

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

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

MUDr. Klára Bořecká
2020

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: **Biochemie a patobiochemie**

Předseda oborové rady: **prof. MUDr. Libor Vítek, PhD., MBA**

Školící pracoviště: **Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky**

1. LF UK a VFN v Praze

Školitel: **MUDr. Lenka Fialová, CSc.**

Obsah

Obsah	2
1 Abstrakt	3
2 Abstract	4
3 Úvod	5
3.1 Metabolismus sacharidů v mozku.....	5
3.2 Imunitní reakce.....	6
3.3 Energetické parametry v likvoru.....	6
4 Hypotézy a cíle práce.....	8
5 Materiál a metodika	8
6 Výsledky.....	9
6.1 Hodnocení KEB ve vztahu k cytologickým skupinám	9
6.2 Srovnání KEB s dalšími energetickými parametry v likvoru.....	11
7 Diskuse	15
8 Závěry.....	18
9 Použitá literatura.....	19

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 (lactoglucose 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 glycorrachia 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 glycorrachia, glucose quotient (Q_{glu}) and CEB on glycaemia has been described. When interpreting energy parameters containing glycorrachia, 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 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

Vyšetření likvoru přispívá do rozhodovacího diagnosticko-terapeutického algoritmu onemocnění centrální nervové soustavy (CNS). Základní vyšetření, které by mělo být dostupné na celém území České republiky nepřetržitě (Sobek O. et al., 2009), je na samém počátku tohoto procesu. Nedílnou součástí urgentního vyšetření likvoru je stanovení parametrů energetického metabolismu glukózy a vyšetření cytologické. Energetické parametry významným způsobem doplňují cytologický obraz informací o aktuálním funkčním stavu přítomných buněk, výsledky biochemické a cytologické analýzy likvoru by měly být interpretovány současně (cyto-energetický princip) (Kelbich, 2015).

3.1 Metabolismus sacharidů v mozku

Lidský mozek je velmi náročný na dodávku energie a kyslíku. Glukóza je nepostradatelným energetickým substrátem dospělého mozku, ale také zdrojem uhlíkatého skeletu pro anabolické reakce. Glykolýza je hlavní cestou metabolismu glukózy, avšak cca 5 % glukózy je za bazálních podmínek metabolizováno pentózovým cyklem (PPP) bez vzniku ATP. PPP má vysokou aktivitu ve vyvíjejícím se mozku, zvýšená aktivita je také odpovědí na oxidační stres (Dringen R., 2007). Převážně v astrocytech je v malém množství přítomen glykogen, který je neustále rychle obnovován (Gruetter R., 2003). V mozku probíhají neustálé interakce mezi specializovanými typy buněk (Bélanger M., 2011).

V průběhu ontogenetického vývoje jsou využívány především jiné substráty než glukóza, dostupné z cirkulace. Také dospělý mozek za určitých okolností může využívat alternativní energetické substráty ve velké míře (Robers E. L. Jr., 2007). Laktát již není považován pouze za odpadní produkt anaerobní glykolýzy. Má velmi významnou roli v intermediárním metabolismu, slouží jako metabolický pufr, energetický substrát, v poslední době se diskutuje o signální a regulační úloze laktátu, který je chápán spíše jako hormon (Lauritzen K. H., 2014, Proia P. et al., 2016; Domenech-Estevéz E. et al., 2015; Schurr A., 2006).

3.2 Imunitní reakce

Buňky nespecifické imunity mají schopnost fagocytovat. Fylogeneticky mladší mechanismy nitrobuněčného zabíjení využívají kyslík pro tvorbu řady baktericidních reaktivních sloučenin kyslíku, chloru a dusíku v procesu zvaném oxidační (respirační) vzplanutí (Slauch J. M., 2011; Forman H. J., Torres M., 2002). Tento proces vyžaduje rychlé dodání značného množství energie a je spojen s vysokou spotřebou kyslíku a zvýšenou aktivitou PPP (Chapel H. et al., 2018; Krejsek J. et al., 2016).

Různé patologické podněty vedou k rozvoji různých patofyziologických procesů v organismu. Vazba antigenu spolu s kostimulačními interakcemi v mikroprostředí příslušných cytokinů vede k aktivaci a polarizaci imunitní reakce (Latha T. S., 2014; Pellerin L., 2014). Zjednodušeně lze říci, že dominující zánětlivá odpověď s důrazem na fagocytózu a oxidační vzplanutí (za podpory T_H1 anebo T_H17 subsetu lymfocytů) způsobí přepnutí metabolismu na vysoký obrat glykolýzy k rychlé dodávce energie (Ramond E. et al., 2019). V likvoru se takový razantní zánět projeví výrazným posunem biochemických energetických parametrů do patologických hodnot.

3.3 Energetické parametry v likvoru

Základní energetické parametry v likvoru jsou glukóza a laktát (Adam P. et al., 2001, Huy N. T. et al., 2010). Glykorachie dosahuje u dospělých v ustáleném stavu cca 60 % sérové hodnoty, hodnoty se liší dle věku (Leen W. G. et al., 2012). Při hyperglykémii stoupá i glykorachie, nikoliv však se zachováním stejné proporce (Q_{glu} se snižuje), při hypoglykémii je to naopak: glykorachie klesá méně než by odpovídalo poklesu v krvi (Q_{glu} se zvyšuje) (Hegen H. et al., 2014).

Laktát je metabolickým produktem glukózy, koncentrace laktátu je ovlivněna množstvím glukózy vstupující do metabolismu. Význam měření koncentrace laktátu v likvoru pro rozlišení bakteriální a virové meningitidy je již dlouho znám, je dostupná řada diskriminačních cut-off (Sakushima K. et al., 2011). Koncentrace laktátu v likvoru má též prognostický potenciál (Vengerov I. et al., 2008).

Glukóza a laktát mají svá omezení, spojení hodnot obou parametrů do jednoho poměru/výpočtu vzhledem k inverznímu vztahu změn (spotřeba glukózy a produkce laktátu) násobí senzitivitu poměru. Hanzal popsal tzv. glukolaktický kvocient Q ($\text{glukóza}_{\text{CSF}}/\text{laktát}_{\text{CSF}}$) již v roce 1955 (Hanzal F., 1955). Kelbich odvodil tzv. Koefficient energetické bilance (KEB) = $38 - 18 * \text{laktát}_{\text{CSF}}/\text{glukóza}_{\text{CSF}}$ (Kelbich P. et al., 1998, Kelbich P., 2015, Kelbich P. et al., 2007).

Klasifikuje energetický stav v likvorovém kompartmentu do tří vrstev:

- Fyziologicky je přirozený úbytek glukózy průběžně substituován dodávkou z krve, v likvoru je rozpuštěno značné množství kyslíku. Glykolýza probíhá především aerobním způsobem, tj. pyruvát je dále metabolizován se ziskem maximálního množství energie. Výsledným obrazem je poměrně vysoká glykorachie, nízká koncentrace laktátu v likvoru a KEB v rozmezí 28,0–38,0.
- Při patologickém procesu, jehož podstatou nebo následkem je zánět, s sebou aktivace imunitního systému nese mj. zvýšení nároků na energii. Dochází ke zvýšenému obratu glykolýzy, konzumaci glukózy a kyslíku a vzestupu podílu anaerobní glykolýzy. Produkce ATP klesá, což se odráží v poklesu KEB. U serózních zánětů CNS je pokles KEB mírný (10,0–28,0), může být mírná hypoglykorachie a vzestup koncentrace laktátu v likvoru (oba analyty nemusí být alterovány vůbec).
- Diametrální odlišnost způsobuje oxidační vzplanutí fagocytů s vysokou spotřebou kyslíku. Koncentrace laktátu v likvoru je vysoká, glykorachie nízká a KEB výrazně klesá (pod 10,0).

KEB je v ČR široce používán. Předchozími studiemi je hodnocen jako ideální energetický parametr v likvoru, 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)

4 Hypotézy a cíle práce

V práci se zaměřuji právě na základní vyšetření, kterému jsou rutinně podrobeny téměř všechny vzorky likvoru. Hodnotím vztah energetických parametrů a cytologického vyšetření likvoru ve velkém souboru výsledků u pacientů s různými onemocněními CNS.

- Primárním cílem práce je verifikace hypotézy, že hodnoty KEB jsou významně rozdílné u konkrétních cytologických tříd typicky doprovázejících oxidační vzplanutí fagocytů (tj. zamítnutí nulové hypotézy, že hodnoty KEB jsou v různých cytologických třídách shodné nebo obdobné).
- Sekundárním cílem je rozbor výkladu KEB a rovněž 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 laktátu a glukózy v likvoru. Dále popisují vztahy koncentrace glukózy a laktátu v krvi a likvoru ve studovaném souboru.

5 Materiál a metodika

Retrospektivně jsem analyzovala celkem 8 178 výsledků vyšetření likvoru, které bylo provedeno v Laboratoři pro likvorologii a neuroimunologii v Praze. Vyšetření bylo požadováno z důvodu klinických symptomů vedoucích k podezření na možné neurologické onemocnění.

Bylo provedeno cytologické vyšetření likvoru, tj. stanoven celkový počet erytrocytů a leukocytů ve Fuchs-Rosenthalově komůrce a posouzena cytologická skladba likvoru v trvalém cytologickém preparátu.

V rámci biochemického vyšetření byla stanovena koncentrace glukózy, laktátu, celkové bílkoviny, beta-2-mikroglobulinu, albuminu a IgG, IgA a IgM v likvoru. U části případů byla známa glykémie ($n = 4\,820$) a laktátémie ($n = 1\,979$). Byl vypočten Q_{glu} , KEB a odhad intratékální syntézy imunoglobulinů ve třídách IgG, IgA a IgM dle Reibera.

Soubor byl podle nálezu kvalitativní cytologie rozdělen do 8 skupin: kontrolní skupina ($n = 235$), granulocytární oligocytóza (GO, $n = 64$),

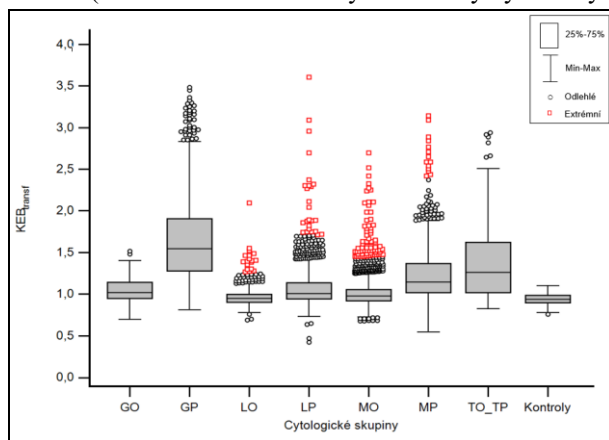
granulocytární pleocytóza (GP, n = 765), monocytární oligocytóza (MO, n = 2 698), monocytární pleocytóza (MP, n = 1 456), lymfocytární oligocytóza (LO, n = 1 199), lymfocytární pleocytóza (LP, n = 1 609) a tumorózní oligocytóza+pleocytóza (TO+TP, n = 152). Do kontrolní skupiny byly zařazeny vzorky s výsledky biochemického i cytologického vyšetření likvoru v referenčním rozmezí.

Ke statistickému zhodnocení byl použit SW Excel, MedCalc, a JMP. Pro optimalizaci rozdělení dat jsem provedla transformaci KEB podle vzorce: $KEB_{transf} = \log(40 - KEB)$ a logaritmickou transformaci ostatních energetických parametrů.

6 Výsledky

6.1 Hodnocení KEB ve vztahu k cytologickým skupinám

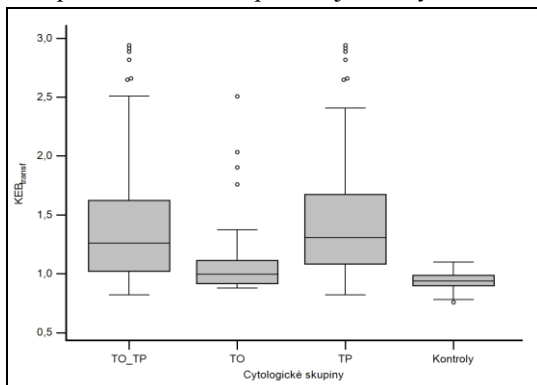
Signifikantně nižší hodnoty KEB (resp. vyšší hodnoty KEB_{transf}) jsem našla u skupin GP a TO+TP v porovnání s kontrolní skupinou, i všemi ostatními cytologickými skupinami ($p \leq 0,0001$), s výjimkou TO+TP vs. MP (mezi TO+TP a MP nebyl statisticky významný rozdíl).



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

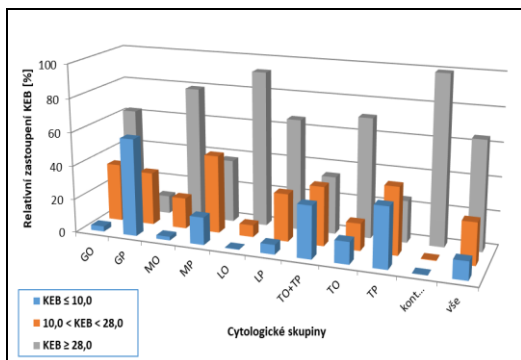
GO = granulocytární oligocytóza, GP = granulocytární pleocytóza, LO = lymfocytární oligocytóza, LP = lymfocytární pleocytóza, MO = monocytární oligocytóza, MP = monocytární pleocytóza, TO = tumorózní oligocytóza, TP = tumorózní pleocytóza

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.



Graf č. 2: KEB_{transf} u tumorózní oligocytozy a tumorózní pleocytozy (samostatná skupina TO a TP vs. společná skupina TO+TP, vysvětlivky viz legenda grafu č. 1)

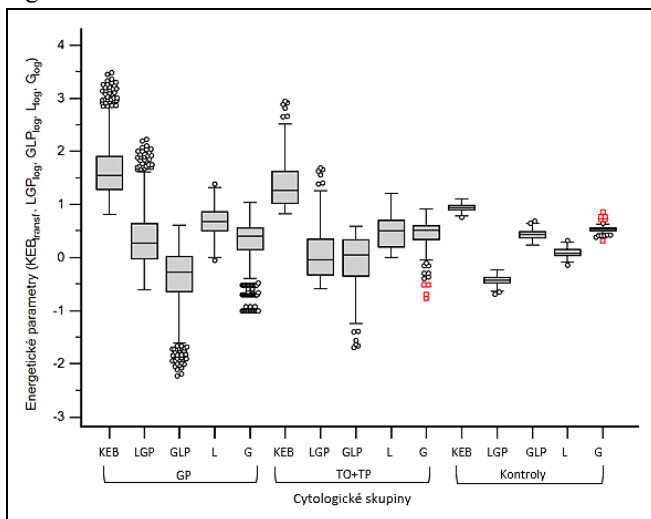
Relativní zastoupení KEB mezi vrstvami klasifikovanými Kelbichem, tj. normální hodnoty (28,0–38,0), „oblast mírného vzestupu anaerobní glykolýzy“ (10,0–28,0) a „oblast excesivního vzestupu anaerobní glykolýzy se susp. přítomností razantního zánětu s oxidačním vzplanutím fagocytů“ (pod 10,0) (Kelbich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



Graf č. 3: Relativní zastoupení KEB mezi cytologickými skupinami (cut-off 10,0 a 28,0, vysvětlivky viz legenda grafu č. 1)

6.2 Srovnání KEB s dalšími energetickými parametry v likvoru

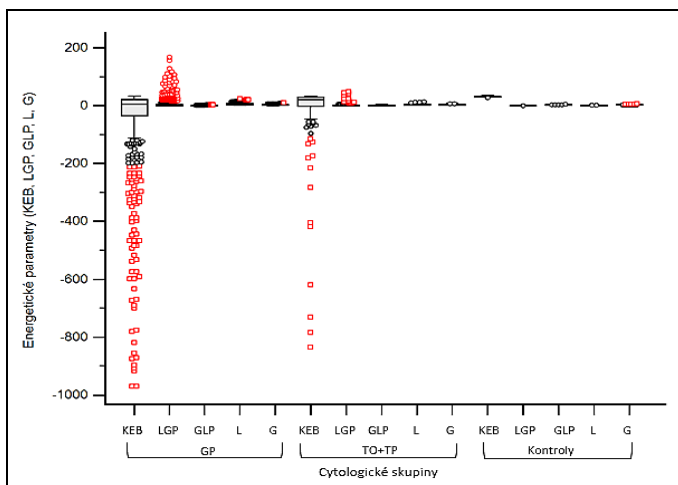
Srovnání KEB s dalšími energetickými parametry pro nejvíce vychýlené cytologické skupiny (GP, TO+TP vs. kontrolní skupina) je znázorněno v grafu č. 4.



Graf č. 4: Energetické parametry v likvoru u vybraných cytologických skupin

KEB = Koefficient energetické bilance, LGP = lakto-glukózový poměr, GLP = glukolaktátový poměr, L = laktát, G = glukóza, ostatní vysvětlivky viz legenda grafu č. 1.

LGP, GLP i koncentrace laktátu odlišují cytologické skupiny GP a TO+TP od kontrolní skupiny i všech ostatních skupin stejně dobře jako KEB ($p \leq 0,0001$, vyjma TO+TP vs. MP). Nicméně KEB proti všem ostatním energetickým parametrům dosahoval zdaleka největšího rozpětí hodnot (od extrémně negativních až do hodnot v referenčním rozmezí). Z důvodu vizualizace tohoto rozpětí jsem i přes jistou nepřehlednost dále připojila graf č. 5 s reálnými hodnotami KEB.



Graf č. 5: Energetické parametry v likvoru u vybraných cytologických skupin (reálné hodnoty bez transformace)

Vysvětlivky viz legenda grafu č. 1 a 4. Z důvodu lepší přehlednosti bylo cíleně odstraněno celkem 25 extrémních hodnot KEB s výsledkem < -1 000.

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

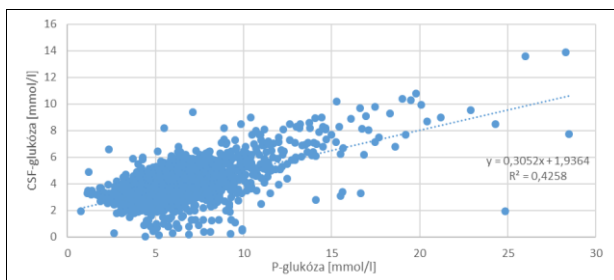
Srovnávaná dvojice	Relativní zastoupení dobře klasifikovaných [%]				
	KEB _{transf}	LGP	GLP	L	G
GO - kontroly	76,9	83,3	69,2	89,0	79,6
GO - GP	69,0	33,3	83,5	63,0	70,7
GO - MO	70,3	79,3	60,3	78,9	71,6
GO - MP	51,1	34,9	63,8	47,8	62,8
GO - LO	80,7	86,3	70,2	89,0	78,9
GO - LP	36,8	22,5	54,0	72,7	75,3
GO - TO+TP	60,7	48,2	64,4	51,0	62,0
GP - kontroly	78,9	45,4	91,2	77,0	67,4
GP - MO	89,8	83,7	86,3	89,2	68,4
GP - MP	74,4	71,9	68,1	72,9	63,3
GP - LO	88,4	72,1	91,7	87,3	72,2

<i>(Pokračování tab. č. 1)</i>	Relativní zastoupení dobře klasifikovaných [%]				
Srovnávaná dvojice	KEB_{transf}	LGP	GLP	L	G
GP - LP	82,6	75,8	79,8	84,7	65,4
GP - TO+TP	56,2	32,6	72,2	54,0	60,1
MO - kontroly	52,6	39,6	60,6	48,5	48,0
MO - MP	74,8	72,6	71,7	74,8	44,1
MO - LO	54,6	48,8	57,4	50,7	50,0
MO - LP	61,2	64,3	56,8	58,6	53,9
MO - TO+TP	89,2	94,8	76,6	86,7	54,4
MP - kontroly	67,1	46,0	77,5	68,5	51,8
MP - LO	75,2	64,5	79,0	76,4	56,1
MP - LP	63,6	59,2	64,3	67,4	58,2
MP - TO+TP	67,3	84,6	52,0	66,0	52,7
LO - kontroly	50,3	46,2	54,5	50,8	48,7
LO - LP	63,1	55,0	63,9	60,6	55,1
LO - TO+TP	92,2	91,9	85,9	92,4	56,0
LP - kontroly	54,8	35,5	63,7	53,0	57,4
LP - TO+TP	80,0	90,9	67,1	82,6	53,5
TO+TP - kontroly	82,7	72,4	85,0	83,5	61,0
Počet nejlepších výsledků	3	5	14	6	1

Tabulka č. 1: Energetické parametry v likvoru – lineární diskriminační analýza (nejvyšší relativní zastoupení správně zařazených hodnot mezi danou dvojicí skupin je označeno červeně)

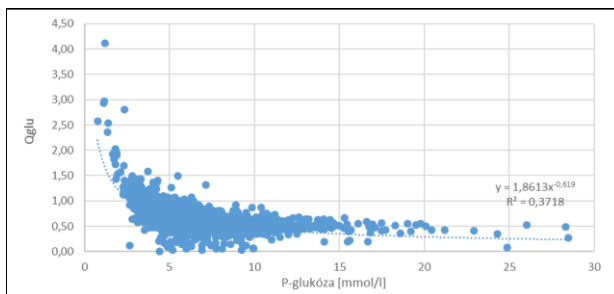
Ačkoliv se většina srovnávaných dvojic ve všech parametrech statisticky významně liší (analýzou shody distribučních funkcí), dle diskriminační analýzy všechny posuzované parametry nerozdělují hodnoty do správných cytologických skupin příliš dobře (velká část hodnot se neliší natolik, aby byly zařazeny správně). Hranice dobré diskriminace (alespoň 70 % správně rozdělených výsledků) byla u všech sledovaných parametrů dosažena pouze u části srovnávaných dvojic. Nejlepších výsledků dosáhl GLP, nejhorších izolovaná glykorachie.

Dále jsem věnovala pozornost vztahům koncentrace glukózy a laktátu v krvi a likvoru v té části souboru, kde byla glykémie a laktatémie známa.



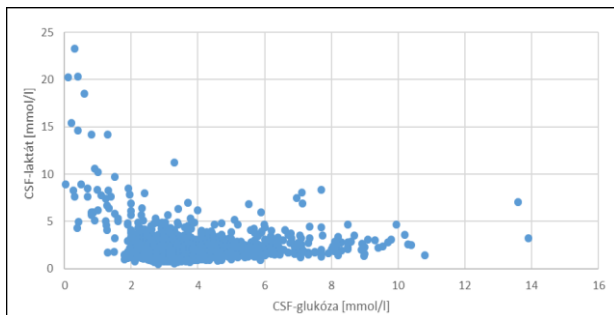
Graf č. 6: Závislost glykorachie na glykémii – soubor dat se známou glykémii (n = 4 820)

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



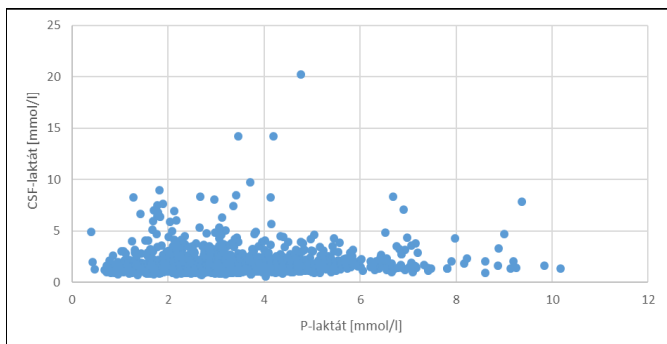
Graf č. 7: Závislost Qglu na glykémii – soubor dat se známou glykémii (n = 4 820)

P-glukóza = glykémie v plazmě



Graf č. 8: Závislost koncentrace laktátu v likvoru na glykorachii – soubor dat se známou glykémii (n = 4 820)

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



Graf č. 9: Závislost koncentrace laktátu v likvoru na koncentraci laktátu v plazmě – soubor dat se známou laktatémií (n = 1 979)

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

7 Diskuse

GP a TO+TP jsou cytologické skupiny, které doprovází imunitní reakci s důrazem na fagocytózu a oxidační vzplanutí fagocytů. U purulentních neuroinfekcí (způsobených extracelulárními bakteriemi) nebo zánětu po reperfúzi ischemických ložisek u části SAK jde o aktivaci neutrofilů, tj. GP (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).

GP je skupinou s největším zastoupením hodnot KEB odpovídajících razantnímu zánětu s oxidačním vzplanutím ($\leq 10,0$). Hodnoty nedosahující tohoto cut-off jsou pravděpodobně odrazem počínajícího stadia serózních neuroinfekcí (kdy neutrofilové mohou po krátkou dobu v cytologickém obraze dominovat), zařazení imunodeficientních a imunosuprimovaných pacientů, pacientů se sekundární neuroinfekcí, nebo na vrub preventivní neuroprotektce (Kelbich P., 2015; Xiong Y. et al., 2001).

Ve skupině TO+TP tvořily hodnoty KEB v oblasti razantního zánětu s oxidačním vzplanutím fagocytů cca jednu třetinu nálezů. Obrana proti nádorům probíhá kromě aktivace fagocytů přes aktivaci specifických i nespecifických cytotoxických buněk (Drake Ch. G., 2006), které nemají enzymové vybavení pro oxidační vzplanutí. Imunitní reakce

na přítomnost maligních buněk může být velmi rozmanitá, daná individuální imunitní reaktivitou daného jedince a nádorového bujení.

Beta-2-mikroglobulin je zánětlivým a tumorovým markerem (Adam P. et al., 2001). V souboru 6 274 pacientů jsme našli statisticky významný vzestup koncentrace beta-2-mikroglobulinu v likvoru u skupin s purulentní meningitidou/encefalitidou a maligní meningeální infiltrací + mozkovými tumory, 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 hodnoty KEB u GP byly ještě signifikantně nižší než u skupin MP, LP. Obraz MP i LP může doprovázet případy infekce potenciálními intracelulárními bakteriemi, kvasinkami a plísněmi nebo nádorový proces v CNS (maligní buňky nemusí být do likvoru vyplaveny), kdy také může dojít k rozvoji razantního zánětu s oxidačním vzplanutím fagocytů. Hodnoty $KEB \leq 10,00$ reprezentovaly pouze relativně malou část ze všech MP a LP.

Při studiu podkladů k této práci jsem našla několik nepřesností a zjednodušení v odvození a výkladu KEB (nyní není považován zisk 38 molekul ATP z jedné molekuly glukózy při aerobní glykolýze za reálný, je zanedbán podíl PPP v metabolismu glukózy, jiný zisk ATP při odbourávání glukóza-1-fosfátu z glykogenolýzy, vliv změn glykémie, změny koncentrace laktátu z jiných důvodů než nedostatku kyslíku, podíl přenosu redukčních ekvivalentů do mitochondrie glycerol-3-fosfátovým člunkem, ovlivnění transportu laktátu a glukózy pH, podíl dalších substrátů v energetickém metabolismu mozku jak v ontogenetickém vývoji, tak za různých situací u dospělých a další). Uvádím je podrobně ve vlastní disertační práci.

Při 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. To je příčinou nalezeného velkého rozpětí hodnot KEB oproti ostatním

parametrům. Takového rozpětí bylo dosaženo také v jiných studiích (Hejčl A. et al., 2013; Kelbich P. et al., 2014).

Hyperglykémie byla u 29,1 % případů ze souboru se známou glykemií, hypoglykémie pouze v 1,6 % případů. Závislost Q_{glu} na glykémii je významná (křivka strmější) v oblasti hypoglykémie až normoglykémie, tj. ve značné části souboru. Reálné hodnoty Q_{glu} u normoglykemických probandů byly vyšší než udávaná horní referenční mez Q_{glu} . Aplikace jednotného cut-off Q_{glu} 0,40 může vést k falešně negativním výsledkům u normo- a hypoglykemických pacientů a falešně pozitivním výsledkům u hyperglykemických pacientů (Hegen H. et al., 2014, Irani D. N., 2009).

Izolovaná glykorachie dosáhla nejhorších výsledků, jak v analýze shody, tak v diskriminační analýze a v rozsahu rozdílů mediánů patologických skupin proti kontrolní skupině. U tohoto jediného parametru byl trend rozdílů oběma směry (pokles i vzestup hodnot proti kontrolní skupině), což je evidentně dáno ovlivněním glykorachie změnou glykémie. Největší rozdíly mediánů byly u izolované koncentrace laktátu v likvoru, vyjma skupiny GP, kde ještě většího nárůstu dosáhl LGP. Nejlepšího výsledku v diskriminační analýze dosáhl GLP, což je dáno matematickými vztahy a vlivem hyperglykémie (právě ve skupinách s největším zastoupením hyperglykémie dosáhl GLP výrazně lepších výsledků než LGP).

Ze simulace vlivu hyperglykémie na KEB dle rovnic spojnic trendu je patrné, že ovlivnění hodnot energetických parametrů závisí nejen na hodnotě glykémie, ale také na rozsahu patologického procesu. Při malém rozsahu patologie může „normalizovat“ KEB nižší hyperglykémie, u razantních zánětů až vysoká hyperglykémie nebo dojde pouze k posunu KEB směrem k referenčnímu rozmezí.

Ve zkoumaném souboru bylo nejvyšší zastoupení hyperglykémie právě u skupin GP, TP a TO, pravděpodobně vlivem závažnosti onemocnění spojených s těmito nálezy. Právě u těchto skupin nejčastěji doprovázejících razantní zánět s oxidačním vzplanutím fagocytů jsou tedy hodnoty energetických parametrů ovlivněny hyperglykemií nejvíce.

8 Závěry

Závěry lze shrnout do následujících bodů:

- Hodnoty KEB ve zkoumaném souboru byly statisticky významně odlišné u skupin GP a TO+TP oproti ostatním skupinám. Dalšími skupinami s třetím a čtvrtým nejvyšším zastoupením nízkých hodnot KEB byly MP a LP. Tyto cytologické skupiny doprovází zánětlivou odpověď s důrazem na fagocytózu a oxidační vzplanutí, ať už neutrofilů, nebo monocytů (purulentní zánět nebo nádorové postižení v oblasti související s likvorovým kompartmentem, infekce potenciálními intracelulárními patogeny). Primární alternativní hypotéza byla potvrzena.
- V těchto skupinách, včetně GP, byly hodnoty KEB nalezeny v celém rozsahu, tj. včetně jen mírně patologických nebo normálních. Pomocí KEB tedy nelze tato vážná onemocnění vyloučit s jistotou. Nicméně nález významného posunu hodnot KEB zřetelně odlišuje případy, kdy jsou tato onemocnění velmi suspektní, a je třeba s nimi v diferenciální diagnostice počítat.
- V odvození a výkladu KEB jsou zjednodušení a nesrovnalosti pomíjející komplexitu vztahů energetického metabolismu v CNS. Především za akutních situací 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. Laktát je indikátorem aktuálního metabolického stavu buňky, nikoli jen dostupnosti kyslíku.
- LGP, GLP a izolovaná koncentrace laktátu v likvoru odlišily cytologické skupiny GP a TO+TP od kontrolní skupiny i všech ostatních skupin stejně dobře jako KEB. KEB však dosáhl zdaleka největšího rozpětí hodnot, a tak může stratifikovat mezi vrstvami patologického vychýlení senzitivněji a názorněji než všechny ostatní srovnávané parametry.

- Hyperglykémie byla cca u třetiny souboru se známou glykemií, v nejvyšším zastoupení právě u skupin GP, TP a TO. Byla prokázána lineární závislost glykorachie a nelineární závislost Q_{glu} na glykémii. Křivka závislosti Q_{glu} na glykémii je strmější v oblasti hypo- a normoglykémie. Změny glykémie ovlivňují všechny energetické parametry, které obsahují glykorachii (včetně KEB) a omezují tak jejich efektivitu pro diagnostiku patologie v tkáni CNS přilehlé likvorovým cestám. Při interpretaci je vhodné znát aktuální glykémii a adjustovat na ni cut-off.
- Neprokázala se závislost koncentrace laktátu v likvoru na glykorachii, ani závislost koncentrace laktátu v likvoru na koncentraci v plazmě.

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

9 Použitá literatura

- Adam P., Táborský L., Sobek O. et al., 2001. Cerebrospinal fluid, 1st ed. *Adv Clin Chem*, 1-62.
- 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.
- Biswas S. K., Mantovani A., 2012. Orchestration and metabolism of macrophages. *Cell Metab*, 15(4), 432-437.
- 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.
- Domenech-Estevéz E., Baloui H., Repond C. et al., 2015. Distribution of monocarboxylate transporters in the periferal nervous system suggest putative roles in lactate shuttling and myelination. *J Neurosci*, 35(10), 4151-4156.
- Drake Ch. G., Jaffee E., Pardoll D. M., 2006. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*, 90, 51-81.
- 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.
- 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.

- Gruetter R., 2003. Glycogen: the forgotten cerebral energy store. *J Neurosci Res*, 74(2), 179-183.
- Hanzal F., 1955. Glucolactic quotient of the cerebrospinal fluid. *Neurol Psychiatr Českoslov*, 18, 107-113.
- Hejčl A., Kelbich P., Bolcha M. et al., 2013. Význam a možnosti vyšetřování metabolismu mozku pomocí mikrodiálýzy v neurointenzivní péči. *Klin Biochem Metab*, 21(42), 13-20.
- 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.
- 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.
- Chapel H., Haeney M., Misbach S. et al., 2018. *Základy klinické imunologie*, 6. vyd. Praha: Triton.
- Irani D. N., 2009. *Cerebrospinal fluid in clinical practise*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
- 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.
- 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.
- Kelbich P., Adam P., Sobek O. et al., 2009. Základní vyšetření likvoru v diagnostice postižení centrálního nervového systému. *Neurol prax*, 10(5), 266-270.
- 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.
- Kelbich P., 2015. *Principy neurochirurgické a neurointenzivistické likvorologie*. Disertační práce. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové.
- 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.
- Krejsek J., Andrýs C., Krčmová I., 2016. *Imunologie člověka*, 1. vyd. Hradec Králové: Garamon s.r.o.

- 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.
- 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.
- 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.
- Pellerin L., 2003. Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int*, 43(4-5), 331-338.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Schurr A., 2006. Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate?. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26(1), 142-152.
- Slauch J. M., 2011. How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria. *Mol Microbiol*, 80(3), 580-583.
- Sobek O., Adam P., Kelbich P. et al., 2009. Vyšetření likvoru - současné možnosti. *Neurol prax*, 10(5), 280-284.
- 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.
- 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.
- 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.

Seznam publikací doktoranda:

1. podkladem disertace:

a) s IF:

- **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. IF 2,197.
- 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. IF 2,761.

b) bez IF:

- Mrázová K., Zeman D., **Bořecká K.** et al., 2017. Doporučení k vyšetřování mozkomíšního moku. *Klin Biochem Metab*, 25(46), 43-47.

Abstrakt:

- **Bořecká K.**, Adam P., Lánská V., 2013. Biochemické parametry energetického metabolismu CNS. *Cesk Slov Neurol N*, Suppl. 2 - Sborník abstrakt 27. českého a slovenského neurologického sjezdu, 76(109), 2S28.

2. bez vztahu k tématu disertace:

a) s IF:

- Burianová I., **Bořecká K.**, 2015. Routine therapeutic monitoring of the active metabolite of carbamazepine: Is it really necessary?. *Clin Biochem*, 48(13-14), 866-869. IF 2,43.

b) bez IF:

- **Bořecká K.**, 2018. Stanovení koncentrace 25-OH vitamínu D inovovanou metodou Roche. *Labor Aktuell*; 2, 20-24.
- **Bořecká K.**, Sečník P., Jabor A. et al., 2017. Srovnání stanovení koncentrace volných lehkých řetězců na analyzátoru SpaPLUS a Immage 800. *Klin Biochem Metab*, 25 (46), 112-115.

- Procházka J., **Bořecká K.**, Lánská V, 2013. Vliv hemolýzy na stanovení celkového a přímého bilirubinu. *Klin Biochem Metab*, 21(42), 215-220.
- **Bořecká K.**, Sixtová D., 2010. Nový tumorový marker proGRP, naše zkušenosti. *Stud Pneumol Phthiseol*, 70(6), 239-242.

Abstrakta:

- Pospíšilová I, **Bořecká K.**, Bednářová .K et al., 2019. Role presepsinu (sCD-14ST) v diagnostice sepse v dětské a novorozenecké populaci, *Klin Bioch Met – Sborník abstrakt XIV. celostátního sjezdu České společnosti klinické biochemie ČLS JEP*, 27(48), 151.
- **Bořecká K.**, Záleský M., Zachoval R. et al., 2017. PHI (index zdraví prostaty) – zkušenosti z Thomayerovy nemocnice. *Klin Bioch Met*, Sborník abstrakt XIII. celostátního sjezdu České společnosti klinické biochemie ČLS JEP, 25 (46), 145.
- Stejskal J., Záleský M., **Bořecká K.** et al., 2017. The predictive value of PHI versus PIRADS in mpMRI targeted prostate cancer biopsies. *Eur Urol*, Suppl., 16(11), e2874-2875.
- Záleský M., **Bořecká K.**, Stejskal J. et al., 2016. Nedetekovatelné PSA po radikální prostatektomii a výsledky ultrasenzitivního PSA pomocí měření různými biochemickými kity. *Ces urol*, Suppl. A – Sborník abstrakt 62. výroční konference České urologické společnosti ČLS JEP, 20, 40.
- Vítovcová M., Pavlová Z., **Bořecká K.**, 2015. Vyšetření synoviální tekutiny na oddělení klinické biochemie Thomayerovy nemocnice. *Klin Bioch Met – Sborník abstrakt XII. celostátního sjezdu České společnosti klinické biochemie ČLS JEP*, 23 (44), 154.
- Pospíšilová I., **Bořecká K.**, 2013. Prokalcitonin – analýza souboru pacientů s koncentrací nad 100 µg/l. *Klin Bioch Met – Sborník abstrakt XI. celostátního sjezdu České společnosti klinické biochemie ČLS JEP*, 21 (42), 164.