýza	<i>glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza</i>	oxidace 2 NADH v dýchacím řetězci	5	6
	<i>fosfoglycerátkináza</i>	oxidace na substrátové úrovni	2	2
	<i>pyruvátkináza</i>	oxidace na substrátové úrovni	2	2
	<i>hexokináza a fosfofruktokináza</i>	ATP se spotřebovává	-2	-2
Celkem			7	8
Citrátový cyklus	<i>pyruvátdehydrogenáza</i>	oxidace 2 NADH v dýchacím řetězci	5	6
	<i>isocitrátdehydrogenáza</i>	oxidace 2 NADH v dýchacím řetězci	5	6
	<i>α-ketoglutarát dehydrogenáza</i>	oxidace 2 NADH v dýchacím řetězci	5	6
	<i>sukcinátthiokináza</i>	oxidace na substrátové úrovni	2	2
	<i>sukcinátdehydrogenáza</i>	oxidace 2 FADH ₂ v dýchacím řetězci	3	4
	<i>maládehydrogenáza</i>	oxidace 2 NADH v dýchacím řetězci	5	6
Celkem			25	30
Celková bilance za aerobních podmínek			32	38
Celková bilance za anaerobních podmínek			2	2

Tabulka č. 1: Energetická výtěžnost glykolýzy – převzato z (Murray R. K., 2012)

Pozn.: Předpokládá se, že NADH je přeneseno do mitochondrií kompletně prostřednictvím malátového člunku a do glykolýzy vstupuje jako substrát volná glukóza.

3.5 Zajištění energetických potřeb na úrovni celého organismu

Dospělý, 70 kg vážící člověk potřebuje denně v závislosti na fyzické aktivitě cca 8–12 MJ získaných z potravy. Tato energetická potřeba je kryta ze 40–60 % sacharidy, z 30–40 % lipidy a z 10–15 % proteiny. Většina lidí přijímá potravu 2–3x denně, je tedy nutné po jídle vytvářet zásoby sacharidů (glykogen) a lipidů (triacylglyceroly) pro období mezi jídly.

Hlavním metabolickým substrátem pro většinu tkání po jídle je glukóza, můžeme pozorovat nárůst respiračního kvocientu (poměr vyprodukovaného CO₂ ke spotřebovanému O₂) z 0,8 až téměř k 1,0 (Murray R. K., 2012). Při lačnění však musí být glukóza šetřena pro centrální nervový systém (CNS), který je na ní z velké části závislý, a pro erytrocyty, které jsou na glykolýzu a pentózový cyklus odkázány zcela (nemají mitochondrie). Zároveň musí být zajištěny alternativní metabolické zdroje pro ostatní tkáně.

Membrána jaterních buněk je pro glukózu relativně volně prostupná, *glukokináza* odstraňuje po jídle glukózu z krve a poskytuje Glc-6-P k syntéze glykogenu a lipogenezi – nadbytečné

množství sacharidů je pohotově využito k syntéze triacylglycerolů jak v játrech, tak v tukové tkáni. V játrech je přítomna *Glc-6-fosfatáza*, která při vysoké koncentraci Glc-6-P katalyzuje zpětnou defosforylaci na glukózu, což chrání hepatocyty před vyvázáním veškerého Pi.

Mezi jídly jsou hlavním producentem glukózy pro ostatní tkáně právě játra. Glc zde vzniká především glykogenolýzou z jaterního glykogenu a glukoneogenezí. Při lačnění vlivem nízké hladiny inzulínu není glukóza vychytávána ve svazech a tukové tkáni, koncentrace glukózy v krvi tedy klesá pouze mírně. V játrech a kosterním svalu jsou jako alternativní zdroj energie oxidovány MK, jejichž koncentrace při lačnění vzrůstá mobilizací z tukové tkáně. Při hladovění dochází v játrech k produkci většího množství acetyl-CoA, než může být oxidováno, a acetyl-CoA je přeměněn na ketolátky. Ketolátky jsou významným dalším zdrojem energie především pro kosterní a srdeční sval, ale i jiné tkáně je dokáží využít ve větším množství. Dalším energetickým substrátem pro řadu orgánů (svaly, játra, ledviny, mozek) je laktát. Při dlouhodobém hladovění tak glukóza představuje méně než 10 % energetických zdrojů metabolismu (Murray R. K., 2012).

Svalový glykogen slouží jako lokální zásoba energie pro svalovou kontrakci, vzhledem k nepřítomnosti *glukóza-6-fosfatázy* nemůže sval uvolňovat volnou glukózu do cirkulace. Svalový glykogen však může sloužit jako zásobárna energie nepřímo, prostřednictvím uvolňování laktátu a alaninu. Laktát vytvořený v kosterním svalu při zátěži je transportován do jater a ledvin, kde je glukoneogenezí přeměněn na glukózu, která se uvolňuje do cirkulace a je dostupná i pro svaly (Coriho nebo laktátový cyklus). Nalačno dochází v kosterním svalu také k produkci alaninu transaminací pyruvátu z glykolýzy (tedy nezávisle na zastoupení alaninu v katabolizovaných bílkovinách). Alanin v játrech po přeměně zpět na pyruvát slouží ke glukoneogenezi (glukózo-alaninový cyklus). Tento cyklus umožňuje také odvedení nadbytečného NH₃ ze svalů do jater, kde je zpracován do netoxické močoviny (Murray R. K., 2012). Nadbytek alaninu uvolňovaný ze svalů při katabolickém stavu u kriticky nemocných může přesáhnout kapacitu enzymů CKC a OXP a vést ke vzestupu laktátu.

Aminokyseliny (AMK) získané z proteinů tkání při dlouhodobém hladovění se mohou přeměňovat na pyruvát nebo jiné meziproducty citrátového cyklu a sloužit ke glukoneogenezi (glukogenní AMK). Další aminokyseliny (fenylalanin, tyrosin, tryptofan a izoleucin) mohou tvořit acetyl-CoA a tedy ketolátky (ketogenní AMK).

Při regulaci metabolismu glukózy má rozhodující úlohu inzulín. Je produkován β -buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu, které jsou pro glukózu volně prostupné. Způsobí okamžité snížení koncentrace glukózy v krvi posílením jejího transportu do buněk tukové tkáně

a kosterního svalu (prostřednictvím GLUT-4). Ovlivněním klíčových enzymů inzulin zvyšuje glykolýzu, syntézu glykogenu, syntézu mastných kyselin a lipogenezi a syntézu proteinů; inhibuje lipolýzu, ketogenezi a glukoneogenezi. Glukagon, hormon produkovaný α -buňkami pankreatu při hypoglykémii, působí opačně. Další hormony, které ovlivňují koncentraci glukózy v krvi (ACTH, růstový hormon, glukokortikoidy, adrenalin a noradrenalin), působí také kontraregulačně k inzulinu, mají tedy hyperglykemizující efekt.

Nádorové buňky představují z hlediska sacharidového metabolismu specifickou tkáň. Do rychle rostoucích nádorových buněk je glukóza transportována výkonnými přenašeči GLUT-1 a GLUT-3 nezávislými na inzulinu, metabolismus glukózy katalyzují specifické výkonné formy enzymů – *HK*, *PFK*, *fosfokinázy* a dalších. Glykolýza probíhá tedy mnohem intenzivněji než v nenádorových buňkách, tvoří se daleko větší množství pyruvátu, který je redukován na laktát (Locasale J. W., 2010; Mathupala S. P. et al., 2006).

3.6 Energetický metabolismus mozku

Lidský mozek je velmi náročný na dodávku energie. Ačkoliv hmotnost mozku odpovídá pouze 2 % tělesné hmotnosti, energie potřebná k udržení mozkových funkcí činí cca 20 % celkového klidového metabolického obratu (Dienel G. A., 2018). Zatímco ve tkáních jako je srdce nebo kosterní sval energetické nároky zřetelně stoupají během mechanické práce, metabolická aktivita mozku se v čase mění mnohem méně. Již klidový stav vyžaduje značné množství energie, ve spánku dochází jen k mírnému poklesu (v REM fázi dokonce může dojít ke vzestupu) metabolického obratu mozku (CRM).

Většinu energie (přibližně 75 %) vyžadují procesy související s přenosem signálu, zbylých 25 % energie slouží k udržení základních buněčných funkcí jako je syntéza a degradace proteinů, fosfolipidů a nukleotidů a axonální transport. Excitační i inhibiční signalizace je uskutečňována prostřednictvím transportu iontů, což se odráží v trvalé elektrochemické aktivitě mozku. Celková spotřeba energie lidským mozkiem je 21 $\mu\text{mol ATP/g/min}$, srovnatelná se spotřebou energie svaly nohou maratonského běžce nebo osmotickou prací v ledvinách (McKenna M. C. et al., 2006). Neurony mají vyšší nároky na energii (cca 60 % celkové energetické spotřeby mozku) než gliální buňky (podíl spotřeby energie gliálními buňkami je uváděn v širokém rozmezí 10–40 %) (Proia P. et al., 2016; Yu I. et al., 2018; Attwell D., Laughlin B., 2001).

Mozek vyžaduje pro udržení svých funkcí kontinuální dodávku energetických substrátů. Ačkoliv může být za určitých podmínek využita oxidace jiných látek, glukóza zůstává

nejdůležitějším a základním energetickým substrátem dospělého mozku a je esenciální také pro vyvíjející se mozek.

Metabolismus glukózy a glykogenu

Lidský lidský mozek spotřebuje denně cca 91 g glukózy (ekvivalent 23 čajových lžiček). Glc je hlavním substrátem pro získání energie, ale je také nepostradatelným zdrojem uhlíkatého skeletu pro syntézu neurotransmiterů a neuromodulátorů (acetylcholinu, glutamátu, glutaminu, GABA, aspartátu, serinu, glycinu), a také laktátu, ribózy-5-fosfátu a NADPH. Extrakce glukózy z arteriální krve činí v mozku pouze cca 10–12 %. Při potřebě zvýšené dodávky energie, však může být množství přenašečů glukózy up-regulováno. Transport glukózy tedy většinou nehraje limitující roli, s výjimkou stavů jako je významná hypoglykémie, především akutní, nebo křeče (Dienel G. A., 2018).

Hypoglykémie nejprve vede k protektivní reakci zprostředkované hypotalamem se symptomy jako je pocení, tachykardie, úzkost a hlad. Při poklesu glykémie pod 2,5 mmol/l klesá metabolický obrat glukózy v mozku (CMR_{glc}) rychleji než obrat kyslíku (CMR_{O_2}), což ukazuje na oxidaci jiných substrátů než glukózy. Déletrvající a hlubší hypoglykémie (cca pod 2,0 mmol/l) vede k neurologickým projevům jako je letargie a křeče, při poklesu pod cca 1,0 mmol/l jsou zásoby ATP v mozku vyčerpány, rozvíjí se kóma a dochází ke smrti neuronů. Je zřejmé, že na neurologických projevech hypoglykémie se podílí také nedostatečná tvorba neurotransmiterů (Butterworth R. F., 2006).

Glykolýza je hlavní cestou metabolismu glukózy v dospělém mozku, vyskytuje se zde především *HK I* preferující glykolýzu (viz kap. 3.1.1). *HK* je při relativně vysokých koncentracích glukózy v mozku saturovaná, tj. katalyzuje fosforylaci glukózy konstantní rychlostí. Aktivita mozkové glykolýzy je regulována především prostřednictvím allosterické kontroly *PFK-1* (Dienel G. A., 2018). Z izoenzymů *LD* se v astrocytech vyskytují především *LD₄* a *LD₅*, v neuronech *LD₁* a *LD₂*. Selektivní distribuce izoenzymů přispívá k modelu funkčního intercelulárního laktátového člunku v mozku, *LD₅* preferuje konverzi pyruvátu na laktát, *LD₁* naopak oxidaci laktátu na pyruvát (Schurr A., 2006).

Cca 5 % glukózy je v dospělém mozku za bazálních podmínek metabolizováno pentózovým cyklem bez vzniku ATP (Dringen R. et al., 2007). Tato metabolická cesta je aktivní v neuronech i astrocytech, v oligodendrocytech dosahuje až 10 % (generuje NADPH k redukčním syntézám) (Amaral A. L. et al., 2016). PPP má vysokou aktivitu ve vyvíjejícím se mozku, vrcholu dosahuje během myelinizace. Zvýšená aktivita PPP je také odpovědí na oxidační stres, např. u zánětů

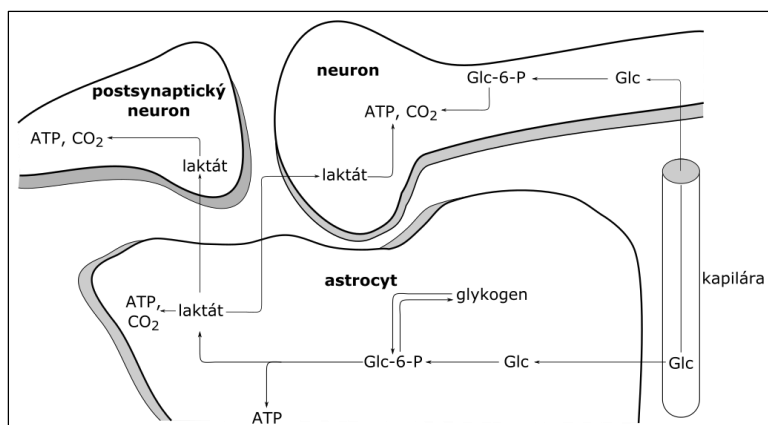
nebo traumatu CNS, nebo při odbourávání biogenních aminů (serotoninu, dopaminu, noradrenalinu) (Dringen R. et al., 2007; Herrero-Mendez A. et al., 2009).

Glykogen je v mozku přítomen pouze v malém množství (0,1 % hmotnosti mozku) (Brown A. M., 2004). Toto množství je využíváno během několika minut (< 5 min), ale kontinuální dodávkou glukózy přes HEB je zásoba glykogenu neustále rychle obnovována. Metabolismus glykogenu tvoří cca 2 % celkového obratu glukózy v mozku (Gruetter R., 2003). Za normálních okolností je v mozku v neaktivní formě méně než 10 % *glykogenfosforylázy*, hlavního enzymu glykogenolýzy. Mozek je relativně izolován od systémové endokrinní regulace, ačkoliv např. glukokortikoidní hormony HEB prostupují. Metabolismus glykogenu je zde regulován převážně lokálně, jak humorálně (např. vasoaktivní intestinální peptid, noradrenalin), tak neuronální aktivitou: glykogenolýza je aktivována Ca^{2+} uvolněným při neuronální excitaci (McKenna M. C. et al., 2006; Hertz L. et al., 2015). Diskutuje se role glykogenu a z něj uvolněného laktátu při formování paměti (Duran J. et al., 2013; Newman L. A. et al., 2011).

Metabolická spolupráce mezi astrocyty a neurony

Vzhledem k vysoce specializovaným funkcím různých typů buněk v mozku je značně rozdílná také buněčná a subbuněčná lokalizace přenašečů, enzymů a metabolických drah. Metabolismus mozku je komplexní, jednotlivé typy buněk jsou na sobě vzájemně závislé a jejich neustálé interakce zcela nepostradatelné. Energetické substráty jsou přes bariéry nejprve transportovány do astrocytů (Mathiisen T. M. et al., 2010). Astrocyty zajišťují zásobování neuronů substráty energetického metabolismu a kontrolují lokální mikroprostředí. To dovoluje neuronům spotřebovat energii bez ovlivnění buněčného acidobazického stavu, objemu buňky a bez produkce AGEs (Bélanger M. et al., 2011).

V dospělém mozku disponují *glykogenfosforylázou* převážně astrocyty, které obsahují také glykogenová granula. Produkt glykogenolýzy i glykolýzy astrocytů je předáván neuronům pravděpodobně ve formě laktátu, čemuž odpovídá i distribuce MCT. *Glukóza-6-fosfatáza* má v mozku velmi nízkou aktivitu. Mezi astrocyty a neurony pravděpodobně funguje cyklus obdobný laktátovému cyklu mezi játry a svaalem, viz obr. č. 8 (McKenna M. C. et al., 2006; Pellerin L., 2003; Mangia S. et al., 2009; Gandhi G. K. et al., 2009; Brown A. M., 2004), ačkoliv řada publikací s tím polemizuje a trvá na glukóze jako dominantním energetickém substrátu neuronů (Chin Ch. P., Roberts E. L., 2003; Díaz-García C. M., 2019; Dienel, 2019).



Obrázek č. 8: Schéma kompartmentalizovaného metabolismu glykogenu – převzato a upraveno podle (McKenna M. C. et al., 2006)

Prekurzorem pro syntézu acetylcholinu je acetyl-CoA získaný z glykolýzy, v synaptických zakončeních cholinergních neuronů probíhá intenzivní metabolismus glukózy (Joseph J., Gibson G. E., 2007).

Mezi astrocyty a neurony existuje GABA-glutamát-glutaminový cyklus. Z astrocytů je uvolňován glutamin (Gln) a ten je vycytáván glutamatergními i GABAergními neurony. Oba druhy neuronů přeměňují pomocí *fosfátem aktivované glutaminázy (PAG)* glutamin na glutamát (Glu), který je v glutamatergních neuronech uvolňován jako neurotransmitter a v GABAergních neuronech přeměněn na GABA. Vychytáváním Glu a GABA a přeměnou na glutamin astrocyty je cyklus dokončen. Amoniak uvolněný z glutaminu *PAG* je použit opět k syntéze Gln. Je přenášen ve formě alaninu z neuronů do astrocytů v laktáto-alaninovém cyklu obdobném glukózo-alaninovému cyklu mezi svalem a játry. V astrocytech je alanin transaminací přeměněn na pyruvát a následně laktát, který je transportován opět do neuronů (McKenna M. C. et al., 2006; Bak L. K., et al., 2006; Dienel G. A., 2018).

Také další enzymy a metabolické cesty jsou v různé míře kompartmentalizovány mezi astrocyty a neurony, viz dále.

Energetický metabolismus mozku v ontogenetickém vývoji

V průběhu ontogenetického vývoje jsou ve velké míře využívány jiné substráty než glukóza, dostupné z cirkulace. V časně postnatální periodě je to především laktát, v kojeneckém období pak ketolátky, v souladu s vysokou koncentrací tuků v mateřském mléce. Ketolátky jsou využívány jako zdroj energie, ale také při syntéze strukturálních lipidů rychle se vyvíjejícího mozku. Intenzita transportu a utilizace glukózy stoupá až s relativně vysokosacharidovou dietou po odstavení, kdy respirační kvocient roste až k hodnotě dospělých. V souvislosti se změnami dostupnosti substrátů dochází v průběhu vývoje také na buněčné úrovni k postupné změně

zastoupení enzymů a přenašečů. MCT-1 je hojně zastoupen v časně fázi vývoje, později se zvyšuje výskyt GLUT-3 i GLUT-1. Aktivita *PDH*, dalších enzymů oxidativního metabolismu glukózy a MAS je během kojeneckého období nízká. Naproti tomu vysoká aktivita enzymů metabolismu ketolátek tvoří typický vývojový vzorec tohoto období, po odstavení postupně klesá na třetinu až čtvrtinu maxima. Přestože je v časném vývojovém období energie kryta především oxidací laktátu a ketolátek, dodávka glukózy je zcela nepostradatelná. Ve vyvíjejícím se mozku jsou totiž vysoké nároky na tvorbu ribóza-5-fosfátu a NADPH v PPP a uhlíkatý skelet glukózy je začleňován do strukturálních lipidů. Lokální utilizace glukózy v mozku signifikantně koreluje s postkoncepčním věkem a získáním nových neurologických schopností (McKenna M. C. et al., 2006; Erecinska M. et al., 2007).

Alternativní zdroje energie využívané dospělým mozkiem

Alternativní energetické substráty může v určité míře využívat také dospělý mozek, který disponuje všemi enzymy potřebnými pro utilizaci monokarboxylových kyselin, laktátu a ketolátek. Neurony za normálních okolností spotřebovávají cca polovinu dodané glukózy, druhou polovinu astrocyty. Vzhledem k větší potřebě energie neuronů než glie (viz výše) je zřejmé, že především neurony využívají i jiné substráty (Proia P. et al., 2016).

Laktát je možný substrát energetického metabolismu i při dostatku kyslíku, koncentrace laktátu v krvi je cca 10x vyšší než koncentrace acetátu. Fyziologicky kryje laktát cca 8–12 % energetických potřeb mozku, při vzestupu laktatémie nebo při hypoglykémii až 25–60 % (De Feyter H. M. et al., 2013; Brooks G. A., 2018; Riske L. et al., 2017; Gallagher C. N. et al., 2009). Některé zdroje dokonce uvádějí, že laktát je v mozku konečným produktem glykolýzy a hlavním energetickým substrátem (Schurr A., 2006). Mozek patří ke tkáním, které produkují poměrně značné množství laktátu: u zdravého normoxického jedince produkuje mozek přibližně 50 $\mu\text{mol}/\text{min}$ laktátu (Van Hall G. et al., 2009). Kromě metabolické role je diskutována také signální funkce laktátu v mozku (např. při regulaci stresové odpovědi a lokálního průtoku krve), stejně tak možnost, že právě laktát je látkou zprostředkující pozitivní vliv cvičení v mnoha fyziologických i patologických stavech, včetně stárnutí mozku a neurodegenerativních onemocnění. Laktátu je připisována úloha v procesu učení, vnímání koncentrace glukózy v krvi hypothalamem, regeneraci mozkové tkáně po traumatu nebo udržování myelinizace (Proia P. et al., 2016; Domenech-Estevéz E. et al., 2015; Schurr A., 2006; Bergersen H. L., 2015; Dienel G. A., 2017; Mosienko V. et al., 2015). Vysoká koncentrace laktátu v séru byla popsána jako neinvazivní biomarker mozkových tumorů (Bharadwaj S. et al., 2015). Podání hypertonického roztoku laktátu má příznivý

hemodynamický a metabolický efekt, je možné využít jako antiedematózní a vazodilatační léčba po poranění mozku, při perioperační ochraně mozku a dalších akutních stavech (Bouzat P., 2014; Ichai C. et al., 2009).

Za normálních okolností je oxidace ketolátek minimální, arteriovenózní diference je zanedbatelná. Avšak mozek ketolátky zvýšeně využívá při prolongovaném hladovění, kdy je dodávka sacharidů nedostatečná a dochází ke vzestupu koncentrace ketolátek v krvi. V rámci adaptace cca po 3 týdnech bez adekvátního přísunu energie, dokáže mozek krýt až 50 % energetické potřeby oxidací ketolátek (Robers E. L. Jr., 2007). Obdobně při ketotických stavech jiné etiologie, jako je dekompenzovaný diabetes mellitus, intenzivní cvičení, vysokotuková nebo ketogenní dieta, mohou ketolátky krýt velkou část energetické potřeby mozku. Byl popsán neuroprotektivní efekt ketolátek, které zvyšují hladinu glutathionu (Romano A. et al., 2017).

Je široce rozšířen názor, že mitochondrie dospělého mozku MK neoxidují, nicméně některé recentní studie (Panov A. et al., 2014; Schultz J. G. et al., 2015; Dienel G. A., 2018) uvádí, že mozek za určitých okolností (prolongované hladovění, dekompenzovaný diabetes nebo ketogenní dieta) může v omezené míře využívat MK jako energetický substrát. Transport MK přes HEB je možný jak difúzí, tak prostřednictvím přenašečů FATP. Kromě β -oxidace v mitochondriích se na metabolismu větvených MK a MK s velmi dlouhým řetězcem podílejí peroxisomy, poruchy mozkové peroxisomální α -oxidace jsou spojeny s mozečkovými defekty a demyelinizační neuropatií. Byl popsán neuroprotektivní, neuromodulační a protizánětlivý vliv MK s krátkým a se středně dlouhým řetězcem a polynenasycených MK (Romano A. et al., 2017; Lei E. et al., 2016; Byrne C. S. et al., 2015; Belkouch M. et al., 2016).

Jako další energetický substrát může mozek využít i AMK. Glu, Gln, aspartát a GABA mohou být při nedostatku glukózy využívány jako energetické substráty. Gln se přemění na Glu *glutaminázou*, Glu vstupuje po transaminaci na α -ketoglutarát do CKC. Uhlíkatý skelet glutamátu opouští CKC jako malát nebo oxalacetát a tvoří prostřednictvím *MDH* nebo *fosfoenolpyruvát karboxykinázy* a *pyruvátkinázy* pyruvát, a následně do něj opět vstupuje jako acetyl-CoA a může být kompletně oxidován. Část citrátového cyklu od α -ketoglutarátu k oxalacetátu poskytuje většinu redukčních ekvivalentů, resp. cca 75 % energie v porovnání s kompletním CKC. Tato metabolická cesta označována jako „pyruvate recycling pathway“ tvoří pyruvát z intermediátů CKC, a umožňuje také produkci NADPH. Je aktivována především při hypoglykémii a při oxidačním stresu, kdy může být většina pyruvátu produkována touto cestou (Cerdán S., 2017; Amaral A. J. et al., 2011).

Ve vysoké míře vstupuje do mozku leucin, který může být přeměněn na 3-hydroxybutyrát a následně oxidován (McKenna M. C. et al., 2006).

Dodávka kyslíku do mozku

Mozkové buňky jsou pro udržení strukturální a funkční integrity absolutně závislé také na plynulé dodávce kyslíku cirkulací. Extrakce O₂ z arteriální krve v mozku činí 50–70 %, tzn., že zůstává jen malá rezerva. V mozku je pouze minimální zásoba kyslíku, není přítomen myoglobin. Při zvýšení požadavků na dodávku kyslíku tak musí dojít ke zvýšení lokálního průtoku krve (CBF), ten se však může zvýšit pouze v omezené míře (Butterworth R. F., 2006). Zvýšený CBF odpovídá maturaci dané oblasti v ontogenetickém vývoji, u dospělých je cca 3,3 ml/100 g/min, což činí 20 % celkové spotřeby O₂ (Dienel G. A., 2018). Při hypoxii nebo ischemii koncentrace ATP a PCr v mozku klesá, což vede ke snížení funkce aktivních iontových přenašečů, především *Na,K-ATPázy*, a tím k poklesu transmembránového gradientu, depolarizaci membrán, otevření napětově řízených iontových kanálů a extracelulárnímu nahromadění neurotransmiterů. Dochází k poklesu pH (hodnoty v ischemické oblasti jsou 6,8–6,2), což prohlubuje poruchu funkce proteinů, včetně *Na,K-ATPázy*. Porucha endotelu a astrocytů tvořících HEB vede ke zvýšenému průniku cytokinů a imunokompetentních buněk, rozvoji zánětu a vzniku vazospasmů a trombů potencujících ischemii. Kaskáda těchto dějů nakonec vede ke smrti buňky (Butterworth R. F., 2006; Busl K. M., Greer D. M., 2010).

Přenos redukčních ekvivalentů do mitochondrie, citrátový cyklus

Přenos redukčních ekvivalentů do mitochondrií je v mozku zajišťován ve značné míře glycerol-3-fosfátovým člunkem, který umožňuje transport NADH proti koncentračnímu gradientu. Aktivita MAS roste během vývoje, paralelně se synaptogenezí. Je signifikantně vyšší v neuronech oproti astrocytům, což koresponduje s účastí tohoto člunku při syntéze Glu.

Pyruvátkarboxyláza je přítomna především v astrocytech. Vzhledem ke kontinuálnímu uvolňování neurotransmiterů neurony (nebo oxidaci Glu na CO₂ a H₂O), je karboxylace pyruvátu na oxalacetát v astrocytech a dodávka neuronům nezbytná pro doplnění CKC neuronů. *MDH* je přítomna jak v mitochondriích, tak v cytosolu neuronů i astrocytů. Představuje určité rozcestí metabolických cest, protože mitochondriální *MDH_m* může směřovat metabolismus cestou CKC nebo cestou MAS. Upřednostnění jedné z cest je dáno asociací *MDH_m* s různými enzymy do přechodných multienzymových komplexů (metabolonů) v závislosti na redoxním stavu buňky a koncentraci klíčových metabolitů v mitochondrii (Malik P. et al., 1993). Citrát je syntetizován především astrocyty, koncentrace citrátu v mozku je relativně vysoká

(0,4 mmol/l v likvoru) (McKenna M. C. et al., 2006). Astrocyty jsou schopny uvolnit velké množství citrátu, a tak významně up-regulovat glykolýzu (McKenna M. C. et al., 2006).

Metabolismus ATP

V udržování hladiny ATP v mozku hraje významnou roli PCr. Koncentrace PCr v mozku je vyšší než koncentrace ATP, aktivita CK, resp. izoenzymů specifických pro mozek (*CK-BB* a *uMtCK*) je extrémně vysoká a koncentrace kreatinu je v mozku vyšší než v plazmě (McKenna M. C. et al., 2006; Béard E., Braissant O., 2010). Kreatin je transportován do mozku přes HEB specifickým přenašečem SLC6A8 (Ohtsuki S. et al., 2002) a také v mozku intratékálně syntetizován (Tachikawa M. et al., 2004; Béard E., Braissant O., 2010). Deficit kreatinu je doprovázen neurologickými příznaky, jako je mentální retardace, epilepsie a autismus. O kreatinu se nově také uvažuje jako o neuromodulátoru a neurotransmiteru, jehož podání může stabilizací mitochondriálních funkcí působit protektivně u pacientů s neurodegenerativními chorobami (Béard E., Braissant O., 2010; Tachikawa M., Hosoya K., 2011). Naproti tomu akumulace kreatininu, který vzniká z kreatinu spontánně, je podkladem uremické encefalopatie; v HEB i HLB existuje účinný transportní efluxní mechanismus kreatininu (Tachikawa M., Hosoya K., 2011).

Koncentrace ATP v mozku je za normálních podmínek vysoká a reprezentuje sumární výsledek velmi rychlé syntézy a spotřeby ATP. Průměrně polovina všech terminálních fosfátových skupin je obměněna přibližně za 3 sekundy, v některých oblastech mozku je obrat ATP pravděpodobně ještě mnohem rychlejší (McKenna M. C. et al., 2006).

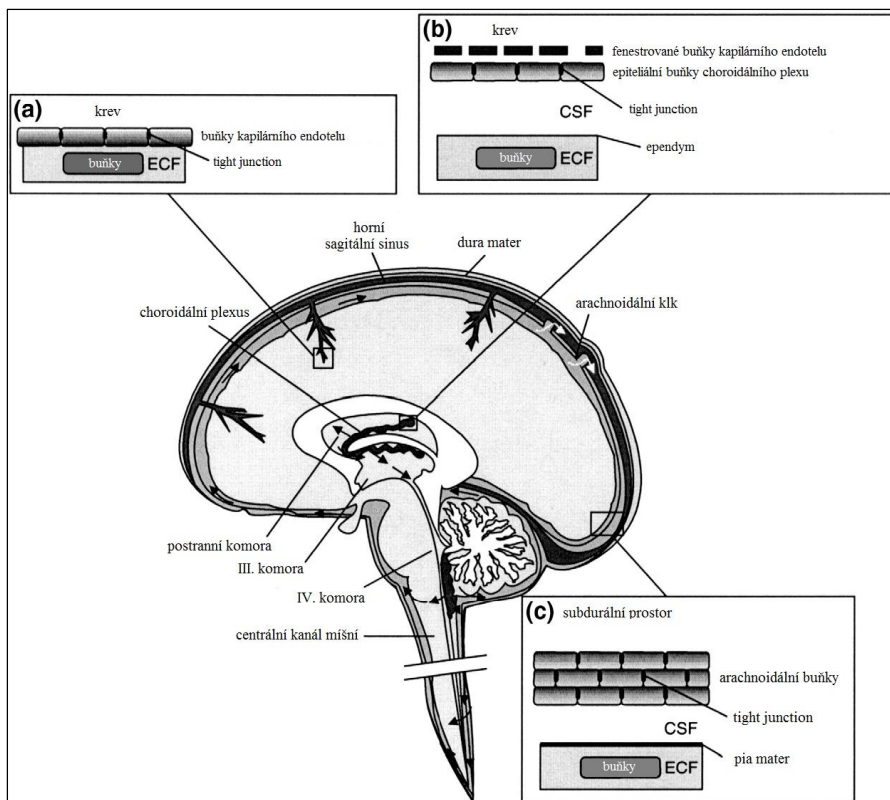
3.7 Bariéry mezi krví, likvorem a tkání CNS

Neurony komunikují pomocí elektrických a chemických signálů. Přesná regulace lokálního mikroprostředí v okolí axonů a synapsí je tedy kritickým místem pro udržení spolehlivé neurální signalizace. Kdekoliv jinde v organismu dochází k výkyvům složení extracelulární tekutiny (ECT), zvláště po jídle, cvičení nebo např. při stresu. Podobná změna ve složení intersticiální tekutiny v centrálním nervovém systému může vést k nekontrolované mozkové aktivitě. Koncentrace mnoha látek, které působí jako neurotransmitery nebo ovlivňují práh pro aktivaci synapsí, je v likvoru (CSF) udržována nižší než v plazmě, viz tab. č. 2.

Analyt	Plazma	CSF	Jednotka
Na ⁺	140	141	mmol/l
K ⁺	4,6	2,9	mmol/l
Mg ⁺⁺	1,7	2,4	mmol/l
Cl ⁻	101	124	mmol/l
HCO ³⁻	23	21	mmol/l
pH	7,4	7,3	–
Glukóza	5,0	3,0	mmol/l
Glutamát	83	1,79–14,7	μmol/l
Albumin	42	0,192	g/l
IgG	9,87	0,012	g/l
Transferin	2,6	0,014	g/l
Plazminogen	0,7	0,000025	g/l
α-2-makroglobulin	3	0,0046	g/l
Cystatin C	0,001	0,004	g/l

Tabulka č. 2: Koncentrace vybraných analytů v plazmě a likvoru – převzato z (Abbott N. J. et al., 2010)

V kontrole složení lokálního mikroprostředí hrají hlavní roli bariéry mezi krví, likvorem a tkání CNS. Jsou formována tři klíčová rozhraní: hemato-encefalická bariéra (HEB), hemato-likvorová bariéra (HLB) a encefalo-likvorová bariéra, viz obr. č. 9.



Obrázek č. 9: Bariéry v mozku – převzato a upraveno podle (Abbott N. J. et al., 2010)
 a) hemato-encefalická bariéra, b) hemato-likvorová bariéra, c) encefalo-likvorová bariéra, ECF = extracelulární tekutina, ECT

Ve všech třech rozhraních je bariérová funkce postavena na kombinaci tří mechanismů: fyzikální bariéry (těsné spoje mezi buňkami zabraňující paracelulárnímu transportu látek), transportní bariéry (existence specifických transportních mechanismů) a metabolické bariéry (enzymy metabolizující procházející molekuly).

Původní koncepce bariér rigidně oddělujících struktury mozku od zbytku těla je dnes již překonaná. Podle současných znalostí bariéry umožňují selektivní vstup a výstup humorálních faktorů a buněk, regulovaný dle aktuálních potřeb při fyziologických i patologických situacích. Základní funkcí bariér je tedy udržení stabilního mikroprostředí, ochrana tkáně CNS před různými škodlivými noxami, včetně mikroorganismů, a zároveň selektivní průnik látek pro mozek potřebných a odtok odpadních produktů metabolismu. Dysfunkce bariér může být příčinou nebo následkem řady onemocnění CNS (roztroušená skleróza, neuromyelitis optica, hypoxie, ischemie a edém mozku, zánět, traumata CNS, Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, epilepsie, nádory, glaukom, lysozomální střešná onemocnění, amyotrofická laterální skleróza a další) (Abbott N. J. et al., 2010; Hawkins B. T., Davis T. P., 2005).

3.7.1 Hemato-encefalická bariéra

Mozkové kapiláry jsou obklopené výběžky astrocytů (pedikly) a pericyty (mikroglíální buňky regulující průsvit kapilár, mohou mít schopnost fagocytózy). Astrocyty zprostředkují kontakt mezi endotelem a nervovými synapsemi. V perivaskulárním regionu se vyskytují také imunitní buňky. Celý komplex tvoří tzv. neurovaskulární jednotku (Pitřha J., 2014).

HEB je strukturálně tvořena endotelem kapilár, bazální membránou a vrstvou astrocytů a pericytů. Endotel mozkových kapilár se liší od endotelu jiných orgánů: neobsahuje transcelulární póry a fenestrace, endotelové buňky jsou navzájem spojeny těsnými kontakty (tight junction) a je zde velmi nízká aktivita pinocytózy. Extrémně těsné spojení v tight junction, na kterém se na molekulární úrovni podílejí specifické proteiny (okludiny, klaudiny, kadheriny, junkční adhezivní molekuly a další), brání paracelulárnímu pohybu polárních molekul různé velikosti. Těsné spoje endotelu tak udělují HEB vlastnosti kontinuální buněčné membrány. Faktory omezující vstup látek do mozku jsou: velikost polárního povrchu ($PSA > 80 \text{ \AA}^2$), tendence tvořit více vodíkových vazeb (> 6), negativní náboj a molekulová hmotnost ($> 450 \text{ Da}$), HEB je hlavní překážkou vstupu hydrofilních sloučenin a sloučenin s vysokou molekulovou hmotností nebo nábojem. Přenos potřebných hydrofilních solutů a nutrientů je umožněn přítomností selektivních přenašečů. Selektivní výměna látek může probíhat na obrovské ploše cca $12\text{--}18 \text{ m}^2$ (Abbott N. J. et al., 2010; Liebner S. et al., 2008).

Buňky asociované s mozkovými kapilárami mohou prostřednictvím uvolnění vasoaktivních látek a cytokinů modifikovat permeabilitu HEB dle aktuálních podmínek. V některých oblastech dospělého mozku (hypofýza, epifýza, cirkumventrikulární orgány) není HEB plně vyjádřená vzhledem k přítomnosti chemorecepčních zón a regulaci uvolňování hormonů (Abbott N. J. et al., 2010). V období krátce po narození, kdy ještě nezralá HEB umožňuje ve vyšší míře vstup mj. imunitních buněk, jsou pravděpodobně dokončovány procesy vedoucí k autotoleranci struktur nervové soustavy (Krejsek J. et al., 2016). Nezralá HEB u novorozenců však také umožňuje průnik látek, jejichž vstup do mozku je u dospělých významně omezen, např. bilirubinu, což je podkladem encefalopatie při novorozenecké hyperbilirubinémii (jádrový ikterus, kernikterus).

Někteří autoři odlišují od HEB bariéru hemato-míšni a hemato-neurální s mírně odlišnými vlastnostmi (Piřha J., 2014).

3.7.2 Hemato-likvorová bariéra

HLB je tvořena v mozkových komorách endotelem kapilár, bazální membránou a epitelem choroidálních plexů. Na straně obrácené směrem k likvoru je povrch epitelu choroidálních plexů zvětšen přítomností výběžků – tzv. mikrovili. Funkci bariéry přebírají v HLB především epitelové buňky, endotelové buňky jsou fenestrovány a relativně propustné. Spojení mezi epitelovými buňkami je těsné (tight junction), ale propustnější než v endotelu HEB. Transportní mechanismy jsou obdobné jako u HEB, rozdíly v transportu látek jsou především kvantitativní. Likvor je secernován přes epiteliální buňky choroidálního plexu do mozkových komor (cca 60 % CSF, zbylých 40 % je tvořeno přestupem intersticiální tekutiny z mozkové tkáně), složení likvoru je tak určováno především HLB. Celkový objem CSF u dospělého je 100–150 ml, likvor je 3–4x za den kompletně vyměněn. CSF cirkuluje z postranních komor do III., pak IV. komory mozkové, dále do cisterna magna a subarachnoidálního prostoru, a je absorbován prostřednictvím arachnoidálních klků (Pacchioniho granulace) do venózních sinusů. Likvor obklopující mozek a míchu uděluje systému pružnost, rehydratuje mozek a míchu, snižuje hmotnost mozku a chrání před poraněním a prudkými výkyvy tlaku a teploty. Vzhledem k rozdílné propustnosti bariér může být likvor hlavním zdrojem vstupu některých látek do mozku. Drenážní funkcí likvoru je odstraňování některých látek z likvoru do krve aktivním transportem nebo prostřednictvím toku CSF se soluty do venózních sinů.

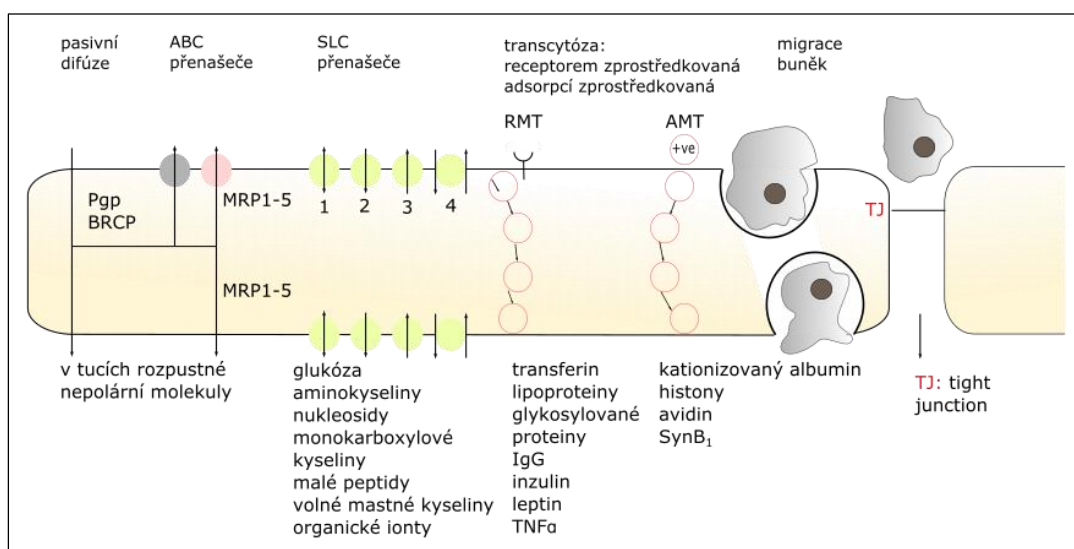
3.7.3 Encefalo-likvorová bariéra

Je tvořena vrstvou astrocytárních výběžků na povrchu mozku a míchy (membrána limitans gliae superficialis), nesouvislou bazální membránou, avaskulárním arachnoidálním epitelem

vystylajícím dura mater a endyemem v oblasti komor CNS. Z důvodu nepřítomnosti cév a relativně malého plošného rozsahu bariéry nedochází k významné výměně látek mezi krví a CNS (Kandel E. R. et al., 2000). Nepřítomnost těsných spojů mezi endyemálními a piálními buňkami dovoluje volný paracelulární pohyb malých hydrofilních molekul z CSF do mozku a *vice versa*. Velké molekuly jako proteiny bariérou také procházejí, ale mnohem méně.

3.7.4 Transport přes HEB

Různé transportní cesty přes HEB jsou znázorněny na obr. č. 10.



Obrázek č. 10: Transportní cesty přes HEB – převzato a upraveno podle (Abbott N. J. et al., 2010)

Specifické přenašeče solutů (SLC) umožňují transcelulární transport konkrétních látek. Exprese těchto přenašečů může být polarizovaná, tj. jsou přítomny jen na lumenální nebo ablumenální straně endotelu. SLC umožňují usnadněnou difúzi (pasivní transport ve směru koncentračního gradientu, kdy není třeba dodávka energie). Aktivní transport (proti koncentračnímu spádu s nutnou dodávkou energie) vyžaduje specifické uspořádání přenašečů: aktivní přenašeč je pouze na jedné straně buňky a je asociován s pasivním transportním systémem na druhé straně buňky (látky přenášené aktivním systémem se kumulují uvnitř buňky a následně buňku opouštějí usnadněnou difúzí po koncentračním gradientu). Množství přenašečů může být down/up regulováno nabídkou substrátů, změnou teploty a pH nebo hormonálně, jak při fyziologickém ontogenetickém vývoji, tak při patologických stavech (Abbott N. J. et al., 2010; Diemel G. A., 2018).

Transport glukózy a laktátu

Hlavní SLC přenašeč v HEB dospělého mozku je GLUT-1 pro přenos glukózy s transportní rychlostí 700 nmol/g/min (Albers R. W. et al., 2012) Velmi vysoká transportní rychlost

potvrzuje důležitost glukózy pro mozek, jiné substráty jsou přenášeny rychlostí mnohem nižší. V menší míře je v mozku také zastoupen další na inzulinu nezávislý přenašeč glukózy, GLUT-3 (Murray R. K., 2012).

GLUT-1 je stereospecifický, extrakce D-glukózy je cca 100x vyšší než L-glukózy. Kapacita tohoto přenašeče postačuje pro transport 2–3x většího množství glukózy, než je za normálních okolností v mozku metabolizováno. Transport glukózy přes HEB roste se stoupajícím pH (Albers R. W. et al., 2012). Při hypoglykémii dochází k zvýšené expresi GLUT-1 transportéru, o efektu chronické hyperglykémie u diabetiků jsou kontroverzní zprávy (Prasad S. et al., 2014). Inaktivační mutace GLUT-1 je podstatou závažných onemocnění jako je dětská rezistentní epilepsie a mentální retardace. Syndrom GLUT-1 deficiencie (GLUT1DS) je relativně vzácná forma encefalopatie, která vzniká na podkladě mutace v SLC2A1 genu. Syndrom má velmi variabilní fenotyp, k manifestaci dochází většinou v kojeneckém období, výjimečně se vyskytuje adultní forma s minimálními příznaky. Při včasné rozpoznání je onemocnění dobře léčitelné ketogenní dietou. Charakteristickým diagnostickým znakem je hypoglykorachie při normoglykémii a normálním dalším nálezem v likvoru (Aulická Š. et al., 2018).

Přenašeče SGLT-1 a SGLT-2 jsou popisovány typicky v epitelu střeva a proximálního tubulu ledvin, oba jsou však pravděpodobně také exprimovány v HEB (Elfeber K. et al., 2004; Enerson B. R., Drewes L., 2006). SGLT umožňuje přenos glukózy sekundárně aktivním transportem. Hnací silou je koncentrační gradient Na^+ , který vytváří Na^+, K^+ -ATPáza za spotřeby ATP na bazální straně buňky, glukóza je přenášena do buňky proti svému koncentračnímu gradientu kotransportem s Na^+ . Vemula popisuje na základě pokusů *in vitro* i *in vivo* zapojení SGLT především při hypoxii/ischémií mozku a hypoglykémii (Vemula S. et al., 2008).

Ačkoliv se v různých zdrojích traduje, že laktát není přes HEB přenášen (Racek J. et al., 1999) jiné uvádějí, že extrakce laktátu z arteriální krve není v mozku zanedbatelná jak v klidu, tak především při vzestupu laktatémie (Knudsen G. M. et al., 1991; Quistorff B. et al., 2008; Rasmussen P. et al., 2011; Van Hall G. et al., 2009). V HEB je zastoupena izoforma přenašeče MCT-1, která přenáší kotransportem s protonem převážně laktát (transportní rychlost 60 nmol/g/min, influx i eflux laktátu), ale také pyruvát, 3-hydroxybutyrát, acetát, a některé exogenní monokarboxylové kyseliny (např. kys. salicylovou, benzoovou a další). Transport je stereospecifický (pro L-laktát), saturovatelný při vysokých koncentracích, ovlivnitelný teplotou a pH (při pH 6,0 je třikrát větší než při pH 7,4), přenášené sloučeniny spolu kompetitivně soutěží (Kido Y. et al., 2000; Halestrap A. P., 2012). Se snižujícím se pH se zvyšuje neionizovaná frakce laktátu, která prostupuje HEB prostou difúzí, zvýšení transportu laktátu je však dáno

především aktivací MCT. MCT-1 v HEB může být up-regulován při vysokých koncentracích cirkulujících ketolátek nebo laktátu (McKenna M. C. et al., 2006).

Přenos dalších látek a buněk

Volně, prostřednictvím pasivní difúze (volný transport ve směru koncentračního spádu, nevyžaduje dodávku energie) přes HEB procházejí malé molekuly a lipofilní látky (O₂, CO₂, N₂O, NH₃, etanol, nikotin, steroidní hormony, většina psychoaktivních drog a některá léčiva). Vstup těchto látek do mozku je limitován pouze průtokem krve, u některých lipofilních látek je však závislý na uvolnění z vazby na transportní proteiny (např. fenobarbital, fenytoin). Permeabilita HEB je větší pro CO₂ než pro H⁺, tzn. pH intersticiální tekutiny mozku odráží spíše pCO₂ krve než pH krve (Albers R. W. et al., 2012). Voda prostupuje prostou difúzí dle osmotického gradientu, transport je posílen kanály aquaporinů.

ABC transportéry, např. P-glykoprotein a BCRP, aktivně „pumpují“ zpět do lumen cév (a tedy ven z mozku) některé lipofilní látky pasivně difundující přes HEB, především xenobiotika nebo endogenní neurotoxické metabolity. Ochraňují tak mozek před potenciálním poškozením, což je při omezené regenerační kapacitě plně diferencovaných neuronů zásadní (Abbott N. J. et al., 2010; Pechnadová K. et al., 2006).

Přenašeče AMK se klasifikují podle charakteru přednostně transportovaných aminokyselin a dalších vlastností. Esenciální AMK mohou vstupovat do mozku velmi rychle, některé z nich jsou využívány jako prekurzory neurotransmiterů. Strukturálně podobné aminokyseliny mezi sebou soutěží o vstup do mozku, vzestup plazmatické koncentrace jedné AMK tak může inhibovat transport ostatních.

Vezikulární transport přes HEB a HLB je velmi omezený, neporušené bariéry významně omezují vstup makromolekul. Mnoho plazmatických proteinů by při volném průniku do mozku mohlo způsobit vážné důsledky (např. protrombin, plazminogen, faktor Xa) (Abbott N. J. et al., 2010). Některé proteiny a peptidy (inzulin, Fe-transferin, IGF, vazopresin, leptin, IgG, TNF α a další) jsou přes HEB transportovány prostřednictvím vazby na specifické receptory, receptorem zprostředkovanou transcytózou (RMT). Polykationické proteiny a lektiny jsou transportovány nescifickým procesem – adsorpcí zprostředkovanou transcytózou (AMT), kdy dochází k vazbě pozitivně nabitých proteinů a peptidů s negativně nabitými cukernými zbytky membránových glykoproteinů a proteoglykanů (glykokalyx). Kapacita AMT je větší (není limitovaná počtem receptorů), kationizace proteinů zvyšuje vstup proteinů do mozku. Pro oba typy transcytózy je zásadní separace transportní cesty od degradace v lyzozomech, což je unikátní vlastností HEB (Nag S., Begley D. J., 2005).

Ionty jsou směňovány mezi krví a mozkiem velmi pomalu. Intravenózně podané K^+ je kompletně směněno se svalem již za 1 h, výměna s mozkiem je jen z poloviny dokončena za 24–36 h (Albers R. W. et al., 2012). Změny kalémie mají jen velmi malý efekt na koncentraci kalia v likvoru i v mozku, dokonce i při velmi vysoké kalémii zůstává koncentrace v likvoru v referenčním rozmezí (Slavík V., Dolezal T., 2012).

HEB mohou procházet i buňky. Fyziologicky probíhá transport imunocytů přes endotel HEB bez porušení těsných spojů, diapedézou přímo přes cytoplazmu endotelových buněk. Při zánětu se však těsné spoje rozvolňují a buňky prostupují jak transcelulárně, tak paracelulárně (Konsman J. P. et al., 2007). Indukce zvýšené propustnosti HEB se účastní řada molekul: zánětlivé cytokiny (IL-1, IL-6, TNF α), leukocytární adhezní molekuly, vazoaktivní bílkoviny a matrix metaloproteinázy a jejich inhibitory (Larsen J. M. et al., 2014).

3.8 Imunitní reakce

Všechny buňky našeho těla dokáží identifikovat signály „vnějšího nebezpečí“ spojené s infekcí patogenními mikroorganismy (tj. vzory PAMP) nebo signály „vnitřního poškození“ (tj. vzory DAMP) pomocí specifických receptorů, tzv. receptorů rozeznávajících molekulové vzory (PRR). PRR jsou vyjádřeny na membránách buněk, některé i nitrobuněčně nebo jsou v solubilní formě v tělních tekutinách. Jsou členěny do různých rodin a vážou obrovské spektrum nejrůznějších molekul. V největší pestrosti a denzitě jsou PRR exprimovány na buňkách vrozené (nespecifické) imunity (Tacheuki O., Akira S., 2010).

Přirozené bariéry a nespecifická imunita

Jako první se do obranné reakce zapojují přirozené obranné bariéry (kůže, sliznice, HEB) a jejich fyziologické funkce, včetně osídlení přirozenou mikrobiotou. Pokud epitelové buňky bariér identifikují signály nebezpečí/poškození a uvolňují cytokiny, dochází k první vlně tvorby interferonů. Při průniku patogenů přes epitel se zapojí další vrstva imunitního systému – nespecifická imunita.

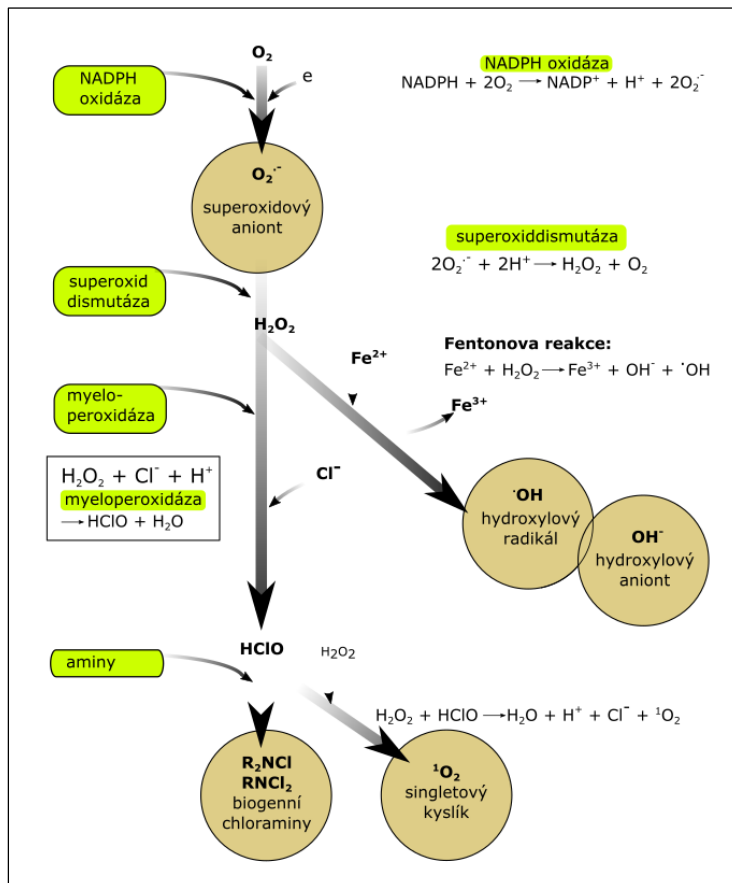
Buňkám nespecifické imunity je společná schopnost vycestovávat do tkání a fagocytovat, tj. identifikovat, pohltit a rozložit částice o velikosti nad 0,5 μ l. Fagocyty škodliviny likvidují (neutrofilly, eozinofily) nebo také zpracovávají a prezentují antigen (dendritické buňky, monocyty, makrofágy).

Neutrofilly tvoří cirkulující pool fagocytujících buněk, mohou však v případě potřeby vycestovat do tkání. Fagocytují především menší částice, např. extracelulární bakterie. Mají krátký životní cyklus, ale jsou tvořeny ve velkém množství. Monocyty přestupují průběžně

z krve do tkání, kde jsou připravené k imunitní reakci jako tkáňové makrofágy. Fagocytují také větší částice, erythrocyty, krystaly hematoidinu, intracelulární bakterie a plísňe, vlastní mrtvé nebo změněné buňky, buněčný detritus nebo imunokomplexy. Fagocyty migrují ve směru gradientu endogenních nebo exogenních chemotaktických působků do místa zánětu (Freeman S. A., Grinstein S., 2014; Underhill D. M., Goodridge H. S., 2012).

Oxidační vzplanutí

Rozlišujeme dva způsoby nitrobuněčného zabíjení: mechanismy na kyslíku nezávislé a na kyslíku závislé. Do první skupiny se řadí lysozym, laktoferin, defenziny a katelicidiny, lyzozomální enzymy, nízké pH a další. Fylogeneticky mladší mechanismy využívají kyslík pro tvorbu řady baktericidních VKR v procesu zvaném oxidační (respirační, metabolické) vzplanutí (Slauch J. M., 2011; Forman H. J., Torres M., 2002; Tung J. P. et al., 2009; Krejsek J. et al., 2016); viz obr. č. 11.



Obrázek č. 11: Oxidační vzplanutí – převzato a upraveno podle (Krejsek J. et al., 2016)

Oxidační vzplanutí je determinováno enzymovou výbavou fagocytů. Nejprve aktivovaná NADPH-oxidáza v membráně fagocytů přenáší elektron z NADPH na molekulový kyslík a vzniká superoxidový radikál $\cdot O_2^-$. Ten v kyselém prostředí (ve fagolyzozomu) přímo generuje peroxid vodíku, v neutrálním a alkalickém prostředí (v živočišných tkáních) je reakce

katalyzována *superoxiddismutázami*. Peroxid vodíku má slabé cidní účinky, ale je schopen prostupovat přes buněčné membrány, stejně jako $\bullet\text{O}_2^-$. Dále *myeloperoxidáza* konvertuje peroxid vodíku a chloridové ionty na silně baktericidní kyselinu chlornou. HClO reaguje s aminoskupinami proteinů za vzniku baktericidních biogenních chloraminů, může být zdrojem také vysoce reaktivních hydroxylových radikálů $\bullet\text{OH}$ v reakci s $\bullet\text{O}_2^-$ (Nauseef, 2014). Peroxid vodíku vytváří s $\bullet\text{O}_2^-$ v přítomnosti iontů Fe^{2+} nebo Cu^{2+} rovněž $\bullet\text{OH}$ (Fentonova reakce). Singletový kyslík $^1\text{O}_2$ může vznikat ze superoxidu, peroxidu vodíku nebo $\bullet\text{OH}$ (Jílek P., 2008; Krejsek J. et al., 2016). Velký význam má také oxid dusnatý vznikající z L-argininu za katalýzy inducibilní *NO-syntázy*. Kromě cytotoxické funkce se NO podílí např. v signalizačních drahách pro vazorelaxaci a neurotransmisi (Kiss J. P., 2000; Vincent S. R., 2008; Lorenz M. et al., 2003; Sun H. X. et al., 2012). VKR mají enormní potenciál na jedné straně likvidovat infekční agens, na druhé straně poškozovat vlastní buňky a tkáně (Krejsek J. et al., 2016). Proces mnohonásobného zvýšení tvorby VKR cca 30 min po začátku fagocytózy vyžaduje rychlé dodání značného množství energie a je spojen s vysokou spotřebou kyslíku a zvýšenou aktivitou PPP (Chapel H. et al., 2018).

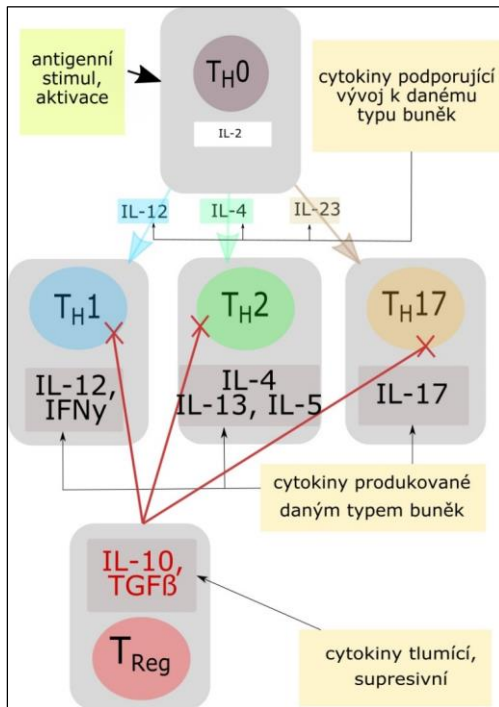
Molekuly HLA

Aktivované makrofágy a zejména dendritické buňky během migrace do spádových sekundárních lymfatických orgánů zpracovávají fagocytovaný materiál do imunogenních peptidů o 5–8 aminokyselinách, které vystaví prostřednictvím molekul HLA na povrchu buňky. HLA I. třídy jsou na povrchu všech jaderných buněk a prezentují vlastní antigeny, HLA II. třídy jsou na povrchu imunocytů a prezentují primárně antigeny cizí. Prezentací antigenu T-lymfocytům se imunitní reakce rozvíjí na specifické složky imunitního systému. Buňky prezentující antigen působí na ostatní buňky také humorálně svými cytokiny. Některé cytokiny mají i systémové účinky, např. IL-1 působí jako endogenní pyrogen, IL-6 aktivuje v hepatocytech syntézu bílkovin akutní fáze (Howell, 2013; Adiko A. C. et al., 2015).

Polarizace T-lymfocytů

Vazba antigenu spolu s kostimulačními interakcemi v optimálním mikroprostředí příslušných cytokinů vede k aktivaci, proliferaci a klonální expanzi lymfocytů. Lymfocyty se na základě „mobilizačního plánu“ od buněk nespecifické imunity (tj. informace o konkrétním nebezpečí prostřednictvím prezentovaného antigenu a cytokinového mikroprostředí) funkčně polarizují do specifických subsetů s různými efektorovými funkcemi (zatímco jiné subety jsou inhibovány) a samy se stávají významnými producenty cytokinů. Pomocné T-lymfocyty

tak hrají v mechanismu adaptivní imunity klíčovou roli, diferencují imunitní odpověď a regulují její průběh, viz obr. č. 12.



Obrázek č. 12: Polarizace T-lymfocytů – převzato a upraveno z (Jílek P., 2008)

Při infekci potenciálně nitrobuněčnými patogeny (viry, Mykobakterium, Listeria, Yersinia, Brucella, Borrelia, Salmonella, Francisella, Aspergillus, Candida, Toxoplazma, Trypanosoma, Plasmodium, Leishmania a další) dochází v prostředí především IL-12 preferenčně k polarizaci T_{H0} do T_{H1} . T_{H1} lymfocyty produkují především IL-2, IL-12 a IFN_{γ} , aktivují M1 makrofágy (viz dále), potencují expresi HLA II. třídy, cytotoxickou reaktivitu specifickou (T_C -lymfocyty) i nespecifickou (ILC a NKT buňky), maturaci B-lymfocytů a produkci protilátek třídy IgG, která opsonizuje patogeny a aktivuje komplement. Tyto patogeny tedy vyvolávají především buněčný typ imunitní odpovědi. Dlouhodobá, chronická expozice antigenům (při infekci bakteriemi nebo mnohobuněčnými parazity, především helminty) nebo exogenním alergenům, vede v prostředí IL-4 k preferenční polarizaci T_{H0} do T_{H2} subsetu. T_{H2} lymfocyty produkují především IL-4, IL-5 a IL-13, podporují maturaci B-lymfocytů a produkci protilátek IgE, IgA a IgG_4 , přes navázání IgE degranulaci basofilů a mastocytů, atrahují eozinofily, stimulují peristaltiku GIT a tvorbu hlenu v dýchacích cestách, aktivují M2 subset makrofágů. Při tomto typu imunitní odpovědi dominuje tvorba protilátek. Infekce extracelulárními bakteriemi (Streptococcus, Staphylococcus, Neisseria, Haemophilus a dalších bakterie), protozoárními parazity nebo fungálními agens indukuje v mikroprostředí IL-6, IL-23 preferenční aktivaci T_{H17} subsetu. T_{H17} lymfocyty produkují IL-17, IL-21 a IL-22 s výrazně prozánětlivými účinky

především na nespecifickou imunitu – podporují migraci a aktivaci neutrofilních granulocytů a makrofágů, diferenciaci nových neutrofilů v kostní dřeni, zvyšují bariérové funkce a produkci antimikrobiálních proteinů, maturaci B-lymfocytů a produkci protilátek a potencují systémovou zánětlivou odpověď (Krejsek J. et al., 2016; Latha T. S. et al., 2014; Pellerin L. et al., 2014). Vlastní buňky změněné virovou infekcí, oxidačním stresem nebo nádorovým zvratem jsou eliminovány cytotoxickými T-lymfocyty, anebo ILC a NKT buňkami pokud netvoří žádné specifické bílkoviny nebo nemají na povrchu HLA molekuly (rozpoznávají nádorové buňky přes KAR, KIR receptory, FcR), ale také mohou indukovat aktivaci M1 makrofágů (Drake Ch. G. et al., 2006; Benson M., Caligiuri M. A., 2014). V poslední době byly vymezeny nové funkční subsety T_H lymfocytů a další pravděpodobně budou následovat. Subset T_H22 je aktivovaný při vystavení organismu planárním aromatickým sloučeninám, subset T_H9 při infekci parazity, především helminty (Krejsek J. et al., 2016; Kaplan M. H. et al., 2015).

Pro regulaci zánětlivé odpovědi a minimalizaci zánětu poškozujícího jsou zásadní regulační T-lymfocyty, které se vyvíjí v místě zánětu současně s prozánětlivými efektorovými subsety. Tato populace také není homogenní, je popsána řada podskupin. Produkují protizánětlivé cytokiny (IL-10, IL-35, TGFβ), mohou modulovat efektorové mechanismy a spustit apoptózu imunocytů (Jílek P., 2008; Krejsek J. et al., 2016).

Polarizace makrofágů

Podobná plasticita jako u T_H buněk byla nalezena u cytotoxických lymfocytů, makrofágů, dendritických buněk a dalších imunocytů. Zjednodušeně lze říci, že existují dva hlavní typy aktivovaných makrofágů (Mosser D. M., Edwards P. E., 2008; Gordon S., Taylor P. R., 2005; Mills C. D., 2012). Pod vlivem INFγ a ligandů TLR vznikají makrofágy typu M1. M1 efektivně fagocytují a degradují zbytky odumřelých buněk a pohlcené mikroorganismy, jsou účinnými producenty reaktivních sloučenin kyslíku, chloru a NO, mají vysokou expresi HLA II. třídy a antigen prezentující kapacitu, produkují prozánětlivé cytokiny. Podporují tak další rozvoj zánětlivého procesu, aktivují T_H1 lymfocyty a NK buňky; zprostředkovávají obranu především proti intracelulárním patogenům a nádorům. Buňky typu M2 vznikají z klidových makrofágů alternativní cestou pod vlivem cytokinů IL-4 a IL-13, k indukci M2 přispívají glukokortikoidy, IL-10 a prostaglandiny. Hlavní funkcí M2 je tlumení zánětu, podpora hojení, regenerace a remodelace tkáně. M2 produkují hlavně protizánětlivé cytokiny, fagocytují imunokomplexy, aktivují fibroblasty, napomáhají angiogenezi, chybí jim účinná schopnost prezentace antigenu. Makrofágy M2 polarizují imunitní odpověď k T_H2; účastní se obrany proti parazitům, alergie,

infiltrují nádory (TAM) – svými imunosupresivními vlastnostmi mohou přispívat k podpoře jejich růstu (Hořejší V., 2015; Italiani P., Boraschi D., 2014).

M1 a M2 se zásadně liší také metabolicky: zpracováním argininu (v M1 tvorba baktericidního NO, v M2 ornitinu jako prekursoru polyaminů a kolagenu), metabolismem železa a glukózy. Makrofágy M1 při aktivaci prodělají metabolický přesmyk k vysokému obratu glykolýzy, což umožňuje velmi rychlé spuštění energeticky náročného oxidačního vzplanutí, dokonce eliminují množství mitochondrií prostřednictvím mitofagie. Toto metabolické reprogramování buňky se stejně jako u nádorových buněk označuje jako Warburgův efekt. Fenotyp je zprostředkován aktivací HIF-1 α a zahrnuje vzestup transkripce GLUT-1, *HK II* a *PFK-2* a tedy výrazně zvýšený glykolytický flux, přičemž konečným produktem je převážně laktát (Ramond E. et al., 2019). Některé intracelulární patogeny (např. *Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis* nebo *Mycobacterium tuberculosis*) mají schopnost indukovat M1 fenotyp makrofágů k vytvoření podpůrného mikroprostředí (Ramond E. et al., 2019). Naproti tomu oxidativní metabolismus glukózy a mastných kyselin makrofágů M2 poskytuje stabilní dodávku energie pro tkáňovou remodelaci a reparaci. Polarizace makrofágů do „reduktivního“ nebo „oxidativního“ módu s různou produkcí laktátu a rozdílnými koncentracemi glutathionu tak zásadně přispívá k rozdílné funkci, mluví se o konceptu „imuno-metabolismu“ (Biswas S. K., Mantovani A., 2012; Švachová V., 2013; Ramond E. et al., 2019).

3.8.1 Imunitní reakce v CNS

Mozek a mícha jsou za přispění řady faktorů značně segregovány od periferního imunitního systému. K těmto faktorům patří omezená prostupnost bariér pro imunoglobuliny, imunomediátory a imunocyty, nedostatek lymfatických cév a dentritických buněk v parenchymu mozku a nízká exprese HLA molekul (Muldoon L. L. et al., 2013). Na rozdíl od poměrů v periferní cirkulaci jsou imunokompetentní buňky v likvoru fyziologicky přítomny pouze v omezeném počtu k zajištění imunitního dohledu, v převaze se vyskytují buňky specifické imunity – lymfocyty. Přítomnost neutrofilních granulocytů v likvoru a tkáni mozku u purulentní meningoencefalitidy (Malipiero U. et al., 2006), buněk lymfocytární řady u serózních zánětů (Mahadevan S. et al., 2007) nebo eozinofilů u infekce helminty (Ferrari T. C. et al., 2008) však dokazuje, že imunocyty do tohoto prostoru při zánětu pronikají, ačkoliv infiltrace je v porovnání s jinými tkáněmi nižší. Z důvodu rigidního kostěného ohraničení mozku je rozvoj otoku značně nebezpečný; rozsáhlejší rozvoj zánětlivé reakce, především s oxidačním vzplanutím fagocytů, zhoršuje neuronální dysfunkci a přežití pacienta (Berger J. R., Koralnik I. J., 2005; Galea I. et al., 2007).

Recentní studie diskutují cesty vstupu imunocytů do CNS a molekulární podstatu rozvolnění bariér (Wilson E. H. et al., 2010; Williams J. L. et al., 2014), lokální funkce jednotlivých buněčných linií, např. indukci rozdílných fenotypů mikroglie v různém cytokinovém prostředí obdobně diferenciaci monocytů do M1 a M2 typu (Michelucci A. et al., 2009), a kooperaci mezi nimi (Wilson E. H. et al., 2010; Muldoon L. L. et al., 2013). Jsou k dispozici moderní vizualizační techniky jako MRI se superparamagnetickými nanopartikulami potaženými specifickými protilátkami proti jednotlivým subtypům imunocytů (Weinstein J. et al., 2010). Imunocyty pronikají přes HEB a tvoří perivaskulární „manžety“ kolem malých cév. Perivaskulární prostor funguje jako specifické místo koordinace imunitní odpovědi (Wolburg H. et al., 2005), lokální (intratékální) syntéza imunoglobulinů pochází z perivaskulárních infiltrátů lymfocytů B. V CNS operuje pouze omezený počet B-lymfocytů, protilátky mají omezenou (oligoklonální) heterogenitu, na rozdíl od polyklonálních imunoglobulinů v séru (Bednářová J., Adam P., 2002). V intratékální syntéze většinou nedochází k izotypovému přesmyku tvorby protilátek z třídy IgM do třídy IgG v subakutní fázi nemoci.

S nárůstem vakcinace dětí proti třem základním bakteriálním neuropatogenům (*H. influenzae*, *S. pneumoniae* a *N. meningitis*) narůstá poměr serózních meningitid. Nicméně u některých sérotypů zmíněných patogenů je efektivita očkování nižší, také u neočkované části populace zůstává bakteriální purulentní meningitida problémem. V České republice byla v roce 2017 nemocnost bakteriální meningitidou 1,0/100 000 obyvatel, nejvyšší ve věkové skupině do 1 roku: 6,7/100 000 obyvatel (Zdravotnická ročenka, 2018). Pacient s purulentní meningitidou je bezprostředně ohrožen na životě, časná diagnostika a zahájení antibiotické terapie hraje klíčovou roli. Klinické příznaky bakteriální i serózní meningitidy jsou obdobné, kultivace je náročná na čas a množství biologického materiálu a nedostatečně senzitivní, k diferenciální diagnostice je třeba vyšetření dalších urgentních biomarkerů v krvi a likvoru.

3.9 Vyšetření likvoru

3.9.1 Cytologické vyšetření likvoru

Cytologické vyšetření provádíme na úrovni kvantitativní (počet buněk) a kvalitativní (celulární skladba).

Kvantitativní cytologie se stanovuje ve Fuchs-Rosenthalově komůrce při 200 násobném zvětšení. V jedné části komůrky se hodnotí počet erytrocytů v nativním likvoru, v druhé části počet leukocytů v likvoru obarveném kyselým nebo bazickým fuchsinem (zvýrazní jádra leukocytů a rozruší membránu erytrocytů). Objem komůrky nad plochou vymezenou vrypy je 3,2 μ l, z toho důvodu je možné udávat počet buněk v likvoru jako počet elementů/3 μ l.

Diferenciace leukocytů na mononukleáry (buňky s nečlenitým jádrem, tedy lymfocyty a monocyty) a polynukleáry (s členitým jádrem, tj. granulocyty) je málo spolehlivá a upouští se od ní (Mrázová K. et al., 2017).

Pro kvalitativní cytologii je třeba zhotovit trvalý preparát buď cytosedimentační technikou (má menší záchyt buněk, ale je k buňkám šetrnější) nebo technikou cytocentrifugační. Základní barvení podle Pappenheima (May-Grünwald + Giemsa-Romanowski, MGG) umožňuje dobře rozlišit jednotlivé buněčné řady. Pro sledování specifických znaků (např. průkaz lipidů, trojmocného železa a další) lze využít speciální barvení. Preparát se prohlíží celý při 200 nebo 400násobném zvětšení. Hodnotí se jak kritérium morfologické (přítomné buněčné typy, případně mikrobiální patogeny, krystaly), tak funkční (známky aktivace a zastoupení aktivovaných forem).

Fyziologický likvor

Fyziologický likvor je oligocelulární, horní referenční mez je u dospělých 10 leukocytů/3 μ l likvoru (3–4/ μ l), u novorozenců vzhledem k nezralosti bariér 60–90 leukocytů/3 μ l (ke snížení počtu na úroveň dospělých dochází cca během tří měsíců věku). Vyskytují se pouze mononukleární buňky: z 65–80 % lymfocyty, méně četné monocyty (přibližně v poměru 7 : 3), je přítomno do 10 % aktivovaných forem. Je možný nález ojedinělých buněk výstelky likvorových cest. Kvalitativní cytologie klasifikuje nálezy podle definovaných pravidel: jako pleocytóza se nazývá zvýšení počtu leukocytů, oligocytóza nález normálního počtu buněk, ale patologické skladby. Přívlastek je určen početně převažující buněčnou linií (s výjimkou tumorózní oligocytózy/pleocytózy při jakékoliv přítomnosti maligních elementů) nebo známek aktivace: granulocytární, lymfocytární, monocytární nebo tumorózní (Adam P. et al., 2003; Adam P. et al., 2001; Kluge H., 2007; Slavik V., Dolezal T., 2012).

Lymfocyty

Buňky lymfocytární řady tvoří velmi heterogenní skupinu zahrnující buňky specifické i nespecifické imunity (B-lymfocyty, T_H lymfocyty, T_C lymfocyty, NK a NKT buňky). Dle morfologických znaků lze v likvoru rozlišit klidový lymfocyt, aktivovaný lymfocyt (lymfoidní buňku), lymfoplazmocyt a plazmocyt (Adam P. et al., 2003; Kluge H., 2007). Dominující výskyt buněk lymfocytární řady v likvoru je nejčastějším patologickým nálezem. Tvoří obraz tzv. serózního zánětu infekční (infekce viry, obligátními nebo fakultativními intracelulárními bakteriemi, kvasinkami, plísněmi), i neinfekční etiologie (autoimunitní onemocnění, regenerační a reparační procesy, paraneoplastické záněty, reaktivní změny při maligní meningeální infiltraci nebo po krvácení do CNS). Zvýšený podíl buněk

lymfocytární řady, tj. buněk specifické imunity, nastupuje až po časné nespecifické fázi zánětlivé odpovědi. V případě zánětu způsobeného potenciálně intracelulárními bakteriemi, kvasinkami, plísněmi nebo při maligní meningeální infiltraci (MMI) lze předpokládat, že (často značná) přítomnost lymfocytárních elementů v likvoru zahrnuje především subset T_{H1} lymfocytů stimulující aktivitu M1 makrofágů (Kelbich P. et al., 2009; Kelbich P. et al., 2007; Kelbich P. et al., 2012; Krejsek J. et al., 2016).

Monocyty

Monocyty tvoří dominující buněčný podíl v likvoru výjimečně. Ve většině případů serózních zánětů jsou adherovány ve tkáních (epicentru patologického procesu), zatímco v likvoru nacházíme v převaze lymfocyty T_{H1} (Kelbich P. et al., 2009). Monocyty/makrofágy se však významně účastní jak počáteční fáze zánětlivé reakce (rozpoznání PAMP/DAMP, fagocytózy a prezentace antigenu, aktivace dalších imunocytů), tak průběhu zánětu a konečné „úklidové reakce“ (likvidace vlastních odumřelých buněk, nádorových buněk, imunokomplexů a mikrobů), i když se pravděpodobně jedná o různé subpopulace monocytů. Podle fagocytovaného materiálu se rozlišují typy makrofágů (erytrofágy, siderofágy, lipofágy, lymfofágy), jejichž nález specifikuje charakter a dynamiku patologického děje (čerstvé vs. starší krvácení do likvorových cest, destrukce tkáně CNS, pozánětlivá úklidová reakce apod.). Počet monocytů v likvoru se obvykle zvyšuje s dobou probíhajícího zánětu, zřejmě v důsledku postupného vyplavování z postižené tkáně, monocytární pleocytóza je typická spíše pro déle se vyvíjející zánětlivou odpověď. Monocytární oligocytóza nebo pleocytóza je také často obrazem neinfekčních procesů (kompresivní syndrom, cévní mozková příhoda, nádorové, autoimunitní nebo degenerativní onemocnění CNS, trauma mozku), od diskrétních reaktivních změn až po závažné nálezy (Kelbich P. et al., 2014; Adam P. et al., 2003; Kluge H., 2007).

Neutrofilní granulocyty

Dominující výskyt neutrofilů v likvoru lze pozorovat u tzv. purulentního zánětu při infekci extracelulárními bakteriemi (Adam P. et al., 2003; Jílek P., 2008; Kluge H., 2007; Kelbich P. et al., 2007; Krejsek J. et al., 2016). Granulocytární oligocytózu/pleocytózu lze dočasně zachytit také v časném stadiu serózních zánětů CNS, okamžitá mobilizace nespecifické imunity překlenuje dobu potřebnou k aktivaci a diferenciaci specifické zánětlivé odpovědi – celulární složení záhy přechází v převahu lymfocytů. Zvýšenou přítomnost neutrofilních granulocytů v likvoru lze někdy pozorovat ještě před rozvojem samotného zánětlivého procesu při systémovém postižení organismu především neurotrofními patogeny (typicky *Neisseria*

meningitidis). Tato příprava likvorového kompartmentu na případnou invazi patogenu se označuje jako „preventivní neuroprotektce“ (Kelbich P. et al., 2012).

Převažující výskyt neutrofilních granulocytů, odpovídající pseudopurulentnímu zánětu v CNS může být pozorován také u některých pacientů po subarachnoidálním krvácení (SAK) jako obraz intenzivní zánětlivé reakce po reperfúzi tkáně původně ischemizované následkem vasospasmů. Za hlavní chemotaktický faktor a induktor oxidačního vzplanutí neutrofilů je v tomto případě považována především C5a složka komplementu (Kelbich P. et al., 2009).

Eosinofilní granulocyty

Eosinofily se vyskytují v likvoru podstatně méně často, jejich výskyt může svědčit pro chronicitu procesu, regeneraci a reparaci poškozené tkáně (Kelbich P., 2015). Významnější, či dokonce dominující zastoupení eosinofilních granulocytů v cytologické skladbě likvoru by mělo vést k úvahám o alergické, autoimunitní či parazitární příčině postižení CNS (Adam P. et al., 2003; Kelbich P. et al., 2009).

Nádorové buňky

Nález nádorových elementů v likvoru je zjištěním zásadním, vyšetření likvoru si uchovává svůj diagnostický význam i přes rychlý rozvoj zobrazovacích metod. Zejména v případě izolované MMI je kvalitativní cytologické vyšetření likvoru často jedinou metodou, potvrzující nádorovou etiologii onemocnění. Provedení kvalitativní cytologie je nutné především při nálezu pleocytózy a/nebo hyperproteinorachie a hypoglykorachie v základním panelu vyšetření likvoru (Šťourač P. et al., 2009; Pavlidis N., 2004). Doprovodná celulární reakce může být velmi rozmanitá, od minimální (celkový počet leukocytů v likvoru může být normální), po reaktivní zánět především monocytárního charakteru se známkami razantního oxidačního vzplanutí (Kelbich P. et al., 2012). Klasická cytologie může být doplněna metodami imunocytologie, imunotypizace a molekulární genetiky, umožňujícími provést bližší klasifikaci nálezu. Pátrání po nádorových buňkách je důležité zejména u pacientů s hematologickým onemocněním a solidními tumory predominantně metastazujícími do mozku (karcinom plic, prsu, ledvin a melanom) (Kluge H., 2007; Adam P. et al., 2003; Šťourač P. et al., 2009).

Erytrocyty

Erytrocyty se za normálního stavu v likvoru nenacházejí. Arteficiální příměs krve je však poměrně častou komplikací odběru likvoru. Existují postupy pro korekci počtu leukocytů a koncentrace celkové bílkoviny na počet erytrocytů (Adam P. et al., 2001), výrazná příměs krve však analýzu likvoru znesnadňuje až znemožňuje. S přítomností erytrocytů v likvoru se dále setkáváme u SAK. Cytologickým průkazem krvácení do likvorových cest je nález

erytrofágů, siderofágů a krystalů hematoidinu volných nebo fagocytovaných (Adam P. et al., 2003; Kluge H., 2007). Uvolňování erytrocytů z postiženého parenchymu CNS do likvoru kulminuje 2. den po atace krvácení (Kelbich P., 2015).

3.9.2 Biochemické vyšetření likvoru

Základní (urgentní) biochemické vyšetření likvoru zahrnuje vyšetření energetických parametrů (minimálně glukózy a laktátu), celkové bílkoviny, event. nativní spektrofotometrie likvoru při podezření na SAK; je doplněno stanovením C-reaktivního proteinu (CRP) v krvi. Dále je doporučeno vyšetřit albumin a imunoglobuliny v likvoru a v krvi k určení propustnosti HLB či poruchy cirkulace likvoru a intratékální syntézy imunoglobulinů.

3.9.2.1 Celková bílkovina a proteinogram

Proteinorachie, tj. koncentrace celkové bílkoviny (CB) v likvoru je citlivý, ale nespecifický parametr; pro základní rychlou orientaci však zcela nezbytný. Podává informaci o míře permeability HLB a cirkulaci likvoru, zánětlivé reakci, příp. destrukci tkáně CNS. Za tímto globálním parametrem pak stojí detailní likvorový proteinogram, resp. analýza koncentrace jednotlivých proteinů v rámci specializovaného vyšetření likvoru (Sobek O. et al., 2009; Kala M., Mareš J., 2008; Adam P. et al., 2001).

Koncentrace CB v lumbálním likvoru je za fyziologických okolností cca 200x nižší než v krevní plazmě. Významně závisí mj. na věku, způsobu odběru likvoru a poloze při odběru (Deisenhammer F. et al., 2011). Při zánětu v CNS dochází k rozvolnění bariér a přestupu humorálních složek imunitní reakce do tkáně CNS a likvoru. Zároveň při déletrvajícím zánětu dochází k intratékální syntéze imunoglobulinů a dalších proteinů. Výraznější vzestup CB nastává u purulentního zánětu oproti seróznímu, hodnocení dle cut-off (v literatuře různé, cca 0,6–2,2 g/l (Viallon A. et al., 2016; Deisenhammer F. et al., 2011; Adam P. et al., 2001; Pandey P., Jha B., 2015)) významnou měrou přispívá k diferenciální diagnostice těchto dvou stavů. K hyperproteinorachii dále může přispívat přítomnost strukturálních bílkovin při destrukci tkáně CNS, porucha cirkulace likvoru při obstrukci v likvorových cestách, anebo příměs krve.

Složky celkové bílkoviny v likvoru

Za fyziologických podmínek je hlavní složkou CB v likvoru albumin, referenční rozmezí je rovněž vhodné adjustovat na věk (viz tab. č. 3). Albumin není syntetizován intratékálně, je produkován pouze v játrech. Kvocient albuminu ($Q_{alb} = \text{albumin}_{CSF} / \text{albumin}_{krev}$) je tedy přesnějším ukazatelem propustnosti HLB (Deisenhammer F. et al., 2011).

Vzestup koncentrace imunoglobulinů v likvoru může být způsoben přechodem sérových imunoglobulinů přes HLB a/nebo intratékální syntézou. Pro kvantitativní odhad rozsahu intratékální syntézy protilátky dané třídy je možné využít řadu výpočtů (Reiber H., 2001). Kvalitativní průkaz intratékální syntézy imunoglobulinů umožňuje isoelektrická fokuzace.

Zánětlivé markery tvoří heterogenní skupinu zahrnující především bílkoviny akutní fáze (CRP, transferin, alfa-1-mikroglobulin, orosomukoid, prealbumin, C4 složka komplementu). CRP v likvoru může přispívat k diferenciaci diagnostice mezi purulentním a serózním zánětem, k výraznějšímu vzestupu dochází u Gram-negativních bakteriálních meningitid (Rajs G. et al., 2002; Shokrollahi M. R. et al., 2018; Adam P. et al., 2003).

K tumorovým markerům patří beta-2-mikroglobulin, orosomukoid a C3 složka komplementu (Adam P. et al., 2003). Beta-2-mikroglobulin je nízkomolekulární protein, který tvoří lehký řetězec HLA komplexu s převažující expresí na lymfocytech a makrofázích. S těžkým řetězcem je vázán pouze nekovalentně, během metabolismu a degradace buněk se snadno uvolňuje do biologických tekutin. Koncentrace beta-2-mikroglobulinu odráží buněčný obrat, je markerem aktivace imunitního systému, stejně tak tumorovým markerem, především u hematologických malignit. To jsme potvrdili také v naší práci při vyšetření skupiny 6 274 pacientů s definovaným neurologickým onemocněním. Nalezli jsme statisticky významný vzestup koncentrace beta-2-mikroglobulinu v likvoru u skupiny s purulentní meningitidou/encefalitidou a maligní meningeální infiltrací + mozkovými tumory, tedy u skupin s výraznou aktivací imunitního systému nebo s tkáňovou destrukcí. Zatímco např. u skupin s roztroušenou sklerózou nebo s polyneuritis a polyneuropatií byly hodnoty nízké (Svatoňová J. et al., 2014).

Mezi markery tkáňové destrukce patří apolipoproteiny (apo AI a apo B) a strukturální proteiny (S100, GFAP, MBP, NSE). Specifické postavení má protein 14-3-3 při diagnostice Creutzfeldt-Jacobovy choroby a tzv. likvorový triplet (tau-protein, fosforylovaný tau-protein a beta-amyloid) v diagnostice Alzheimerovy demence (Bartoš A. et al., 2012; Matěj R. et al., 2008; Hajduková L. et al., 2015).

3.9.2.2 Energetické parametry

Základní energetické parametry v likvoru jsou glukóza a laktát (Bořecká K. et al., 2013; Adam P. et al., 2001; Leen W. G. et al., 2012).

Glukóza a Q_{glu}

Glukóza přestupuje z krve do tkáně CNS a do likvoru pasivním i aktivním transportem přes HEB a HLB. Glykorachie je tedy značně závislá na glykémii, vhodnější než stanovení izolované glykorachie je kvocient glukózy ($Q_{glu} = \text{glukóza}_{CSF}/\text{glukóza}_{krev}$) (Mrázová K. et al., 2017). Glykorachie dosahuje u dospělých v ustáleném stavu cca 60 % sérové hodnoty ($Q_{glu} = 0,6$), hodnoty se liší dle věku (Leen W. G. et al., 2012).

Do transportu glukózy zasahují další faktory, např. saturovatelnost a up/down-regulace přenašečů pro glukózu, vliv pH a další. Při hyperglykémii stoupá i glykorachie, při hypoglykémii glykorachie klesá, nikoliv však se zachováním stejné proporce (tj. Q_{glu}). Při hyperglykémii glykorachie stoupá méně než by odpovídalo vzestupu v krvi (Q_{glu} se snižuje), při hypoglykémii je to naopak: glykorachie klesá méně než by odpovídalo poklesu v krvi (Q_{glu} se zvyšuje). Hodnoty Q_{glu} nad 1,0 jsou popisovány jak u dětí do 1 roku věku v souvislosti s vyšším průtokem krve menším mozkem využívajícím méně glukózy a tendencí k hypoglykémii, tak u dospělých s hypoglykemií krátce před odběrem likvoru (Hegen H. et al., 2014; Nigrovic L. E. et al., 2012). Leen et al. našla u novorozenců 95 % hodnot Q_{glu} v rozsahu 0,42–1,38 (Leen W. G. et al., 2012).

Využití glykorachie pro diferenciální diagnostiku patologie v CNS je tedy limitováno hypoglykemickými a hyperglykemickými stavy a správným načasováním odběru, toto omezení zcela neodstraní ani použití Q_{glu} . U suspekce na GLUT1DS se lumbální punkce provádí po 4–6 h lačnění v analgosedaci právě k prevenci stresové hyperglykémie, tj. falešně negativního výsledku (Aulická Š. et al., 2018).

Hypoglykorachie bez hypoglykémie při alteraci dalších biochemických a cytologických parametrů v likvoru je diagnostickým znakem zánětu mozkových plen a přilehlé tkáně mozku. Změny jsou výrazně vyjádřené především u zánětů bakteriálních, mohou se objevit u zánětů také další infekční etiologie (virových, mykotických, tuberkulózního, neurosyfilis, neurotoxoplazmózy, neurobrucelózy). Nejčastěji se za cut-off pro rozlišení bakteriální a virové meningitidy považuje Q_{glu} 0,4 (Hegen H. et al., 2014). Zhruba ve třetině případů je příčina neinfekční (cévní mozková příhoda, neurosarkoidóza, MMI, SLE s postižením mozku). Hypoglykorachie je spojena s horší prognózou pacientů (Chow E., Troy S. B., 2014; Shrikanth V. et al., 2015).

Kauzální patofyziologie hypoglykorachie u těchto onemocnění je v literatuře značně diskutována. Předpokládá multifaktoriální příčina: porušený transport glukózy přes zánětem alterované meniny, spotřeba glukózy přítomnými imunocyty (event. erytrocyty nebo

nádorovými buňkami), parenchymem mozku a přítomnými mikroorganismy (Chow E., Troy S. B., 2014; Shrikanth V. et al., 2015). Experimentální podání bakterií do cisternálního likvoru bylo záhy následováno poklesem glykorachie, nicméně tento efekt nebyl pozorován u leukopenických psů; naopak indukce „chemické“ neinfekční meningitidy výrazně nezměnila glykorachii (Petersdorf R. G., Harter D. H., 1961). Z recentních prací je zřejmé, že výrazný pokles glukózy koreluje pouze se současným vzestupem leukocytů a přítomností mikroorganismů v likvoru, samotná pleocytóza u „aseptických“ meningitid (tj. neinfekčních nebo virových) je spojena pouze s mírným nebo žádným poklesem glykorachie (Baud M. O. et al., 2017). Je tedy zřejmé, že k výrazné hypoglykorachii při purulentním zánětuje nutná interakce mikrobiálních patogenů s imunitním systémem hostitele.

Laktát

Koncentrace laktátu v likvoru se mírně liší dle věku (Leen W. G. et al., 2012). V likvoru je za normálních okolností koncentrace laktátu vyšší než v arteriální plazmě (Zima T. et al., 2007), tj. odráží především lokální produkci a konzumpci. Laktát je metabolickým produktem glukózy, koncentrace laktátu je tak ovlivněna množstvím glukózy vstupující do metabolismu ve tkáni přilehlé likvorovému kompartmentu.

Laktát v likvoru stoupá u zánětů CNS, při hypoxii a ischemii mozku, po SAK, při MMI, status epilepticus a vrozených metabolických poruchách (Leen W. G. et al., 2012; Chow S. L. et al., 2005). Význam měření koncentrace laktátu v likvoru pro rozlišení bakteriální a virové (aseptické) meningitidy je již dlouho znám. V literatuře je dostupná řada diskriminačních cut-off (Huy N. T. et al., 2010; Abro A. H. et al., 2009; Mudasir M. et al., 2018), Sakushima v metanalýze dat doporučuje 3,9 mmol/l s diagnostickou senzitivitou 93 % při specificitě 99 % (Sakushima K. et al., 2011). Koncentrace laktátu v likvoru má též prognostický potenciál (Vengerov I. et al., 2008). Metabolismus laktátu v mozku je komplexní, změny koncentrace laktátu v likvoru mohou nastat z různých příčin: změnou koncentrace v plazmě; v nervové tkáni přilehlé likvorovým cestám alterací transportu laktátu do buněk a z buněk, změnami v intenzitě glykolýzy, glykogenolýzy, v aktivitě MAS, CKC a *PDH*, ovlivněním pH a redoxního stavu, případně přítomností mozkových tumorů nebo MMI (Dienel G. A., Cruz N. F., 2003).

Poměry a výpočty zahrnující glukózu a laktát

Glukózu i laktát je možné zahrnout do skórovacích systémů spolu s dalšími laboratorními parametry nebo klinickými symptomy (Dubos F. et al., 2006; Nigrovic L. E. et al., 2007).

Oba samostatné biochemické parametry mají svá omezení (viz výše). Myšlenka spojit koncentraci glukózy a laktátu do jednoho poměru/výpočtu je již velmi stará. Inverzní vztah spotřeby glukózy a produkce laktátu násobí senzitivitu takového poměru, lze použít pouze jeden cut-off, nejsou třeba další ekonomické náklady. Tyto poměry a výpočty mohou být užitečným pomocníkem pro odlišení serózních a purulentních zánětů CNS.

Hanzal již v r. 1955 (Hanzal F., 1955) a následně v roce 1963 v monografii (Hanzal F. et al., 1963) popsal tzv. glukolaktický kvocient Q jako poměr látkové koncentrace glukózy v likvoru ke koncentraci laktátu v likvoru. Jako normu deklaroval hodnoty vyšší než 2, u „metastáz karcinomu do mozku nebo jeho plen“ 1–2, u „akutních hnisavých a tuberkulózních zánětů mozkomíšních plen“ nižší než 1.

Současný Národní číselník laboratorních položek (NČLP) Ministerstva zdravotnictví ČR (seznam všech dostupných laboratorních vyšetření s jednoznačnou identifikací pro účely jednotné elektronické komunikace) obsahuje položku s názvem Laktát/glukóza představující obrácený relativní poměr, tedy poměr látkové koncentrace laktátu v likvoru ke koncentraci glukózy v likvoru. Referenční meze poměru laktát/glukóza nejsou v NČLP stanoveny.

Kelbich odvodil tzv. Koeficient energetické bilance (KEB) (Kelbich P. et al., 1998; Kelbich P. et al., 2007; Kelbich P. et al., 2014; Bořecká K. et al., 2013; Kelbich P., 2015). Autor uvádí, že model zjednodušeně vychází z představy dynamické rovnováhy mezi přísunem glukózy a průběžnou produkcí laktátu v likvorovém kompartmentu. Příspěvek laktátu produkovaného mozgovým parenchymem a z krve tvoří přirozené pozadí, které je zahrnuto do celkové koncentrace laktátu v likvoru. Výpočet KEB vychází ze tří základních axiomů metabolismu glukózy: 1. aerobní glykolýzou vzniká z jedné molekuly glukózy 38 ATP (rozdíl mezi dříve udávanými 38 ATP vs. současně deklarovanými 32 ATP viz kap. 3.3), 2. anaerobní glykolýzou vznikají z jedné molekuly glukózy 2 molekuly ATP, 3. anaerobní glykolýzou vznikají z jedné molekuly glukózy 2 molekuly laktátu. Pro zjednodušení jsou aktuální látkové koncentrace glukózy a laktátu číselně ztotožněny s počty jejich molekul (1 mol/l = 1 molekula). Matematickou úpravou uvedených vztahů vzniká výsledná podoba KEB (v původní práci označeného jako statický KEB_S). Autor uvádí:

$$x = [\text{glukóza}_{\text{CSF}}] [\text{mmol/l}]; y = [\text{laktát}_{\text{CSF}}] [\text{mmol/l}]$$

Množství anaerobně přeměněné glukózy (s 6 atomy uhlíku) odpovídá polovičnímu množství vyprodukovaného laktátu (se 3 atomy uhlíku):

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

Tzn., že z konkrétního podílu z celkového látkového množství glukózy v likvorovém kompartmentu se anaerobně vyprodukuje dvojnásobné látkové množství laktátu, které je identické s vyprodukovaným množstvím ATP:

$$[\text{ATP}_{\text{anaerobní}}] = y$$

Zbývající množství glukózy v likvorovém kompartmentu je přeměněno aerobně, tedy s produkcí 38 ATP na každou její molekulu:

$$x_{\text{aerobní}} = x - x_{\text{anaerobní}} = x - \frac{y}{2}$$

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

Celková produkce ATP odpovídá součtu produkce anaerobní a aerobní:

$$[\text{ATP}] = [\text{ATP}_{\text{anaerobní}}] + [\text{ATP}_{\text{aerobní}}]$$

$$[\text{ATP}] = y + 38 \left(x - \frac{y}{2} \right)$$

Průměrná produkce ATP z 1 molekuly glukózy pak představuje výslednou hodnotu KEB:

$$\text{KEB} = \frac{[\text{ATP}]}{x}$$

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

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

Výsledek dle výkladu autora vyjadřuje průměrný počet molekul ATP vzniklých z jedné molekuly glukózy a rozsah anaerobního metabolismu glukózy za aktuálních energetických podmínek v likvorovém kompartmentu.

Dle výkladu Kelbicha (Kelbich P. et al., 2017) lze rozlišit tři situace:

- 1) Za fyziologických podmínek je přirozený úbytek glukózy průběžně eliminován dodávkou z krve, v likvoru je rozpuštěno poměrně značné množství kyslíku. Glykolýza probíhá především aerobním způsobem, tj. pyruvát je dále metabolizován na CO_2 a H_2O se získáním značného množství energie. Výsledným likvorovým obrazem je poměrně vysoká glykorachie, nízká koncentrace laktátu v likvoru a KEB v rozmezí 28,0–38,0.
- 2) Při patologickém procesu v CNS, jehož podstatou nebo následkem je zánět, s sebou aktivace imunitního systému nese mj. zvýšení energetických nároků. Dochází ke zvýšenému obratu glykolýzy, konzumaci glukózy a kyslíku a vzestupu podílu anaerobního metabolismu glukózy. Produkce energie klesá, což se odráží v poklesu KEB. U serózních infekčních i neinfekčních zánětů je pokles KEB mírný (v rozsahu 10,0–28,0), může být mírná

hypoglykorachie a vzestup koncentrace laktátu v likvoru (koncentrace obou analytů nemusí být alterována vůbec). Cytologickým obrazem je lymfocytární nebo monocytární pleocytóza/oligocytóza (kromě počáteční fáze zánětu).

- 3) Diametrální odlišnost energetických poměrů v likvorovém kompartmentu způsobuje oxidační vzplanutí fagocytů. Tento proces je spojen s vysokou spotřebou kyslíku a intenzivním rozvojem anaerobního metabolismu glukózy. Koncentrace laktátu v likvoru je vysoká, glykorachie nízká a KEB výrazně klesá: pod 10,0 může nabývat i vysoce záporných hodnot. Cytologicky je tento stav doprovázen buď granulocytární pleocytózou při purulentní meningitidě (způsobené extracelulárními bakteriemi nebo po reperfúzi ischemických ložisek vzniklých následkem vasospasmů u části SAK) nebo lymfocytární/monocytární/tumorózní pleocytózou nebo oligocytózou (při infekci potenciálními intracelulárními patogeny, plísněmi nebo kvasinkami nebo MMI).

KEB je v ČR široce používán. Předchozími studiemi je hodnocen jako ideální energetický parametr v likvoru, do značné míry omezující nedostatky samostatného vyšetření koncentrace glukózy a laktátu, umožňující přesnější stratifikaci aktuálního energetického stavu v likvorovém kompartmentu a tkáni přilehlé (Kelbich P. et al., 2009; Kelbich P. et al., 2014; Bořecká K. et al., 2013; Kelbich P., 2015)

Z důvodu výskytu reálných výsledků KEB pod 2,0, což by byla teoreticky nejnižší možná dosažitelná hodnota při dodržení uvedených axiomů (při úplné spotřebě veškeré glukózy pouze anaerobní glykolýzou by byly produkovány na 1 molekulu glukózy nejméně 2 molekuly ATP) Kelbich v původní práci odvodil také tzv. dynamický KEB_D , který dle autora dosahuje „realističtějších“ výsledků (ve smyslu pozitivních hodnot). U 248 neurologických pacientů rozdělených dle klinických nálezů do 10 skupin dosáhl KEB_D hodnot mediánů v rozmezí 18,48–29,48, zatímco KEB_S -5,25–29,23. Autor vysvětluje hodnoty KEB pod 2,0 porušenou dynamickou rovnováhou během probíhajícího patologického procesu, resp. poškozením HLB s porušením transportu glukózy a laktátu. Jako vstupní hodnoty ve výpočtu KEB_D pak používá místo aktuálních koncentrací glukózy a laktátu v likvoru koncentrace glukózy „spotřebované“ a laktátu „vyprodukovaného“, které definuje jako rozdíl aktuálních koncentrací těchto parametrů od hodnot předpokládaných při zachování Q_{glu} 0,60 (Kelbich P. et al., 1998):

Předpokládaná koncentrace glukózy v likvoru při ustanovení dynamické rovnováhy činí 60 % glykémie:

$$[\text{glukóza}_{\text{CSF předp.}}] = 0,60 [\text{glukóza}_S]$$

Rozdíl mezi předpokládanou koncentrací glukózy v CSF při ustavení dynamické rovnováhy a aktuální koncentrací glukózy v likvoru $[glukóza_{CSF}]$ představuje odchylku v množství spotřebované glukózy v CSF $[glukóza_{CSFsp.}]$ při porušení dynamické rovnováhy:

$$[glukóza_{CSFsp.}] = [glukóza_{CSFpředp.}] - [glukóza_{CSF}]$$

$$[glukóza_{CSFsp.}] = 0,60 [glukóza_S] - [glukóza_{CSF}]$$

Vztah mezi aktuálním poměrem koncentrací glukózy v CSF a krevním séru a normálním poměrem koncentrací glukózy v CSF a krevním séru (0,60) pak charakterizuje míru porušení rovnováhy (x) mezi spotřebou glukózy v CSF a rychlostí jejího transportu přes HLB:

$$x = \frac{[glukóza_{CSF}]}{0,60 [glukóza_S]}$$

Dále předpokládáme, že ke stejnému porušení rovnováhy dochází i v případě nadprodukce laktátu, kdy přebytečný laktát není dostatečně rychle odváděn z likvorového kompartmentu do krve, a tak nastává jeho kumulace a zvýšení jeho koncentrace v CSF. Předpokládanou koncentraci laktátu v likvoru získáme po eliminaci právě té složky laktátu, která je v likvorovém kompartmentu nakumulovaná a která způsobuje jeho falešně zvýšenou koncentraci v CSF. Předpokládanou koncentraci laktátu v CSF $[laktát_{CSFpředp.}]$ získáme vynásobením aktuální koncentrace laktátu $[laktát_{CSF}]$ v likvoru vztahem odvozeným pro míru porušení rovnováhy mezi spotřebou glukózy v CSF a rychlostí jejího transportu přes HLB (x):

$$[laktát_{CSFpředp.}] = x [laktát_{CSF}]$$

$$[laktát_{CSFpředp.}] = \frac{[glukóza_{CSF}] [laktát_{CSF}]}{0,60 [glukóza_S]}$$

Nadprodukcí laktátu $[laktát_{CSFpředp.}]$ odvodíme odečtením předpokládané koncentrace laktátu v likvoru $[laktát_{CSFpředp.}]$ od aktuální koncentrace laktátu v likvoru $[laktát_{CSF}]$:

$$[laktát_{CSFnad.}] = [laktát_{CSF}] - [laktát_{CSFpředp.}]$$

$$[laktát_{CSFnad.}] = [laktát_{CSF}] - \frac{[glukóza_{CSF}] [laktát_{CSF}]}{0,60 [glukóza_S]}$$

Konečný vztah pro dynamický koeficient energetické bilance KEB_D obdržíme po dosažení koncentrace spotřebované glukózy v CSF $[glukóza_{CSFsp.}]$ a koncentrace nadprodukce laktátu v CSF $[laktát_{CSFnad.}]$ do vztahu pro výpočet statického koeficientu energetické bilance KEB_S , namísto aktuálních koncentrací glukózy $[glukóza_{CSF}]$ a laktátu $[laktát_{CSF}]$ v CSF:

$$KEB_D = \frac{\left\{ [glukóza_{CSFsp.}] - \frac{[laktát_{CSFnad.}]}{2} \right\} + [laktát_{CSFnad.}]}{glukóza_{CSFsp.}}$$

$$KEB_D = \frac{38 \left\{ 0,60 [glu_S] - [glu_{CSF}] - \frac{[lact_{CSF}]}{2} + \frac{[glu_{CSF}] [lact_{CSF}]}{1,20 [glu_S]} \right\} + [lact_{CSF}] - \frac{[glu_{CSF}] [lact_{CSF}]}{0,60 [glu_S]}}{0,60 [glu_S] - [glu_{CSF}]}$$

Podmínka řešení vztahu:

$$[glukóza_{CSF}] \neq 0,60 [glukóza_S]$$

Podmínka řešení vztahu pro KEB_D není splněna při ustavení dynamické rovnováhy mezi spotřebou glukózy v likvorovém kompartmentu a jejím transportem z krve přes HLB, v takovém případě provedeme výpočet podle vztahu pro KEB_S .

4 Cíle

Onemocnění centrálního nervového systému představují pro lidský organismus vážný, potencionálně život ohrožující stav. Vyšetření likvoru přispívá zásadními informacemi do rozhodovacího diagnosticko-terapeutického algoritmu těchto onemocnění. Urgentní (základní) vyšetření likvoru, které by mělo být dostupné na celém území České republiky 24 hodin denně (Sobek O. et al., 2009), je na samém počátku tohoto procesu.

Nedílnou součástí základního vyšetření likvoru je stanovení parametrů energetického metabolismu glukózy a vyšetření cytologické. Izolovaný zvýšený počet leukocytů nemusí být nutně známkou skutečně přítomného lokálního patologického procesu v CNS, a naopak normální počet buněk nevylučuje patologii v likvorovém kompartmentu. Energetické parametry významným způsobem doplňují cytologický obraz (morfologické hledisko) informací o úrovni aktivace přítomných buněk (funkční hledisko). Cyto-energetický princip interpretace likvorologických výsledků, tj. společné hodnocení cytologických a energetických parametrů umožňuje rychlou diferenciální diagnostiku charakteru postižení CNS/PNS a určuje směr následného vyšetřování a adekvátní péče o pacienta.

Různé patologické podněty vedou k rozvoji různých patofyziologických procesů v organismu, polarizaci imunitní odpovědi, a mj. k rozdílným výsledkům vyšetření likvoru a krve. Zjednodušeně lze říci, že dominující zánětlivá odpověď s důrazem na fagocytózu a oxidační vzplanutí způsobí přepnutí metabolismu na vysoký obrat glykolýzy pro rychlou dodávku energie a výrazný posun biochemických energetických parametrů do patologických hodnot. Takový posun energetických parametrů budí podezření na závažný patologický stav, dále diferencovatelný dle cytologického obrazu.

V této práci se zaměřuji právě na základní vyšetření, kterému jsou rutinně podrobeny téměř všechny vzorky likvoru odebrané pacientům s podezřením na různá onemocnění CNS/PNS. Toto vyšetření je široce a rychle dostupné a ekonomicky nenáročné (v porovnání se zobrazovacími vyšetřeními jsou náklady řádově nižší). V rámci cyto-energetického principu hodnotím vztah výsledků energetických parametrů a cytologického vyšetření likvoru.

1. Primárním cílem práce je verifikace hypotézy, že spolu s výraznou alterací energetických parametrů v likvoru se častěji vyskytují určité cytologické nálezy, resp. že jsou významně rozdílné hodnoty Koeficientu energetické bilance u konkrétních cytologických tříd typicky doprovázejících oxidační vzplanutí fagocytů (tj. zamítnutí nulové hypotézy, že hodnoty KEB jsou v různých cytologických třídách shodné nebo obdobné). Tuto hypotézu verifikuji

ve velkém souboru výsledků základního vyšetření likvoru ($n = 8\ 178$) u pacientů s různými onemocněními CNS.

2. V rámci přípravy teoretických podkladů pro první část této práce bylo nutné detailně prostudovat definici a předpoklady k odvození KEB. Sekundárním cílem druhé části práce je tak rozbor výkladu KEB a rovněž srovnání KEB s dalšími parametry energetického metabolismu glukózy (lakto-glukózového poměru, gluko-laktátového poměru a izolované koncentrace laktátu a glukózy v likvoru) ve vztahu k cytologickému nálezu ve stejně velkém souboru výsledků. Dále podrobně zkoumám a popisuji vztahy koncentrace glukózy a laktátu v krvi a likvoru.

5 Materiál a metody

5.1 Data

Retrospektivně jsem analyzovala celkem 8 178 výsledků vyšetření likvoru a krve, které bylo provedeno v letech 1998–2007 v Laboratoři pro likvorologii a neuroimunologii, Expertním pracovišti SEKK v Praze. Vyšetření bylo požadováno z důvodu klinických symptomů, které v dif. dg. jednotlivých pacientů vedly k podezření na možné neurologické onemocnění (bolest hlavy a horečka, známky meningeálního dráždění, porucha vědomí, ložiskové neurologické nálezy, komplikace po neurochirurgických výkonech nebo traumatech a další). Odběr a vyšetření likvoru bylo provedeno standardním způsobem v rámci rutinní praxe, u všech pacientů byl získán informovaný souhlas s odběrem a vyšetřením biologického materiálu. Do hodnocení byly zahrnuty pouze případy s kompletními výsledky cytologického a biochemického vyšetření likvoru. U části případů byla známa i glykémie ($n = 4\,820$) a laktatémie ($n = 1\,979$). Věk probandů byl v rozsahu 0–89 let, průměrně 45,8 let.

5.2 Metodika provedených vyšetření

5.2.1 Teoreticko-metodická východiska

Preanalytická fáze

Likvor se odebírá nejčastěji lumbální punkcí, jiné přístupy jsou méně časté. Protože rychle dochází k rozpadu buněk a při větším obsahu buněk se pokračující glykolýzou mohou měnit také energetické parametry, vzorek je třeba do laboratoře doručit co nejrychleji po odběru: maximálně do 1,5–2 h; při podezření na SAK do 1 h (Mrázová K. et al., 2017; Teunissen C. E. et al., 2009). Koncentrace glukózy v likvoru se s glykemií vyrovnává pomaleji, je doporučeno odebrat likvor cca 30 min po odběru krve (Mrázová K. et al., 2017), resp. do 60 min (Shrikanth V. et al., 2015). Odběr likvoru je pro pacienta relativně náročný a získané množství je malé (maximálně 3x5 ml u dospělého, u dětí méně), rozsah testování likvoru je tedy omezený a důkladné naplánování algoritmu vyšetření je krucální.

Analytická fáze

Vlastní vyšetření likvoru začíná makroskopickým zhodnocením vzhledu vzorku. Fyziologicky je likvor čirý, bezbarvý. Erytrochromní (narůžovělý až krvavý) likvor vzniká patologickou (při SAK) nebo arteficiální (při traumatické lumbální punkci) příměsí krve. Xantochromní (nažloutlý) likvor může být známkou staršího krvácení do likvorových cest, anebo přestupu

bilirubinu přes HLB při zvýšené koncentraci v krvi nebo zvýšené propustnosti HLB. Likvor obsahující velké množství leukocytů se stává opalescentním až zakaleným.

Následuje cytologické a biochemické vyšetření likvoru; výsledky obou by měly být v souladu a tvořit některý z typických likvorologických vzorů (Adam P. et al., 2001; Deisenhammer F. et al., 2011; Kelbich P. et al., 2009; Racek J. et al., 1999).

5.2.2 Vlastní metodický algoritmus

Při cytologickém vyšetření byl hodnocen celkový počet buněk ve Fuchs-Rosenthalově komůrce (kvantitativní cytologie) – nativně počet erytrocytů, a při barvení fuchsinem počet leukocytů. Dále byl cyto-sedimentační technikou zhotoven trvalý cytologický preparát (kvalitativní cytologie) při barvení MGG, a posouzena cytologická skladba likvoru dle platné klasifikace nálezů – viz kap. 3.9.1. U vzorků s nálezem suspektních atypických buněk bylo provedeno speciální barvení cytologického preparátu (toluidinová modř, Papanicolaou) a „druhé čtení“ ke confirmaci přítomnosti maligních elementů. Při podezření na destrukci tkáně CNS, tj. nálezů buněk charakteru lipofágů, bylo doplněno barvení na lipidy (Oil Red 0).

V rámci biochemického vyšetření byla stanovena koncentrace glukózy a laktátu v likvoru a plazmě spektrofotometricky (Synchron Lx, Beckman Coulter, glukóza enzymatická reakce s hexokinázou, laktát enzymatická reakce s laktát oxidázou), koncentrace celkové bílkoviny v likvoru turbidimetricky (Synchron Lx, Beckman Coulter), dále imunonefelometricky koncentrace beta-2-mikroglobulinu, albuminu a imunoglobulinů IgG, IgA a IgM v likvoru (Array 360, Beckman Coulter; BN II, Siemens). Byl vypočten Q_{glu} , KEB a odhad intratékální syntézy imunoglobulinů ve třídách IgG, IgA a IgM dle Reibera.

Dělení souboru

Soubor byl podle nálezů kvalitativní cytologie rozdělen do 8 skupin: kontrolní skupina ($n = 235$), granulocytární oligocytóza (GO, $n = 64$), granulocytární pleocytóza (GP, $n = 765$), monocytární oligocytóza (MO, $n = 2\,698$), monocytární pleocytóza (MP, $n = 1\,456$), lymfocytární oligocytóza (LO, $n = 1\,199$), lymfocytární pleocytóza (LP, $n = 1\,609$) a tumorózní oligocytóza+pleocytóza (TO+TP, $n = 152$). Tumorózní oligocytóza i pleocytóza byla zařazena do stejné skupiny vzhledem k malému množství výsledků a jednoznačně stejné etiologii patologického procesu.

Do kontrolní skupiny byly zařazeny vzorky s výsledky biochemického i cytologického vyšetření likvoru v referenčním rozmezí (viz tab. č. 3), včetně Q_{alb} , koncentrace beta-2-mikroglobulinu v likvoru a výpočtu intratékální syntézy imunoglobulinů ve třídách IgG,

Parametr	Věk	Rozmezí	Jednotka
Energetický metabolismus			
Glukóza _{CSF}		2,0–4,2	mmol/l
Q _{glu}		0,55–0,65	-
Laktát _{CSF}		0,7–2,1	mmol/l
Cytologie			
Počet erytrocytů		0	/3 μl
Počet leukocytů	> 3 měsíce	0–10	/3 μl
Cytologická skladba	Lymfocyty : monocyty = 7 : 3		
Permeabilita hemato-likvorové bariéry			
Celková bílkovina _{CSF} (CB _{CSF})	0–2 týdny	450,0–1 090,0	mg/l
	2–4 týdny	510,0–1 010,0	
	1–3 měsíce	240,0–650,0	
	3–6 měsíců	230,0–370,0	
	6–12 měsíců	170,0–350,0	
	1–10 let	160,0–310,0	
	11–18 let	160,0–400,0	
	19–40 let	240,0–490,0	
	41–50 let	270,0–600,0	
	51–60 let	290,0–670,0	
	> 61 let	260,0–790,0	
Kvocient albuminu (Q _{alb}) Q _{alb} = [albumin _{CSF}] / [albumin _{krv.}]	0–2 týdny	5,6–23,2	x 10 ⁻³
	2–4 týdny	7,6–16,4	
	1–3 měsíce	2,3–10,6	
	3–6 měsíců	2,0–4,8	
	6–12 měsíců	1,4–4,5	
	1–10 let	1,0–4,5	
	11–18 let	1,0–5,0	
	19–30 let	1,7–5,7	
	31–40 let	1,8–6,2	
	41–50 let	2,0–7,2	
	51–60 let	2,1–8,9	
> 61 let	2,2–9,9		
Zánětlivá aktivita			
Beta-2-mikroglobulin _{CSF}		0,2–2,0	mg/l
Intratékální syntéza IgG (Reiber)		0	%
Intratékální syntéza IgA (Reiber)		0	%
Intratékální syntéza IgM (Reiber)		0	%

Tabulka č. 3: Referenční meze vybraných parametrů (Adam P. et al., 2001; Felgenhauer K., 1998; Seyfert S. et al., 2002; Reiber H., 2001; Kelbich P. et al., 2009; Lamers K. J. B., Wevers R. A., 1995)

IgA a IgM. Ačkoliv tato kritéria vymezení kontrolní skupiny nemusí být považována za přesvědčivá, prakticky není jiná možnost, neboť odběr likvoru zdravým lidem nelze rutinně provádět.

Statistické zpracování

Ke statistickému zhodnocení byl použit SW Excel, verze 2016 (Microsoft, USA), MedCalc, verze 19.1.3 (MedCalc Software, Belgie) a JMP, verze 11.0 (SAS, USA). Protože rozdělení dat nebylo Gaussovo a poměrně často bylo dosaženo výrazně negativních hodnot KEB (zešikmené rozložení pravděpodobnosti), pro optimalizaci rozdělení a přehlednější znázornění v krabicových grafech jsem provedla matematickou transformaci KEB podle vzorce:

$$KEB_{\text{transf}} = \log(40 - KEB)$$

a logaritmickou transformaci ostatních energetických parametrů. Byla provedena deskriptivní statistika, D'Agostino-Pearson test, Kolmogorov-Smirnov test, Kruskal-Wallis test, Steel-Dwass test, lineární diskriminační analýza, krabicové, sloupcové a XY-bodové grafy.

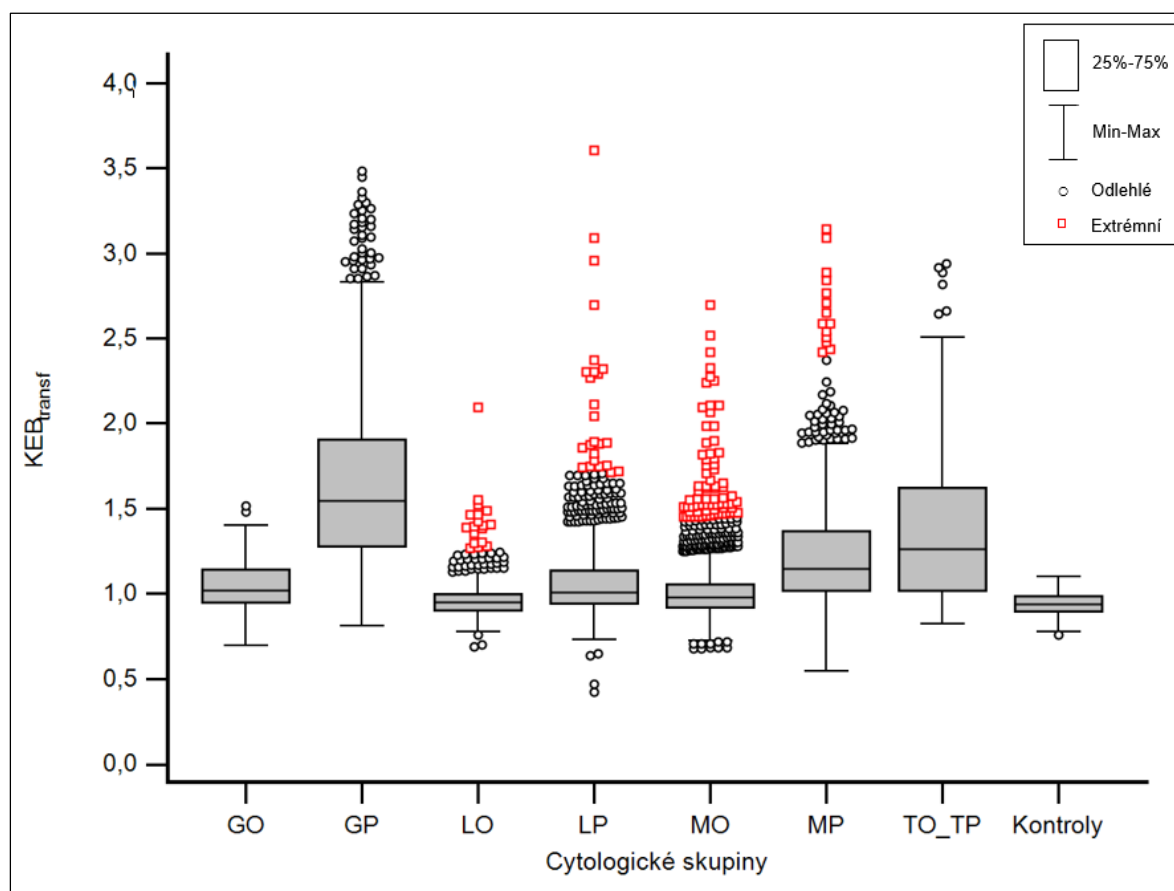
6 Výsledky

6.1 Hodnocení KEB ve vztahu k cytologickým skupinám

Popisná statistika výsledků KEB je sumarizována v tab. č. 4, hodnoty KEB_{transf} u jednotlivých cytologických skupin jsou znázorněny v grafu č. 1.

Cytologie	n	KEB						
		Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil	2,5. percentil	97,5. percentil
Kontroly	235	31,31	27,45	34,30	30,36	32,05	28,53	33,30
GO	64	29,55	7,00	35,03	26,24	31,12	12,51	32,91
GP	765	4,70	-2 996,50	33,55	-40,35	20,82	-1 132,00	31,72
LO	1 199	31,13	-83,95	35,11	30,14	31,97	24,28	33,35
LP	1 609	29,77	-3 980,50	37,36	26,39	31,24	-2,95	33,26
MO	2 698	30,45	-457,69	35,25	28,70	31,68	11,45	33,39
MP	1 456	25,97	-1 360,00	36,50	16,84	29,56	-51,70	32,63
TP+TO	152	21,80	-835,00	33,40	-1,66	29,52	-463,23	32,47

Tabulka č. 4: KEB u jednotlivých cytologických skupin



Graf č. 1: KEB_{transf} u jednotlivých cytologických skupin

GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza

Výsledky KEB v jednotlivých cytologických skupinách jsem dále podrobila analýze shody distribučních funkcí více nezávislých výběrů pomocí Kruskal-Wallisova a následně Steel-Dwassova testu. První test zamítl hypotézu shody KEB ve všech cytologických skupinách ($p < 0,0001$), výsledky mnohonásobného srovnání dvojic shrnuje tab. č. 5.

Srovnávaná dvojice	Hladina významnosti p	Srovnávaná dvojice	Hladina významnosti p
GO - kontroly	< 0,0001	MO - MP	< 0,0001
GO - GP	< 0,0001	MO - LO	< 0,0001
GO - MO	0,0382	MO - LP	< 0,0001
GO - MP	< 0,0001	MO - TO+TP	< 0,0001
GO - LO	< 0,0001	MP - kontroly	< 0,0001
GO - LP	0,9997, ns	MP - LO	< 0,0001
GO - TO+TP	0,0001	MP - LP	< 0,0001
GP - kontroly	< 0,0001	MP - TO+TP	0,1448, ns
GP - MO	< 0,0001	LO - kontroly	0,2327, ns
GP - MP	< 0,0001	LO - LP	< 0,0001
GP - LO	< 0,0001	LO - TO+TP	< 0,0001
GP - LP	< 0,0001	LP - kontroly	< 0,0001
GP - TO+TP	< 0,0001	LP - TO+TP	< 0,0001
MO - kontroly	< 0,0001	TO+TP - kontroly	< 0,0001

Tabulka č. 5: KEB_{transf} – srovnání cytologických skupin

Statisticky nevýznamné hodnoty jsou označeny kurzívou

GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza, ns = nesignifikantní

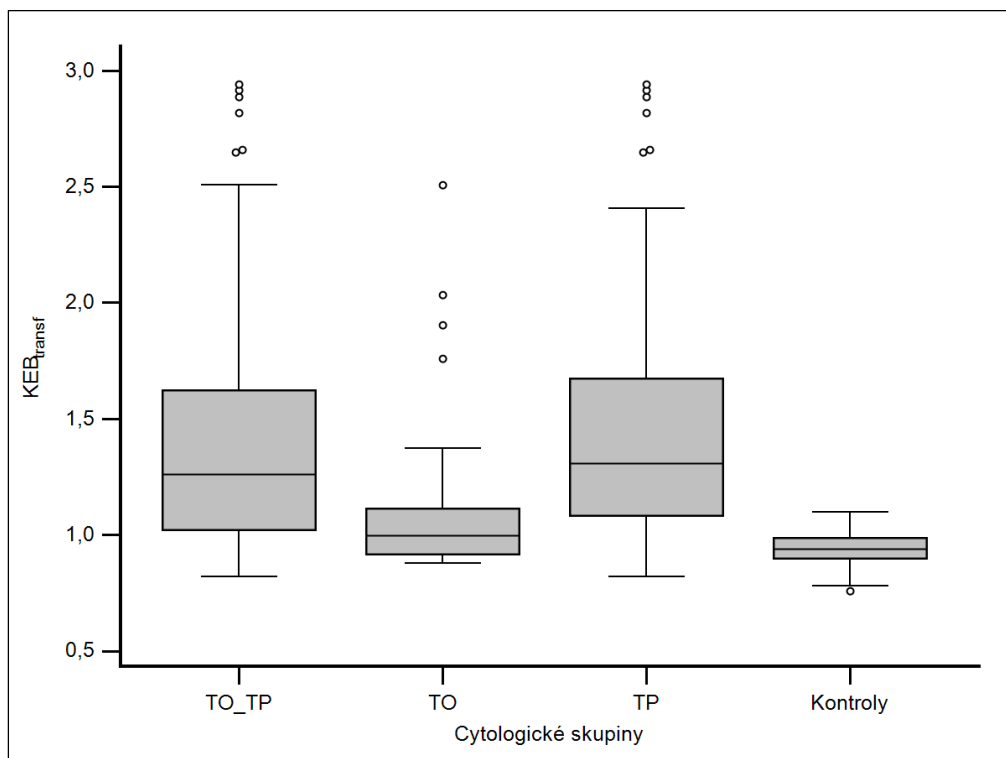
Signifikantně nižší hodnoty KEB (resp. vyšší hodnoty KEB_{transf}) jsem našla u skupin granulocytární pleocytózy a tumorózní oligocytózy+pleocytózy v porovnání s kontrolní skupinou, i všemi ostatními cytologickými skupinami (p ve všech případech $\leq 0,0001$), s výjimkou TO+TP vs. MP (mezi TO+TP a MP nebyl statisticky významný rozdíl).

Společnou skupinu TO+TP jsem i přes nízký počet výsledků následně rozdělila na samostatné skupiny TO a TP. Rozdíl hodnot KEB skupiny TP oproti kontrolní skupině se ještě zvýraznil. U skupiny TO není energetický metabolismus tak dalece alterován jako u skupiny TP, hodnoty KEB se od normy liší méně. Z toho důvodu jsou výsledky analýzy společné skupiny TO+TP „horší“ (ve smyslu méně rozdílné od normy) než u samotné skupiny TP, u většiny následujících testů a grafů jsou proto uvedeny také samostatné skupiny TO a TP. Výsledky KEB samostatných skupin TO a TP jsou shrnuty v tab. č. 6 a znázorněny v grafu č. 2 (pro lepší názornost je uvedena i sloučená skupina TO+TP a kontrolní skupina).

		KEB						
Cytologie	n	Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil	2,5. percentil	97,5. percentil
TO	31	30,13	-282,40	32,50	27,28	31,72	-121,75	32,47
TP	121	19,72	-835,00	33,40	-6,73	27,94	-619,00	32,38
TO+TP	152	21,80	-835,00	33,40	-1,66	29,52	-463,23	32,47
Kontroly	235	31,31	27,45	34,30	30,36	32,05	28,53	33,30

Tabulka č. 6: KEB u tumorózní oligocyty a pleocyty

TO = tumorózní oligocyty, TP = tumorózní pleocyty



Graf č. 2: KEB_{transf} u tumorózní oligocyty a pleocyty (samostatná skupina TO a TP vs. společná skupina TO+TP)

TO = tumorózní oligocyty, TP = tumorózní pleocyty

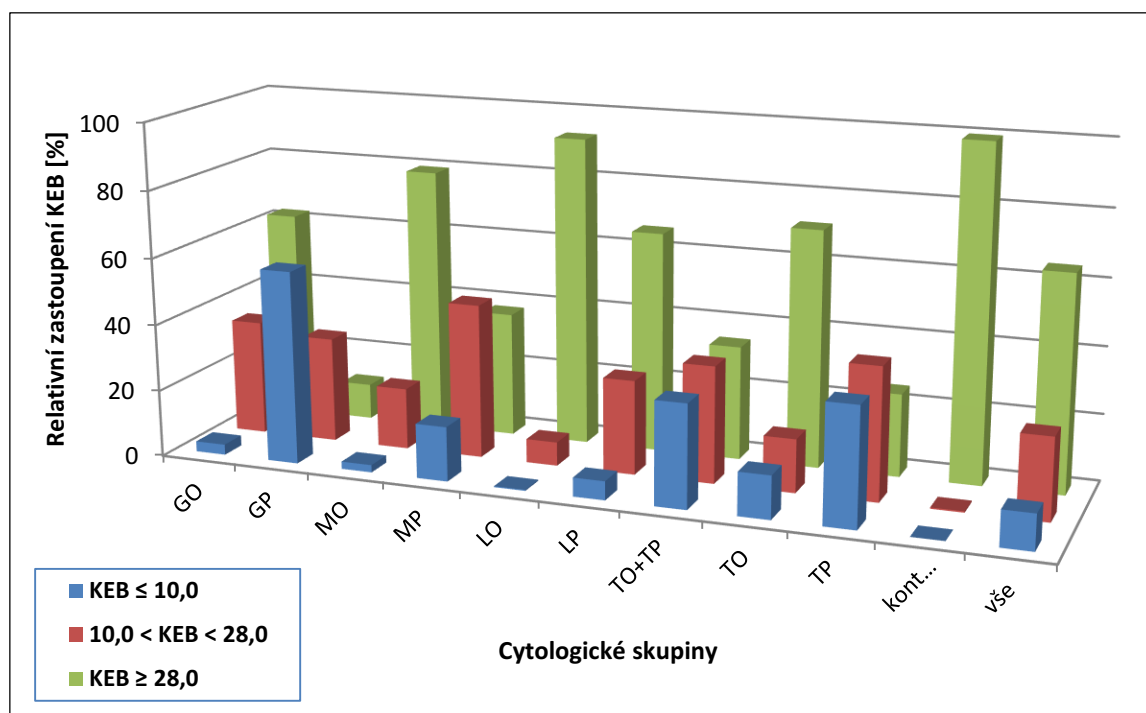
Vysvětlivky ke znázornění krabicového grafu viz vizuální legenda grafu č. 1.

Relativní zastoupení KEB mezi vrstvami klasifikovanými Kelbichem, tj. normální hodnoty (28,0–38,0), „oblast mírného vzestupu anaerobní glykolýzy“ (10,0–28,0) a „oblast excesivního vzestupu anaerobní glykolýzy se susp. přítomností razantního zánětu s oxidačním vzplanutím fagocytů“ (pod 10,0) (Kelbich P. et al., 2007), demonstruje tab. č. 7 a graf č. 3.

Skupina	KEB [%]		
	KEB ≤ 10,0	10,0 < KEB < 28,0	KEB ≥ 28,0
GO	3,1	34,4	62,5
GP	57,8	31,5	10,7
MO	2,2	18,4	79,4
MP	16,3	46,2	37,5
LO	0,3	7,1	92,6
LP	5,7	28,2	66,2
TO+TP	30,9	34,9	34,2
TO	12,9	16,1	71,0
TP	35,5	39,7	24,8
Kontroly	0,0	0,4	99,6
Vše	10,8	24,7	64,5

Tabulka č. 7: Relativní zastoupení KEB mezi cytologickými skupinami (cut-off 10,0 a 28,0)

GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza



Graf č. 3: Relativní zastoupení KEB mezi cytologickými skupinami (cut-off 10,0 a 28,0)

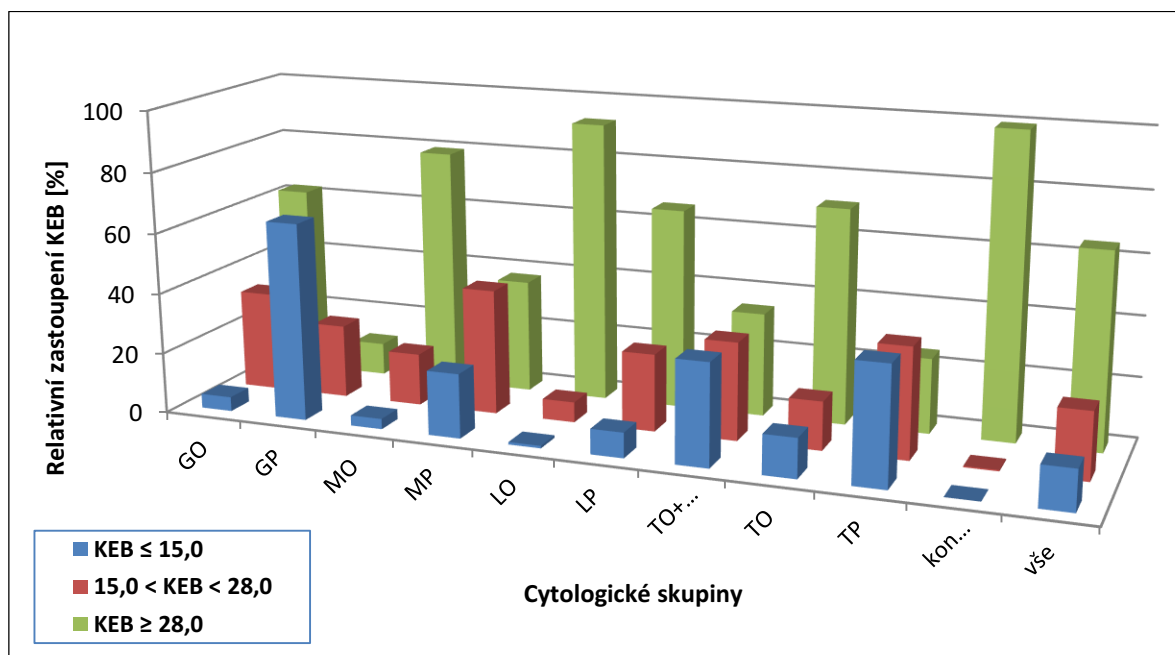
GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza

V novějších publikacích (Kelbich P. et al., 2017; Kelbich P., 2015) je uvedena spíše cut-off hodnota KEB = 15,0 pro vymezení skupiny „mírného vzestupu anaerobní glykolýzy“,

resp. oblasti serózního zánětu, místo původních 10,0. Relativní zastoupení KEB při cut-off 15,0 a 28,0 ukazuje tab. č. 8 a graf č. 4.

Skupina	KEB [%]		
	KEB ≤ 15,0	15,0 < KEB < 28,0	KEB ≥ 28,0
GO	4,7	32,8	62,5
GP	65,1	24,2	10,7
MO	3,4	17,2	79,4
MP	21,2	41,3	37,5
LO	0,8	6,7	92,6
LP	8,3	25,5	66,2
TO+TP	33,6	32,2	34,2
TO	12,9	16,1	71,0
TP	38,8	36,4	24,8
Kontroly	0,0	0,4	99,6
Vše	13,4	22,1	64,5

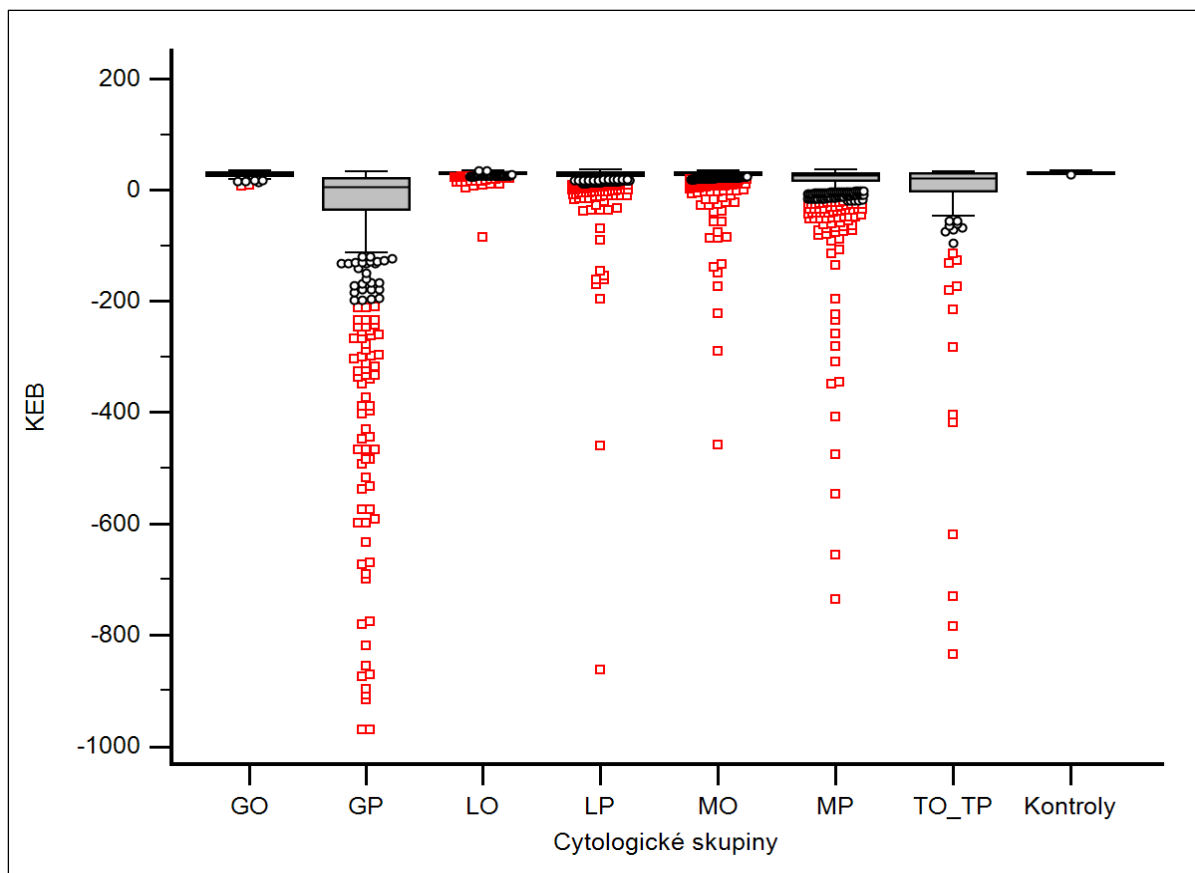
Tabulka č. 8: Relativní zastoupení KEB mezi cytologickými skupinami (cut-off 15,0 a 28,0)
GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza



Graf č. 4: Relativní zastoupení KEB mezi cytologickými skupinami (cut-off 15,0 a 28,0)
GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza

Ve skupině GP je obrovské, resp. největší rozpětí hodnot KEB; jsou zde nalezeny hodnoty extrémně negativní, ale také jen mírně snížené oproti normě nebo v referenčním rozmezí.

Z důvodu vizualizace tohoto rozpětí u skupin GP a TO+TP jsem dále připojila i graf č. 5 s reálnými (netransformovanými) hodnotami KEB, i přes jistou nepřehlednost ve smyslu porovnání rozložení hodnot mezi jednotlivými cytologickými skupinami.



Graf č. 5: KEB u jednotlivých cytologických skupin (reálné hodnoty bez transformace)
GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza
Vysvětlivky ke znázornění krabicového grafu viz vizuální legenda grafu č. 1.
Pro lepší přehlednost bylo cíleně odstraněno 25 extrémních hodnot KEB < -1 000 (převážně z GP).

6.2 Srovnání KEB s dalšími energetickými parametry v likvoru

V další části práce jsem se zaměřila na srovnání KEB s dalšími parametry energetického metabolismu glukózy ve vztahu k cytologickému nálezu v likvoru, tj. lakto-glukózovým poměrem (LGP), gluko-laktátovým poměrem (GLP), a izolovanou koncentrací glukózy a laktátu v likvoru.

Sumární statistika zmíněných energetických parametrů je shrnuta v tab. č. 9–12, rozložení hodnot znázorňují grafy č. 6–9.

		Lakto-glukózový poměr						
Cytologie	n	Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil	2,5. percentil	97,5. percentil
Kontroly	235	0,37	0,21	0,59	0,33	0,42	0,26	0,53
GO	64	0,47	0,16	1,72	0,38	0,65	0,28	1,42
GP	765	1,85	0,25	168,58	0,95	4,35	0,35	65,00
LO	1 199	0,38	0,16	6,78	0,33	0,44	0,26	0,76
LP	1 609	0,46	0,04	223,25	0,38	0,65	0,26	2,27
MO	2 698	0,42	0,15	27,54	0,35	0,52	0,26	1,48
MP	1 456	0,67	0,08	77,67	0,47	1,18	0,30	4,98
TO	31	0,44	0,31	17,80	0,35	0,60	0,31	8,88
TP	121	1,02	0,26	48,50	0,56	2,48	0,31	36,50
TP+TO	152	0,90	0,26	48,50	0,47	2,20	0,31	27,85

Tabulka č. 9: Lakto-glukózový poměr v likvoru u jednotlivých cytologických skupin

		Gluko-laktátový poměr						
Cytologie	n	Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil	2,5. percentil	97,5. percentil
Kontroly	235	2,69	1,71	4,87	2,36	3,02	1,90	3,83
GO	64	2,13	0,58	6,06	1,53	2,62	0,71	3,55
GP	765	0,54	0,01	4,04	0,23	1,05	0,02	2,86
LO	1 199	2,62	0,15	6,23	2,29	2,99	1,31	3,88
LP	1 609	2,19	0,00	28,00	1,55	2,66	0,44	3,80
MO	2 698	2,38	0,04	6,55	1,94	2,85	0,68	3,90
MP	1 456	1,50	0,01	12,00	0,85	2,13	0,20	3,35
TO	31	2,29	0,06	3,27	1,68	2,87	0,14	3,26
TP	121	0,98	0,02	3,91	0,40	1,79	0,03	3,20
TP+TO	152	1,11	0,02	3,91	0,45	2,12	0,04	3,26

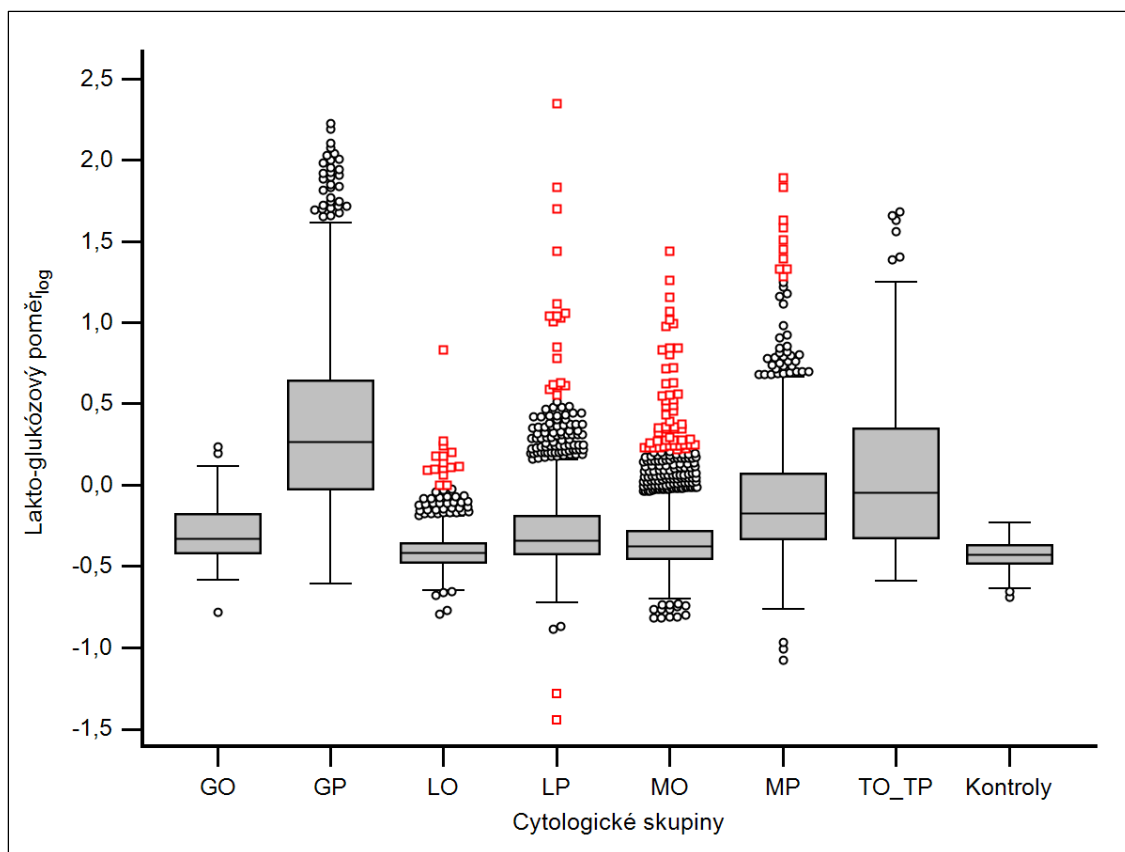
Tabulka č. 10: Gluko-laktátový poměr v likvoru u jednotlivých cytologických skupin

		Laktát [mmol/l]						
Cytologie	n	Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil	2,5. percentil	97,5. percentil
Kontroly	235	1,20	0,72	2,10	1,10	1,40	0,90	1,80
GO	64	1,87	0,47	7,20	1,50	3,02	0,97	5,61
GP	765	4,80	0,90	24,80	3,20	7,30	1,41	16,27
LO	1 199	1,30	0,40	20,80	1,20	1,54	0,90	2,72
LP	1 609	1,60	0,10	10,20	1,30	2,20	0,93	5,01
MO	2 698	1,50	0,30	18,40	1,28	1,97	0,91	4,48
MP	1 456	2,60	0,17	27,20	1,75	3,90	1,09	7,70
TO	31	1,57	1,00	8,90	1,23	3,04	1,08	6,73
TP	121	3,30	1,00	14,60	2,20	5,37	1,10	10,60
TP+TO	152	2,99	1,00	14,60	1,76	5,13	1,10	9,90

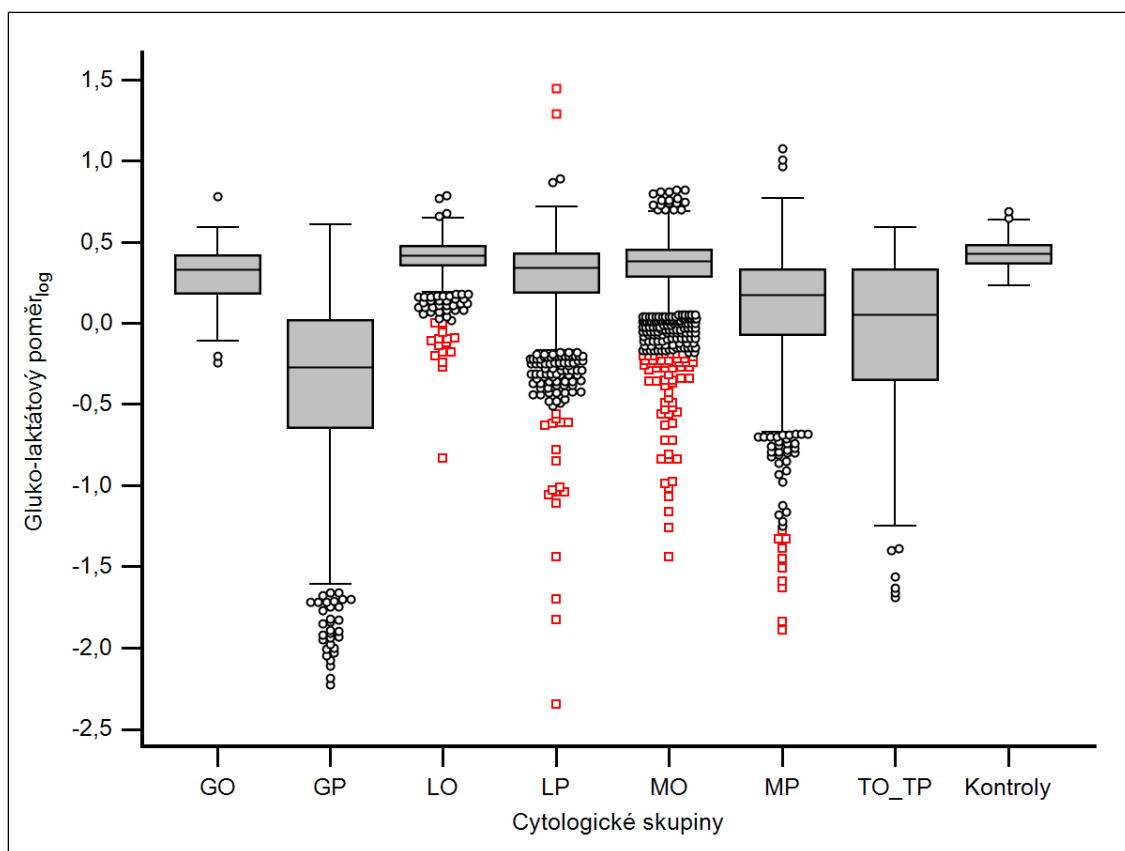
Tabulka č. 11: Laktát v likvoru u jednotlivých cytologických skupin

		Glukóza [mmol/l]						
Cytologie	n	Medián	Minimum	Maximum	1. kvartil	3. kvartil	2,5. percentil	97,5. percentil
Kontroly	235	3,40	2,04	7,30	3,20	3,60	2,66	4,23
GO	64	3,77	2,39	9,00	3,31	4,42	2,84	8,06
GP	765	2,52	0,10	10,83	1,40	3,66	0,20	6,90
LO	1 199	3,40	0,65	9,80	3,20	3,72	2,63	5,70
LP	1 609	3,30	0,04	10,80	2,90	3,70	1,70	5,90
MO	2 698	3,50	0,13	13,91	3,14	4,00	2,19	6,70
MP	1 456	3,50	0,08	15,10	2,90	4,40	0,80	6,96
TO	31	3,50	0,50	8,08	3,28	4,22	0,88	6,15
TP	121	3,00	0,17	7,80	2,00	3,90	0,30	5,90
TO+TP	152	3,30	0,17	8,08	2,20	4,00	0,38	5,95

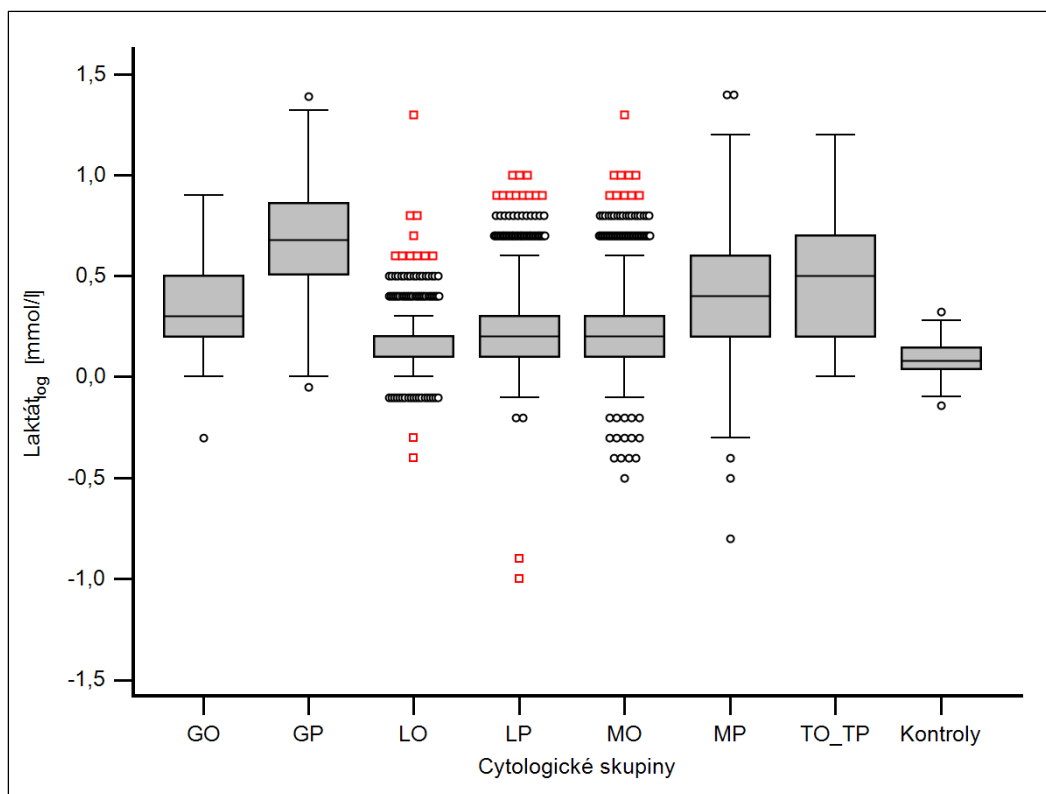
Tabulka č. 12: Glukóza v likvoru u jednotlivých cytologických skupin



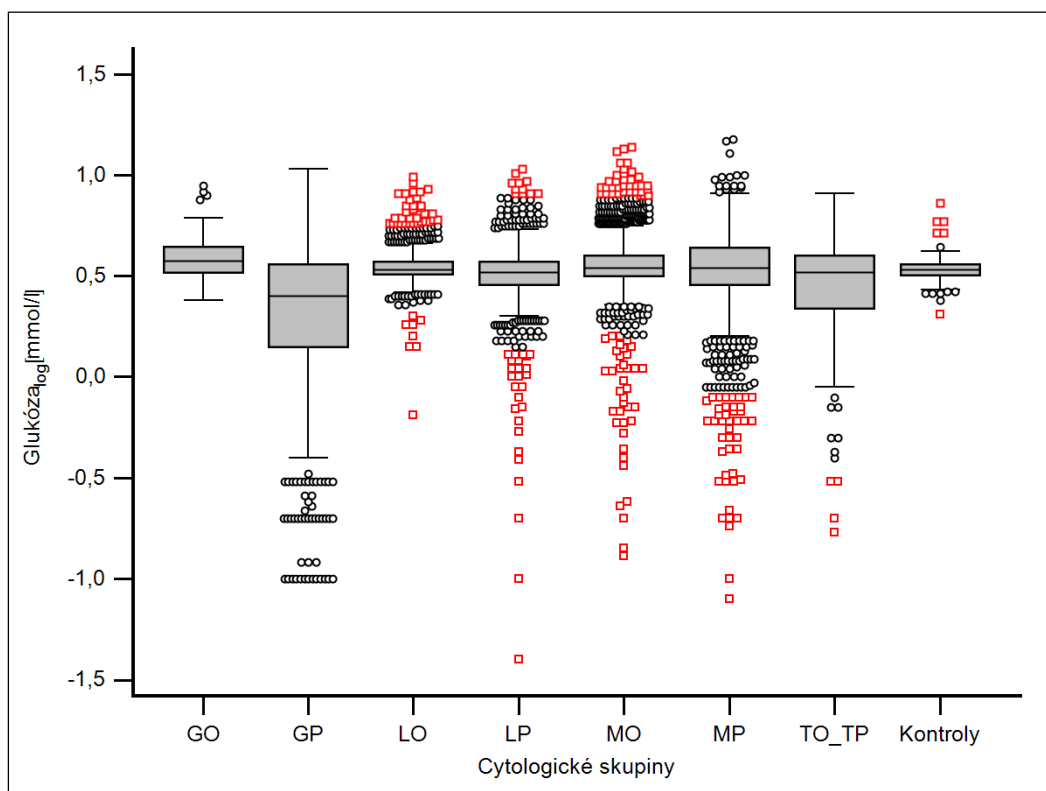
Graf č. 6: Lakto-glukózový poměr_{log} v likvoru u jednotlivých cytologických skupin



Graf č. 7: Gluko-laktátový poměr_{log} v likvoru u jednotlivých cytologických skupin



Graf č. 8: Laktát_{log} v likvoru u jednotlivých cytologických skupin

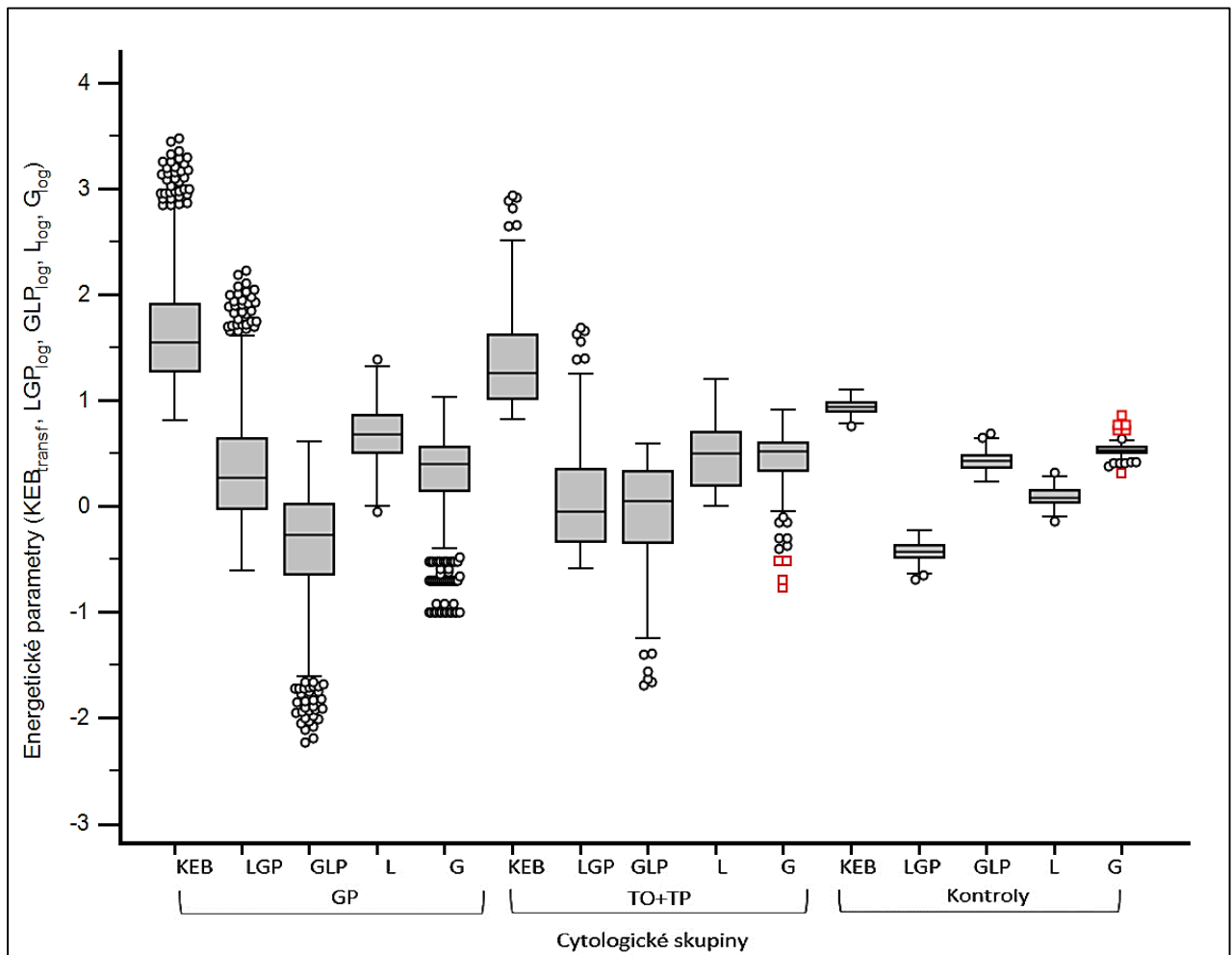


Graf č. 9: Glukóza_{log} v likvoru u jednotlivých cytologických skupin

GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza

Vysvětlivky ke znázornění krabicového grafu viz vizuální legenda grafu č. 1.

Pro názornost jsou všechny hodnocené energetické parametry u nejvíce vychýlených skupin, tj. GP, TO+TP a kontrolní skupiny, dále situovány do jednoho grafu č. 10.

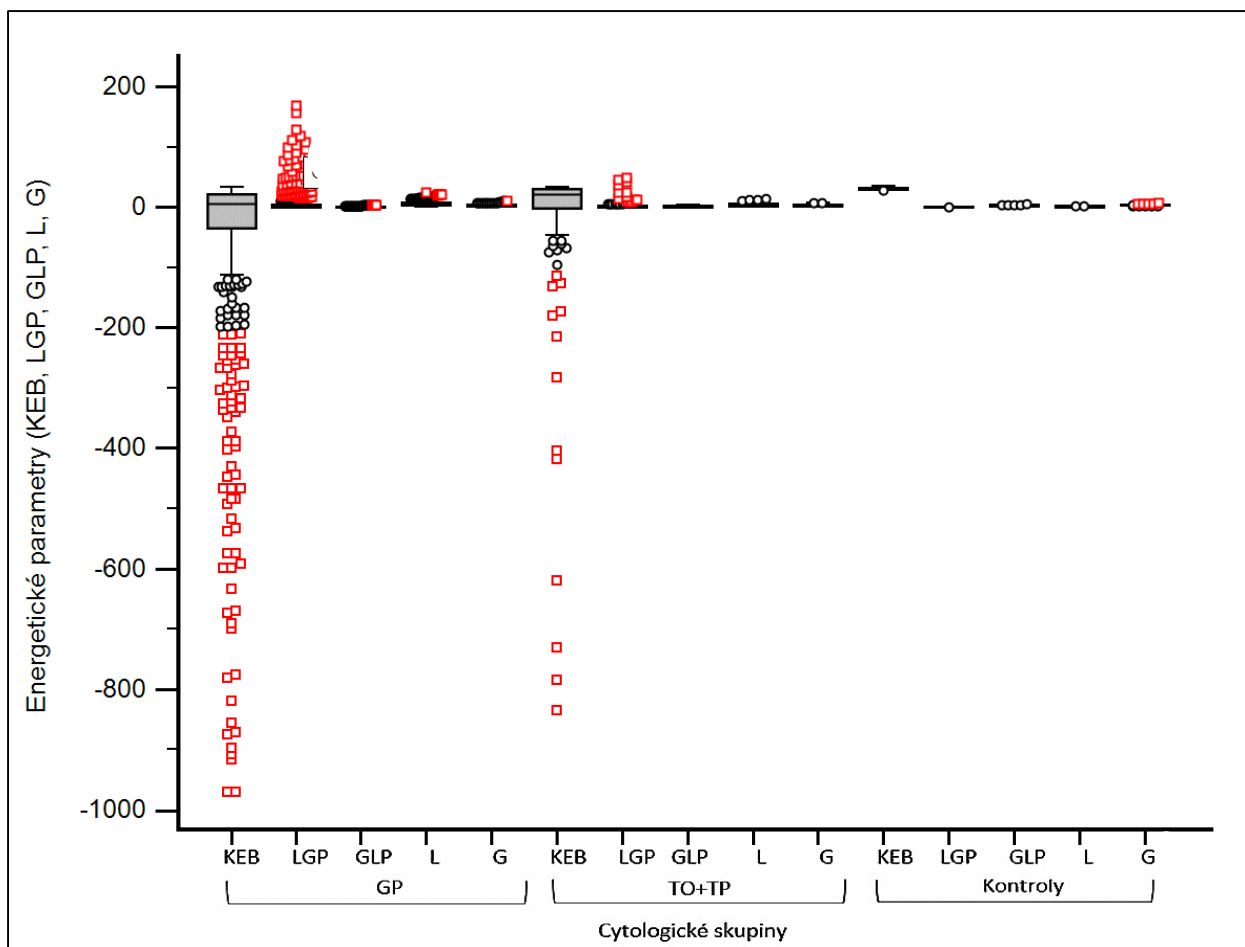


Graf č. 10: Energetické parametry v likvoru u vybraných cytologických skupin

KEB = Koeficient energetické bilance, LGP = lakto-glukózový poměr, GLP = gluko-laktátový poměr, L = laktát, G = glukóza, GP = granulocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza

Vysvětlivky ke znázornění krabicového grafu viz vizuální legenda grafu č. 1.

Skutečné (netransformované) hodnoty KEB, LGP, GLP, koncentrace laktátu a glukózy v likvoru, tj. reálné rozpětí znázorňuje graf č. 11. Je zřejmé, že ačkoliv LGP a GLP odlišují cytologické skupiny GP a TO+TP od kontrolní skupiny i všech ostatních skupin stejně dobře jako KEB, KEB dosahoval zdaleka největšího rozpětí hodnot (od normy až po silně negativní hodnoty).



Graf č. 11: Energetické parametry v likvoru u vybraných cytologických skupin (reálné hodnoty bez transformace)

KEB = Koeficient energetické bilance, LGP = lakto-glukózový poměr, GLP = gluko-laktátový poměr, L = laktát, G = glukóza, GP = granulocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza

Vysvětlivky ke znázornění krabicového grafu viz vizuální legenda grafu č. 1.

Pro lepší přehlednost bylo cíleně odstraněno 25 extrémních hodnot KEB < -1 000 (převážně z GP).

Rozsah možné změny parametru při patologii jsem hodnotila pomocí relativních rozdílů mediánů patologických skupin proti kontrolní skupině, viz tab. č. 13. Největší rozdíly byly u izolované koncentrace laktátu v likvoru.

Cytologická skupina	Relativní rozdíl mediánu proti kontrolní skupině [%]				
	KEB	LGP	GLP	Laktát	Glukóza
GO	-5,6	+26,3	-20,8	+55,8	+10,7
GP	-85,0	+398,1	-79,9	+300,0	-26,0
LO	-0,6	+2,8	-2,7	+8,3	0,0
LP	-4,9	+23,1	-18,8	+33,3	-2,9
MO	-2,8	+12,9	-11,4	+25,0	+2,9
MP	-17,1	+79,9	-55,6	+116,7	+2,9
TO	-3,8	+17,8	-15,1	+30,8	+2,9
TP	-37,0	+173,3	-63,4	+175,0	-11,8
TO+TP	-30,4	+142,3	-58,7	+149,2	-2,9

Tabulka č. 13: Srovnání relativních rozdílů mediánů patologických cytologických skupin proti kontrolní skupině

KEB = Koefficient energetické bilance, LGP = lakto-glukózový poměr, GLP = gluko-laktátový poměr, GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza

Dále jsem hodnotila další energetické parametry analýzou shody distribučních funkcí více nezávislých výběrů pomocí Kruskal-Walisova a následně Steel-Dwassova testu. První test zamítl hypotézu shody všech energetických parametrů ve všech cytologických skupinách ($p < 0,0001$), výsledky mnohonásobného srovnání dvojic jsou uvedeny v přehledu v tab. č. 14. Hodnoty energetických parametrů se mezi jednotlivými srovnávanými dvojicemi liší velmi podobně (p -hodnoty jsou shodné nebo obdobné), zřetelně vybočuje pouze izolovaná glykorachie.

Srovnávaná dvojice	Hladina významnosti p				
	KEB _{transf}	LGP	GLP	Laktát	Glukóza
GO - kontroly	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
GO - GP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
GO - MO	0,0382	0,0399	0,0365	0,0001	0,1123, ns
GO - MP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0217	0,1881, ns
GO - LO	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0008
GO - LP	0,9997, ns	0,9998, ns	0,9996, ns	0,0279	< 0,0001
GO - TO+TP	0,0001	0,0001	0,0001	0,0047	0,0005
GP - kontroly	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
GP - MO	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
GP - MP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
GP - LO	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
GP - LP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
GP - TO+TP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0047
MO - kontroly	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0002
MO - MP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,8261, ns
MO - LO	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0003
MO - LP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
MO - TO+TP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
MP - kontroly	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,1024, ns
MP - LO	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,5362, ns
MP - LP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
MP - TO+TP	0,1448, ns	0,1480, ns	0,1421, ns	0,2783, ns	0,0029
LO - kontroly	0,2327, ns	0,3441, ns	0,2217, ns	< 0,0001	0,3731, ns
LO - LP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
LO - TO+TP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0122
LP - kontroly	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,3779, ns
LP - TO+TP	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,7169, ns
TO+TP - kontroly	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,5483, ns

Tabulka č. 14: Energetické parametry v likvoru - srovnání cytologických skupin

Statisticky nevýznamné hodnoty jsou označeny kurzívou

KEB = Koefficient energetické bilance, LGP = lakto-glukózový poměr, GLP = gluko-laktátový poměr, GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza, ns = nesignifikační

Ve snaze co nejpřesněji zjistit, jak jednotlivé energetické parametry svými konkrétními hodnotami diskriminují mezi cytologickými skupinami (neboli jak se rozdělí hodnoty jednotlivých energetických parametrů dle vnitřně vypočtených cut-off do správných cytologických skupin), jsem analyzovala dvojice skupin lineární diskriminační analýzou. Výsledky uvádí tab. č. 15.

Srovnávaná dvojice	Relativní zastoupení dobře klasifikovaných hodnot[%]					
	KEB _{transf}	LGP	GLP	Laktát	Glukóza	Průměr
GO - kontroly	76,9	83,3	69,2	89,0	79,6	79,6
GO - GP	69,0	33,3	83,5	63,0	70,7	63,9
GO - MO	70,3	79,3	60,3	78,9	71,6	72,1
GO - MP	51,1	34,9	63,8	47,8	62,8	52,1
GO - LO	80,7	86,3	70,2	89,0	78,9	81,0
GO - LP	36,8	22,5	54,0	72,7	75,3	52,2
GO - TO+TP	60,7	48,2	64,4	51,0	62,0	57,2
GP - kontroly	78,9	45,4	91,2	77,0	67,4	72,0
GP - MO	89,8	83,7	86,3	89,2	68,4	83,5
GP - MP	74,4	71,9	68,1	72,9	63,3	70,1
GP - LO	88,4	72,1	91,7	87,3	72,2	82,3
GP - LP	82,6	75,8	79,8	84,7	65,4	77,7
GP - TO+TP	56,2	32,6	72,2	54,0	60,1	55,0
MO - kontroly	52,6	39,6	60,6	48,5	48,0	49,9
MO - MP	74,8	72,6	71,7	74,8	44,1	67,6
MO - LO	54,6	48,8	57,4	50,7	50,0	52,3
MO - LP	61,2	64,3	56,8	58,6	53,9	58,9
MO - TO+TP	89,2	94,8	76,6	86,7	54,4	80,3
MP - kontroly	67,1	46,0	77,5	68,5	51,8	62,2
MP - LO	75,2	64,5	79,0	76,4	56,1	70,2
MP - LP	63,6	59,2	64,3	67,4	58,2	62,5
MP - TO+TP	67,3	84,6	52,0	66,0	52,7	64,5
LO - kontroly	50,3	46,2	54,5	50,8	48,7	50,1
LO - LP	63,1	55,0	63,9	60,6	55,1	59,5
LO - TO+TP	92,2	91,9	85,9	92,4	56,0	83,7
LP - kontroly	54,8	35,5	63,7	53,0	57,4	52,9
LP - TO+TP	80,0	90,9	67,1	82,6	53,5	74,8
TO+TP - kontroly	82,7	72,4	85,0	83,5	61,0	76,9
Vše	21,7	17,4	20,3	18,9	14,7	
Průměr	69,4	62,0	70,4	70,6	60,7	
Počet nejlepších výsledků	3	5	14	6	1	

Tabulka č. 15: Energetické parametry v likvoru – lineární diskriminační analýza

Nejvyšší relativní zastoupení správně zařazených hodnot mezi danou dvojicí skupin je označeno červeně)

KEB = Koefficient energetické bilance, LGP = lakto-glukózový poměr, GLP = gluko-laktátový poměr, GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza

Výsledky ukazují, že ačkoliv se většina srovnávaných dvojic ve všech parametrech statisticky významně liší (viz tab. č. 14), při detailním pohledu diskriminační analýzy všechny posuzované energetické parametry bez výjimky nerozdělují hodnoty do správných cytologických skupin příliš dobře, resp. velká část hodnot se mezi skupinami neliší natolik, aby byly zařazeny správně. Mezi jednotlivými srovnávanými dvojicemi nejlépe rozřazují různé energetické parametry, nejčastěji dosáhl nejlepších výsledků GLP. Nejhůře rozřazovala izolovaná glykorachie.

Správné zařazení hodnot energetických parametrů do cytologických skupin není v dané dvojici skupin stejnoměrné (hodnoty jsou ve skupinách různě homogenní). Separátní relativní zastoupení správně zařazených hodnot energetických parametrů pro jednotlivé členy porovnávané dvojice cytologických skupin ukazuje tab. č. 16.

		Relativní zastoupení dobře klasifikovaných hodnot [%]				
Srovnávaná dvojice	Člen	KEB _{transf}	LGP	GLP	Laktát	Glukóza
GO - kontroly	GO	56,3	48,4	65,6	51,6	50,0
	Kontroly	82,6	92,8	70,2	99,1	87,7
GO - GP	GO	92,2	100,0	76,6	89,1	71,9
	GP	67,1	27,7	84,1	60,8	70,6
GO - MO	GO	46,9	37,5	56,3	43,8	40,6
	MO	70,8	80,3	60,3	79,7	72,3
GO - MP	GO	76,6	84,4	62,5	68,8	43,8
	MP	50,0	32,8	63,9	46,8	63,6
GO - LO	GO	53,1	45,3	53,1	48,4	48,4
	LO	82,2	88,5	82,2	91,2	80,6
GO - LP	GO	62,5	79,7	48,4	43,8	50,0
	LP	35,8	20,2	54,2	73,8	76,3
GO - TO+TP	GO	79,7	100,0	67,2	76,6	54,7
	TO+TP	52,6	26,3	63,2	47,4	65,1
GP - kontroly	GP	72,4	28,6	88,6	69,6	62,1
	Kontroly	100,0	100,0	99,6	100,0	84,7
GP - MO	GP	69,3	28,0	86,1	65,9	66,9
	MO	95,6	99,4	86,3	95,8	68,8
GP - MP	GP	60,3	25,1	77,8	55,9	66,7
	MP	81,8	96,5	63,0	81,9	61,5
GP - LO	GP	71,9	28,4	88,1	68,6	64,2
	LO	98,9	99,9	94,0	99,2	77,3
GP - LP	GP	66,8	26,7	84,4	65,9	62,1
	LP	90,1	99,1	77,6	93,7	67,0

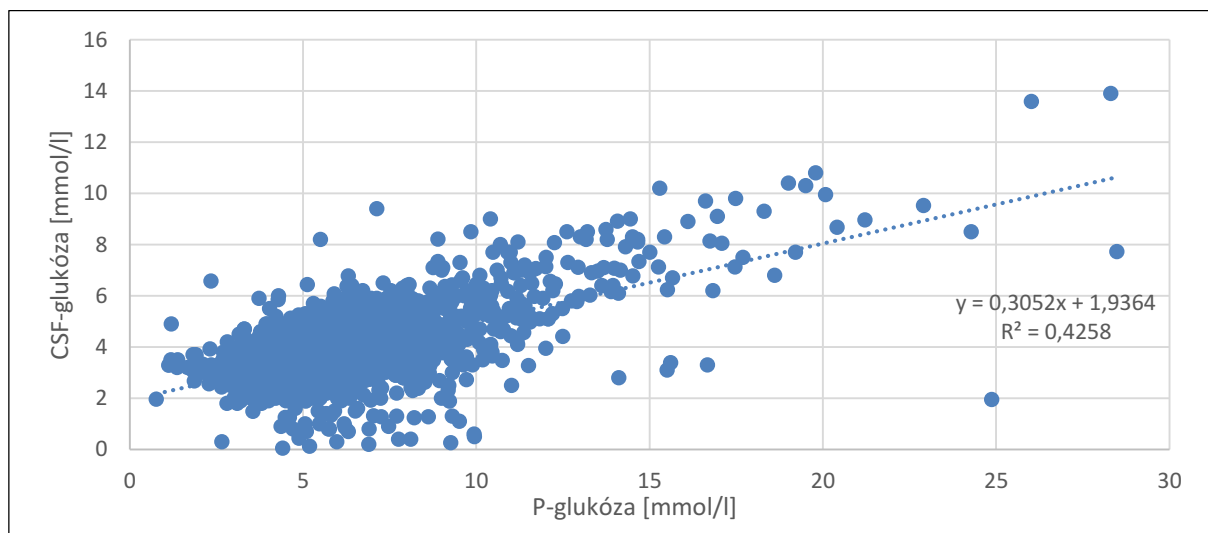
<i>(Pokračování tab. č. 16)</i>		Relativní zastoupení dobře klasifikovaných hodnot [%]				
Srovnávaná dvojice	Člen	KEB _{transf}	LGP	GLP	Laktát	Glukóza
GP - TO+TP	GP	53,3	21,7	76,2	49,9	59,9
	TO+TP	70,4	87,5	52,0	74,3	61,2
MO - kontroly	MO	51,0	35,5	60,5	45,1	46,1
	Kontroly	70,2	86,0	62,1	87,7	70,2
MO - MP	MO	85,5	94,0	73,2	85,5	36,9
	MP	55,1	33,0	68,9	54,9	57,4
MO - LO	MO	47,1	32,7	55,9	37,5	41,5
	LO	71,4	85,2	60,9	80,2	69,2
MO - LP	MO	73,2	89,7	59,1	71,9	46,1
	LP	41,1	21,6	53,0	36,2	67,0
MO - TO+TP	MO	91,2	98,7	77,1	88,6	54,2
	TO+TP	53,3	26,3	67,1	52,6	57,9
MP - kontroly	MP	61,9	37,2	76,0	63,4	48,9
	Kontroly	99,6	100,0	86,8	100,0	69,8
MP - LO	MP	60,2	36,6	73,7	60,8	45,9
	LO	93,4	98,4	85,4	95,4	68,5
MP - LP	MP	49,2	26,8	64,6	52,0	48,9
	LP	76,6	88,5	64,1	81,3	66,6
MP - TO+TP	MP	69,6	90,9	51,5	68,4	52,2
	TO+TP	44,7	23,7	56,6	43,4	57,9
LO - kontroly	LO	76,2	66,7	85,9	75,0	73,1
	Kontroly	58,7	65,1	52,8	65,5	59,1
LO - LP	LO	84,1	96,1	69,1	86,4	46,6
	LP	47,5	24,4	59,9	41,3	61,4
LO - TO+TP	LO	97,0	99,8	88,2	97,1	56,3
	TO+TP	54,6	28,9	68,4	55,3	53,9
LP - kontroly	LP	50,4	26,1	62,9	47,2	59,7
	Kontroly	85,1	100,0	69,4	93,2	41,3
LP - TO+TP	LP	82,5	97,0	67,4	85,5	53,9
	TO+TP	52,6	25,7	63,2	51,3	49,3
TO+TP - kontroly	TO+TP	55,9	29,6	72,4	57,9	49,3
	Kontroly	100,0	100,0	93,2	100,0	68,5

Tabulka č. 16: Energetické parametry v likvoru – lineární diskriminační analýza
(jednotlivé členy porovnávané dvojice cytologických skupin separátně)

KEB = Koeficient energetické bilance, LGP = lakto-glukózový poměr, GLP = gluko-laktátový poměr,
GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza,
LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza,
TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza

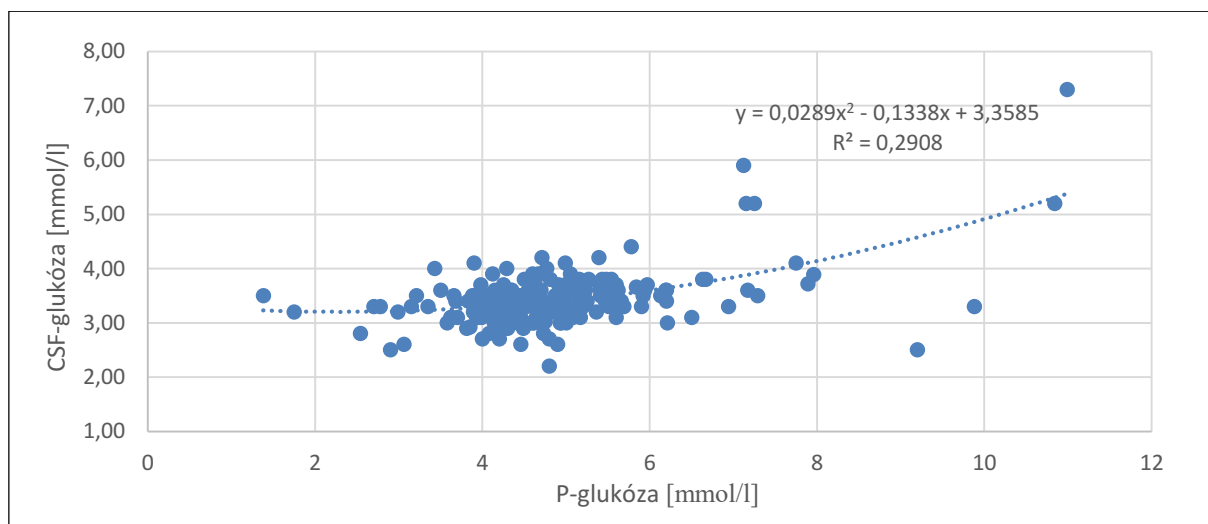
Dále jsem věnovala pozornost vztahům koncentrace glukózy a laktátu v krvi a likvoru ve studovaném souboru, resp. té části, u které je glykémie a laktatémie známa, viz kap. 5.1. Glykémie byla v rozsahu: 0,8–28,5 mmol/l, laktatémie v rozsahu 0,4–10,2 mmol/l.

Závislost glykorachie na glykémii v celém souboru se známou glykemií (n = 4 820) je znázorněna v grafu č. 12 a v souboru kontrol (příčemž do vymezení této kontrolní skupiny není zahrnuta glykorachie ani koncentrace laktátu v likvoru, a jsou odstraněny výsledky s výraznější příměsí krve v likvoru, tj. nad 100 erytrocytů/3 µl; n = 231) v grafu č. 13.



Graf č. 12: Závislost glykorachie na glykémii – celý soubor dat (n = 4 820)

P-glukóza = glykémie v plazmě, CSF-glukóza = glykorachie

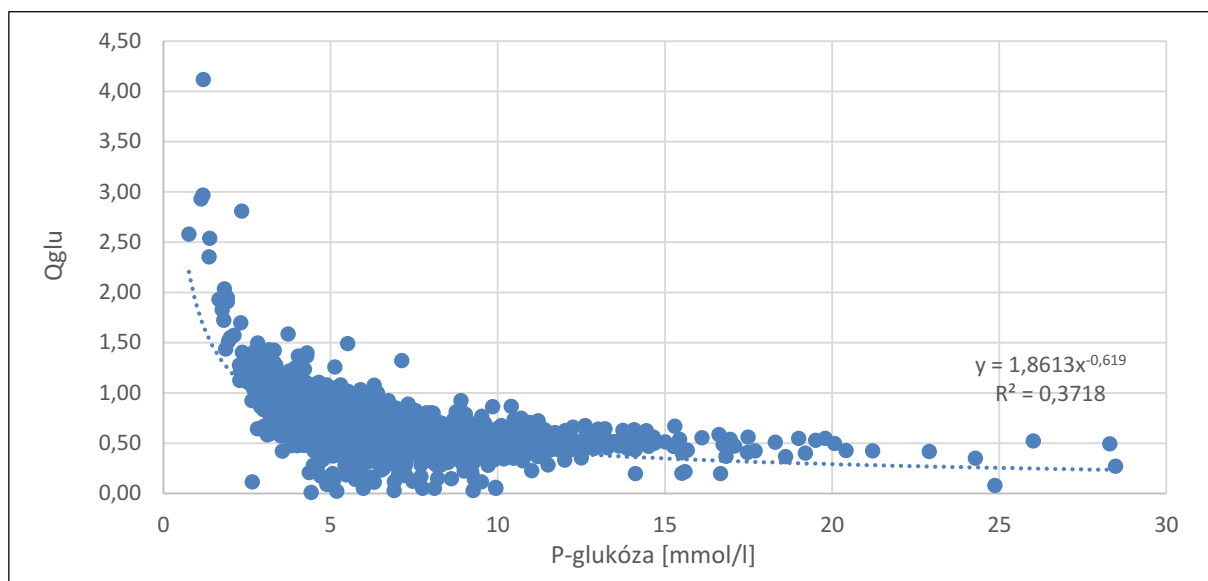


Graf č. 13: Závislost glykorachie na glykémii – kontrolní skupina (n = 231)

P-glukóza = glykémie v plazmě, CSF-glukóza = glykorachie

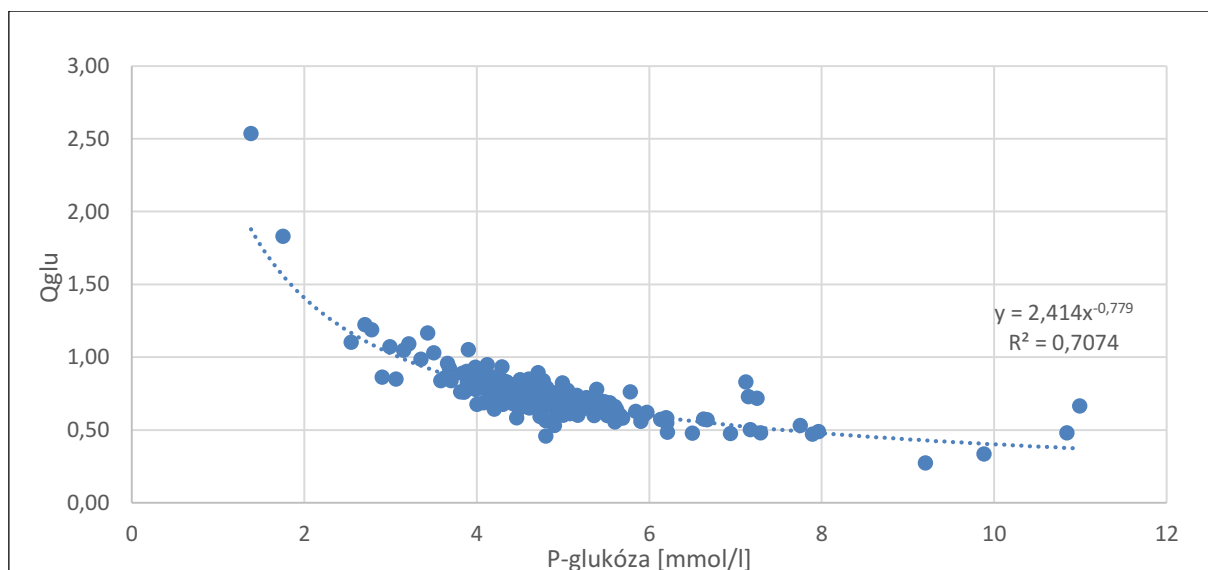
Závislost glykorachie na glykémii je zřetelná, avšak s relativně větším rozptylem hodnot kolem spojnice trendu, především v celém souboru dat.

Závislost Q_{glu} na glykémii se již graficky jeví jako ještě významnější a těsněji přiléhající spojnicí trendu než závislost glykorachie na glykémii, jak v celém souboru dat ($n = 4\ 820$), tak v kontrolním souboru ($n = 231$) – viz grafy č. 14 a 15.



Graf č. 14: Závislost Q_{glu} na glykémii – celý soubor dat ($n = 4\ 820$)

P-glukóza = glykémie v plazmě



Graf č. 15: Závislost Q_{glu} na glykémii – kontrolní skupina ($n = 231$)

P-glukóza = glykémie v plazmě

Vzhledem k významné závislosti na glykémii je evidentní omezená efektivita glykorachie i Q_{glu} pro hodnocení přítomnosti patologie v CNS. Toto omezení se však přenáší také na KEB, neboť glykorachie je součástí výpočtu KEB. Hyperglykémie by tak mohla vzestupem glykorachie maskovat pokles KEB. Dle rovnic spojnic trendu grafů č. 13 a 15 lze vypočíst k dané glykémii příslušnou glykorachii a Q_{glu} a modelovat vliv glykémie na posun KEB. Hodnoty odvozené

glykorachie, Q_{glu} a KEB při modelových koncentracích laktátu v likvoru u kontrolní skupiny jsou uvedeny v tab. č. 17.

Glykémie [mmol/l]	Glykorachie odvozená [mmol/l]	Glykorachie odvozená s posunem [mmol/l]	Laktát _{CSF} [mmol/l]	Q_{glu} vypočtené	Q_{glu} odvozené	KEB	KEB s posunem
3,0	3,2	3,2	1,5	1,07	1,02	29,6	29,6
5,0	3,4	3,4	1,5	0,68	0,69	30,1	30,1
8,0	4,1	4,1	1,5	0,52	0,48	31,5	31,5
10,0	4,9	4,9	1,5	0,49	0,40	32,5	32,5
15,0	7,9	7,9	1,5	0,52	0,29	34,6	34,6
3,0	3,2	3,1	2,2	1,07	1,02	25,7	25,3
5,0	3,4	3,3	2,2	0,68	0,69	26,4	26,0
8,0	4,1	4,0	2,2	0,52	0,48	28,4	28,2
10,0	4,9	4,8	2,2	0,49	0,40	29,9	29,8
15,0	7,9	7,8	2,2	0,52	0,29	33,0	32,9
3,0	3,2	2,2	3,5	1,07	1,02	18,4	9,6
5,0	3,4	2,4	3,5	0,68	0,69	19,5	11,9
8,0	4,1	3,1	3,5	0,52	0,48	22,8	17,9
10,0	4,9	3,9	3,5	0,49	0,40	25,2	21,9
15,0	7,9	6,9	3,5	0,52	0,29	30,0	28,8
3,0	3,2	1,2	4,5	1,07	1,02	12,8	-28,4
5,0	3,4	1,4	4,5	0,68	0,69	14,2	-19,4
8,0	4,1	2,1	4,5	0,52	0,48	18,4	0,1
10,0	4,9	2,9	4,5	0,49	0,40	21,5	10,2
15,0	7,9	5,9	4,5	0,52	0,29	27,7	24,2
20,0	12,2	10,2	4,5	0,61	0,23	31,4	30,1

Tabulka č. 17: Odvozená glykorachie, Q_{glu} a KEB při modelových koncentracích laktátu v likvoru – kontrolní skupina

Barevná pásma dle koncentrace laktátu v likvoru; červeným písmem označena normalizace KEB vlivem hyperglykémie

Glykorachie odvozená = glykorachie vypočtená z rovnice závislosti glykorachie na glykémii v kontrolní skupině (graf č. 13)

Glykorachie odvozená s posunem = glykorachie odvozená z rovnice závislosti glykorachie na glykémii v kontrolní skupině (graf č. 13), současně odečtena modelová hodnota vlivem patologie

Q_{glu} vypočtené = Q_{glu} vypočtené jako poměr glykorachie odvozené a glykémie

Q_{glu} odvozené = Q_{glu} odvozené z rovnice závislosti Q_{glu} na glykémii v kontrolní skupině (graf č. 15)

KEB = KEB vypočtený z koncentrace laktátu v likvoru a glykorachie odvozené

KEB s posunem = KEB vypočtený z koncentrace laktátu v likvoru a glykorachie odvozené s posunem

Je patrné, že ovlivnění hodnot KEB hyperglykémii je závislé jak na hodnotě glykémie, tak na rozsahu patologického procesu. Při normální modelové koncentraci laktátu v likvoru

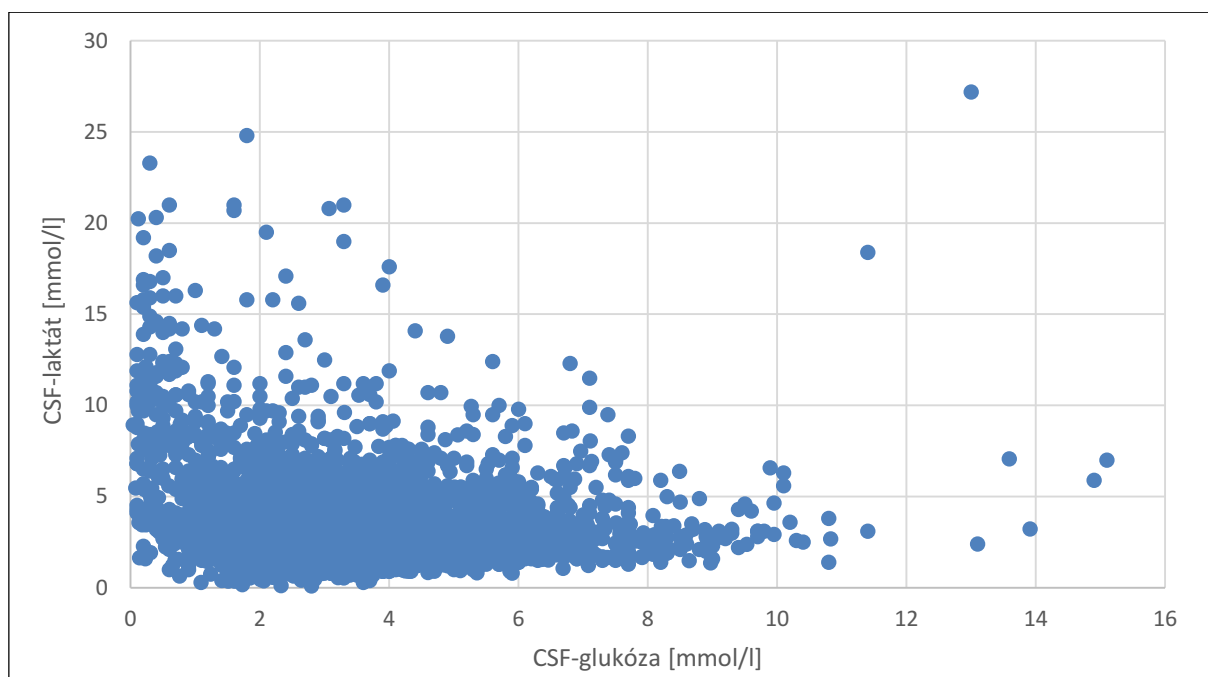
(1,5 mmol/l) a předpokládaném nulovém poklesu glykémie vlivem patologie v CNS (modré pásmo) nemá změna glykémie směrem dolů ani nahoru vliv na vychýlení hodnoty KEB mimo referenční rozmezí (dle Kelbicha, tj. 28,0–38,0). Zatímco již při hraniční koncentraci laktátu v likvoru (2,2 mmol/l) a předpokládaném minimálním poklesu glykémie vlivem patologie v CNS (o 0,1 mmol/l, zelené pásmo) ovlivní glykémie 8,0 mmol/l a více hodnotu KEB (včetně KEB s posunem) ve smyslu normalizace hodnot. Při patologické koncentraci laktátu v likvoru (3,5 mmol/l) a při modelovém snížení glykorachie o 1,0 mmol/l vlivem patologie (žluté pásmo) již „normalizuje“ KEB až hyperglykémie 15,0 mmol/l a více; při koncentraci laktátu 4,5 mmol/l a poklesu glykémie vlivem patologie o 2,0 mmol/l (červené pásmo) hyperglykémie 20,0 mmol/l a více. Tzn., že u významného posunu koncentrace laktátu a glukózy v likvoru vlivem razantního patologického procesu nemusí dojít až k normalizaci KEB vlivem hyperglykémie, ale posun KEB směrem k referenčnímu rozmezí je i v tomto případě zřetelný. KEB s posunem (viz vysvětlivky tab. č. 17) dosahuje hodnot odpovídajících razantnímu zánětu s oxidačním vzplanutím (pod 10,0) i v případě patologického laktátu (červené pásmo) pouze u glykémie menší než cca 10,0 mmol/l.

Vzhledem k prokázanému vlivu hyperglykémie na energetické parametry v likvoru, včetně KEB, jsem dále analyzovala relativní zastoupení hyperglykémie u jednotlivých patologických cytologických skupin. Druhá mezní hodnota 8,5 mmol/l byla zvolena cíleně: glykémie nad 8,5 mmol/l zvyšuje glykorachii v kontrolním souboru nad normu (4,2 mmol/l) bez vlivu patologie v CNS (viz též tab. č. 17). Výsledky shrnuje tab. č. 18, je patrné vyšší zastoupení hyperglykémie právě u skupin GP a TO+TP.

Cytologická skupina	Relativní zastoupení hyperglykémie $\geq 5,6$ mmol/l [%]	Relativní zastoupení hyperglykémie $\geq 8,5$ mmol/l [%]
GO	41,9	6,5
GP	67,0	23,4
MO	29,8	5,9
MP	35,1	7,8
LO	22,8	3,4
LP	30,2	4,4
TO	42,9	14,3
TP	47,5	10,0

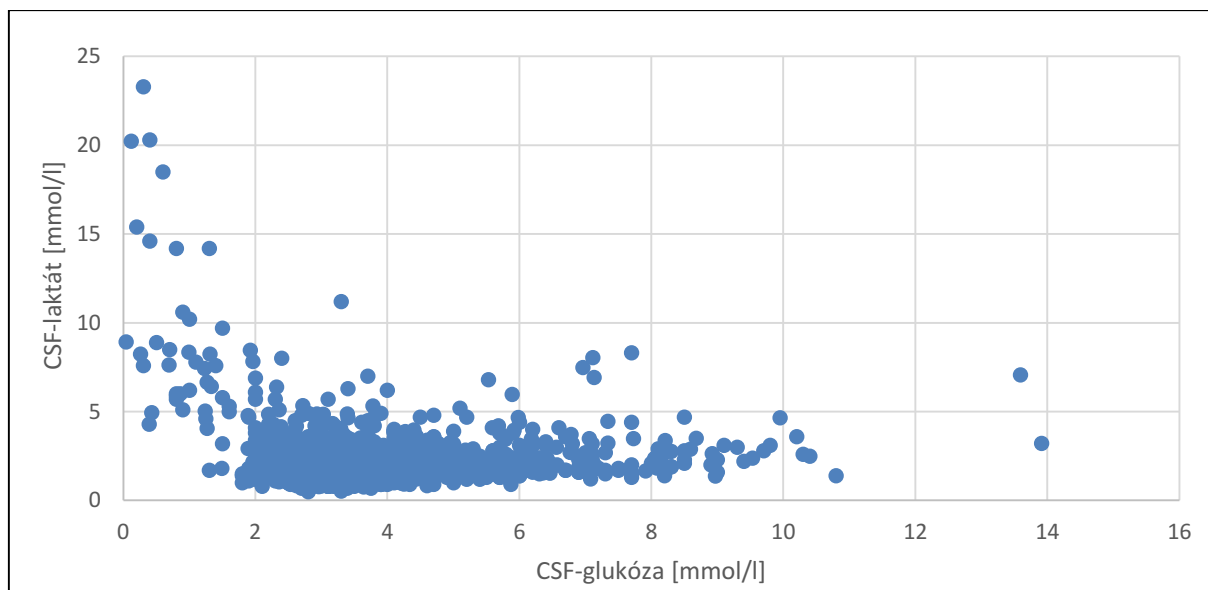
Tabulka č. 18: Relativní zastoupení hyperglykémie v patologických cytologických skupinách

Vyšší nabídka glukózy jako energetického substrátu u hyperglykorachie nabízí také hypotézu, že by i laktát mohl být produkován v těchto případech v likvorovém kompartmentu ve větším množství, bez ovlivnění lokálními energetickými nároky a množstvím kyslíku. Závislost mezi koncentrací laktátu v likvoru a glykorachii v celém souboru včetně neznámé glykémie (n = 8 178), celém souboru se známou glykemií (n = 4 820) a kontrolním souboru (n = 231) zobrazují grafy č. 16–18.



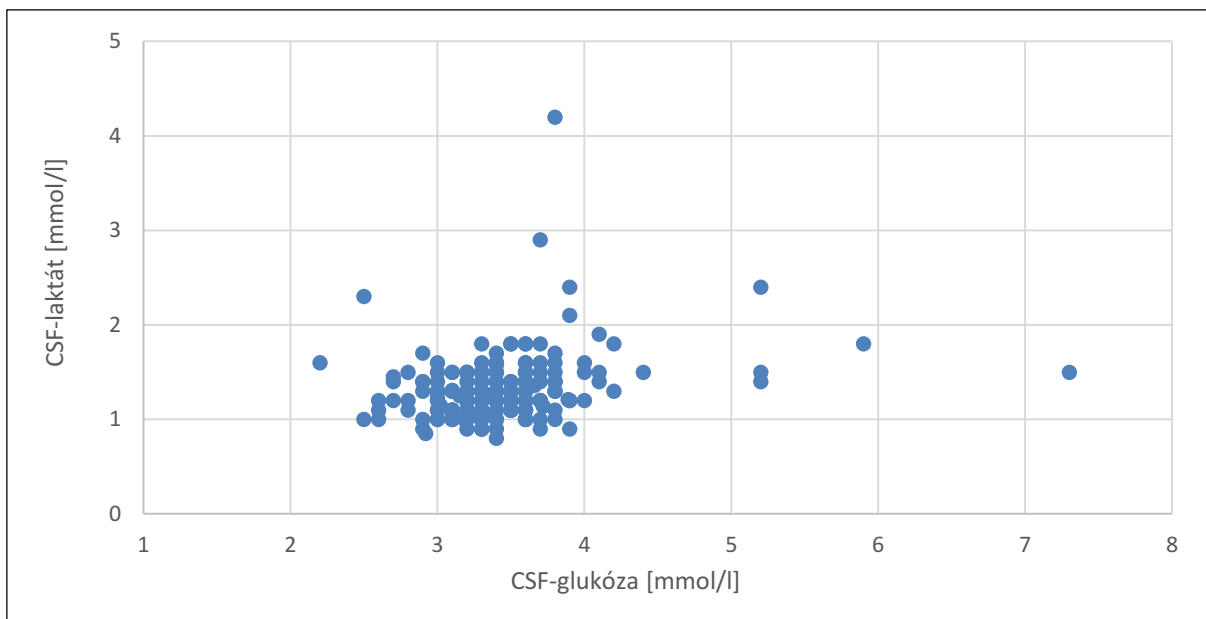
Graf č. 16: Závislost koncentrace laktátu v likvoru na glykorachii – celý soubor dat (n = 8 178)

CSF-glukóza = glykorachie, CSF-laktát = koncentrace laktátu v likvoru



Graf č. 17: Závislost koncentrace laktátu v likvoru na glykorachii – celý soubor dat se známou glykemií (n = 4 820)

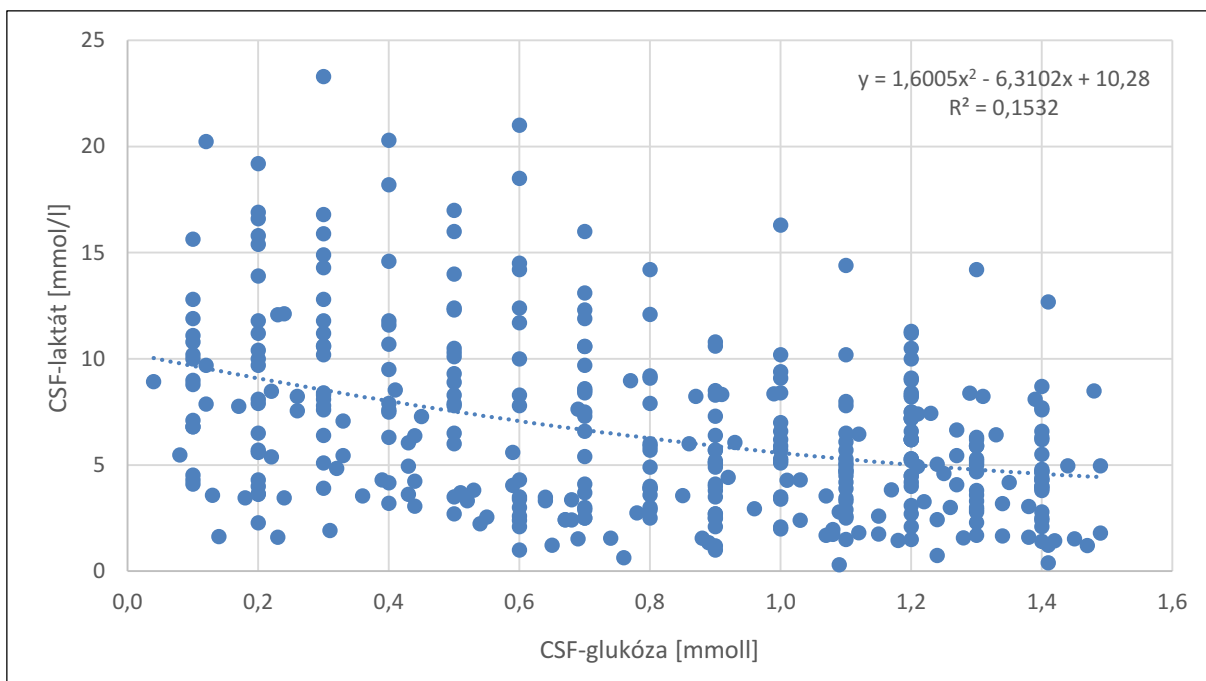
CSF-glukóza = glykorachie, CSF-laktát = koncentrace laktátu v likvoru



Graf č. 18: Závislost koncentrace laktátu v likvoru na glykorachii – kontrolní soubor (n = 231)

CSF-glukóza = glykorachie, CSF-laktát = koncentrace laktátu v likvoru

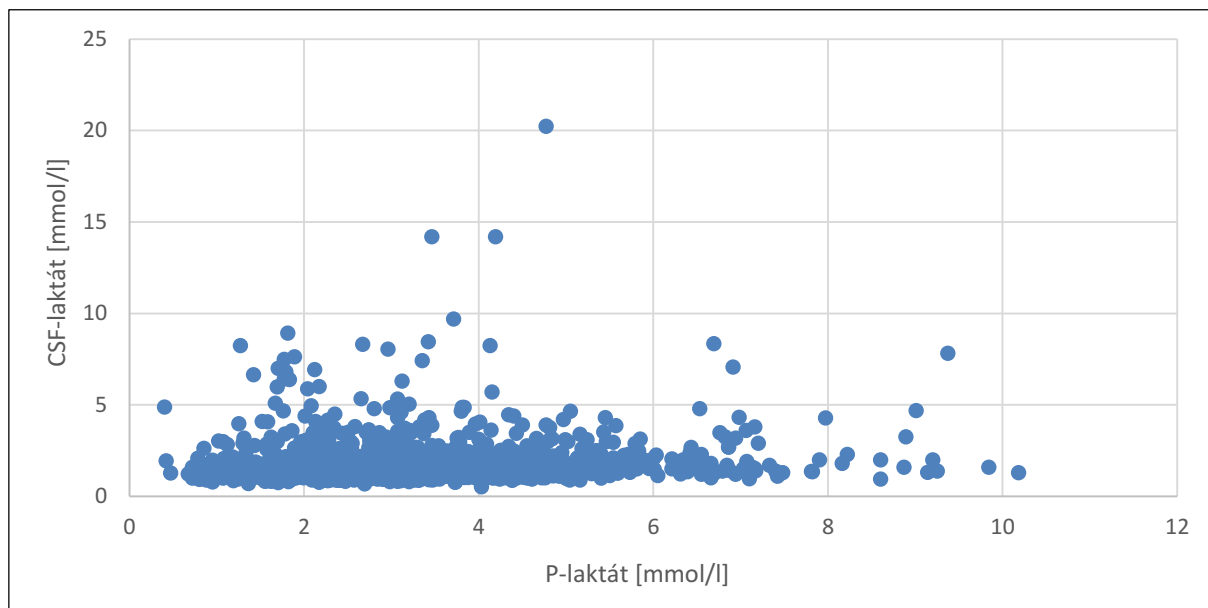
Závislost mezi koncentrací laktátu v likvoru a glykorachii se nepotvrdila. V grafu č. 16 a 17 je však naznačená mírná korelace nízké glykorachie a vysoké koncentrace laktátu v likvoru. Dále jsou tedy vybrány z celého souboru pouze případy s hypoglykorachii < 1,5 mmol/l (n = 380) pro posouzení závislosti koncentrace glukózy a laktátu v likvoru u případů se suspektní patologií CNS, viz graf č. 19.



Graf č. 19: Závislost koncentrace laktátu v likvoru na glykorachii – výběr případů s hypoglykorachii < 1,5 mmol/l z celého souboru dat (n = 380)

CSF-glukóza = glykorachie, CSF-laktát = koncentrace laktátu v likvoru

Poslední graf č. 20 zobrazuje závislost koncentrace laktátu v likvoru na koncentraci v plazmě v celém souboru se známou laktatemií.



Graf č. 20: Závislost koncentrace laktátu v likvoru na koncentraci laktátu v plazmě – celý soubor dat (n = 1 979)

CSF-glukóza = glykorachie, CSF-laktát = koncentrace laktátu v likvoru

7 Diskuze

7.1 Hodnocení KEB ve vztahu k cytologickým skupinám

GP a TO+TP jsou cytologické skupiny, u kterých jsem již před vlastním testováním předpokládala významně odlišné hodnoty KEB vzhledem k tomu, že doprovází imunitní reakci s důrazem na fagocytózu a oxidační vzplanutí. U purulentních bakteriálních neuroinfekcí nebo zánětu po reperfúzi ischemických ložisek u části SAK jde o aktivaci neutrofilů (Kelbich P. et al., 2014; Kelbich P., 2015). U TO+TP lze předpokládat aktivaci makrofágů, zejména M1 typu (Ramond E. et al., 2019; Biswas S. K., Mantovani A., 2012). Nálezy jsou v souladu s jinými studiemi, Kelbich nalezl u purulentních neuroinfekcí medián KEB -164,3 a senzitivitu nálezu GP + KEB < 10,0 až 95,7 % (Kelbich P. et al., 2013).

GP je skupinou s největším zastoupením nízkých hodnot KEB odpovídajících razantnímu zánětu s oxidačním vzplanutím (pod 10,0, resp. 15,0): 57,8 % (442/765), resp. 65,1 % (498/765), zatímco hodnoty v referenčním rozmezí naopak tvořily pouze 10,7 % (82/765). Hodnoty nedosahující cut-off pro oxidační vzplanutí jsou částečně pravděpodobně odrazem počínajícího stadia serózních neuroinfekcí, kdy neutrofily mohou po krátkou dobu v cytologickém obraze dominovat.

Schopnost tvorby reaktivních sloučenin kyslíku a chloru při oxidačním vzplanutí je dána fagocytům, jejichž aktivace probíhá na samotném začátku imunitní reakce. K plnému rozvinutí razantního zánětu však přispívá zapojení polarizovaných buněk specifické imunity a potenciace aktivace fagocytů. Při interpretaci likvorového nálezu tak hraje roli také časový faktor. U pacientů imunodeficientních nebo imunosuprimovaných pak nemusí k rozvoji plně vyjádřeného zánětlivého obrazu dojít vůbec (Krejsek J. et al., 2016).

Výsledky pacientů se sekundární neuroinfekcí po neurochirurgickém výkonu nebo traumatu hlavy a páteře byly rovněž zahrnuty do hodnoceného souboru dat, což mohlo přinést další modifikaci nálezů. V těchto případech může být vývoj zánětu a likvorového obrazu alterován řadou faktorů, např. produkcí glukokortikoidů vlivem stresu, primárním onemocněním CNS, reparací po operačním zákroku nebo traumatu, případným systémovým zánětem, protektivním podáním antibiotik, častou polymorbiditou pacientů, možnou kontaminací CNS nepatogenními mikroby apod. Tito pacienti často nevyvinou adekvátní imunitní reakci, včetně buněčnosti likvoru a posunu hodnot energetických parametrů. Na druhou stranu právě hodnocení nálezů v likvoru cyto-energetickým principem (metabolické manifestace oxidačního vzplanutí) může přispět ke stanovení diagnózy infekční komplikace v těchto těžkých situacích (Kelbich P., 2015; Xiong Y. et al., 2001).

Normální hodnoty KEB u GP mohou být částečně způsobeny také tzv. preventivní neuroprotekcí (Kelbich P. et al., 2012), kdy můžeme pozorovat patologický cytologický obraz a hyperproteinorachii, ačkoliv nedochází k funkční aktivaci přítomných buněk a posunu hodnot energetických parametrů. Právě energetické parametry jsou schopny rozlišit preventivní neuroprotekcí imitující neuroinfekci od skutečného purulentního zánětu.

V mozku je rozvoj zánětu, především s oxidačním vzplanutím fagocytů, a nedílného poškození a otoku tkáně velmi přísně kontrolován a regulován (Berger J. R., Koralnik I. J., 2005; Galea I. et al., 2007). To také může přispívat k širokému rozsahu hodnot energetických parametrů i cytologických nálezů v rámci zánětu CNS infekčního i neinfekčního.

Lze tedy shrnout, že hodnoty KEB ve zkoumaném souboru byly statisticky významně odlišné (nižší) u skupin GP a TO+TP oproti ostatním skupinám (primární alternativní hypotéza byla potvrzena), ačkoliv i v těchto skupinách byly hodnoty KEB nalezeny v celém rozsahu, tj. včetně jen mírně patologických nebo normálních.

Nízký počet měření ve skupině TO a TP je v souladu s nízkou prevalencí těchto vážných onemocnění v populaci, navíc část nádorových postižení mozku a mozkových plen nemusí uvolňovat maligní buňky do likvoru. Ve skupině TO+TP tvořily hodnoty KEB pod 10,0 (resp. 15,0), tj. v oblasti razantního zánětu s oxidačním vzplanutím, cca jednu třetinu nálezů: 30,9 % (47/152), resp. 33,6 % (51/152). To je druhé nejvyšší zastoupení tak nízkých hodnot KEB následující za skupinou GP. V této souvislosti je vhodné připomenout, že obrana proti nádorům probíhá kromě aktivace fagocytů především přes aktivaci specifických i nespecifických cytotoxických buněk (Drake Ch. G. et al., 2006). Tyto imunocyty likvidují cíl různými mechanismy, nemají však enzymové vybavení pro oxidační vzplanutí. Imunitní reakce na přítomnost maligních buněk (a likvorologický cytologický i energetický obraz) může být tedy velmi rozmanitá, daná individuální imunitní reaktivitou daného jedince i daného nádorového bujení.

Vedle kvantifikace KEB je ve vztahu k diferenciální diagnostice cytologických skupin rovněž možné přistoupit ke stanovení (ekonomicky náročnějších) parametrů, které nespádají do základního vyšetření likvoru. Ve skupinách s bakteriální meningitidou/encefalitidou a maligní meningeální infiltrací/mozkovými nádory jsme zjistili podstatné zvýšení hodnot beta-2-mikroglobulinu, což rovněž svědčí pro významnou aktivaci imunitního systému a tkáňovou destrukci právě u těchto skupin (Svatoňová J. et al., 2014).

Také skupiny MP a LP ukázaly signifikantní rozdíl KEB vůči kontrolám ($p < 0,0001$), nicméně stejný rozdíl byl mezi skupinami MP a GP a skupinami LP a GP, tzn., že hodnoty KEB u GP

byly ještě signifikantně nižší (KEB_{transf} vyšší) než u skupin MP, LP. Obraz MP i LP může doprovázet případy infekce potenciálními intracelulárními bakteriemi, kvasinkami a plísněmi nebo nádorový proces v CNS, kdy dochází převážně k rozvoji imunitní odpovědi typu: fagocytóza a oxidační vzplanutí fagocytů – polarizace k T_H1 – potenciace fagocytózy a oxidačního vzplanutí (Krejsek J. et al., 2016; Kelbich P. et al., 2012). Proto je pokles KEB také u těchto skupin očekáván, nicméně zmiňované případy reprezentují pouze relativně malou část – posouvají hodnoty KEB méně než u GP. Ve zkoumaném souboru byly nalezeny hodnoty $KEB \leq 10,00$ u 16,3 % případů (237/1 456) MP a 5,7 % případů (91/1 609) LP. Zvolíme-li cut-off KEB 15,0, je zastoupení logicky vyšší: 21,2 % (309/1 456) u MP a 8,3 % (133/1 609) případů LP. Interkvartilové rozpětí KEB u skupiny LP bylo 26,39–31,24, což koresponduje s oblastí serózního zánětu, který právě LP nebo LO obvykle doprovází. Větší část případů v těchto skupinách je tedy spojena s infekcemi jinými patogeny nebo neinfekčními záněty, kdy dochází k rozvoji převážně jiného typu imunitní odpovědi (bez potenciace oxidačního vzplanutí fagocytů) a KEB dosahuje pouze mírně snížených hodnot. Charakteristickým cytologickým obrazem u serózních zánětů (infekčního i neinfekčního původu) je právě LP, ale podle stadia a typu onemocnění můžeme nalézt také GP, MP nebo MO. Také tyto cytologické obrazy tedy u části případů serózních zánětů doprovází pouze mírný pokles KEB, čímž se rozdíly KEB mezi jednotlivými cytologickými skupinami částečně stírají.

Ačkoliv skupina LO není v žádném smyslu shodná se skupinou kontrolní, nenalezla jsem mezi těmito skupinami statisticky významný rozdíl v hodnotách KEB. LO je charakteristickým cytologickým obrazem autoimunitních procesů v CNS/PNS (například roztroušené sklerózy), chronických zánětů, případně počátečního stadia serózních zánětů. V těchto případech je oxidační vzplanutí fagocytů zcela výjimečné. Tomu odpovídají moje nálezy: velmi malá část výsledků (pod 1,0 % případů) dosahuje významného snížení KEB při cut-off KEB 10,0 i 15,0, pouze v jednom případě až k negativním hodnotám, zatímco hodnoty KEB v referenčním rozmezí byly u 92,6 % případů. Obdobně Kelbich našel u skupiny „mírných serózních zánětů CNS s intratékální syntézou imunoglobulinů neinfekční etiologie“ 92,5 % hodnot KEB v normě (Kelbich P. et al., 2013).

Mezi hodnotami KEB ve skupinách GO a MO nebyl nalezen statisticky významný rozdíl, stejně tak mezi skupinami GO a LP, ačkoliv se hodnoty KEB u všech těchto skupin statisticky významně lišily od kontrolní skupiny (ve všech případech $p < 0,0001$). Většina hodnot KEB ve skupinách GO, MO a LP je buď v referenčním rozmezí, nebo v oblasti hodnot mírně snížených. Cytologický obraz GO zpravidla nedoprovází purulentní neuroinfekce, spíše

se objevuje v počátečním stadiu serózních zánětů CNS nebo cerebrální ischemie. Velmi nízké hodnoty KEB (pod 10,0, resp. 15,0) se ve skupině GO vyskytovaly, ale jejich relativní zastoupení bylo velmi malé: 3,1 % (2/64), resp. 4,7 % (3/64).

Závěrem je nutné zdůraznit, že do dokonalosti mnohaúrovňového a flexibilního imunitního systému vstupují negativní faktory, jako jsou rozličné mechanismy úniku patogenů imunitnímu dohledu, neopakovatelná individuální reaktivita daného jedince, ovlivněná v aktuální situaci dalšími faktory (další onemocnění, užívání léků, stresová reakce apod.) (Krejsek J. et al., 2016). Výsledný obraz imunitní reakce je tedy dán kombinací mnoha proměnných. 100% posun všech výsledků biochemického a cytologického vyšetření likvoru do očekávaných hodnot tedy ani předpokládat nelze.

7.2 Rozbor KEB

Při studiu podkladů ke zpracování této práce jsem našla několik nepřesností a zjednodušení v odvození a výkladu KEB. Uvádím je k diskusi v přehledu:

- Jako maximální počet molekul ATP produkovaných z jedné molekuly glukózy při aerobní glykolýze a navazující OXP je uvedena, a v odvození výpočtu KEB použita hodnota 38 (Kelbich P. et al., 1998; Kelbich P., 2015). Recentní zdroje (Hertz L., 2007; Stettner A. I., 2004) však uvádí maximální zisk pouze 32 molekul ATP nebo méně (vliv úniku protonů, více podjednotek *ATP-syntázy*, transportu P_i a dalších látek, zapojení rozpojovačů, viz kap. 3.3 a 3.4). Vzorec pro výpočet KEB by tedy dle současných poznatků měl být konstruován takto:

$$KEB = 32 - 15 \frac{[\text{laktát}]}{[\text{glukóza}]}$$

Z toho vyplývá, že by KEB reálně dosahoval nižších hodnot než vypočtených původním vzorcem. Maximální hodnota, které by mohl dosáhnout ve smyslu pojetí autora, by pak teoreticky měla být 32,0, nikoliv 38,0.

Vzhledem k up-regulaci exprese UCP-2 v pozdním stadiu zánětu k ochraně proti oxidačnímu stresu (Emre Y., Nübel T., 2009; Cadenas S., 2018), může být produkce ATP ještě nižší.

V hodnoceném souboru bylo 95 % hodnot KEB (2,5.–97,5. percentil) ve skupině kontrol v rozmezí 28,5–33,3. Ačkoliv autor pravděpodobně určil dolní referenční mez KEB (28,0) pouze empiricky (není publikována práce definující referenční meze validovanou statistickou metodou v referenční populaci, jistě s ohledem na důvody uvedené také v této

práci v kap. 5.2.2), Dolní referenční mez v našem souboru přibližně odpovídá (2,5. percentil = 28,5). 97,5. percentil, který standardně určuje horní referenční mez, je v kontrolní skupině mírně vyšší (33,3) než teoreticky odvozená hodnota 32,0; nicméně je nutné počítat také s určitou analytickou chybou měření jak koncentrace laktátu, tak glukózy. Hodnoty 38,0, kterou Kelbich udává jako horní referenční mez, však nepochybně v kontrolní skupině zdaleka nedosahovala ani maximální hodnota KEB (34,3), ani 97,5. percentil KEB (33,3). Dokonce i v celém souboru napříč všemi cytologickými skupinami byl 97,5. percentil KEB v rozmezí 31,7–33,4, tj. nepřesáhl ani v jednom případě hodnotu 34,0. Sám Kelbich našel v kontrolní skupině 176 probandů hodnoty KEB 28,5–34,9 (Kelbich P. et al., 2013).

- Glukóza vstupuje do mozku pasivním i aktivním transportem z krve. Změny glykémie v době blízké odběru likvoru zásadním způsobem ovlivňují glykorachii (Hegen H. et al., 2014; Nigrovic L. E. et al., 2012) a současně tedy i KEB, který na glykémii adjustován není. Do teoretických základů odvození KEB tak významným způsobem zasahují další reálné faktory. V kontrolním souboru se známou glykemií bylo pouze minimum případů s hypoglykemií ($< 3,0$ mmol/l, $n = 7$, rozmezí KEB: 22,5–32,0) i výraznější hyperglykemií ($\geq 7,8$ mmol/l, $n = 6$, rozmezí KEB: 29,8–34,1), které by výrazněji mohly vychýlit KEB, nicméně i mezi těmito dvěma málo početnými skupinami je naznačen posun KEB ovlivněný pouze změnou glykémie. Tímto tématem se podrobně zabývám dále.
- Odvození KEB, resp. počtu molekul získaných z glukózy, počítá pouze s malátovým člunkem pro přenos redukčních ekvivalentů do mitochondrie. V mozku je však hojně zastoupen také glycerol-3-fosfátový člunek, který umožňuje transport redukčních ekvivalentů z cytosolu do mitochondrií proti koncentračnímu gradientu za cenu nižší produkce ATP (Berg J. M. et al., 2002). Kromě výše popsaného správnějšího výpočtu KEB může být v mozku při OXP zisk ATP nižší i vlivem zastoupení glycerol-3-fosfátového člunku. Reálné hodnoty KEB ve zkoumaném souboru jsou skutečně nižší – viz výše.
- Do základních axiomů použitých k odvození KEB zasahuje dále skutečnost, že kromě glykolýzy je část glukózy metabolizována jinými drahami, např. pentózovým cyklem. Pentózovým cyklem může být glukóza spotřebována kompletně (ve 2. fázi může vznikat glukóza, která opět může vstupovat do PPP), bez produkce ATP. V dospělém mozku je bazálně metabolizováno touto drahou cca 5 % glukózy, daleko větší zastoupení je ve vyvíjejícím se mozku. Zvýšená aktivita PPP je však také odpovědí na zvýšený oxidační stres, např. právě u zánětlivého onemocnění CNS především s oxidačním vzplanutím

(Dringen R. et al., 2007). Právě pro fagocyty je produkce NADPH v PPP zásadní, neboť proces oxidačního vzplanutí začíná přenosem elektronu z NADPH na molekulární kyslík *NADPH-oxidázou*. To znamená, že spotřeba glukózy je při těchto stavech teoreticky větší, než by odpovídalo produkci laktátu. Větší pokles glykorachie při stejné koncentraci laktátu v likvoru vede ke vzestupu LGP (glykorachie je ve jmenovateli zlomku) a poklesu KEB (vlivem násobení a odečítání ve vzorci). Tzn., že při zánětu s oxidačním vzplanutím fagocytů teoreticky není propad KEB do patologických (nízkých) hodnot způsoben jen vysokým stupněm anaerobního metabolismu glukózy, jak deklaruje Kelbich, ale také větším obratem PPP.

- Kelbich uvádí, že KEB udává počet molekul ATP vyprodukovaných z jedné molekuly glukózy za aktuálních energetických poměrů v likvorovém kompartmentu (Kelbich P. et al., 1998; Kelbich P. et al., 2014; Kelbich P., 2015). Při dodržení axiomů použitých pro odvození KEB a bez významnějšího podílu ostatních vlivů (viz všechny body zde uvedené) by nejnižší teoreticky dosažitelná hodnota KEB (při 100 % metabolismu glukózy anaerobně k laktátu) mohla být 2,0, resp. vzhledem k analytické chybě měření glukózy i laktátu v malém rozsahu kolem hodnoty 2,0. V reálné praxi KEB však nezřídka dosahuje nižších, až silně negativních hodnot. Např. při koncentraci laktátu 4,5 mmol/l a glukózy 1,0 mmol/l je KEB -43,0, což by dle tohoto výkladu znamenalo, že je reálný aktuální nedostatek 43 molekul ATP. Takové vyčerpání ATP by však vedlo ke smrti buňky.

Ke změnám koncentrací látek v likvorovém i systémovém kompartmentu může docházet (především u akutních stavů) tak rychle, že se nestačí ustanovit dynamická rovnováha. Z toho důvodu dokonce Kelbich primárně konstruoval výpočet také dynamického KEB_D (Kelbich P. et al., 1998), který je však podstatně složitější a v praxi se vůbec neujal. V KEB_D autor zohledňuje nedostatečně ustanovenou dynamickou rovnováhu, resp. vliv „poškození HLB s porušením transportních funkcí přenašečů glukózy a laktátu“ (Kelbich P. et al., 1998) tím, že místo aktuálních koncentrací glukózy a laktátu v likvoru, počítá s rozdílem aktuálních koncentrací od hodnoty předpokládané při zachování $Q_{glu} 0,60$ (tj. $Q_{glu} 0,60$ tak považuje za známku dosažení dynamické rovnováhy). Rozdíl aktuální glykorachie od předpokládané při $Q_{glu} 0,60$ však nemusí být způsoben pouze spotřebou glukózy a kumulací laktátu v likvoru vlivem patologického procesu při nedostatečně ustanovené dynamické rovnováze, jak autor popisuje. Významný posun Q_{glu} (a tedy rozdíl glykémie aktuální od předpokládané) může být pouze na vrub změny glykémie do vysokých nebo nízkých hodnot, $Q_{glu} 0,60$ zdaleka není zachován v celém rozsahu možné

glykémie (viz graf č. 14 a 15 a dále). Změna transportu glukózy a laktátu přes HLB a HEB při onemocnění CNS kromě toho nemusí být proporcionální pro obě látky, jak Kelbich v odvození KEB_D předpokládá – viz např. opačný vliv poklesu pH na transport těchto solutů, který zánět standardně doprovází.

Lze shrnout, že právě u akutních patologických stavů s oxidačním vzplanutím základní axiomy odvození a výkladu KEB neplatí, uplatňuje se řada dalších faktorů, a KEB spíše než počet molekul ATP (produkovaných z jedné molekuly glukózy za aktuálního energetického stavu) určuje aktuální proporci mezi spotřebou glukózy, dodávkou glukózy z krve a produkcí laktátu v likvorovém prostoru a tkáni CNS přilehlé (v difúzní vzdálenosti).

- Kelbich označuje koncentraci laktátu za marker rozsahu anaerobní glykolýzy. Laktát však není jen odpadním produktem anaerobní glykolýzy, jak na něj dříve bylo nahlíženo (Magisretti P. L., Allaman I., 2018). Laktát umožňuje pokračování glykolýzy regenerací NAD^+ také za nedostatku kyslíku, např. při potřebě rychlé dodávky energie, anebo při překročení kapacity CKC a OXP nebo kapacity člunků (Dienel G. A., 2018). Potřeba rychlé dodávky energie nastává právě při oxidačním vzplanutí, kdy M1 makrofágy po aktivaci prodělají metabolický přesmyk k převážné dodávce energie glykolýzou k laktátu (Ramond E. et al., 2019). Sám laktát může sloužit jako energetický substrát (Brooks G. A., 2018). V mozku je součástí důležité výměny látek mezi astrocyty a neurony (Bak L. K., et al., 2006). V poslední době se laktátu připisuje také regulační a signální funkce (Proia P. et al., 2016; Domenech-Estevéz E. et al., 2015). Produkci ATP a laktátu mohou ovlivňovat také další endogenní a exogenní zásahy do metabolismu, např. blokáda enzymů při sepsi, snížená tvorba ATP a hypoxie tkání při deficitu fosfátů, aktivace glykolýzy a produkce laktátu při alkalóze a další. Metabolismus laktátu je tedy komplexní, změny jeho koncentrace mohou nastat z mnoha příčin. Produkce laktátu není jen ukazatelem dostupnosti kyslíku, ale spíše metabolického stavu buňky.
- Kromě nabídky energetických substrátů ovlivňuje transport glukózy a laktátu (down/up-regulaci přenašečů) také pH. S klesajícím pH vzrůstá transport laktátu MCT přenašečem (a difúze neionizované frakce laktátu) a klesá transport glukózy GLUT přenašečem a naopak (Kido Y. et al., 2000; Albers R. W. et al., 2012). O přenos prostřednictvím MCT kompetují také další monokarboxylové kyseliny, transport laktátu (jak influx, tak eflux) tak může být omezen při vysoké koncentraci ketolátek v krvi nebo

podání exogenních monokarboxylových kyselin, např. kyseliny salicylové, benzoové nebo valproové (Doležal M. et al., 2016).

- Do výsledného metabolického obrazu daného jedince zasahují další faktory, jako např. vliv infekce konkrétním patogenem (některé patogeny indukují určitý metabolický fenotyp hostitele k tvorbě vhodného mikroprostředí, některé naopak efektivně inhibují oxidační vzplanutí a produkci VKR nebo respirační řetězec a produkci ATP či jinak modifikují energetický metabolismus (Ramond E. et al., 2019)) nebo vliv případné dysfunkce dalších orgánů a tkání, např. hyperamonémie nebo urémie (Rhee E. P., 2011; Rao K. V. R., 2012).
- V mozku je v malém množství přítomen glykogen. Glc-1-P získaný při glykogenolýze vstupuje do glykolýzy přímo, čímž se ušetří 1 ATP na fosforylaci glukózy. Pak je zisk ATP při glykolýze k laktátu 3 ATP na 1 molekulu glukózy (Dienel G. A., 2018). S tímto odvozením KEB nepočítá, i když vzhledem k pouze malému množství glykogenu v mozku je toto zjednodušení zanedbatelné.
- Ačkoliv je glukóza základním energetickým substrátem mozkových buněk, tyto dokáží získávat energii i z jiných zdrojů, např. z ketolátek nebo z laktátu samotného. Zastoupení těchto substrátů při krytí energetických potřeb je výrazné především v novorozeneckém a kojeneckém věku (Roberts E. L. Jr., 2007). Také dospělý mozek disponuje všemi enzymy potřebnými pro utilizaci alternativních substrátů. Při hypoglykémii nebo zvýšeném oxidačním stresu také dochází k aktivaci „pyruvate recycling“ cesty a produkci až 75 % ATP z glutaminu, glutamátu nebo aspartátu (Amaral A. J. et al., 2011; Hertz L., 2007). Za určitých podmínek tedy dokáže mozek krýt podstatnou část energetických potřeb oxidací jiných substrátů než glukózy. To znamená, že se poměry energetického metabolismu především u novorozenců a kojenců, ale i u dospělých za určitých stavů (např. déletrvající hladovění, dekompenzace diabetu, ketogenní dieta, hypoglykémie, sepsy) mohou výrazně měnit.
- Koncentraci laktátu i glukózy můžeme rutinně měřit v krvi nebo likvoru (případně v ECT při mikrodiálýze u neurochirurgických pacientů (Hejčl A., et al., 2013)). ATP však vzniká intracelulárně. Koncentrace energetických parametrů v biologických tekutinách tedy nemusí exaktně odpovídat aktuálnímu energetickému stavu uvnitř buněk.
- V nádorové tkáni je energetický metabolismus zcela specifický a vysoká produkce laktátu je běžná (Locasale J. W., 2010). To může ovlivnit jak koncentraci laktátu v krvi u metabolicky aktivních tumorů jako např. u leukémie, tak lokální koncentraci laktátu v likvoru a tkáni CNS přilehlé u MMI, primárních mozkových tumorů nebo solidních

metastáz do mozku. Pokles KEB tedy v těchto specifických případech nemusí souviset jen s aktivací fagocytů a metabolickým stavem postižené tkáně, ale také v různé míře s produkcí laktátu vlastní tkání nádorovou.

- V mozku do energetické homeostázy významnou měrou zasahuje kreatinfosfát, existují specifické mozkové izoenzymy CK (Béard E., Braissant O., 2010). Právě při oxidačním vzplanutí fagocytů a nutnosti rychlé dodávky energie zajišťuje v první fázi zátěže fosforylaci ADP na ATP, a to i za nedostatku kyslíku a glukózy.

Je zjevné, že vztahy metabolismu glukózy, resp. energetického metabolismu v CNS ani zdaleka nejsou triviální, zasahuje do nich celá řada komplexních faktorů. Odvození a výklad KEB tuto komplexitu vztahů však zjednodušuje a pomíjí.

Při užším matematickém pohledu na vzorec výpočtu KEB je zřejmé, že obě proměnné jsou zavzaty do ústřední části vzorce: vlastního LGP. Násobení pak 18x zvyšuje rozsah změn tohoto poměru a odečítání (38 - ...) posouvá výslednou hodnotu na ose „y“ do nižších až negativních hodnot.

7.3 Srovnání KEB s dalšími energetickými parametry v likvoru

LGP i GLP odlišují cytologické skupiny GP a TO+TP od kontrolní skupiny i všech ostatních skupin stejně jako KEB (p ve všech případech $\leq 0,0001$, vyjma TO+TP vs. MP, kde nebyl statisticky významný rozdíl). LGP tvoří podstatu KEB, což je zcela zjevné při porovnání grafů č. 1 a 6, které se téměř shodují, GLP je pak logicky inverzním obrazem (viz graf č. 7).

Izolovaná koncentrace laktátu a především glukózy se liší mezi cytologickými skupinami již méně (viz graf č. 8 a 9), a také ve skupinách GP a TO+TP má menší rozpětí hodnot (graf č. 11). To potvrzuje výhodu spojení těchto dvou veličin do jednoho poměru při převážně inverzním vztahu jejich změn při patologických situacích.

Při zobrazení transformovaných veličin (graf č. 10) je zřejmé, že KEB pouze posouvá hodnoty vlastního LGP na ose „y“. Z výsledků je však také evidentní daleko větší, resp. obrovské rozpětí hodnot KEB oproti samotnému LGP i GLP, což je dáno násobením LGP 18x ve výpočtu KEB (názorně viz graf č. 11). Největší minimo-maximální rozpětí (nejmenší minimum až největší maximum) u patologických skupin bylo -3 980,50 až 37,36. Takového rozpětí hodnot KEB bylo dosaženo také v jiných studiích (Hejčl A., et al., 2013; Kelbich P. et al., 2012; Kelbich P. et al., 2014). Vzhledem k tomuto reálnému rozpětí hodnot může KEB diferencovat mezi vrstvami patologického vychýlení (serózní zánět vs. oxidační vzplanutí fagocytů) senzitivněji a názorněji než všechny ostatní srovnávané parametry.

Hanzal určil jako normu GLP (označuje jej jako „Q“) hodnoty nad 2,0 (Hanzal F. et al., 1963). Možný rozsah patologických hodnot je tak logicky velmi malý (v rozmezí 0,0–2,0), nejmenší ze všech sledovaných parametrů. Nejvyšší interkvartilové rozpětí (nejmenší 1. kvartil až nejvyšší 3. kvartil) u patologických skupin bylo 0,23–2,99. U GP bylo interkvartilové rozpětí 0,23–1,05, tj. cca 2/3 hodnot bylo pod cut-off definovaným Hanzalem pro purulentní meningitidu (< 1,0) (Hanzal F. et al., 1963). Zbylá třetina je patrně na vrub počáteční fáze serózního zánětu, event. preventivní neuroprotektce a zahrnutí imunosuprimovaných a imunodeficientních pacientů – viz komentář k první části práce. U TP byl 3. kvartil 1,79, tedy v rozmezí uvedeném Hanzalem pro „metastázy karcinomu do mozku nebo jeho plen“ (1,0–2,0), medián byl 0,98. Extrémní hodnota GLP 0,01 nebyla zcela ojedinělá, vyskytovala se ve skupině GP u 19 případů velmi nízké glykorachie a vysoké koncentrace laktátu v likvoru (odpovídá rozvinutému purulentnímu zánětu).

Dle cut-off určeného Hanzalem pro GLP a fyziologické koncentrace laktátu v likvoru zhruba poloviční oproti glykorachii by normální hodnoty LGP měly být do 0,5. Ve studovaném souboru překročily cut-off 0,5 mediány LGP pouze u skupin GP (1,85), TP (1,02) a MP (0,67), 3. kvartily již téměř u všech patologických cytologických skupin kromě LO (0,44). 2,5.–97,5. percentil u kontrolní skupiny byl 0,26–0,53, což zcela odpovídá odvozenému cut-off. Nejvyšší hodnota LGP (223,5) dosáhla cca 450násobku cut-off. V tomto konkrétním případě se však jednalo o (pro LP netypicky) vysokou pleocytózu (počet leukocytů 24 112/3 μ l) s glykorachií 0,04 mmol/l (při glykémii 4,41 mmol/l), koncentrací laktátu v likvoru 8,93 mmol/l a KEB -3 980,50.

Rozdíly mediánů energetických parametrů proti kontrolní skupině

Nejmenších relativních rozdílů mediánů u patologických skupin ve srovnání s kontrolní skupinou dosáhla glykorachie: -26,0 až +10,7 % (viz tab. č. 13). U tohoto jediného parametru byl trend rozdílu mediánů oběma směry (pokles i nárůst glykorachie oproti kontrolní skupině). Dokonce 3. kvartil všech patologických skupin přesahoval 3. kvartil kontrolní skupiny a 97,5. percentil přesahoval horní referenční mez (4,2 mmol/l) u všech patologických skupin (viz tab. č. 12). Naproti tomu mediány všech ostatních posuzovaných energetických parametrů se u patologických skupin proti kontrolní skupině měnily vždy jen jedním směrem (trend byl shodný u všech patologických skupin). Největších rozdílů dosáhly izolovaná koncentrace laktátu v likvoru a LGP: +8,3 až +300,0 % a +2,8 až +398,1 %.

Ve všech sledovaných energetických parametrech dosáhla největších relativních rozdílů mediánů skupina GP a TP, významného rozdílu dále MP. Pouze u GP byl relativní rozdíl

mediánu LGP oproti kontrolám ještě vyšší než u izolovaného laktátu v likvoru (u GP je také významný pokles glykorachie: -26 %), u všech ostatních skupin byl však rozdíl laktátu největší. I zde je nepochybný vliv hyperglykémie a zmírnění poklesu nebo dokonce vzestup glykorachie. Jen u skupiny GP je kromě významného vzestupu koncentrace laktátu pokles glykorachie vlivem patologického procesu natolik globální a dostatečný, aby převážil vliv hyperglykémie (viz také tab. č. 18 a hodnocení vlivu hyperglykémie dále). Přidání glykorachie do poměru k laktátu výsledné relativní rozdíly oproti kontrolám tedy spíše snížilo, ačkoliv jednotlivé případy se samozřejmě mohou individuálně lišit.

Relativní rozdíly mediánů izolované koncentrace laktátu v likvoru a LGP jsou sice zřetelně větší než u KEB, nicméně rozsah absolutních hodnot je malý (viz tab. č. 4, 9 a 11).

Jako nejlepší z energetických parametrů stran největšího relativního rozdílu při patologii se jeví izolovaná koncentrace laktátu v likvoru, resp. LGP u GP, u TP jsou změny koncentrace laktátu a LGP srovnatelné.

Analýza shody distribučních funkcí

Hodnoty KEB, LGP, GLP a koncentrace laktátu v likvoru se mezi jednotlivými srovnávanými dvojicemi liší velmi podobně (p-hodnoty jsou shodné nebo obdobné), zřetelně vybočuje pouze izolovaná glykorachie (viz tab. č. 14). Hodnoty glykorachie nejsou statisticky významně rozdílné ani mezi skupinami, kde hodnoty všech ostatních sledovaných parametrů rozdílné jsou (např. MP - LO, MP - kontroly, LO - TO+TP a další). Opět je pravděpodobným vysvětlením nevýhoda izolovaného stanovení glykorachie vzhledem k významné závislosti na aktuální glykémii.

Nejméně nesignifikantních výsledků (tj. $p > 0,05$) dosáhla izolovaná koncentrace laktátu v likvoru.

Diskriminační analýza

Hranice dobré diskriminace, tj. alespoň 70 % správně rozdělených výsledků, byla u všech sledovaných energetických parametrů dosažena pouze u části srovnávaných dvojic, viz tab. č. 15. Např. KEB_{transf} správně zařazuje výsledky mezi skupinami GO - kontroly v 76,9 % (nesprávně zařadí 23,1 % výsledků), ale jen v 36,8 % mezi skupinami GO - LP. Mezi skupinami GO - kontroly se tedy 79,6 % hodnot KEB_{transf} liší dostatečně a jsou správně zařazeny, ale jen 36,8 % hodnot mezi skupinami GO - LP, tj. ve skupinách GO a LP jsou hodnoty KEB podobné. Diskriminační analýza tak dále upřesňuje informace z analýzy shody distribučních funkcí; např. mezi skupinami GP - kontroly se hodnoty všech hodnocených

energetických parametrů statisticky významně liší ($p < 0,0001$), nicméně nejlépe tyto dvě skupiny diskriminuje GLP (91,2 % správně zařazených).

Dále je patrný fakt, že mezi jednotlivými srovnávanými cytologickými dvojicemi nejlépe rozřazují hodnoty různé energetické parametry, tzn. není jeden univerzální parametr, který by nejlépe zařadil hodnoty mezi všemi dvojicemi cytologických skupin. Toto je také důvod špatného rozřazení do všech cytologických skupin najednou u všech posuzovaných energetických parametrů (viz řádek „vše“ v tabulce). Např. KEB_{transf} nejlépe rozřazuje mezi dvojicí GP - MO, ale mezi dvojicí GO - TO+TP nejlépe rozřazuje GLP atd. V tomto smyslu „nejhorším“ parametrem je glykorachie (nejlépe rozřadila pouze v jednom případě z 28, správná diskriminace byla v řadě srovnávaných dvojic pouze kolem 50 %). To je ve shodě s předchozími nálezy a s komentářem k nim. Naopak poněkud překvapivé je zjištění, že v tomto smyslu „nejlepším“ energetickým parametrem je GLP: nejlépe rozřadil ve 14 případech z 28. KEB_{transf} nejlépe rozřadil pouze ve 3 případech z 28. V nejvíce sledovaných skupinách, které typicky doprovází razantní zánět s oxidačním vzplanutím, tj. GP, TO+TP, případně MP, nejlépe zařazoval právě GLP, následovaný izolovanou koncentrací laktátu v likvoru a KEB.

Zařazení do správných cytologických skupin ve srovnávané dvojici přitom není stejnoměrné, např. KEB_{transf} správně zařadil 235/235 kontrol (100,0 %), ale jen 554/765 (72,4 %) výsledků ze skupiny GP mezi skupinami GP - kontroly, viz tab. č. 16. Je tedy zřejmé, že ve skupině kontrol jsou hodnoty homogenní a odlišné od skupiny GP, zatímco ve skupině GP hodnoty KEB homogenní nejsou a část se jich od kontrol neliší dostatečně.

Je zjevné, že obrácení poměru laktát/glukóza na glukóza/laktát dodává výslednému podílu jiný rozměr. Mezi konkrétními dvojicemi tyto obrácené poměry nerozdělují stejně, ba většinou ani obdobně. Samostatné proměnné vstupují do diskriminační analýzy lineárně, zatímco jejich podíl již lineární funkcí není. Přírůstek čitatele způsobí větší změnu výsledného podílu než tentýž relativní přírůstek jmenovatele, naopak úbytek jmenovatele způsobí větší změnu výsledného podílu než tentýž relativní úbytek jmenovatele. Pokud se veličiny v podílu mění protisměrně (jedna stoupá a jedna klesá, jako je tomu v případě koncentrace laktátu a glukózy v likvoru), je ovlivnění výsledku větší, pokud se jedná o přírůstek čitatele a úbytek jmenovatele než naopak. Pokud tedy od poměru dvou veličin v diagnostice očekáváme ideálně co největší změnu od normy, LGP je teoreticky výhodnější, resp. pravděpodobně bude patologický stav odrážet větší odchylkou od normy než GLP. Do těchto matematických vztahů vstupuje ještě další faktor, kterým je nestejná relativní změna obou veličin. Největší změny podílu je dosaženo, pokud je úbytek jmenovatele větší než přírůstek čitatele. Teoreticky, pokud

se glukóza metabolicky spotřebovává také jinými cestami než glykolýzou s produkcí laktátu (vzestup odbourávání glukózy cestou pentózového cyklu právě při zánětu), je změna (pokles) koncentrace glukózy větší než změna (nárůst) koncentrace laktátu v likvoru, a tudíž by LGP měl být ideálním energetickým markerem.

Do těchto teoretických předpokladů však v reálném komplexním živém organismu vstupuje řada dalších faktorů, které nejsou v této studii zkoumány (např. vliv věku a pohlaví), včetně individuální reaktivity daného jedince (každý jedinec má při měřeních svoji vlastní chybu). Problematika je značně složitá, reálné fyziologické podmínky zásadním způsobem mění teoretický matematický základ. Jedním ze zásadních faktorů ovlivňujících teoretický předpoklad je výrazná závislost glykorachie na glykémii. Hyperglykémie způsobuje menší pokles, žádnou změnu nebo dokonce nárůst jmenovatele v LGP a znevýhodňuje použití jak LGP samotného, tak KEB, jehož je základem. Hypoglykémie, která naopak může způsobit pokles jmenovatele LGP, je daleko méně častá (viz výsledky tohoto souboru v dalším odstavci). Nevýhoda vlivu glykémie na glykorachii evidentně není odstraněna ani umístěním koncentrací glukózy a laktátu v likvoru do poměru. Potvrzením této hypotézy je fakt, že GLP rozřazoval výrazně lépe než LGP právě u skupin s největším relativním zastoupením hyperglykémie (viz tab. č. 18), tj. např. u GP (GLP: 88,6 % vs. LGP 28,6 % správně zařazených do skupiny GP mezi skupinami GP - kontroly) nebo TO+TP (GLP: 72,4 % vs. LGP 29,6 % správně zařazených do skupiny TO+TP mezi skupinami TO+TP - kontroly). Zatímco u skupin s nižším zastoupením hyperglykémie (pod 30,0 %), tj. u skupin MO, LO a kontroly dosáhl LGP lepších výsledků správně zařazených než GLP.

Závislost glykorachie, Q_{glu} a KEB na glykémii

Glykémie byla stanovena u větší části souboru: 58,9 % (4 820/8 178). Hyperglykémie $\geq 5,6$ mmol/l byla ve značném množství případů: 29,1 % (1 403/4 820). Z toho cca třetina, resp. 34,9 % (489/1 403) měla zvýšenou i glykorachii $\geq 4,2$ mmol/l a ve 43,0 % (603/1 403) byl Q_{glu} menší než 0,55. Hyperglykémie $\geq 7,8$ mmol/l byla v 7,7 % případů (369/4 820), zastoupení hyperglykorachie ($\geq 4,2$ mmol/l) u těchto případů bylo již značně vyšší, resp. 65,6 % (242/369), v 66,4 % (245/369) byl Q_{glu} nižší než 0,55. V malém množství případů byla glykémie velmi vysoká, tj. $\geq 15,0$ mmol/l (35/4 820, tj. 0,7 %), podíl hyperglykorachie opět výrazně vzrostl (glykorachie $\geq 4,2$ mmol/l v 29/35, tj. 82,9 %, Q_{glu} pod 0,55 v 31/35, tj. 88,6 %). Hyperglykorachie ($> 4,2$ mmol/l) byla u 19,6 % případů z celého souboru (1 603/8 178). Hypoglykémie $< 3,0$ mmol/l byla pouze v 1,6 % případů (75/4 820), z toho hypoglykorachie pod 2,0 mmol/l jen ve 4,0 % (3/75), zatímco $Q_{glu} > 0,65$ v 97,3 % (73/75). Závislost glykorachie

na glykémii je evidentní, s rostoucí glykemií podíl hyperglykorachie narůstá, ještě více je ovlivněn Q_{glu} .

Závislost glykorachie na glykémii v celém souboru je lineární (viz graf č. 12), korelační koeficient (Pearsonův) $r = 0,7$ ($p < 0,0001$) je na hranici mezi středním a vysokým stupněm korelační závislosti. Lineární závislost glykorachie na glykémii v celém rozsahu nalezených koncentrací je ve shodě např. s Leen, která našla v souboru 4 516 probandů glykémie v rozsahu 0,8–40,4 mmol/l, hyperglykémii $> 7,8$ mmol/l u 7,5 % a Q_{glu} v rozsahu 0,17–2,03 (Leen W. G. et al., 2012). Na rozdíl od Nigrovic (Nigrovic L. E. et al., 2012) není v celém souboru dat patrné „zalomení“ spojnice trendu (menší strmost od glykémie více než cca 13,0–15,0 mmol/l). U kontrolní skupiny se spojnice trendu jeví spíše opačně (vyšší strmost závislosti u vysoké hyperglykémie), ale zde je bodů s hyperglykemií relativně málo. Posouzení vztahu glykorachie a glykémie v celém souboru je však zatíženo faktem, že jsou zahrnuty případy, kdy do metabolismu glukózy v tkáni CNS a likvorovém kompartmentu významně zasahuje právě patologický proces. V oblasti hyperglykémie je nicméně tato chyba malá, protože patologie v CNS se vzestupem glykorachie projevuje pravděpodobně spíše sporadicky. Případů hyperglykorachie (nad 4,2 mmol/l) při normoglykémii (do 5,6 mmol/l) bylo v celém souboru dat 2,3 % (111/4 820).

Také v kontrolním souboru bylo zastoupení hyperglykémie $\geq 5,6$ mmol/l nezanedbatelné: 15,6 % (36/231). Hyperglykémie $\geq 7,8$ mmol/l byla v 2,6 % (6/231), hyperglykémie nad 15,0 mmol/l se nevyskytla. Hypoglykémie $< 3,0$ mmol/l byla v 3,0 % (7/231). V kontrolní skupině je optimální rovnice spojnice trendu závislosti glykorachie na glykémii nelineární; závislost je mírně slabší (koeficient determinace $R^2 = 29$ %, Spearmanův korelační koeficient $r_s = 0,356$ při $p < 0,0001$ odpovídá střednímu stupni korelační závislosti).

Závislost Q_{glu} na glykémii má opačný trend než u vztahu glykorachie a glykémie, viz grafy č. 14 a 15. Závislost je nelineární, r_s v celém souboru byl $-0,709$ ($p < 0,0001$), $R^2 = 37$ % a v kontrolní skupině $r_s = -0,792$ ($p < 0,0001$), $R^2 = 71$ %, což odpovídá těsné až velmi těsné závislosti. V celém souboru (graf č. 14) je oproti kontrolnímu souboru (graf č. 15) vidět vychýlení křivky směrem k ose „x“ (Q_{glu} pod 0,50) v oblasti glykémie cca 4,0–8,0 mmol/l. To je pravděpodobně způsobené zahrnutím případů patologie v CNS do celého souboru, včetně purulentních meningitid, kde lze očekávat významný pokles glykorachie. V důsledku toho je pravděpodobně také R^2 v celém souboru nižší než u kontrolní skupiny.

Závislost Q_{glu} na glykémii se jeví významnější (křivka je strmější) především v oblasti hodnot glykémie pod 5,0–6,0 mmol/l, zatímco závislost glykorachie na glykémii spíše v oblasti hodnot

glykémie nad 6,0 mmol/l. Q_{glu} tedy více stoupá s poklesem glykémie v oblasti normo- a hypoglykémie, zatímco glykorachie více stoupá spíše v oblasti hyperglykémie.

Dle rovnice spojnice trendu odpovídá oblasti normoglykémie (od 3,0 do 5,6 mmol/l) u kontrolní skupiny Q_{glu} 0,63–1,03, tj. hodnoty byly vyšší než referenční rozmezí Q_{glu} . Hodnoty uváděné jako referenční rozmezí Q_{glu} (0,55–0,65) odpovídaly v kontrolní skupině glykémii 4,2–6,7 mmol/l. 95 % reálných hodnot Q_{glu} (2,5.–97,5. percentil) v kontrolní skupině bylo v rozsahu 0,59–1,01. Všechny reálné hodnoty Q_{glu} v celém souboru se známou glykemií ($n = 4\ 820$) byly v rozsahu 0,01–4,12. Velmi nízké hodnoty pod 0,05 ($n = 6$) byly vždy v důsledku velmi nízké glykorachie ($\leq 0,4$ mmol/l, při různé glykémii) spojené s patologickou pleocytózou, vysokou koncentrací laktátu v likvoru a nízkým KEB při patologii v CNS. Vysoké hodnoty Q_{glu} nad 2,00 ($n = 8$) byly vždy u hypoglykémie (při Q_{glu} 4,12 byla glykémie 1,2 mmol/l), s nízkým počtem leukocytů v likvoru. Hodnot Q_{glu} nad 1,00 bylo celkem 205 (4,3 %), z toho 32,2 % s hypoglykemií $< 3,0$ mmol/l (66/205), ale maximum, resp. 98,5 % s glykemií $< 5,6$ mmol/l. Pokles glykémie již v oblasti normoglykémie tak skutečně způsobil vzestup Q_{glu} nad normu (0,65) a potenciálně mohl maskovat pokles Q_{glu} vlivem patologie (viz graf č. 15). Vzestup glykémie nad cca 8,5 mmol/l způsobil vzestup glykorachie nad normu (4,2 mmol/l), tedy mohl maskovat pokles glykorachie vlivem patologického procesu (viz graf č. 13) anebo naopak imitovat patologii poklesem Q_{glu} .

Tento závěr je v souladu s nálezy v literatuře: velmi strmý pokles Q_{glu} v oblasti glykémie cca od 1,0 do 5,0 mmol/l; od glykémie \geq cca 8,0 mmol/l pokles Q_{glu} malý, \geq cca 15,0 mmol/l již jen minimální (Leen W. G. et al., 2012; Powers W. J., 1981). Leen doporučuje Q_{glu} adjustovat na věk (Leen W. G. et al., 2012); Hegen také na glykémii: 5. percentil Q_{glu} jako cut-off pro purulentní meningitis: 0,50 při glykémii do 5,56 mmol/l; 0,40 při glykémii 5,56–8,33 mmol/l; 0,30 při glykémii $\geq 8,33$ mmol/l (Hegen H. et al., 2014). Irani akceptuje cut-off Q_{glu} pro diabetické pacienty 0,31 (Irani D. N., 2009). Aplikace široce používaného jednotného cut-off 0,40 může vést k falešně pozitivním výsledkům u hyperglykemických pacientů a falešně negativním výsledkům u normoglykemických a hypoglykemických pacientů (Hegen H. et al., 2014). Kelbich našel u 65,6 % probandů ze skupiny kontrol ($n = 131$) Q_{glu} větší než horní referenční mez (Kelbich P. et al., 2013).

Zde je nutné také uvést, že na Q_{glu} může mít vliv také preanalytická fáze. Nedodržení rychlého doručení vzorku krve do laboratoře nebo odběru do zkumavky s vhodným antiglykolytikem může způsobit falešné snížení glykémie *in vitro* a zvýšení Q_{glu} (Dujmovic I., Deisenhammer F., 2010; Kelbich P. et al., 2013). Nicméně velmi obdobné nálezy křivky závislosti Q_{glu}

na glykémii v literatuře (Leen W. G. et al., 2012; Hegen H. et al., 2014), kde je deklarováno správné preanalytické zacházení, ukazují na rutinní výskyt takových hodnot Q_{glu} . Kromě toho byla hyperglykémie v tomto zkoumaném souboru velmi častá, na rozdíl od hypoglykémie.

Ze simulace vlivu hyperglykémie na glykorachii, Q_{glu} a KEB dle rovnic spojnic trendu je patrné, při malém rozsahu patologie může „normalizovat“ KEB již nižší hyperglykémie, u razantních zánětů až vysoká hyperglykémie (viz tab. č. 17 a komentář k ní). Při větší hyperglykémii ($\geq 10,0$ mmol/l) jsou hodnoty Q_{glu} „odvozené“ z rovnice spojnice trendu závislosti Q_{glu} na glykémii v kontrolním souboru významně nižší než Q_{glu} „vypočtené“ z dané glykémie a glykorachie odvozené z rovnice spojnice trendu závislosti glykorachie na glykémii (viz vysvětlivky k tabulce č. 17). Např. při glykémii 15,0 mmol/l a koncentraci laktátu v likvoru 1,5 mmol/l je Q_{glu} odvozené 0,29, zatímco Q_{glu} vypočtené 0,52. V grafu č. 13 (kontrolním souboru) se bodů s glykemií nad 8,0 mmol/l vyskytuje velmi málo a především jsou značně rozptýleny kolem spojnice trendu, křivka tak nemusí být exaktně proložena. V grafu č. 15 je bodů s vysokou glykemií stejný nedostatek, ale jsou daleko těsněji přilehlé ke spojnici trendu. Reálnější jsou tedy pravděpodobně Q_{glu} odvozené než vypočtené, tj. nižší hodnoty Q_{glu} (a vyšší glykorachie) při hyperglykémii (větší vliv hyperglykémie).

Zastoupení hyperglykémie není u jednotlivých patologických cytologických skupin stejné. Ve zkoumaném souboru bylo nejvyšší zastoupení hyperglykémie právě u skupin GP (67,0 %), TP (47,5 %) a TO (42,9 %), pravděpodobně vlivem závažnosti onemocnění spojených s těmito nálezy (stresová hyperglykémie, intenzivní infúzní terapie, případná dekompenzace diabetu). Právě u těchto skupin doprovázejících razantní zánět s oxidačním vzplanutím fagocytů jsou tedy hodnoty glykorachie, GLP, LGP i KEB ovlivněny nejvíce, resp. posun těchto parametrů do patologických hodnot je zmenšený vlivem hyperglykémie. U normoglykemických pacientů by tedy všechny tyto parametry diskriminovaly GP, TO a TP ještě lépe. Obdobně Kelbich našel u 15,7 % pacientů s prokázanou bakteriální purulentní meningitidou normální nebo zvýšenou glykorachii (Kelbich P. et al., 2013).

Vztahy mezi koncentrací laktátu a glukózy v plazmě a likvoru

Závislost mezi koncentrací laktátu v likvoru a glykorachii se nepotvrdila, jak v celém souboru dat ($r_s = 0,048$, $p < 0,0001$), a části se známou glykemií ($r_s = 0,229$, $p < 0,0001$), tak v kontrolní skupině ($r_s = 0,258$, $p = 0,0001$), viz grafy č. 16 až 18. V celém souboru dat (graf č. 16 a 17) je však v první polovině křivky naznačená korelace nízké glykorachie a vysoké koncentrace laktátu v likvoru, což odpovídá charakteristickému obrazu patologie v CNS, resp. právě razantnímu zánětu s oxidačním vzplanutím fagocytů. Pokud v celém souboru vybereme pouze

případy s hypoglykemií $< 1,5$ mmol/l ($n = 380$), je však závislost koncentrace laktátu v likvoru na glykémii nevýznamná ($r_s = -0,353$ při $p < 0,0001$, $R^2 = 15\%$), viz graf č. 19.

Závislost koncentrace laktátu v likvoru na koncentraci v plazmě (tedy možný zvýšený prostup přes HLB při hyperlaktémii) v souboru všech výsledků se známou laktémií ($n = 1\,979$) se také neprokázala (viz graf č. 20), $r_s = 0,180$ při $p < 0,0001$. Korelace se sice významně liší od nuly ($p < 0,0001$) vzhledem k velikosti porovnávaných souborů, z uspořádání dat v grafu je však zřejmé, že se mezi nimi žádná zřetelná závislost nevyskytuje. Tento závěr je v souladu s literárními zdroji, které uvádějí, že koncentrace laktátu v likvoru není závislá na koncentraci v plazmě (Zima T. et al., 2007; Huy N. T. et al., 2010).

8 Závěry

Cílem této práce bylo prozkoumat vzájemný vztah biochemického a cytologického nálezu v likvoru ve velkém souboru dat. Závěry lze shrnout do následujících bodů:

1. Hodnoty KEB byly statisticky významně odlišné (nižší) u skupin GP a TO+TP oproti ostatním cytologickým skupinám. Rozdíl hodnot KEB skupiny TP oproti kontrolní skupině se ještě zvýraznil po rozdělení společné skupiny TO+TP na samostatné skupiny. GP, TO a TP jsou cytologické třídy typicky doprovázející purulentní zánět nebo nádorové postižení v oblasti související s likvorovým kompartmentem, tedy procesy, u nichž je v imunitní reakci důraz na aktivaci fagocytů a potenciaci oxidačního vzplanutí. Dalšími skupinami s třetím a čtvrtým nejvyšším zastoupením nízkých hodnot KEB byly MP a LP. Tyto cytologické skupiny mohou doprovázet případy infekce potenciálními intracelulárními patogeny taktéž s aktivací fagocytózy a oxidačního vzplanutí. Primární alternativní hypotéza byla v tomto velkém souboru dat tedy jednoznačně potvrzena s vysokou statistickou významností. Tím byla také potvrzena souvislost mezi změnami biochemických energetických parametrů a cytologických nálezů.
2. Vzhledem k nedostatečnému relativnímu zastoupení hodnot KEB pod cut-off 10,0 (15,0) v těchto skupinách (nedosahuje 100 % ani ve skupině GP, kde byly nalezeny také mírně patologické i normální hodnoty), nelze však pomocí KEB diagnózu těchto vážných onemocnění vyloučit s jistotou (rule-out). Nicméně nález významného posunu hodnot KEB zřetelně odlišuje případy, kdy jsou tato onemocnění velmi suspektní, a je třeba s nimi v diferenciální diagnostice počítat (rule-in). Další studie potvrzující senzitivitu, specificitu a prediktivní hodnoty KEB pro jednotlivá onemocnění jsou však nezbytné.
3. KEB byl podroben detailnímu rozboru. Dobře diferencuje různé cytologické obrazy, resp. patofyziologické situace, nicméně v jeho odvození a výkladu jsou zjednodušení a nesrovnalosti pomíjející komplexitu vztahů energetického metabolismu v CNS. Především za akutních situací s oxidačním vzplanutím fagocytů základní axiomy odvození a výkladu KEB neplatí, uplatňuje se řada dalších faktorů, a KEB, spíše než počet molekul ATP produkovaných z jedné molekuly glukózy, určuje aktuální proporcí mezi spotřebou glukózy, dodávkou glukózy z krve a produkcí laktátu v likvorovém prostoru a tkáni CNS přilehlé (v difúzní vzdálenosti). Laktát není jen odpadním produktem anaerobní glykolýzy, je produkován i spotřebováván také za dostatku kyslíku. Metabolismus laktátu je komplexní, změny jeho koncentrace mohou nastat z mnoha příčin. Není jen ukazatelem dostupnosti kyslíku, ale indikátorem aktuálního metabolického stavu buňky.

4. Další energetické parametry, resp. LGP, GLP a izolovaná koncentrace laktátu v likvoru odlišují cytologické skupiny GP a TO+TP od kontrolní skupiny i všech ostatních skupin stejně jako KEB. Hodnoty GLP i LGP odpovídaly cut-off definovanému Hanzalem (Hanzal F. et al., 1963). KEB však proti všem ostatním energetickým parametrům dosáhl zdaleka největšího rozpětí hodnot (od normy až po silně negativní hodnoty). To je dáno vzorcem pro výpočet KEB, který vlastní LGP násobí (18x zvyšuje rozsah změn) a následně odečítá. Vzhledem k tomuto reálnému rozpětí hodnot může KEB stratifikovat mezi vrstvami patologického vychýlení (serózní zánět vs. oxidační vzplanutí fagocytů) senzitivněji a názorněji než všechny ostatní srovnávané parametry.
5. Izolovaná glykorachie dosáhla nejhorších výsledků, jak v analýze shody distribučních funkcí a distribuční analýze, tak v rozsahu rozdílů mediánů patologických skupin proti kontrolní skupině. U tohoto jediného parametru byl trend rozdílu oběma směry (pokles i vzestup hodnot proti kontrolní skupině), což je evidentně dáno ovlivněním glykorachie hyperglykemií. Největší rozdíly mediánů byly u izolované koncentrace laktátu v likvoru, vyjma skupiny GP, kde ještě většího nárůstu oproti kontrolní skupině dosáhl LGP.
6. Diskriminační analýza ukázala, že ačkoliv se většina srovnávaných dvojic ve všech parametrech statisticky významně liší, při detailním pohledu všechny posuzované energetické parametry bez výjimky nerozdělují hodnoty do správných cytologických skupin příliš dobře, resp. velká část hodnot se mezi skupinami neliší natolik, aby byly zařazeny správně. Nejlépe diskriminujícím energetickým parametrem (nejčastěji rozřazujícím hodnoty správně mezi jednotlivými dvojicemi cytologických skupin) byl GLP. Ovlivnění glykorachie hyperglykemií s velkou pravděpodobností zhoršilo diskriminaci hodnot jak LGP, tak KEB.
7. Byla prokázána závislost glykorachie na glykémii (lineární) a ještě těsnější závislost Q_{glu} na glykémii (nelineární). Křivka závislosti Q_{glu} na glykémii je strmější v oblasti hypoglykémie a normoglykémie, tedy ve značné části souboru. Reálné hodnoty Q_{glu} u normoglykemických probandů byly vyšší než udávaná horní referenční mez Q_{glu} , pokles glykémie již v oblasti normoglykémie, tj. pod 5,6 mmol/l potenciálně mohl maskovat pokles Q_{glu} vlivem patologického procesu. Naopak vzestup glykémie nad cca 8,5 mmol/l způsobil vzestup glykorachie nad normu, tedy mohl maskovat pokles glykorachie vlivem patologického procesu, anebo naopak imitovat patologii poklesem Q_{glu} .
8. Hyperglykémie se vyskytovala cca u třetiny souboru se známou glykemií, v nejvyšším zastoupení u skupin GP, TP a TO. Právě u těchto skupin nejčastěji doprovázejících razantní zánět s oxidačním vzplanutím fagocytů jsou tedy hodnoty energetických parametrů

ovlivněny hyperglykemií nejvíce. Změny glykémie ovlivňují všechny parametry obsahující glykorachii, včetně KEB, a omezují efektivitu těchto parametrů pro diagnostiku patologie v tkáni CNS přilehlé likvorovým cestám. Při interpretaci je tedy vhodné znát aktuální glykémii a adjustovat na ni cut-off.

9. Závislost mezi koncentrací laktátu v likvoru a glykorachii nebyla prokázána jak v celém souboru, tak v kontrolním souboru. Závislost koncentrace laktátu v likvoru na koncentraci v plazmě (tedy možný zvýšený prostup přes HLB při hyperlaktatémii) v souboru všech výsledků se známou laktatemií se také neprokázala.

Výsledky práce významným způsobem potvrdily kruciální potřebu cyto-energetického principu interpretace likvorologických výsledků již na úrovni základního vyšetření likvoru.

9 Citovaná literatura

1. Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E. et al., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*, 37(1), 13-25.
2. Abro A. H., Abdou A. S., Ustadi A. M. et al., 2009. CSF lactate level: a useful diagnostic tool to differentiate acute bacterial and viral meningitis. *J Pak Med Assoc*, 59(8), 508-511.
3. Adam P., Táborský L., Sobek O. et al., 2001. Cerebrospinal fluid, 1st ed. *Adv Clin Chem*, 1-62.
4. Adam P., Sobek O., Táborský L. et al., 2003. Complete proteinogram of cerebrospinal fluid and its contribution to the diagnostics of inflammatory and autoimmune diseases of the central nervous system. *Sb Lek.*, 104(1), 1-12.
5. Adam P., Táborský L., Sobek O. et al., 2003. *Cytology of cerebrospinal fluid*, 1st ed. Praha: Medica News Publishers.
6. Adiko A. C., Babdor J., Gutiérrez-Martínez E. et al., 2015. Intracellular transport routes for MHC I and their relevance for antigen cross-presentation. *Front Immunol*, 6, 335, doi: 10.3389/fimmu.2015.00335.
7. Albers R. W., Siegel G. J., Xie Z. J., 2012. Membrane transport. In: *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical neurobiology*, 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 40-63.
8. Amaral A. J., Teixeira A. P., Sonnewald U. et al., 2011. Estimation of intracellular fluxes in cerebellar neurons after hypoglycemia: importance of the pyruvate recycling pathway and glutamine oxidation. *J Neurosci Res*, 89(5), 700-710.
9. Amaral A. L., Hadera M. G., Tavares J. M. et al., 2016. Characterization of glucose-related metabolic pathways in differentiated rat oligodendrocyte lineage cells. *Glia*, 64(1), 21-34.
10. Attwell D., Laughlin B., 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21(10), 1133-1145.
11. Aulická Š., Česká K., Ošlejšková H., 2018. Syndrom GLUT-1 deficiencie – expandující klinické spektrum léčitelného onemocnění. *Cesk Slov Neurol*, 114(2), 171-173.
12. Bak L. K., Schousboe A., Waagepetersen H. S., 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*, 98(3), 641-653.
13. Bartoš A., Čechová L., Švarcová J. et al., 2012. Likvorový triplet (tau proteiny a beta-amyloid) v diagnostice Alzheimerovy-Fischerovy nemoci. *Cesk Slov Neurol N*, 75/108(5), 587-594.
14. Baud M. O., Vitt J. R., Robbins N. M. et al., 2017. Pleocytosis is not fully responsible for low CSF glucose in meningitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 22(5), 1-8.
15. Béard E., Braissant O., 2010. Synthesis and transport of creatin in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem*, 115, 297-313.
16. Bednářová J., Adam P., 2002. Likvorový profil u roztroušené sklerózy mozkomíšni. *Neurol prax*, 5, 249-251.

17. Bélanger M., Yang J., Petit J. M. et al., 2011. Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection. *J Neurosci*, 31(50), 18338-18352.
18. Belkouch M., Hachem M., Elgot A. et al., 2016. The pleiotropic effects of omega-3 docosahexaenoic acid on the hallmarks of Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*, 38, 1-11.
19. Benson M., Caligiuri M. A., 2014. Killer immunoglobulin-like receptors and tumor immunity. *Cancer Immunol Res*, 2(2), 99-104.
20. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L., 2002. *Biochemistry, 5th ed.* New York: WH Freeman.
21. Berger J. R., Koralnik I. J., 2005. Progressive multifocal leukoencephalopathy and natalizumab-unforeseen consequences. *N Engl J Med*, 353(4), 414-416.
22. Bergersen H. L., 2015. Lactate transport transport and signaling in the brain: potential therapeutic targets and roles in body-brain interaction. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35(2), 176-185.
23. Bharadwaj S., Venkatraghavan L., Mariappan R. et al., 2015. Serum lactate as a potential biomarker of non-glioma brain tumors. *J Clin Neurosci*, 22(10), 1625-1627.
24. Biswas S. K., Mantovani A., 2012. Orchestration and metabolism of macrophages. *Cell Metab*, 15(4), 432-437.
25. Bořecká K., Adam P., Sobek O. et al., 2013. Coefficient of energy balance: effective tool for early differential diagnosis of CNS diseases. *Biomed Res Int*, 2013, e745943, doi: 10.1155/2013/745943.
26. Bouzat P., Sala N., Suys T. et al., 2014. Cerebral metabolic effects of exogenous lactate supplementation on the injured human brain. *Intensive Care Med*, 40, 412-421.
27. Brooks G. A., 2018. The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metab*, 27(4), 757-785.
28. Brown A. M., 2004. Brain glycogen re-awakened. *J Neurochem*, 89(3), 537-552.
29. Busiello R. A., Savarese S., Lombardi A., 2015. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front Physiol*, 6, 36, doi: 10.3389/fphys.2015.00036.
30. Busl K. M., Greer D. M., 2010. Hypoxic-ischemic brain injury: pathophysiology, neuropathology and mechanisms. *NeuroRehabilitation*, 26(1), 5-13.
31. Butterworth R. F., 2006. Metabolic encephalopathies. In: *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. 7th ed.* Philadelphia: Lippincott-Raven.
32. Byrne C. S., Chambers E. S., Morrison D. J. et al., 2015. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *Int J Obes*, 29(9), 1331-1338.
33. Cadenas S., 2018. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1859(9), 940-950.
34. Cerdán S., 2017. Twenty-seven years of cerebral pyruvate recycling. *Neurochem Res*, 42(6), 1621-1628.

35. De Feyter H. M., Mason G. F., Shulman G. I. et al., 2013. Increased brain lactate concentrations without increased lactate oxidation during hypoglycemia in type 1 diabetes individuals. *Diabetes*, 62(9), 3075-3080.
36. Deisenhammer F., Bartos A., Egg R. et al., 2011. Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis. In: *European handbook of neurological management: volume 1, 2nd ed.* Singapore: Wiley-Blackwell Publishing Ltd., 5-19.
37. Díaz-García C. M., Yellen G., 2019. Neurons rely on glucose rather than astrocytic lactate during stimulation. *J Neurosci Res*, 97(8), 883-889.
38. Dienel G. A., Cruz N. F., 2003. Neighborly interaction of metabolically-active astrocytes in vivo. *Neurochem Int*, 43(4-5), 339-354.
39. Dienel G. A., 2017. The metabolic trinity, glucose-glycogen-lactate, links astrocytes and neurons in brain energetics, signaling, memory, and gene expression. *Neurosci Lett*, 637, 18-25.
40. Dienel G. A., 2018. Brain glucose metabolism: integration of energetics with function. *Physiol Rev*, 99, 949-1045.
41. Dienel, G. A., 2019. Does shuttling of glycogen-derived lactate from astrocytes to neurons take place during neurotransmission and memory consolidation?. *J Neurosci Res*, 97, 863-882.
42. Divakaruni A. S., Brand M. D., 2011. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology*, 26(3), 192-205.
43. Doležal M. et al., 2016. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Praha: Karolinum.
44. Domenech-Estevéz E., Baloui H., Repond C. et al., 2015. Distribution of monocarboxylate transporters in the peripheral nervous system suggest putative roles in lactate shuttling and myelination. *J Neurosci*, 35(10), 4151-4156.
45. Drake Ch. G, Jaffee E., Pardoll D. M., 2006. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*, 90, 51-81.
46. Dringen R., Hoepken H. H., Minich T. et al., 2007. Pentose phosphate pathway and NADPH metabolism. In: *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Brain energetics integration of molecular and cellular processes*. Berlin: Springer-Verlag, 41-62.
47. Dubos F., Lamotte B., Bibi-Triki F. et al., 2006. Clinical decision rules to distinguish between bacterial and aseptic meningitis. *Arch Dis Child*, 91, 647-650.
48. Dujmovic I., Deisenhammer F., 2010. Stability of cerebrospinal fluid/serum glucose ratio and cerebrospinal fluid lactate concentrations over 24 h: analysis of repeated measurements. *Clin Chem Lab Med*, 48(2), 209-212.
49. Duran J., Saez I., Gruart A. et al., 2013. Impairment in long-term memory formation and learning-dependent synaptic plasticity in mice lacking glycogen synthase in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(4), 550-556.

50. Elfeber K., Köhler A., Lutzenburg M. et al., 2004. Localization of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. *Histochem Cell Biol*, 121(3), 201-207.
51. Elustondo P. A., White A. E., Hughes M. E. et al., 2013. Physical and functional association of lactate dehydrogenase (LDH) with skeletal muscle mitochondria. *J Biol Chem*, 288, 25309-25317.
52. Emre Y., Nübel T., 2009. Uncoupling protein UCP2: when mitochondrial activity meets immunity. *FEBS Lett*, 584(8), 1437-1442.
53. Enerson B. R., Drewes L., 2006. The rat blood brain barrier transcriptome. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(7), 959-973.
54. Erecinska M., Cherian S., Silver I. A., 2007. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol*, 73(6), 397-445.
55. Felgenhauer K., 1998. Laboratory of neurological diseases. In: *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1308-1326.
56. Ferrari T. C, Gazzinelli G., Corrêa-Oliveira R., 2008. Immune response and pathogenesis of neuroschistosomiasis mansoni. *Acta Trop*, 108(2-3), 83-88.
57. Ferreira L. G., 2013. Role of the phosphocreatine system on energetic homeostasis in skeletal and cardiac muscles. *Einstein*, 12(1), 126-131.
58. Forman H. J., Torres M., 2002. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Resp Crit Care Med*, 166(12), S4-8.
59. Freeman S. A., Grinstein S., 2014. Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol Rev*, 262(1), 193-215.
60. Galea I., Bechmann I., Perry V. H., 2007. What is immune privilege (not)?. *Trends Immunol*, 28(1), 12-18.
61. Gallagher C. N., Carpenter K. L., Grice P. et al., 2009. The human brain utilizes lactate via the tricarboxylic acid cycle: a 13C-labelled microdialysis and high-resolution nuclear magnetic resonance study. *Brain*, 132(10), 2839-2849.
62. Gandhi G. K, Cruz N. F., Ball K. K. et al., 2009. Astrocytes are poised for lactate trafficking and release from activated brain and for supply of glucose to neurons. *J Neurochem*, 111(2), 522-536.
63. Gladden L. B., 2004. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millenium. *J Physiol*, 558 (Pt 1), 28-31.
64. Gordon S., Taylor P. R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5(12), 953-964.
65. Gruetter R., 2003. Glycogen: the forgotten cerebral energy store. *J Neurosci Res*, 74(2), 179-183.
66. Hajduková L., Sobek O., Prchalová D. et al., 2015. Biomarkers of brain damage: S100B and NSE concentrations in cerebrospinal fluid - a normative study. *Biomed Res Int*, 2015, e379071, doi: 10.1155/2015/379071.

67. Hale T., 2008. History of developments in sport and exercise physiology: A. V. Hill, maximal oxygen uptake, and oxygen debt. *J Sports Sci*, 26(4), 365-400.
68. Halestrap A. P., 2012. The monocarboxylate transporter family - structure and functional characterization. *IUBMB Life*, 64(1), 1-9.
69. Hanzal F., Skaličková O., Viklický J., 1963. *Mozkomíšní mok v klinické a laboratorní praxi*. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství.
70. Hanzal F., 1955. Glucolactic quotient of the cerebrospinal fluid. *Neurol Psychiatr Českoslov*, 18, 107-113.
71. Hawkins B. T., Davis T. P., 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, 57(2), 173-185.
72. Hejčl A., Kelbich P., Bolcha M. et al., 2013. Význam a možnosti vyšetřování metabolismu mozku pomocí mikrodialýzy v neurointenzivní péči. *Klin Biochem Metab*, 21(42), 13-20.
73. Hegen H., Auer M., Deisenhammer F., 2014. Serum glucose adjusted cut-off values for normal cerebrospinal fluid/serum glucose ratio: implications for clinical practice. *Clin Chem Lab Med*, 59(9), 1335-1340.
74. Herrero-Mendez A., Almeida A., Fernández E. et al., 2009. The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh I. *Nat Cell Biol*, 11(6), 747-752.
75. Hertz L., Xu J., Song D. et al., 2015. Astrocytic glycogenolysis: mechanisms and functions. *Metab Brain Dis*, 30(1), 317-333.
76. Hertz L., Peng L., Dienel G. A., 2007. Energy metabolism in astrocytes: high rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(2), 219-249.
77. Holeček M., 2006. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada Publishing, a.s.
78. Hořejší V., 2015. Makrofágy jako pomocníci nádorů. *Vesmír* 94, 2, 319.
79. Howell W. M., 2013. HLA and disease: guilt by association. *Int J Immunogenet*, 41(1), 1-12.
80. Huy N. T., Thao N. T., Diep D. T. et al., 2010. Cerebrospinal fluid lactate concentration to distinguish bacterial from aseptic meningitis: a systemic review and meta-analysis. *Crit Care*, 14(6), 240, doi: 10.1186/cc9395.
81. Chapel H., Haeney M., Misbach S. et al., 2018. *Základy klinické imunologie, 6. vyd.* Praha: Triton.
82. Chatham J. C., Des Rosiers C., Forder J. R., 2001. Evidence of separate pathways for lactate uptake and release by the perfused rat heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 281(4), e794-802, doi:10.1152/ajpendo.2001.281.4.E794.
83. Chin Ch. P., Roberts E. L., 2003. Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(11), 1263-1281.

84. Chow E., Troy S. B., 2014. The differential diagnosis of hypoglycorrhachia in adult patients. *Am J Med Sci*, 348(3), 186-190.
85. Chow S. L., Rooney Z. J., Cleary M. A. et al., 2005. The significance of elevated CSF lactate. *Arch Dis Child*, 90(11), 1188-1189.
86. Ichai C., Armando G., Orban J. C. et al., 2009. Sodium lactate versus mannitol in the treatment of intracranial hypertensive episodes in severe traumatic brain-injured patients. *Intensive Care Med*, 35, 471-479.
87. Irani D. N., 2009. *Cerebrospinal fluid in clinical practise*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
88. Italiani P., Boraschi D., 2014. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol*, 5, 514, doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.
89. Jacobs R. A., Meinild A. K., Nordsborg N. B. et al., 2013. Lactate oxidation in human skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304(7), e686-689, doi: 10.1152/ajpendo.00476.2012.
90. Jansen T. C., van Bommel J., Schoonderbeek F. J. et al., 2010. Early lactate-guided therapy in intensive care unit patients: a multicenter, open-label, randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 182(6), 752-761.
91. Jílek P., 2008. *Základy imunologie, 2. přepracované vyd.* Praha: Anyway.
92. John S., Weiss J. N., Ribalet B., 2011. Subcellular localization of hexokinases I and II directs the metabolic fate of glucose. *PLoS ONE*, 6(3), e17674, doi: 10.1371/journal.pone.0017674.
93. Joseph J., Gibson G. E., 2007. Coupling of neuronal function to oxygen and glucose metabolism through changes in neurotransmitter dynamics as revealed with aging, hypoglycemia and hypoxia. In: *Handbook of neurochemistry and molecular biology, 3rd ed.* New York: Springer, 297-320.
94. Kala M., Mareš J., 2008. *Lumbální punkce a mozkomíšní mok, 1. vyd.* Praha: Galén.
95. Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessel T. M., 2000. *Principles of neural science, 4th ed.* New York: McGraw-Hill.
96. Kane D. A., 2014. Lactate oxidation at the mitochondria: a lactate-malate-aspartate shuttle at work. *Front Neurosci*, 8(366), 366, doi: 10.3389/fnins.2014.00366.
97. Kaplan M. H., Hufford M. M., Olson M. R., 2015. The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol*, 15(5), 295-307.
98. Kelbich P., Slavík S., Jasanská J. et al., 1998. Hodnocení energetických poměrů v likvorovém kompartmentu pomocí vyšetřování vybraných parametrů metabolismu glukosy v CSF. *Klin Biochem Metab*, 6(27), 213-225.
99. Kelbich P., Koudelková M., Machová H. et al., 2007. Význam urgentního vyšetření mozkomíšního moku pro včasnou diagnostiku neuroinfekcí. *Klin mikrobiol inf lék*, 13(1), 9-20.
100. Kelbich P., Adam P., Sobek O. et al., 2009. Základní vyšetření likvoru v diagnostice postižení centrálního nervového systému. *Neurol prax*, 10(5), 266-270.

101. Kelbich P., Hejčl A., Procházka J. et al., 2012. Cytologie a energetika jako důležité atributy vyšetření likvoru. *Klin Biochem Metab*, 20(41), 17-24.
102. Kelbich P., Hejčl A., Procházka J. et al., 2013. Buněčnost likvoru, energetické poměry v likvorovém kompartmentu a intenzita zánětlivé odpovědi v centrálním nervovém systému. *Klin Biochem Metab*, 21(42), 6-12.
103. Kelbich P., Hejčl A., Krulichová I. S. et al., 2014. Coefficient of energy balance, a new parameter for basic investigation of the cerebrospinal fluid. *Clin Chem Lab Med*, 52(7), 1009-1017.
104. Kelbich P., 2015. *Principy neurochirurgické a neurointenzivistické likvorologie*. Disertační práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové.
105. Kelbich P., Hejčl A., Staněk I. et al., 2017. Principles of the cytological-energy analysis of the extravascular body fluids. *Biochem Mol Biol J*, 3(1:6), 1-3.
106. Kido Y., Tamai I., Okamoto M. et al., 2000. Functional clarification of MCT1-mediated transport of monocarboxylic acids at the blood-brain barrier using in vitro cultured cells and in vivo BUI studies. *Pharm Res*, 17(1), 55-62.
107. Kiss J. P., 2000. Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res Bull*, 52(6), 459-466.
108. Kluge H., 2007. *Atlas of CSF cytology*. Stuttgart; New York: GeorgThieme Verlag.
109. Knudsen G. M., Paulson O. B., Hertz M. M., 1991. Kinetic analysis of the human blood-brain barrier transport of lactate and its influence by hypercapnia. *J Cereb Blood Flow Met*, 11(4), 581-586.
110. Konsman J. P., Drukarch B., Van Dam A. M., 2007. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci*, 112(1), 1-25.
111. Koolman J., Roehm K. H., 2005. *Color atlas of biochemistry, 2nd ed*. New York: Thieme.
112. Krejsek J., Andrýs C., Krčmová I., 2016. *Imunologie člověka, 1. vyd*. Hradec Králové: Garamon s.r.o.
113. Lamers K. J. B., Wevers R. A., 1995. Cerebrospinal fluid diagnostics: biochemical and clinical aspects. *Klin Biochem Metab*, 24(2), 63-75.
114. Larsen J. M., Martin D. R., Byrne M. E., 2014. Recent advances in delivery through the blood-brain barrier. *Curr Top Med Chem*, 14(9), 1148-1160.
115. Latha T. S., Reddy M. C., Durbaka P. R. et al., 2014. $\gamma\delta$ T cell-mediated immune responses in disease and therapy. *Front Immunol*, 5, 571, doi: 10.3389/fimmu.2014.00571.
116. Lauritzen K. H., Morland C., Puchades M. et al., 2014. Lactate receptor sites link neurotransmission, neurovascular coupling, and brain energy metabolism. *Cereb Cortex*, 24(10), 2784-2795.
117. Leen W. G., Willemsen M. A., Wevers R. A. et al., 2012. Cerebrospinal fluid glucose and lactate: age-specific reference values and implications for clinical practice. *PLoS ONE*, 7(8), e42745, doi: 10.1371/journal.pone.0042745.

118. Lei E., Vacy K., Boon W. C., 2016. Fatty acids and their therapeutic potential in neurological disorders. *Neurochem*, 95, 75-84.
119. Lieberman M. A., Peet A., 2014. *Marks' essentials of medical biochemistry*. Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS.
120. Liebner S., Corada M., Bangsow T. et al., 2008. Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood brain barrier. *J Cell Biol*, 183(3), 409-417.
121. Locasale J. W., Cantley L. C., 2010. Altered metabolism in cancer. *BMC Biology*, 8, 88, doi: 10.1186/1741-7007-8-88.
122. Lorenz M., Wessler S., Follmann E. et al., 2003. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J Biol Chem*, 279(7), 6190-6195.
123. Magisretti P. L., Allaman I., 2018. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci*, 19, 235-242.
124. Mahadevan S., Shankar S. K., Satishchandra P. et al., 2007. Characterization of human immunodeficiency virus (HIV)-infected cell in infiltrates associated with CNS opportunistic infection in patients with HIV clade infection. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66(9), 799-808.
125. Malik P., McKenna M. C., Tildon J. T. et al., 1993. Regulation of malate dehydrogenases from neonatal, adolescent and mature rat brain. *Neurochem Res*, 18(3), 247-257.
126. Malipiero U., Koedel U., Pfister H. W. et al., 2006. TGFbeta receptor II gene deletion in leucocytes prevents cerebral vaskulitis in bacterial meningitis. *Brain*, 129(Pt 9), 2404-2415.
127. Mangia S., Simpson I. A., Vannucci S. J. et al., 2009. The in vivo neuron-to astrocyte lactate shuttle in human brain: evidence from modeling of measured lactate levels during visual stimulation. *J Neurochem*, 109 (Suppl. 1), 55-62.
128. Matěj R., Nováková J., Fiala J. et al., 2008. Vyšetřování proteinu 14-3-3 v mozkomíšním moku – klinicko-patologická korelace. *Cesk Slov Neurol N*, Svazek 71/104(6), 695-699.
129. Mathiisen T. M., Lehre K. P., Danbolt N. C. et al., 2010. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*, 58(9), 1094-1103.
130. Mathupala S. P., Ko Y. H., Pedersen P. L., 2006. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both. *Oncogene*, 25(34), 4777-4786.
131. McKenna M. C., Gruetter R., Sonnewald U. et al., 2006. Energy metabolism of the brain. In: *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects, 7th ed*. Philadelphia: Elsevier, Inc., 531-557.
132. Michelucci A., Heurtaux T., Grandbarbe L. et al., 2009. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: effects of oligomeric and fibrillar amyloid-. *J Neuroimmunol*, 210(1-2), 3-12.

133. Mills C. D., 2012. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. *Crit Ref Immunol*, 32(6), 463-488.
134. Mosienko V., Teschemacher A. G., Kasparov S., 2015. Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain?. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35(7), 1069-1075.
135. Mosser D. M., Edwards P. E., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8(12), 958-969.
136. Mrázová K., Zeman D., Bořecká K. et al., 2017. Doporučení k vyšetřování mozkomíšního moku. *Klin Biochem Metab*, 25(46), 43-47.
137. Mudasir M., Wani W. A., Malik M. A. et al., 2018. Cerebrospinal fluid lactate: a differential biomarker for bacterial and viral meningitis in children. *J Pediatr*, 94, 88-92.
138. Muldoon L. L., Alvarez J. I., Begley D. J. et al., 2013. Immunologic privilege in the central nervous system and the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(1), 13-21.
139. Murray R. K., Granner D. K., 2006. *Harper's illustrated biochemistry, 27th international ed.* DeSoto: McGraw-Hill Publishing Company.
140. Murray R. K., 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie. 5. české vyd.* Praha: Galén.
141. Nabben N., Hoeks J., Moonen-Kornips E. et al., 2011. Significance of uncoupling protein 3 in mitochondrial function upon mid- and long-term dietary high-fat exposure. *FEBS Lett*, 585 (24), 4010-4017.
142. Nag S., Begley D. J., 2005. Blood-brain barrier, exchange of metabolites and gases. In: *Pathology and genetics. Cerebrovascular diseases.* Basel: Neuropath Press, 22-29.
143. Nauseef, W. M., 2014. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cell Microbiol*, 16(8), 1146-1155.
144. Nelson D. L., Cox M. M., 2013. *Lehninger principles of biochemistry, 6th ed.* New York: W. H. Freeman & Co Ltd.
145. Newman L. A., Korol D. L., Gold P. E., 2011. Lactate produced by glycogenolysis in astrocytes regulates memory processing. *PLoS One*, 6(12), e28427, doi: 10.1371/journal.pone.0028427.
146. Nigrovic L. E., Kuppermann N., Macias C. G. et al., 2007. Clinical prediction rule for identifying children with cerebrospinal fluid pleocytosis at very low risk of bacterial meningitis. *JAMA*, 297, 52-60.
147. Nigrovic L. E., Kimia A. A., Shah S. S. et al., 2012. Relationship between cerebrospinal fluid glucose and serum glucose. *N Engl J Med*, 366(6), 576-578.
148. Nübel T., Ricquier D., 2006. Respiration under control of uncoupling proteins: clinical perspective. *Horm Res*, 65(6), 300-310.
149. Ohtsuki S., Tachikawa M., Takanaga H. et al., 2002. The blood-brain barrier creatine transporter is a major pathway for supplying creatine to brain. *J Cereb Blood Flow Met*, 22(11), 1327-1335.
150. Pandey P., Jha B., 2015. Cytological and biochemical profile of cerebrospinal fluid from meningitis patients. *ACCLM*, 1(1), 2-5.

151. Panov A., Orynbayeva Z., Vavilin V. et al., 2014. Fatty acids is energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int*, 2014, e472459, doi: 10.1155/2014/472459.
152. Pavlidis N., 2004. The diagnostic and therapeutic management of leptomenigeal carcinomatosis. *Ann Oncol*, 15(Suppl 4), 285-291.
153. Pecqueur C., Alves-Guerra M. C., Gelly C. et al., 2001. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem*, 276, 8705-8712.
154. Pedersen T. H., Nielsen O. B., Lamb G. D. et al., 2004. Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science*, 305(5687), 1144-1147.
155. Pechnadová K., Buzková H., Slanař O. et al., 2006. Efluxní transmembránový transportér – P-glykoprotein. *Klin Biochem Met*, 14(35), 196-201.
156. Pellerin L., Jenks J. A., Bégin P. et al., 2014. Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy. *Immunol Res*, 58(0), 358-368.
157. Pellerin L., 2003. Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int*, 43(4-5), 331-338.
158. Petersdorf R. G., Harter D. H., 1961. The fall in cerebrospinal fluid sugar in meningitis: some experimental observation. *Arch Neurol*, 4, 21-30.
159. Piřha J., 2014. Bariéry nervového systému za fyziologických a patologických stavů. *Cesk Slov Neurol N*, 77/110(5), 553-559.
160. Powers W. J., 1981. Cerebrospinal fluid to serum glucose ratios in diabetes mellitus and bacterial meningitis. *Am J Med*, 71(2), 217-220.
161. Prasad S., Sajja R. K., Naik P. et al., 2014. Diabetes mellitus and blood-brain barrier dysfunction: an overview. *J Pharmacovigil*, 2(2), 125.
162. Proia P., Di Liegro C. M., Schiera G. et al., 2016. Lactate as a metabolite and regulator in the central nervous system. *Int J Mol Sci*, 17(9), e1450, doi: 10.3390/ijms17091450.
163. Quistorff B., Secher N. H., Van Lieshout J. J., 2008. Lactate fuels the human brain during exercise. *FASEB J*, 22(10), 3443-3449.
164. Racek J., Eiselt J., Holeček V. et al., 1999. *Klinická biochemie, 1. vyd.*. Praha: Galén - Karolinum.
165. Rajs G., Finzi-Yeheskel Z., Rajs A. et al., 2002. C-reactive protein concentrations in cerebral spinal fluid in gram-positive and gram-negative bacterial meningitis. *Clin Chem*, 48(3), 591-592.
166. Ramond E., Jamet A., Coureuil M. et al., 2019. Pivotal role of mitochondria in macrophage response to bacterial pathogens. *Front Immunol*, 10, 2461, doi: 10.3389/fimmu.2019.02461.
167. Rao K. V. R., Norenberg M. D., 2012. Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy. *Neurochemistry International*, 60(7), 697-706.

168. Rasmussen P., Wyss M. T., Lundby C., 2011. Cerebral glucose and lactate consumption during cerebral activation by physical activity in humans. *The FASEB Journal*, 25(9), 2865-2872.
169. Reiber H., 2001. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin. Chem. Acta*, 310, 173-186.
170. Rhee E. P., Thadhani R., 2011. New insights into uremia-induced alterations in metabolic pathways. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 20(6), 593-598.
171. Riske L., Thomas R. K., Baker G. B. et al., 2017. Lactate in the brain: an update on its relevance to brain energy, neurons, glia and panic disorder. *Ther Adv Psychopharmacol*, 7(2), 85-89.
172. Robers E. L. Jr., 2007. The support of energy metabolism in the central nervous system with substrates other than glucose. In: *Brain energetics integration of molecular and cellular processes*. Berlin: Springer-Verlag, 137-179.
173. Rogatzki M. J., Ferguson B. S., Goodwin M. L. et al., 2015. Lactate is always the end product of glycolysis. *Front Neurosci*, 9, 22, doi: 10.3389/fnins.2015.00022.
174. Romano A., Koczwara J. B., Gallelli C. A. et al., 2017. Fats for thoughts: an update on brain fatty acid metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*, 84, 40-45.
175. Sakushima K., Hayashino Y., Kawaguchi T. et al., 2011. Diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid lactate for differentiating bacterial meningitis from aseptic meningitis: a meta-analysis. *J Infect*, 62(4), 255-262.
176. Satrústegui J., Contreras L., Ramos M. et al., 2007. Role of aralar, the mitochondrial transporter of aspartate-glutamate, in brain N-acetylaspartate formation and Ca²⁺ signaling in neuronal mitochondria. *J Neurosci Res*, 85(15), 3359-3366.
177. Satrústegui J., Bak L. K., 2015. Fluctuation in cytosolic calcium regulate the neuronal malate-aspartate NADH shuttle: implications for neuronal energy metabolism. *Neurochem Res*, 40, 2425-2430.
178. Sečník P., Merta D., 2016. "Vše" o laktátu [online]. [cit. 5. 10. 2019]. Dostupné z: <http://www.akutne.cz>.
179. Seyfert S., Kunzmann V., Schwertfeger N. et al., 2002. Determinants of lumbar CSF protein concentration. *J Neurol*, 249(8), 1021-1026.
180. Shapiro N. I., Howell M. D., Talmor D. et al., 2005. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. *Ann Emerg Med*, 45(5), 524-528.
181. Shokrollahi M. R., Shabanzadeh K., Noorbakhsh S. et al., 2018. Diagnostic value of CRP, procalcitonin, and ferritin levels. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*, 18(1), 58-62.
182. Shrikanth V., Salazar L., Khoury N. et al., 2015. Hypoglycorrhachia in adults with community-acquired meningitis: etiologies and prognostic significance. *Int J Infect Dis*, 39, 39-43.
183. Schultz J. G., Laranjeira A., Van Huffel L. et al., 2015. Glial β -oxidation regulates drosophila energy metabolism. *Sci Rep*, 15(5), 7805, doi: 10.1038/srep07805.

184. Schurr A., 2006. Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate?. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(1), 142-152.
185. Slauch J. M., 2011. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria. *Mol Microbiol*, 80(3), 580-583.
186. Slavik V., Dolezal T., 2012. *Cerebrospinal fluid*. New York: Nova Science Publishers, Inc.
187. Sobek O., Adam P., Kelbich P. et al., 2009. Vyšetření likvoru - současné možnosti. *Neurol prax*, 10(5), 280-284.
188. Stettner A. I., Segrè D., 2004. The cost of efficiency in energy metabolism. *PNAS*, 110(24), 9629-9630.
189. Sun H. X., Zeng D. Y., Li R. T. et al., 2012. Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*, 60(6), 1407-1414.
190. Svatoňová J., Bořecká K., Adam P., 2014. Beta2-microglobulin as a diagnostic marker in cerebrospinal fluid: a follow-up study. *Dis Markers*, 2014, e495402, doi: 10.1155/2014/495402.
191. Šťourač P., Bednářová J., Čermáková Z., 2009. Význam cytologie mozkomíšního moku. *Neurol prax*, 10(5), 294-296.
192. Švachová V., 2013. *Subpopulace lidských monocytů a makrofágů*. Diplomová práce. Praha: Univerzita Karlova.
193. Tacheuki O., Akira S., 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
194. Tachikawa M., Fukaya M., Terasaki T. et al., 2004. Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases CK-Mi and CK-B suggest a novel neuronal relationship for brain energy homeostasis. *Eur J Neurosci*, 20(1), 144-160.
195. Tachikawa M., Hosoya K., 2011. Transport characteristics of guanidino compounds at the blood-brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier: relevance to neural disorders. *Fluids Barriers CNS*, 8(1), 13, doi: 10.1186/2045-8118-8-13.
196. Teunissen C. E., Petzold A., Bennett J. L. et al., 2009. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*, 73(22), 1914-1922.
197. Townsend K. L., Yu-Hua T., 2014. Brown fat fuel utilization and thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 25(4), 168-177.
198. Tung J. P., Fraser J. F., Wood P. et al., 2009. Respiratory burst function of ovine neutrophils. *BMC Immunol*, 10, 2, doi: 10.1186/1471-2172-10-25.
199. Underhill D. M., Goodridge H. S., 2012. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol*, 12(7), 492-502.
200. Van Hall G., Strømstad M., Rasmussen P. et al., 2009. Blood lactate is important energy source for the human brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29(6), 1121-1129.

201. Vemula S., Roder K. E., Yang T. et al., 2008. A functional role for sodium-dependent glucose transport across the blood-brain barrier during oxygen glucose deprivation. *J Pharmacol Exp Ther*, 328(2), 487-495.
202. Vengerov I., Nagibina M. V., Chentsov V. B. et al., 2008. Clinical implication of lactate-acidosis in purulent meningitis. *Ter Arkh*, 80(11), 33-36.
203. Viallon A., Botelho-Nevers E., Zeni F., 2016. Clinical decision rules for acute bacterial meningitis: current insights. *Open Access Emerg Med*, 8, 7-16.
204. Vincent S. R., 2008. Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Prog Neurobiol*, 90(2), 246-255.
205. Weinstein J., Varallyay C. G., Dosa E. et al., 2010. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: diagnostic magnetic resonance imaging and therapeutics in CNS pathology, a review. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30, 15-35.
206. Williams J. L., Holman D. W., Klein R. S., 2014. Chemokines in the balance: maintenance of homeostasis and protection at CNS barriers. *Front Cell Neurosci*, 8, 154, doi: 10.3389/fncel.2014.00154.
207. Wilson E. H., Weninger W., Hunter C. A., 2010. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest*, 120(5), 1368-1379.
208. Wilson J. E., 2003. Isoenzymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol*, 206, 2046-2057.
209. Wolburg H., Wolburg-Buchholz K., Engelhardt B., 2005. Diapedesis of mononuclear cell across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves the tight junctions intact. *Acta Neuropathol*, 109, 181-190.
210. Xiong Y., Peterson P. L., Lee C. P., 2001. Alterations in cerebral energy metabolism induced by traumatic brain injury. *Neurol Res*, 23(2-3), 129-138.
211. Yu I., Herman P., Rothman D. L. et al., 2018. Evaluating the gray and white matter energy budgets of human brain function. *J Cereb Blood Flow Metab*, 38(8), 1339-1353.
212. *Zdravotnická ročenka České republiky*, © 2018. Ústav zdravotnických informací a statistiky [online]. [cit. 26. 12. 2019]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz>.
213. Zima T. et. al., 2007. *Laboratorní diagnostika*, 2. vyd. Praha: Galén.