

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Ústav klinické biochemie a patobiochemie FN v Motole

**Michaela Daňková**

Význam stanovení SAA a porovnání s CRP a  
prokalcitoninem

*Bakalářská práce*

Praha 2012

Autor práce: **Michaela Daňková**

Vedoucí práce: **RNDr. Jiří Zadina, CSc.**

Oponent práce: **Prof. MUDr. Richard Průša, CSc.**

Datum obhajoby: **2012**

## **Bibliografický záznam**

DAŇKOVÁ, Michaela. *Význam stanovení SAA a porovnání s CRP a prokalcitoninem*. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Ústav klinické biochemie a patobiochemie, 2012. 60 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Jiří Zadina, CSc.

## **Anotace**

Bakalářská práce se zabývá významem stanovení sérového amyloidu A (SAA) u vybraných skupin pacientů a porovnání s C-reaktivním proteinem (CRP) a prokalcitoninem (PCT). SAA, CRP a PCT jsou proteiny akutní fáze, které vykazují významný vzestup koncentrace v krvi během několika hodin po zánětovém stimulu. Syntéza probíhá v játrech a je vyvolána prozánětlivými cytokiny. CRP je nejstarší a v rutinní praxi nejpoužívanější reaktant akutní fáze. SAA a hlavně prokalcitonin patří mezi novější ukazatele zánětu. SAA není tak často využíván v diagnostice, přestože je stejně senzitivním reaktantem akutní fáze jako CRP, protože teprve v nedávné době byla vyvinuta metoda vhodná k rutinnímu stanovení.

Teoretická část práce stručně popisuje proteiny akutní fáze a podrobněji se soustředí na charakteristiku a srovnání SAA, CRP a PCT. V další části jsou popsány metody stanovení jednotlivých analytů. Experimentální část je zaměřena na charakteristiku vybraného souboru pacientů a metodiku měření SAA imunonefelometrickou metodou na biochemickém analyzátoru Immage 800. Získaná data u tří vybraných skupin pacientů byla statisticky vyhodnocena. Cílem práce bylo zhodnotit korelaci zánětlivých markerů u dvou vybraných skupin a u třetí skupiny porovnat hladiny CRP a SAA u obézních pacientek a zdravé kontrolní skupiny.

## **Klíčová slova**

proteiny akutní fáze, sérový amyloid A, C-reaktivní protein, prokalcitonin, imunonefelometrie

## **Annotation**

The purpose of the bachelor thesis is to evaluate serum amyloid (SAA) as a diagnostic marker in selected patient groups and to compare the results of SAA with those of C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT). SAA, CRP and PCT are acute-phase proteins, whose blood concentration significantly increases within a few hours after an inflammatory stimulus. The synthesis, caused by proinflammatory cytokines, takes place in the liver. CRP is the most and longest used acute-phase reactant in routine practice. As indicators of inflammation, SAA and especially procalcitonin have been used more lately. Although SAA is an acute-phase reactant as sensitive as CRP, it is not employed so often in the diagnosis since a method suitable for routine diagnosis was not developed until recently.

Briefly describing the acute-phase proteins, the theoretical part elaborates on the characterization and comparison of SAA, CRP and PCT. It further outlines methods for the determination of individual analytes. The experimental part focuses on defining selected patient groups and the immunonephelometric method for measuring SAA by the Immage 800 biochemical analyzer. The data obtained in three selected patient groups have been statistically evaluated. The aim of the thesis has been to evaluate the correlation of inflammatory markers in two selected groups and to compare the CRP and SAA levels in the third group consisting of obese female patients and a healthy control group.

## **Keywords**

acute phase proteins, serum amyloid A, C-reactive protein, procalcitonin, immunonephelometry

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracovala samostatně pod vedením RNDr. Jiřího Zadiny, CSc., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 23. 4. 2012

Michaela Daňková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Zadinovi, CSc. z Ústavu klinické biochemie a patobiochemie 2. lékařské fakulty UK a FN Motol za odborné vedení mé práce. Dále děkuji Ing. Martě Pechové, také z Ústavu klinické biochemie a patobiochemie, za pomoc při sběru vzorků a MUDr. Tomáši Fraňkovi z téhož ústavu za bližší seznámení s analyzátozem Immage a pomoc při stanovení SAA. Také děkuji Lubomíru Štěpánkovi za cenné rady a pomoc při statistickém vyhodnocení.

## Obsah

<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>10</b>
1.1 PROTEINY AKUTNÍ FÁZE (APP).....	10
1.1.1 Reakce akutní fáze .....	10
1.1.2 Význam a biochemická charakteristika APP .....	11
1.1.3 Rozdělení APP .....	12
1.1.4 Cytokiny.....	14
1.2 SÉROVÝ AMYLOID A (SAA) .....	15
1.2.1 Genetická a biochemická charakteristika.....	15
1.2.2 Funkce a význam .....	16
1.3 C-REAKTIVNÍ PROTEIN (CRP) .....	17
1.3.1 Pentraxiny .....	18
1.3.2 Genetická a biochemická charakteristika.....	18
1.3.3 Funkce a význam .....	19
1.4 PROKALCITONIN (PCT).....	20
1.4.1 Genetická a biochemická charakteristika.....	21
1.4.2 Uplatnění v diagnostice a interpretace nálezů .....	22
1.4.3 Kalcitonin.....	25
1.5 SROVNÁNÍ SAA, CRP A PCT .....	25
1.6 METODY STANOVENÍ .....	26
1.6.1 Turbidimetrie a nefelometrie .....	27
1.6.2 Stanovení SAA.....	28
1.6.3 Stanovení CRP .....	28
1.6.4 Stanovení PCT .....	29
<b>2 CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>31</b>
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>32</b>
3.1 SOUBOR PACIENTŮ.....	32
3.1.1 Skupiny pacientů.....	32
3.1.2 Metodika sběru a přechovávání vzorků .....	33
3.2 METODA STANOVENÍ SAA.....	34
3.2.1 Princip metody .....	34

---

3.2.2	Image 800 .....	34
3.2.3	Reagencie .....	35
3.2.4	Přístrojové vybavení a spotřební materiál.....	36
3.2.5	Pracovní postup.....	36
3.3	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ.....	38
3.3.1	Skupina obézních a kontrolní skupina .....	38
3.3.2	Skupina kojenců a dětí a skupina prokalcitoninu .....	39
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>42</b>
4.1	SKUPINA OBÉZNÍCH A KONTROLNÍ SKUPINA.....	42
4.1.1	Naměřené hodnoty .....	42
4.1.2	Statistické vyhodnocení .....	43
4.2	SKUPINA KOJENCŮ A DĚTÍ .....	45
4.2.1	Naměřené hodnoty .....	45
4.2.2	Statistické vyhodnocení .....	46
4.3	SKUPINA PROKALCITONINU.....	47
4.3.1	Naměřené hodnoty .....	47
4.3.2	Statistické vyhodnocení .....	50
<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>53</b>
5.1	SKUPINA OBÉZNÍCH A KONTROLNÍ SKUPINA.....	53
5.2	SKUPINA KOJENCŮ A DĚTÍ .....	54
5.3	SKUPINA PROKALCITONINU.....	54
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>57</b>



## Seznam zkratek

AA	amyloid A (amyloid associated)
AACT	$\alpha_1$ -antichymotrypsin
AAT	$\alpha_1$ -antitrypsin
AGP	$\alpha_1$ -kyselý glykoprotein (orosomukoid)
AM	$\alpha_2$ -makroglobulin
AMK	aminokyseliny
APP	proteiny akutní fáze (acute phase proteins)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
C3, C4	složky komplementu
Cpl	ceruloplazmin
CRP	C-reaktivní protein
Fbg	fibrinogen
FN	Fakultní nemocnice
HDL	vysoce denzní lipoproteiny (high-density lipoproteins)
Hp	haptoglobin
Hpx	hemopexin
hs-CRP	vysoce senzitivní stanovení CRP (high-sensitivity C-reactive protein)
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
LDL	nízko denzní lipoproteiny (low-density lipoproteins)
LPS	lipopolysacharid, endotoxin
MODS	syndrom multiorgánového selhání (multiorgan distress syndrome)
PAI-1	inhibitor aktivátoru plasminogenu 1
PCT	prokalcitonin
PEG	polyethylenglykol
POCT	testování v místě péče o pacienta (point-of-care testing)
SAA	sérový amyloid A
SAP	sérový amyloid P
SERPIN	inhibitory serinových proteáz
SIRS	syndrom systémové zánětlivé odpovědi (systemic inflammatory response syndrome)
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$
UK	Univerzita Karlova
ÚKBP	Ústav klinické biochemie a patobiochemie

## ÚVOD

Pro eukaryotické organizmy je charakteristická přítomnost obranných a adaptačních mechanismů. Tyto fyziologické děje se označují jako reakce akutní fáze. Jejím hlavním úkolem je zajistit stabilitu vnitřního prostředí při narušení jeho integrity. Dochází k výrazným změnám jaterní proteosyntézy a tvorbě tzv. proteinů akutní fáze (APP). Tyto proteiny jsou důležitou složkou nespecifické imunity. Jsou uvolňovány z hepatocytů vlivem působení prozánětlivých cytokinů. V klidovém období jsou koncentrace těchto proteinů nízké nebo i neměřitelné, ale po zánětlivém stimulu mohou prudce stoupat, pak je označujeme jako pozitivní reaktanty nebo naopak jejich koncentrace klesá, tyto proteiny pak nazýváme negativní reaktanty [1, s. 10-27].

Od objevení prvního proteinu akutní fáze CRP v roce 1930 v laboratořích Rockefellerovy univerzity uběhlo již více než 80 let. Za tu dobu si bezesporu proteiny akutní fáze vysloužily nenahraditelnou úlohu v diagnostice a monitorování zánětlivých stavů. Jejich použití již dnes není omezeno pouze na diagnostiku zánětu, ale mají diagnostický význam např. i u kardiovaskulárních onemocnění, revmatických a nádorových onemocnění a u rejekce štěpu. Mnoho APP je stále předmětem intenzivního výzkumu a zdaleka dnes není prozkoumána fyziologická a patogenetická úloha všech APP [2].

Ve své práci se zaměřím na některé z proteinů akutní fáze, především sérový amyloid A, C-reaktivní protein a jeden z novějších ukazatelů zánětu – prokalcitonin. U sérového amyloidu A se budu zabývat jeho stanovením u třech vybraných skupin pacientů imunonefelometrickou metodou na analyzátoru Immage 800. Na první skupině obézních pacientek a k ní náhodně vybrané zdravé kontrolní skupině se pokusím potvrdit stanovenou hypotézu, že koncentrace zánětlivých markerů (v tomto případě SAA a CRP) budou u obézních žen vyšší než u zdravé skupiny. U druhé skupiny složené z kojenců a dětí a třetí skupiny vybrané podle hladiny prokalcitoninu budu hodnotit korelaci mezi markery zánětu. Na skupině kojenců a dětí korelaci mezi CRP a SAA a u poslední skupiny prokalcitoninu budu porovnávat korelaci mezi PCT, CRP a SAA.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Proteiny akutní fáze (APP)

„Proteiny akutní fáze jsou sekreční proteiny jaterních buněk, jejichž tvorba a uvolnění do cirkulace jsou regulovány prozánětlivými cytokiny“ [1, s. 14]. Tato současná definice je zaměřena především na regulační mechanismus syntézy proteinů. Podle starší definice jsou proteiny akutní fáze (APP) plazmatické bílkoviny, které se tvoří v játrech a jejichž koncentrace stoupá během prvních 7 dnů zánětu o 25 % a více.

Regulaci syntézy a sekrece APP zajišťují prozánětlivé cytokiny, především interleukiny 1 a 6 (IL-1, IL-6) a tumor nektotizující faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Tvorbu APP ovlivňuje i řada dalších faktorů, např. protizánětlivé cytokiny, hormony, růstové faktory, těžké kovy i faktory fyzikální povahy. Hlavním zdrojem APP jsou játra, ale nutno dodat, že prakticky žádný protein se netvoří pouze v hepatocytech. Produkce APP probíhá v menší míře i v extrahepatálních tkáních a regulována je také prozánětlivými cytokiny [1, s. 13-14; 3, s. 73].

### 1.1.1 Reakce akutní fáze

Reakce akutní fáze je nespecifická obranná reakce organismu. Je založena na obranných a adaptačních systémech, které slouží k zajištění stability vnitřního prostředí při narušení jeho integrity. Rozvíjí se při lokálním nebo systémovém zánětu, při traumatickém poškození tkáně a při nádorovém bujení. Dochází ke kvantitativním a kvalitativním změnám v proteosyntéze. V játrech se zvyšuje exprese proteinů, které jsou potřebné pro průběh obranné reakce a pro udržení homeostázy. Stoupají hladiny plazmatických proteinů nezbytných pro obranu makroorganismu a současně klesá syntéza strukturních proteinů [1, s. 13; 3, s. 73; 4, s. 549].

Zánětlivá reakce může mít řadu příčin, může být vyvolána jak imunologickým podnětem, tak neimunologickým. Imunologickým podnětem je nejčastěji bakteriální, virová nebo parazitární infekce. Naopak neimunologickým podnětem může být poranění způsobené chemickými a fyzikálními vlivy, jako je např. popálení, poleptání nebo ozáření, dále pak může jít o poškození nádorovým bujením nebo pooperační komplikace. Cílem zánětlivé reakce je však vždy lokalizovat poškození, zamezit dalšímu šíření a následně zajistit zhojení poškozené tkáně, aby mohla dále plnit svou fyziologickou funkci [5, s. 60; 6, s. 489].

Podle rozsahu a délky trvání se rozlišují dva typy zánětlivé reakce, lokální a systémová reakce. Dále se rozlišuje akutní a chronický zánět. Akutní zánět je považován za fyziologický proces, protože většinou odezní bez následků a poškozená tkáň se kompletně zhojí. Naopak chronický zánět je vždy patologický, dochází k destrukci tkáně, částečnému nahrazení vazivem a trvalému poškození [5, s. 57].

Lokální zánětlivá reakce má své typické příznaky, mezi které patří zčervenání, otok, bolest a zvýšení teploty [5, s. 57]. Pokud je však zánět dostatečně intenzivní, projeví se systémovou reakcí. Pro celkovou reakci organismu jsou charakteristické tyto projevy: horečka, buněčná odpověď (leukocytóza), hormonální odpověď a změna koncentrace proteinů akutní fáze [3, s. 73]. V roce 1992 byla přijata společností Critical Care Society definice syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS). SIRS je systémová odezva organismu na infekční i neinfekční podněty. Jako sepse se označuje SIRS vyvolaný infekčním podnětem. Vždy jde o akutní a život ohrožující stav. SIRS může vyústit až do stavu, kdy orgánové funkce nejsou schopny udržet homeostázu a dochází k multiorgánové dysfunkci, která se označuje jako syndrom multiorgánového selhání (MODS) [4, s. 549].

### 1.1.2 Význam a biochemická charakteristika APP

Společnou vlastností proteinů akutní fáze je regulace jejich syntézy prozánětlivými cytokiny a zásadní význam v průběhu zánětlivé odpovědi. APP mají některé společné biochemické charakteristiky. Oligomerní uspořádání má vliv na biologické funkce APP, ovlivňuje biologický poločas a afinitu k cílovým strukturám. Typická je skupina pentraxinů s pentamerickým uspořádáním. Dalším společným znakem je významná genetická variabilita většiny APP, která má vliv na plazmatické hladiny v klidovém i zánětlivém období. Poločas APP v cirkulaci závisí na jejich funkci. APP jsou z oběhu odstraněny degradací volnými proteolytickými enzymy nebo mohou být po vazbě na specifické receptory odstraněny endocytózou [1, s. 19-21].

Proteiny akutní fáze mají své specifické funkce, většina APP má však polyfunkční charakter, jak je vidět v tabulce 1 a 2. APP působí jako regulátory zánětlivých reakcí, slouží k opsonizaci bakteriálních membrán a buněčných složek. Dále se uplatňují jako inhibitory, inaktivují proteolytické enzymy a tím chrání tkáň před proteolýzou. Mají úlohu scavengerů neboli „zametačů“, kteří zajišťují ochranu před oxidačním stresem. Důležitou funkcí je i imunomodulační aktivita, kdy dochází k ovlivnění tvorby cytokinů a leukocytů pomocí specifických receptorů pro APP. APP

mají transportní funkci, také se uplatňují při adhezi a agregaci trombocytů, aktivují komplement, dále ovlivňují koagulační kaskádu a inhibují fibrinolýzu. V neposlední řadě napomáhají v reparačních procesech, regulují buněčnou proliferaci a stimulují angiogenezi [1, s. 22-26; 6, s. 491].

### 1.1.3 Rozdělení APP

Do rodiny proteinů akutní fáze patří asi 30 plazmatických bílkovin jaterního původu s pozitivním, negativním nebo neutrálním chováním během systémové reakce [7, s. 5]. Podle toho APP dělíme:

- Pozitivní APP

Díky stimulaci IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 nebo jejich kombinaci dochází ke zvýšení plazmatické hladiny pozitivních APP [1, s. 15]. V tabulce 1 je přehled nejčastěji využívaných pozitivních APP, jejich hlavních funkcí a referenčních mezí.

**Tabulka 1. Přehled pozitivních APP**

Název	Zkratka	Referenční meze	Hlavní funkce
<b>C-reaktivní protein</b>	<b>CRP</b>	0 – 5 mg/l	opsonizace, aktivace komplementu, modulace fagocytózy, indukce apoptózy, antioxidační aktivita
<b>Sérový amyloid A</b>	<b>SAA</b>	0 - 10 mg/l	vazba HDL3, chemoatraktant monocytů, adheze trombocytů, baktericidní efekt
<b>Prokalcitonin</b>	<b>PCT</b>	0 – 0,5 $\mu$ g/l	prekurzor kalcitoninu, modulace cytokinové sítě
<b>Ceruloplazmin</b>	<b>Cpl</b>	0,2 – 0,6 g/l	transport mědi, ochrana před oxidačním stresem, stimulace angiogeneze
<b>Haptoglobin</b>	<b>Hp</b>	0,3 – 2,0 g/l	vazba volného hemoglobinu při hemolýze, inhibice lyzozomálních enzymů
<b>Hemopexin</b>	<b>Hpx</b>	1,0 – 1,9 g/l	vazba volného hemu při hemolýze, ochrana před oxidačním stresem
<b>Fibrinogen</b>	<b>Fbg</b>	2 – 4 g/l	faktor koagulační kaskády, agregace trombocytů
<b><math>\alpha_1</math>-antitrypsin</b>	<b>AAT</b>	1,2 – 2,4 g/l	ochrana před proteolýzou, imunomodulační aktivita, SERPIN

<b><math>\alpha_1</math>-antichymotrypsin</b>	<b>AACT</b>	0,18 – 0,26 g/l	ochrana před proteolýzou, imunomodulační aktivita, SERPIN
<b>Inhibitor aktivátoru plasminogenu 1</b>	<b>PAI-1</b>	0,11 – 0,69 g/l	inhibice fibrinolýzy, ovlivnění koagulační kaskády, SERPIN
<b><math>\alpha_1</math>-kyselý glykoprotein (orosomukoid)</b>	<b>AGP</b>	0,5 – 1,2 g/l	inhibice T-lymfocytů, stimulace fibroblastů, vazba APP a hormonů
<b><math>\alpha_2</math>-makroglobulin</b>	<b>AM</b>	1,2 – 2,4 g/l	zasahuje do buněčné proliferace, inhibice NK buněk, fibrinolýzy, tvorby volných radikálů
<b>Složky komplementu C3 a C4</b>	<b>C3, C4</b>	C3 0,75 - 1,4 C4 0,1 - 0,34 g/l	Lýza bakterií, buněk

*Upraveno dle [1, s. 16-26 ], doplněno [4, s. 832-863].*

#### ▪ Negativní APP

Mezi negativní APP patří albumin, prealbumin a transferin (tabulka 2). Během reakce akutní fáze dochází k poklesu plazmatické hladiny těchto bílkovin. Prozápětivé cytokiny inhibují jejich tvorbu v játrech. Negativní APP jsou důležité transportní a strukturní proteiny, které se uplatňují především v klidovém období. Příčinou snížení je jejich urychlený katabolismus a omezení proteosyntetické kapacity jater. Játra tvoří přednostně pozitivní APP, což jsou proteiny imunitních, zánětlivých a reparačních dějů, které jsou nezbytné pro překonání akutní fáze zánětu [1, s. 15; 3, s. 73].

**Tabulka 2. Přehled negativních APP**

Název	Referenční meze	Hlavní funkce
<b>Albumin</b>	35 – 50 g/l	transportní protein, udržuje onkotický tlak
<b>Prealbumin</b>	0,19 – 0,39 g/l	transportní protein
<b>Transferin</b>	2,2 – 3,6 g/l	transport a metabolismus železa, baktericidní účinky, stimulace buněčné proliferace

*Převzato a upraveno dle [1, s. 23].*

#### ▪ Neutrální APP

Jsou to proteiny, jejichž koncentrace se během zánětu nemění. Zda bude hodnota proteinu neutrální, vždy záleží na konkrétní situaci. Neutralita APP je způsobena odlišným efektem IL-6 na jedné straně a IL-1 a TNF- $\alpha$  na straně druhé. Příkladem je

sérový amyloid P (SAP). IL-6 stimuluje expresi a sekreci SAP, zatímco IL-1 expresi v jaterních buňkách inhibuje. IL-1 tedy blokuje IL-6 a plazmatická hladina se nemění [1, s. 15].

Proteiny akutní fáze se dále mohou dělit do 3 skupin podle rychlosti změn plazmatické koncentrace:

- Časné APP

Pro časné APP je typická velmi rychlá odpověď, nárůst koncentrace je patrný již za 6 až 10 hodin. Patří sem bílkoviny s velmi krátkým biologickým poločasem. Jejich vzestup vrcholí během druhého a třetího dne. Nárůst plazmatické koncentrace může být až 1000násobný oproti fyziologické hodnotě. Patří sem především C-reaktivní protein, sérový amyloid A a prokalcitonin.

- Středně rychle reagující APP

Nástup těchto proteinů je o něco pozvolnější než u časných APP. Koncentrace stoupá za 12 až 16 hodin od počátku zánětu a maxima dosahují 72 až 96 hodin od začátku zánětu. Patří sem např.  $\alpha_1$ -kyselý glykoprotein,  $\alpha_1$ -antitrypsin, haptoglobin a fibrinogen. Vzestup koncentrace je maximálně 2 - 4násobný.

- Pozdní APP

Plazmatická koncentrace stoupá velmi pozvolna za 48 až 72 hodin, maximální vzestup hladiny je nejčastěji 50 až 100 %. Hlavními zástupci jsou ceruloplazmin a složky komplementu C3 a C4 [8; 6, s. 492].

#### **1.1.4 Cytokiny**

Cytokiny jsou zánětlivé mediátory, tvoří velkou skupinu informačních molekul, které mají polypeptidovou strukturu. Jejich působení je převážně autokrinní a parakrinní, ale některé cytokiny s velkou prozánětlivou aktivitou, hlavně IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ , někdy mohou mít i endokrinní účinek podobně jako hormony. Cytokiny se vážou na specifické buněčné membránové receptory. Zdrojem cytokinů jsou především všechny buňky imunitního systému, ale schopnost tvořit cytokiny mají i somatické buňky, tím je zajištěna meziorgánová komunikace a homeostáza. Jejich účinky se prostřednictvím jednoduchých i složitých zpětných vazeb vzájemně ovlivňují,

překrývají a doplňují. V současné době je popsáno přes 130 cytokinů, ale jejich celkový počet se odhaduje na 300 [4, s. 550].

Podle své funkce se cytokiny dělí na zánětlivé, protizánětlivé, uplatňující se v buněčné imunitě, v humorální imunitě a dále na interferony a hematopoetické cytokiny [3, s. 159].

Zánětlivé cytokiny jsou hlavním podnětem k syntéze proteinů akutní fáze. IL-6 je hlavním induktorem syntézy pozitivních APP a zároveň inhibitorem negativních APP. IL-1 a TNF- $\alpha$  mají také přímou stimulační aktivitu na játra, ale většinou působí zprostředkovaně indukcí IL-6. Vzájemný vztah cytokinů a proteinů akutní fáze je oboustranný a ovlivňují ho jednoduché nebo složité zpětné vazby. Pro hladký průběh zánětlivé odpovědi je také důležitá přítomnost glukokortikoidů. Glukokortikoidy jsou důležité pro optimální tvorbu APP, mají komplexní charakter a nelze je označit jako inhibiční nebo stimulační [1, s. 41-42].

## 1.2 Sérový amyloid A (SAA)

Sérový amyloid A je společný název pro rodinu polymorfních apolipoproteinů. SAA patří mezi hlavní APP, je syntetizován především v játrech a jeho koncentrace stoupá působením zánětlivých cytokinů. Je to vazebný protein HDL. Do skupiny SAA řadíme několik strukturně podobných proteinů, které jsou kódovány v multigenním komplexu na chromozomu 11. Exprese proteinů může být jak konstitutivní, tak indukovaná zánětlivými faktory. SAA je stejně senzitivní APP jako CRP, ale přesto není zdaleka tak často využíván v diagnostice neboť jeho úloha byla zjištěna později a teprve nedávno byly vyvinuty metody stanovení pro rutinní praxi [1, s. 61-62; 9].

### 1.2.1 Genetická a biochemická charakteristika

SAA je skupina proteinů, kódovaných různými geny, které se nacházejí na 11. chromozomu. Na krátkém raménku 11. chromozomu byly identifikovány 4 geny, označené SAA-1 – 4. Všechny geny mají shodnou strukturu, skládají se ze 4 exonů a 3 intronů, což je typické pro geny apolipoproteinů. SAA-1 a SAA-2 mají stejnou sekvenci nukleotidů a kódují identický protein. Exprese je indukovaná zánětlivými cytokiny a jejich produkt má vlastnosti APP. Produkt SAA-1 a SAA-2 se označuje jako A-SAA. SAA-1 má 3 alelické varianty SAA-1-alfa, -beta, -gamma a SAA-2 má 2 alely SAA-2-alfa, -beta. SAA-3 je pseudogen. SAA-4 je zánětlivými stimuly regulován jen



minimálně. Produktem SAA-4 je konstitutivní SAA označený C-SAA, jeho exprese se velmi liší od A-SAA. Primární struktura C-SAA má jen 55 % homologii s A-SAA [1, s. 62; 9, s. 381-382].

Biochemická struktura není zatím dostatečně prozkoumána. Uspořádání SAA v cirkulaci je monomerní i hexamerní a obě formy jsou v rovnováze. Sekundární struktura je tvořena  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -strukturou. Molekulová hmotnost je 11 až 15 kDa [1, s. 62-63]. Předpokládaný biologický poločas SAA je asi 1 hodina, ale není úplně přesně znám. SAA je časný marker zánětu, jeho koncentrace stoupá během 6 až 9 hodin od zánětlivého stimulu. Normální plazmatické hladiny jsou 0 až 10 mg/l. Koncentrace SAA v klidovém stadiu nepřesáhne 20 mg/l, ale po výrazném stimulu, jako je např. operace nebo infekce mohou hodnoty stoupat k 400 až 500 mg/l nebo i výše. Syntéza SAA je indukována prozánětlivými cytokiny, hlavně IL-1 a IL-6 [10, s. 81; 1, s. 63].

### 1.2.2 Funkce a význam

SAA jsou malé apolipoproteiny, které během reakce akutní fáze rychle asociují s třetí frakcí vysoce denzních lipoproteinů (HDL3). Význam vazby mezi SAA a HDL3 není zatím zcela jasný. SAA chrání před oxidačním stresem v místě zánětu, protože inhibuje tvorbu kyslíkových radikálů. Dále působí jako chemoatraktant a regulátor migrace monocytů, neutrofilů a lymfocytů skrz endoteliální stěnu. Na membráně monocytů se nacházejí specifická vazebná místa pro SAA. Dalšími funkcemi SAA jsou adheze trombocytů a přímý baktericidní efekt [1, s. 64-65].

Při akutním zánětu přináší produkce SAA organismu výhody. U chronického zánětu má kvůli dlouhodobé nadprodukci nepříznivé důsledky. V zánětlivém ložisku dochází k uvolňování IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$  z buněk zánětlivého infiltrátu. Uvolněné cytokiny stimulují játra k produkci SAA. SAA je prekurzor amyloidu A (AA). V lyzozomech dochází k proteolytickému štěpení a degradaci SAA na amyloid A. Amyloid A se ukládá v orgánech a vzniká sekundární amyloidóza. Amyloidóza je onemocnění, které se projevuje hromaděním látek proteinové povahy v extracelulárním prostoru. Sekundární amyloidóza navazuje na chronická zánětlivá onemocnění infekčního i neinfekčního původu. Postihuje především ledviny, játra, slezinu, nadledviny, lymfatické uzliny a střevo. Poškození orgánů může být různé, závažné je především u ledvin, kde hrozí selhání [1, s. 66; 11, s. 59].

Autoři Ryšavá et al. hodnotili vliv SAA na vznik a progresi sekundární amyloidózy ledvin. Bylo vyšetřeno 22 nemocných s histologicky prokázanou

amyloidózou ledvin a 23 zdravých dobrovolníků. Hladiny SAA dobře korelují s ostatními markery zánětu. SAA je přeměněn na amyloid A působením leukocytárních proteáz a za přispění glykosaminoglykanů. Cílem bylo najít souvislost mezi SAA a rozsahem amyloidových depozit. Mimo jiné byla prokázána jednoznačná korelace mezi SAA a CRP. Hladiny SAA byly výrazně zvýšeny u skupiny pacientů s amyloidózou, nejvyšší hodnoty byly u jedinců s pokročilým onemocněním. Nebyla prokázána přímá souvislost mezi SAA a hladinami TNF- $\alpha$  a IL-6. Je zřejmé, že pro další progresi amyloidózy je potřeba dlouhodobé zvýšení SAA a ne jednorázový výkyv k vysokým hodnotám [12, s. 151-154].

SAA představuje podobně jako CRP rizikový faktor rozvoje aterosklerózy. Ateroskleróza hrozí hlavně jedincům s chronickým zánětem, tedy se zvýšenou koncentrací A-SAA [1, s. 187].

### 1.3 C-reaktivní protein (CRP)

Název proteinu je odvozen od jeho schopnosti reagovat s C-polysacharidem *Streptococcus pneumoniae*. Byl objeven v roce 1930 Williamem Tillem a Thomasem Francesem z Rockefellerovy univerzity. Patří mezi pentraxiny. Je to nejdéle známý a klinicky nejvýznamnější APP. U zdravého člověka je jeho koncentrace velmi nízká, během zánětlivého stimulu však stoupá až na několiknásobek původní hladiny. Během velmi intenzivní zánětlivé reakce může hladina dosáhnout až tisícinásobku. Koncentrace v séru roste za 6 až 9 hodin po začátku zánětu a vrcholí za 1 až 3 dny. Syntéza probíhá v hepatocytech a je vyvolána cytokiny, především interleukinem 6. Nárůst koncentrace vyvolá především bakteriální zánět, u virových zánětů je zvýšení minimální. Stanovení CRP se uplatňuje například pro včasnou diagnostiku a sledování průběhu bakteriální infekce, k odlišení bakteriální a virové infekce, záchyt hnisavých komplikací po operacích, sledování akutního infarktu myokardu, revmatických chorob a maligních onemocnění [1, s. 43-48; 3, s. 71]. CRP je velmi citlivý parametr, ale nespecifický. Neinformuje o tíži onemocnění, ale pouze o přítomnosti infekce. Ke stimulaci sekrece stačí malá zánětlivá reakce, zvyšuje se hlavně při lokalizované infekci, ale i při sepsi, při rejekci štěpu a po operaci [4, s. 535].

### 1.3.1 Pentraxiny

Pentraxiny jsou proteiny s multimerickým a pentagonálním uspořádáním. Můžeme je rozdělit na dvě skupiny. Klasické, tzv. krátké pentraxiny, mezi které se řadí nejdéle známý představitel pentraxinů CRP a sérový amyloid P (SAP). Druhá skupina jsou dlouhé pentraxiny, byly objeveny počínaje rokem 1993 a jejich počet pravděpodobně není definitivní. Zatím je známo 5 dlouhých pentraxinů – pentraxin 3 (PTX3), neuronální pentraxin 1 (NP1), neuronální pentraxin 2 (NP2), neuronální pentraxinový receptor (NPR) a polydom. Ve srovnání s krátkými pentraxiny mají molekulovou hmotnost podjednotek přibližně dvojnásobnou, proto byla skupina označena jako dlouhé pentraxiny. Většina dlouhých pentraxinů nepatří mezi APP, jejich syntéza není přísně vázána na játra. Regulace a lokalizace syntézy je variabilní.

Název celé skupiny pentraxinů je odvozen od hlavního zástupce CRP, který má pentagonální tvar molekuly. Lidský CRP je pentamer, tvoří ho 5 identických globulárních podjednotek o hmotnosti 25 kDa spojených nekovalentní vazbou do jednoho pentamerického cyklu. Další zástupce skupiny krátkých pentraxinů je SAP, který je dekamer. Tvoří ho tedy 10 podjednotek uspořádaných do dvou nekovalentně navázaných pentamerických cyklů. Oba krátké pentraxiny jsou reaktanty akutní fáze, ale jejich koncentrace je závislá na živočišném druhu. CRP je hlavní reaktant akutní fáze u člověka a SAP je hlavní APP u hlodavců. U člověka se SAP při reakci akutní fáze chová jako neutrální APP. CRP a SAP jsou součástí nespecifické obranné reakce organismu, váží se na fragmenty nukleárních struktur, které se uvolňují z poškozených buněk při zánětu. Každá z podjednotek CRP může vázat 2 atomy  $\text{Ca}^{2+}$ . CRP za přítomnosti kalciových iontů váže široké spektrum ligandů, jako např. DNA a chromatin, imunokomplexy, různé sacharidy a složky komplementu [1, s. 17-61; 13, s. 100-101].

### 1.3.2 Genetická a biochemická charakteristika

Gen pro CPR je uložen na 1. chromozomu v regionu q2.1. Gen je v těsné vazbě s genem pro SAP a ve stejném regionu se nachází i pseudogen CRP (CRPP1). Gen CRP je tvořen dvěma exony, které jsou odděleny intronem. První exon kóduje úvodní sekvenci a první 2 aminokyseliny proteinu. Druhý exon kóduje dalších 204 aminokyselin [1, s. 45-46]. Jak již bylo řečeno CRP je pentamer s molekulovou hmotností 120 kDa. Biologický poločas CRP je kolem 19 hodin [10, s. 79].

### 1.3.3 Funkce a význam

„CRP působí jako opsonizující faktor pro fagocytózu bakterií, parazitů a imunokomplexů. Aktivuje klasickou kaskádu komplementu. Navíc CRP váže chromatin, histony a malé částice jaderných nukleoproteinů“ [1, s. 48-49]. Úplný rozsah všech biologických funkcí CRP není dosud objasněn. V následujících bodech jsou shrnuty a popsány hlavní známé funkce CRP:

- Opsonizace bakterií a buněčných složek

CRP je schopen vázat poškozené a nekrotické části buněk. CRP se váže na fosfatidylcholin v bakteriální stěně a na buněčných membránách kalcium-dependentní vazbou. Na každou podjednotku CRP se naváží 2 atomy  $\text{Ca}^{2+}$  a dojde ke změně alosterické konfigurace CRP. V této podobě může dojít k vazbě na cílové struktury, nejčastěji na nukleární chromatin a membrány poškozených buněk. Nedochozí však k vazbě na zdravé buňky [1, s. 49].

- Aktivace komplementu

Komplement je asi 30 sérových a membránových proteinů, z nichž hlavní složkou je 9 sérových proteinů, které označujeme C1 – C9. Po reakci na různé podněty dochází ke kaskádovité aktivaci jednotlivých složek. Komplement se aktivuje třemi cestami – alternativní, lektinovou a klasickou cestou. CRP je aktivátor klasické cesty komplementové kaskády. CRP se váže na některé mikroorganismy a poté je schopen vázat a aktivovat protein C1 [5, s. 49-52].

- Přímá imunomodulační aktivita

Na membráně neutrofilů, monocytů a NK buněk (přirozených zabíječů) jsou specifické receptory pro CRP. Spolu s dalšími faktory dochází k stimulaci nebo inhibici jejich fagocytární aktivity a dalších funkcí [1, s. 50]. CRP také přes aktivaci svých receptorů moduluje efekty prozánětlivých cytokinů [13, s. 102].

- Další funkce

Účinky CRP na funkci trombocytů a lymfocytů nejsou zatím zcela objasněny. CRP se však uplatňuje při adhezi a agregaci trombocytů. Podle některých studií má CRP také přímou antioxidační aktivitu. Přesto však hlavní funkcí CRP zůstává eliminace exogenních a endogenních patologických struktur a následná aktivace komplementu [13, s. 102].

CRP je v séru zdravých lidí přítomen v nízkých koncentracích, což je do 5 mg/l. Během zánětlivého procesu koncentrace mnohonásobně stoupají. CRP má velmi krátký

biologický poločas, proto koncentrace klesají rychle, asi 50 % za den. Tu skutečnost je možné využít při monitorování antibiotické léčby. Hladina CRP se může zvyšovat i fyziologicky, např. u novorozenců (3. den až 15 mg/l) a kojenců (do 10 mg/l), dále v těhotenství (do 20 mg/l). Zvýšení je možné i u kuřáků a po nadměrné fyzické zátěži. CRP má významnou cirkadiánní variabilitu. Koncentrace může stoupat s věkem, dále hladina souvisí s vysokým krevním tlakem, konzumací alkoholu a kávy, nízkou fyzickou aktivitou, únavou, zvýšenou hladinou triacylglycerolů, inzulínovou rezistencí a diabetem [10, s. 79].

V současné době se o CRP hovoří v souvislosti s aterosklerózou a cévními komplikacemi. V kardiovaskulární medicíně se stanovuje vysoce senzitivní CRP (hs-CRP). Stanovení CRP vysoce senzitivní metodou má nižší detekční limit a umožňuje přesné stanovení v nižších koncentracích. U jedinců s hodnotami v horní části normy (nad 2,4 mg/l) je vyšší riziko koronární příhody, cévní mozkové příhody a ischemické choroby dolních končetin než u zdravých jedinců s hodnotami pod 1 mg/l. CRP může být proteinem sledovaným v rámci prevence aterosklerózy. Není jisté, zda je CRP jen markerem aterosklerózy nebo jestli se také podílí na vzniku aterosklerózy a aterosklerotických komplikací [14, s. 329-331].

#### 1.4 Prokalcitonin (PCT)

Prokalcitonin patří mezi nové ukazatele zánětu. Mnoho let byl považován jen za prekurzor hormonu kalcitoninu, až v roce 1993 byl prokázán jeho význam jako zánětlivého mediátoru. Na prokalcitonin bylo po roce 1993 a samozřejmě i dnes zaměřeno mnoho experimentálních a klinických studií, ale přesto je stále mnoho nejasností ohledně jeho metabolismu a fyziologického významu. U zdravého člověka je produkován C-buňkami štítné žlázy a následně přeměněn na aktivní hormon kalcitonin. Při zánětu se produkce PCT přesouvá hlavně do jater. Byly prokázány vysoké plazmatické hladiny především u bakteriální a mykotické infekce. U lokálních bakteriálních infekcí a u virových infekcí se PCT významně nezvyšuje. Vysoké koncentrace najdeme u akutních bakteriálních infekcí a při sepsi. Prokalcitonin se v diagnostice uplatňuje jako senzitivní a specifický ukazatel bakteriální infekce. Plazmatická hladina PCT stoupá podle typu a rozsahu zánětu [1, s. 241; 3, s. 73].

Syntéza prokalcitoninu během zánětu není soustředěna v C-buňkách štítné žlázy, protože při zánětu se hladina zvyšuje i u jedinců s tyreoidektomií. Řadu let nebylo jasné,

kde dochází k syntéze zánětlivého prokalcitoninu. Dnes už víme, že hlavním zdrojem zánětlivého prokalcitoninu jsou játra, ale i další tkáně. Tvorba PCT byla prokázána v neuroendokrinních buňkách střeva a plic, v monocytech a makrofázích. Dále bylo potvrzeno, že k syntéze dochází i v řadě dalších buněčných typů. Regulace syntézy zánětlivého prokalcitoninu je zcela odlišná od regulace tyreoidálního PCT. Zásadní vliv na syntézu zánětlivého PCT má bakteriální endotoxin (LPS) a prozánětlivé cytokiny, hlavně TNF- $\alpha$  a IL-1. Bakteriální endotoxin je lipopolysacharid, je součástí buněčné stěny bakterií a uvolňuje se do okolí po rozpadu bakterie. LPS je hlavním stimulem pro syntézu PCT [15, s. 23-29].

V tabulce 3 jsou fyziologické vlastnosti zánětlivého PCT a pro srovnání jsou uvedeny vlastnosti PCT tvořeného C-buňkami štítné žlázy a hormonu kalcitoninu.

**Tabulka 3. Vlastnosti zánětlivého PCT a srovnání s PCT tvořeným C-buňkami štítné žlázy a kalcitoninem**

	Zánětlivý PCT	PCT tvořený C-buňkami	Kalcitonin
<b>Gen</b>	CALC-I ?	CALC-I	
<b>Zdroj</b>	hepatocyty aj.	C buňky štítné žlázy	
<b>Dominantní regulace</b>	LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1	hypokalcémie	
<b>M<sub>r</sub></b>	13 000	13 000	3500
<b>Délka řetězce</b>	116 (114) AMK	116 AMK	32 AMK
<b>Poločas v cirkulaci</b>	25 – 30 hodin	není uvolňován do oběhu	4 – 5 minut
<b>Fyziologický význam</b>	modulace cytokinové sítě?	hormonální prekurzor	kalciotropní hormon

*Převzato z [15, s. 30].*

#### 1.4.1 Genetická a biochemická charakteristika

Prokalcitonin vytvořený v C-buňkách štítné žlázy je tvořen peptidovým řetězcem o 116 aminokyselinách, ale zánětlivý PCT cirkulující v krvi obsahuje jen 114 aminokyselin. Dochází totiž k odštěpení dvou AMK. Prokalcitonin má molekulovou hmotnost 13 kDa. Prekurzorem prokalcitoninu je pre-prokalcitonin o 141 aminokyselinách, po odštěpení signálního peptidu o 25 AMK vzniká prokalcitonin.

Z prokalcitoninu intracelulárním štěpením vznikají 3 molekuly. Dojde k odstranění N-terminálního úseku (N-prokalcitonin) o 57 AMK a C-terminálního fragmentu (katakalcinu) o 21 AMK za vzniku hormonu kalcitoninu. Kalcitonin má 32 AMK a sekvence odpovídá 60. až 91. pozici řetězce PCT. Struktura zánětlivého prokalcitoninu a PCT tvořeného C-buňkami je identická. Za normálních okolností se prokalcitonin tvoří v C-buňkách štítné žlázy a skoro všechen je přeměněn v endoplazmatickém retikulu C-buněk na funkční hormon kalcitonin. Proto je jeho koncentrace u zdravého člověka neměřitelná nebo velmi nízká. Nedochází totiž k uvolnění ze štítné žlázy do oběhu [15, s. 17-19; 10, s. 81].

„Gen zodpovědný za syntézu zánětlivého PCT nebyl zatím jasně definován a dosavadní úvahy jsou pouze spekulativní. Většina vědců se nicméně domnívá, že zánětlivý PCT je kódován stejným genem jako prekurzor kalcitoninu v C-buňkách štítné žlázy“ [15, s. 20]. Gen se nachází na krátkém raménku 11. chromozomu a označuje se jako CALC-I. V sousedství tohoto genu je další trojice genů (CALC-II, CALC-III a CALC-IV). Je možné, že mají společný evoluční původ a uvažuje se i o existenci dalších neznámých genů této skupiny, které by mohli vyvolávat syntézu PCT během zánětu [15, s. 20-22].

#### **1.4.2 Uplatnění v diagnostice a interpretace nálezů**

PCT se již řadu let využívá k diagnostice zánětlivých stavů a porovnává se s dalšími užívanými zánětlivými markery. Vyšetření PCT se uplatňuje v diferenciální diagnostice zánětlivých onemocnění. Slouží k odlišení bakteriální a nebakteriální infekce. Uplatnění má také u monitorování kriticky nemocných pacientů. Vysoké a dále rostoucí hladiny PCT svědčí pro bakteriální komplikace a špatnou prognózu pro pacienta. Pokles hladiny PCT naopak znamená ústup infekce a příznivou prognózu. Dále se používá při sledování léčby a průběhu bakteriální infekce a v diagnostice bakteriálních infekcí u imunosuprimovaných pacientů [15, s. 84-88].

U zdravého jedince je koncentrace v plazmě pod 0,5 µg/l. Mírně zvýšené hodnoty jsou od 0,5 až 2 µg/l, od 3 µg/l se jedná o vysoké hodnoty a velmi vysoké jsou, pokud dosáhnou 30 až 300 µg/l. U velmi těžkých bakteriálních infekcí mohou hladiny PCT dosáhnout až na 1000 µg/l. Podle plazmatické hladiny PCT můžeme rozeznat systémové a lokalizované infekce. Pokud se infekce týká jen jednoho orgánu a nejde o systémový zánět, pak by hladina PCT neměla přesáhnout 5 µg/l. Při sepsi bývají

hodnoty nad 10 µg/l, ale mohou být i několikanásobně vyšší [4, s. 535]. Nejčastější interpretace nálezů PCT je uvedena v tabulce 4.

**Tabulka 4. Interpretace nálezů PCT**

PCT (µg/l)	Hodnocení	Vybrané klinické stavy
<b>0 – 0,5</b>	<b>normální hodnoty</b>	zdravé osoby
<b>0,5 - 2</b>	<b>mírné zvýšení</b>	lokalizovaný infekční zánět, chronický zánět, virózy (hepatitis A, B)
<b>2 - 10</b>	<b>vysoké hodnoty</b>	systémová bakteriální infekce, intenzivní SIRS nebakteriálního původu
<b>10 a více</b>	<b>velmi vysoké hodnoty</b>	těžká sepse, multiorgánové selhání

*Převzato a upraveno dle [15, s. 89].*

V následující části je shrnuto chování PCT v různých patologických i fyziologických situacích a zvýšení PCT z infekčních a neinfekčních příčin.

- Sepse a infekce

Hladina PCT stoupá u generalizované bakteriální, parazitární i plísňové infekce se systémovými projevy. K vzestupu hladiny naopak nedochází u virových infekcí a zánětlivých reakcí neinfekčního původu. Nejvyšší hodnoty nacházíme u těžké sepse. Mírně zvýšený je PCT u lokalizovaných bakteriálních infekcí, proto PCT není markerem lokalizované infekce. Vysoké hodnoty PCT jsou i u dětí s těžkými infekcemi a u novorozenců je PCT indikátorem časně i pozdní sepse. PCT se také uplatňuje při sledování léčby antibiotiky, pokud je léčba úspěšná, dojde k významnému poklesu PCT. Je třeba pamatovat na to, že nízké hladiny PCT nevylučují infekci a snížením hladiny u těžké infekce nedojde k úplnému potlačení infekce. U těchto stavů se nesmí zanedbat léčba antibiotiky [4, s. 535-536].

- Pooperační období

Prokalcitonin je součástí systémové imunitní odpovědi na operační trauma. Ke zvýšení hodnot PCT někdy dochází i u sterilních a mimobřišních výkonů, což dokazuje, že nejen bakteriální endotoxin vyvolává zvýšenou syntézu PCT. Přesné příčiny vzestupu hladiny PCT v pooperační době nejsou zatím jasné. Míra zvýšení hladiny PCT závisí na typu a rozsahu operace. Zvýšení PCT pozorujeme především u větších operací (např.: břišní a hrudní zákroky, operace v retroperitoneu a v mediastinu), hodnoty však



většinou nepřekročí 2 µg/l. Pokud je koncentrace vyšší, může jít o nástup infekčních komplikací. Přesáhnou-li hodnoty 10 µg/l, není to obvyklé a může se jednat o infekci. Hladiny se zvyšují nejčastěji 1. až 2. den po zákroku. U menších operací (např.: drobné extraabdominální výkony, laparoskopické zákroky) jsou hladiny PCT většinou v normálu. U pacientů s vysokým rizikem sepse je doporučeno denně stanovit koncentraci PCT, lze tím předejít infekčním komplikacím a vývoji sepse [4, s. 536; 15, s. 55-62].

#### ▪ Transplantace

„Infekční komplikace ohrožují život zhruba 25 % pacientů po transplantaci srdce, plic nebo jater. Ještě více (kolem 30 %) výkonů je komplikováno akutní rejekcí transplantovaného orgánu“ [15, s. 71]. Normální imunitní odpověď po podání štěpu je potlačena řadou léků (imunosupresivní léčba, kortikoidy, antibiotika). Infekce musí být včas odlišena od akutní rejekce štěpu. Plazmatická koncentrace PCT se mění podobně jako u rozsáhlé operace. Pokud nedojde ke komplikaci, plazmatické hladiny dosahují maxima 1. až 2. den po transplantaci. Akutní rejekce transplantovaného orgánu nemá žádný vliv na hladinu PCT, ale systémová bakteriální infekce vede k významnému vzestupu PCT i u imunosuprimovaných pacientů [15, s. 71-74].

#### ▪ U novorozenců

Bezprostředně po narození a několik dní po porodu bývá hladina PCT zvýšená. 24 hodin po porodu dosáhne hladina maxima (0,5 – 21 µg/l), během 48 hodin klesne pod hodnotu normální pro dospělé populaci, což je 0,5 µg/l. Význam fyziologického vzestupu PCT po narození není zatím objasněn. Přesto i u novorozenců je prokalcitonin senzitivním markerem bakteriální infekce, je však potřeba přihlídnout k této odchylce od normálních hodnot. Pokud dojde k vzestupu nad fyziologické zvýšení, je třeba zvážit výskyt novorozenecké sepse [4, s. 536; 15, s. 78].

#### ▪ Popáleninové trauma

Při popáleninách se zvyšuje hladina PCT a zvýšení je úměrné rozsahu popálení a stupni poškození tkáně. PCT se zvyšuje brzy po popáleninovém traumatu, již do 8 hodin a přetrvává několik dní [4, s. 536].

#### ▪ Nehematologické malignity

Některá maligní onemocnění vedou ke zvýšení prokalcitoninu, jedná se hlavně o medulární karcinom štítné žlázy nebo malobuněčný karcinom plic. U obou onemocnění jsou výchozí buňky příbuzné a zachovávají si schopnost produkovat PCT. U zdravého člověka je hormonální prekurzor prokalcitonin přeměněn proteolytickým

štěpením. U malignit, které pocházejí z C-buněk štítné žlázy a z neuroendokrinních buněk plic je zachována produkce PCT, ale nedochází k proteolytické degradaci [15, s.75-76].

### 1.4.3 Kalcitonin

Jelikož je PCT prekurzorem hormonu kalcitoninu, je na místě shrnout pár základních informací o kalcitoninu. Kalcitonin je peptidový hormon produkováný parafolikulárními C-buňkami štítné žlázy. Skládá se z 32 aminokyselin a má relativní molekulovou hmotnost 3500. Kalcitonin vzniká intracelulární proteolýzou prokalcitoninu v endoplazmatickém retikulu C-buněk štítné žlázy. Hlavní funkcí kalcitoninu je snižovat hladinu sérového kalcia. Je antagonistou parathormonu produkovaného příštítnými tělisky. Stimulem pro jeho sekreci je zvýšená koncentrace kalcia. Kalcitonin se využívá i jako tumorový marker k diagnostice a monitorování medulárního karcinomu štítné žlázy [3, s. 107; 4, s. 197].

## 1.5 Srovnání SAA, CRP a PCT

Společným znakem sérového amyloidu A, C-reaktivního proteinu i prokalcitoninu je velmi nízká nebo zanedbatelná plazmatická hladina v klidových stavech, ale při infekčním nebo neinfekčním zánětu dochází velmi rychle k výrazné indukci syntézy. Plazmatická koncentrace může stoupat 100x až 1000x [1, s. 224].

CRP a SAA jsou považovány za nejcitlivější reaktanty akutní fáze. Hladina SAA v séru se zvyšuje i u virových infekcí více než CRP. CRP a SAA však nejsou specifické parametry, naopak PCT je specifický ukazatel sepse, syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) a také syndromu multiorgánového selhání (MODS). U virových infekcí, autoimunitních poruch a malignit se PCT zvyšuje jen minimálně nebo vůbec [16, s. 469-470].

Při stanovení zánětlivých markerů je nejdůležitější zvolit vhodný marker nebo jejich kombinaci, tak aby co nejvíce vypovídaly o stavu pacienta.

V tabulce 5 jsou pro porovnání uvedeny některé vlastnosti zánětlivých markerů – SAA, CRP a PCT.

**Tabulka 5. Vlastnosti SAA, CRP a PCT**

Jednotlivé parametry	Sérový amyloid A	C-reaktivní protein	Prokalcitonin
<b>Zkratka</b>	SAA	CRP	PCT
<b>Referenční meze</b>	0 - 10 mg/l	0 – 5 mg/l	0 – 0,5 µg/l
<b>Relativní molekulová hmotnost</b>	11 – 15 kDa	120 kDa	13 kDa
<b>Biologický poločas</b>	1 hodina	19 hodin	25 – 30 hodin
<b>Lokalizace genů</b>	krátké raménko 11. chromozomu	dlouhé raménko 1. chromozomu	krátké raménko 11. chromozomu
<b>Délka řetězce (AMK)</b>	104 - 112 AMK	206 AMK	116 (114) AMK
<b>Vzestup hladiny</b>	za 6 – 9 hodin	za 6 – 9 hodin	za 6 – 8 hodin
<b>Dominantní regulace</b>	IL-1, IL-6	IL-6	LPS, TNF- $\alpha$ , IL-1

## 1.6 Metody stanovení

Stanovované zánětlivé markery by ideálně měly splňovat několik ekonomických i diagnostických požadavků. Markery vhodné pro rutinní stanovení by měly mít vysokou senzitivitu a specificitu, možnost statimového stanovení, dále snadnou interpretaci výsledků a v neposlední řadě by měly být cenově dostupné. Je velmi těžké splnit všechny požadované parametry. Proto metody stanovení zánětlivých markerů procházejí neustálým vývojem a vylepšují se stávající metody, aby markery splňovaly diagnostická i ekonomická kritéria a zároveň byla zajištěna co nejlepší péče pacientům [1, s. 245-248].

Proteiny akutní fáze jsou nejčastěji stanovovány pomocí turbidimetrie a nefelometrie. Jsou to optické zákalové metody založené na rozptylu záření heterogenními částicemi. Měříme stupeň zákalu neboli turbiditu. Na heterogenní částice dopadá záření o určité vlnové délce, dochází k odrazu a lomu záření a částečně k absorpci záření. Vzniklé sekundární záření vychází z roztoku všemi směry. Tento jev byl popsán J. Tyndallem, proto rozptyl záření označujeme jako Tyndallův efekt a rozptýlené světlo jako tzv. Tyndallovo světlo [17, s. 76].

### 1.6.1 Turbidimetrie a nefelometrie

#### Imunochemické metody

V klinické biochemii je mnoho metod, které jsou zaměřené na měření stupně zákalu – turbidity. Nejvýznamnější z nich jsou imunochemické metody [18]. Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie jsou běžné analytické metody, které jsou kombinací imunologických a biochemických metod. Základem je reakce antigenu se specifickou protilátkou za vzniku imunokomplexu. Sledujeme koncentraci příslušného antigenu, která je úměrná hustotě zákalu nebo rychlosti tvorby zákalu. V současnosti tyto metody ovládají stanovení sérových bílkovin v rutinních laboratořích [19, s. 45].

#### Turbidimetrie

Turbidimetrie je optická metoda založená na měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích. Při měření je obtížné získat dostatečně stálou reakční směs, proto se používají ochranné koloidy, nejčastěji polyethylenglykol (PEG). Absorbance primárního toku záření po průchodu rozptylujícím prostředím, což je koloidní roztok nebo roztok zakalený sraženinou se měří ve směru dopadajícího záření absorpčními fotometry nebo spektrofotometry [20, s. 167; 21, s. 272-273]. „Fotometrická citlivost je nepřímo úměrná vlnové délce. Proto se např. specifické proteiny často stanovují při nejkratší vlnové délce dosažitelné standardním fotometrem, tj. při 340 nm v blízké UV oblasti. Do střední UV oblasti nelze dále postupovat, i kdyby to spektrofotometr technicky umožňoval, neboť se začne projevovat absorpce nezreagovaných bílkovin, která může hrubě zkreslit měření zákalu imunokomplexu“ [22, s. 7].

#### Nefelometrie

Nefelometrie je metoda založená na měření intenzity difusně rozptýleného světla na dispergovaných částicích. Rozptýlené světlo, které vychází z roztoku všemi směry, měříme pod jiným úhlem než je úhel dopadu paprsků. Pro toto měření se používá buď nefelometrický nástavec k fotometru nebo speciální nefelometr, který bývá plně automatizován [21, s. 273]. Používají se laserové a konvenční nefelometry. Laserový nefelometr je zdrojem monochromatického záření, které je velmi intenzivní a má vysoký stupeň směrovosti. Pro měření se používají helium-neonové nebo argonové lasery. Světlo rozptýlené po průchodu laserového paprsku kyvetou je detekováno

detektorem, který je umístěn pod úhlem 5 až 35° nebo 70 až 90°. Zdrojem záření u konvenčních nefelometrů je halogenová žárovka nebo xenonová výbojka. Tyto světelné zdroje vydávají polychromatické záření, proto se používají interferenční filtry. Stupeň směrovosti u konvenčních nefelometrů je nízký, proto je detektor nastaven pod úhlem 70 až 90° [18].

### 1.6.2 Stanovení SAA

CRP a SAA jsou nejcitlivější ukazatele pro hodnocení zánětu, ale přesto není SAA zdaleka tak často vyšetřován jako CRP. Je to způsobeno dlouho neexistující vhodnou metodou pro rutinní praxi a problematická je také produkce vhodné protilátky proti SAA. To může být způsobeno hydrofobní povahou SAA. Vývoj nových metod však stanovení SAA v klinických laboratořích usnadňuje.

SAA lze stanovit pomocí různých metod, např. radioimunoanalýza, radiální imunodifúze a ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Všechny metody jsou však vhodné spíše pro výzkumné laboratoře a ne pro rutinní provoz. Pro stanovení SAA v rutinních laboratořích bylo nutné zavést automatizovanou a rychlou metodu, která by umožňovala i statimová vyšetření. Proto byla vyvinuta imunochemická metoda stanovení pomocí latexové aglutinace. Existuje i automatizovaná metoda ELISA pro stanovení SAA, která je velmi citlivá, ale nemá široké využití [9, s. 381-384].

- Stanovení imunonefelometrickou metodou

Tato metoda byla použita ke stanovení SAA u všech vzorků této bakalářské práce. Stanovení je založeno na principu imunonefelometrie. Přesný princip a podrobný popis metody viz experimentální část.

### 1.6.3 Stanovení CRP

C-reaktivní protein je rutinně nepoužívanější a nejčastěji stanovovaný protein akutní fáze. V naprosté většině případů se používá jako marker zánětu a slouží k posouzení odpovědi organismu na léčbu, i když význam a funkce CRP v lidském těle jsou širší [14, s. 330]. Následují příklady metod, kterými lze CRP stanovit.

- Stanovení imunoturbidimetrickou metodou

Touto metodou na principu imunoturbidimetrie byla stanovována hladina CRP u všech vzorků v této bakalářské práci. Metoda je založena na reakci protilátky proti lidskému

CRP, která je navázána na latexových částicích s CRP obsaženým ve vzorku. Vzniká nerozpustný imunokomplex, který zvyšuje turbiditu reakční směsi. Stupeň turbidity je úměrný množství CRP ve vzorku a měří se při 596 nm [23]. Měření hladin CRP bylo provedeno na ÚKBP FN v Motole na biochemickém analyzátoru Advia 1800.

- Stanovení imunonefelometrickou metodou

Stanovení je založeno na principu nefelometrie. „K fosfátovému pufru se přidá naředěné lidské sérum a polyklonální kozí protilátka proti lidskému CRP navázaná na částicích. Imunoreakcí vznikají nerozpustné komplexy, které tvoří zákal a ten se měří nefelometricky pod úhlem 90° od dopadajícího laserového paprsku při 670 nm“ [22, s. 9].

- Vysoce senzitivní stanovení CRP (hs-CRP)

Díky moderním metodám na principu imunoturbidimetrie a imunonefelometrie je možné měřit CRP s velmi vysokou citlivostí s detekčním limitem 0,20 mg/l. V současnosti jsou dostupné i metody schopné měřit hs-CRP v koncentracích okolo 0,15 mg/l. Stanovení hs-CRP se uplatňuje u pacientů s anginou pectoris a chronickou koronární nemocí, zvýšené koncentrace hs-CRP mohou předpovědět srdeční příhodu. Pacienti s vyšší koncentrací hs-CRP mají větší riziko kardiovaskulárního onemocnění. Hladiny hs-CRP se zvyšují při obezitě, u diabetiků a u kuřáků [24, s. 163-164].

- POCT

POCT (point-of-care testing) je zkratka využívaná pro vyšetření provedená přímo v místě ošetření pacienta. U stanovení CRP je tato metoda stále více využívána, jak v nemocnicích, tak v terénní praxi. Pomocí malého přenosného turbidimetru je možné stanovit CRP během několika minut [19, s. 98].

#### **1.6.4 Stanovení PCT**

V následující části jsou popsány příklady metod, kterými lze prokalcitonin stanovit.

- Stanovení elektrochemiluminiscenční metodou

Touto metodou byla stanovena hladina PCT u všech vzorků ze skupiny prokalcitoninu na ÚKBP FN v Motole. Měření byla provedena na analyzátoru Cobas e411. Stanovení

je založeno na principu sendvičové metody. Po smíchání dvou elektrochemicky aktivních substancí dochází při určitém napětí na platinové elektrodě k reakci vedoucí k emisi světla. Biotinylovaná monoklonální protilátka proti PCT a monoklonální protilátka značená rutheniovým komplexem reagují s antigenem ve vzorku za vzniku sendvičového komplexu. Po inkubaci se přidají mikročástice potažené streptavidinem, dochází k interakci mezi biotinem a streptavidinem. Poté po nasátí reakční směsi jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou odstraněny. Napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem. Výsledky jsou vyhodnoceny podle kalibrační křivky [25].

- Imunochromatografické stanovení PCT

Jedná se o semikvantitativní stanovení PCT, které slouží jako orientační vyšetření, především při diagnostice sepse a septického šoku. Metoda je založena na principu imunochromatografické analýzy. Stanovení se provádí na vyšetřovacím proužku, který obsahuje dvojici protilátek proti odlišným sekvencím molekuly lidského PCT. Na proužek se nanese pipetou sérum nebo plazma a poté 30 minut probíhá inkubace. Intenzita barvy testovacího proužku je přímo úměrná koncentraci PCT. Koncentrace je vyhodnocena na základě porovnání s referenční barevnou škálou [15, s. 111-112].

## 2 Cíle práce

1. Stručně shrnout základní poznatky o proteinech akutní fáze a podrobněji se zaměřit na sérový amyloid A, C-reaktivní protein a prokalcitonin. Popsat jednotlivé metody stanovení SAA, CRP a PCT.
2. Stanovit hladiny SAA u všech vybraných skupin pacientů imunonefelometrickou metodou na analyzátoru Immage 800.
3. Statisticky porovnat naměřené hodnoty u jednotlivých skupin.
  - U skupiny obézních pacientek porovnat naměřené hodnoty CRP a SAA s hodnotami kontrolní skupiny zdravých žen a pokusit se prokázat stanovenou hypotézu, že koncentrace zánětlivých markerů budou u obézních pacientek vyšší než u zdravých žen.
  - U skupiny kojenců a dětí s nízkými hodnotami CRP zjistit, zda CRP koreluje s hladinou SAA.
  - Na skupině probandů vybraných podle hladiny PCT zhodnotit korelaci mezi PCT, CRP a SAA.



## 3 Experimentální část

### 3.1 Soubor pacientů

#### 3.1.1 Skupiny pacientů

Byly sledovány 3 skupiny pacientů:

##### 1. Obézní pacientky a negativní kontrolní skupina

Skupina obézních zahrnovala 24 pacientek, do skupiny byly vybrány pouze ženy ve věku 20 až 55 let s BMI nad 30. K obézním pacientkám byla náhodně vybrána skupina dvaceti zdravých žen také ve věku 20 až 55 let s normálním BMI, tedy BMI pod 25. U všech žen byl stanoven cholesterol, triacylglyceroly, HDL cholesterol, LDL cholesterol, CRP a SAA.

##### 2. Kojenci a děti s CRP pod 3 mg/l

Skupina kojenců a dětí celkem zahrnovala 60 probandů. Parametrem pro výběr byla hodnota CRP pod 3 mg/l. Skupina byla rozdělena na 6 podskupin podle věku, tak aby byly zahrnuty různé věkové kategorie. V podskupinách byly kojenci a děti od narození do 2 let. Každá věková skupina byla po 10 vzorcích. U všech probandů byl stanoven CRP a SAA.

Rozdělení podle věku:

- 0 – 30 dnů
- 31 – 60 dnů
- 61 – 90 dnů
- 91 – 180 dnů
- 181 dnů – 1 rok
- 1 – 2 roky

##### 3. Skupina prokalcitoninu

Skupina byla rozdělena na 4 podskupiny podle hladin prokalcitoninu a každá zahrnovala 25 vzorků, celkem tedy bylo nasbíráno 100 vzorků. Skupina prokalcitoninu byla rozdělena na podskupiny, tak aby soubor zahrnoval vzorky jak s normálními hodnotami PCT, tak i mírně zvýšené, vysoké i velmi vysoké hladiny (viz tabulka 4). U všech vzorků byl stanoven PCT, CRP a SAA.

Rozdělení podle hladiny PCT:

- 0 – 0,5 µg/l

- 0,51 – 2,0 µg/l
- 2,1 – 10,0 µg/l
- 10,1 - >10,1 µg/l

### 3.1.2 Metodika sběru a přechovávání vzorků

Vzorky byly postupně sbírány během prosince 2011 a ledna 2012 na Ústavu klinické biochemie a patobiochemie FN v Motole. Nejprve se sbíraly vzorky skupiny prokalcitoninu. Z laboratorního informačního systému byl vytištěn seznam vybraných pacientů, u kterých byl vyšetřen prokalcitonin a CRP. Podle seznamu byly vyhledány příslušné vzorky uložené v lednicích. U skupiny prokalcitoninu se u všech vybraných vzorků odebralo ze zkumavky minimálně 500 µl séra do předem označené mikrozukavky Eppendorf. Pro přehlednost a lepší orientaci v množství vzorků se každá ze čtyř podskupin odebírala do různě barevných mikrozukavek. Podskupinu s hladinou PCT 0 až 0,5 µg/l do čiré mikrozukavky, hladinu PCT 0,51 až 2,0 µg/l do žluté, 2,1 až 10 µg/l do červené a 10,1 µg/l a více do modré mikrozukavky Eppendorf. Mikrozukavka byla vždy přehledně popsána jménem pacienta a číslem vzorku.

Poté se sbíraly vzorky kojenců a dětí. Z laboratorního informačního systému se tentokrát vytiskl seznam kojenců a dětí ve věku od narození do dvou let s hladinou CRP pod 3 mg/l. Opět se podle seznamu dohledávaly vzorky uložené v lednicích. U této skupiny byl problém s množstvím séra. Kvůli nedostatku materiálu se muselo mnoho vzorků vyřadit. Odebíralo se vždy alespoň 300 µl, pokud séra bylo méně, vzorek se nepoužil. Sérum se také odebíralo do předem označených mikrozukavek Eppendorf.

Vzorky poslední skupiny obézních pocházely od pacientek Metabolické ambulance ÚKBP FN Motol a byly průběžně posílány do laboratoře ÚKBP FN v Motole ke zpracování. Z každé zkumavky se opět odebralo sérum do mikrozukavky předem označené jménem pacientky. Kontrolní skupina se skládala z dobrovolnic, což byly náhodně vybrané zdravé ženy v požadovaném věkovém rozmezí 20 až 55 let a s BMI pod 25. Do této skupiny jsem přispěla i já vlastním vzorkem krve.

Krev byla nabírána do odběrových zkumavek Vacuette s aktivátorem srážení. Zkumavky byly po příjmu centrifugovány 10 minut při 4000 ot/min a teplotě 4 až 6 °C. Všechny vzorky v mikrozukavkách Eppendorf se vždy hned zamrazily a uchovávaly při -20 °C v mrazničce s kontrolovaným režimem teploty. Vzorky je možné uchovávat zamražené maximálně 3 měsíce a po rozmražení se už nesmí znovu zamrazit. Před analýzou se vzorky nechaly rozmraznout a poté se důkladně promíchaly na třepačce.

## 3.2 Metoda stanovení SAA

Hlavním úkolem praktické části bakalářské práce bylo stanovit u všech vzorků sérový amyloid A na biochemickém analyzátoru Immage 800. Všechna měření byla provedena na Ústavu klinické biochemie a patobiochemie FN v Motole.

### 3.2.1 Princip metody

Stanovení sérového amyloidu A na analyzátoru Immage 800 je založeno na principu imunonefelometrie. Nefelometrie je optická metoda založená na měření intenzity difuzně rozptýleného světla na dispergovaných částicích. V případě imunonefelometrie se světlo odráží od imunokomplexu, který vzniká reakcí specifické protilátky s antigenem ve vzorku [20, s. 168]. U stanovení sérového amyloidu A reagují polystyrenové částice potažené specifickými protilátkami proti lidskému SAA se vzorkem obsahujícím SAA. Vzniklé agregáty rozptylují laserový paprsek o vlnové délce 670 nm procházející vzorkem. Intenzita rozptýleného světla je úměrná koncentraci SAA ve vzorku. Výsledek se stanoví srovnáním se standardním vzorkem o známé koncentraci [26].

### 3.2.2 Immage 800

Nefelometr Immage 800 je plně automatizovaný analyzátor od firmy Beckman Coulter. Je možné vyšetřovat 24 biochemických parametrů najednou, přístroj je zaměřen na analýzu specifických proteinů a lékových hladin. Umožňuje přednostně zpracovat statimové vzorky a jeho výkon je maximálně 180 testů za hodinu. Analyzátor je řízen externím počítačem. Výsledky jsou vyhodnocovány počítačem z kalibračních křivek a převedeny na požadované jednotky. U stanovení SAA je výsledek uváděn na 2 desetinná místa v mg/l. Analyzátor provádí výpočet z naměřené absorbance a kalibrační křivky uložené v paměti přístroje. Doba potřebná k získání prvního výsledku je 10 minut. Provozní teplota analyzátoru je 15 až 32 °C. Zdrojem světla je laser o vlnové délce 670 nm [27].

### Kalibrace

Při kalibraci se analyzují vzorky o známé koncentraci. Na základě odezvy přístroje a přiřazením odezvy ke známé koncentraci se vytvoří kalibrační křivka, která slouží k hodnocení vzorků o neznámé koncentraci. Kalibrace se provádí vždy při zavedení metody a dále, při změně šarže, či pokud naměřené hodnoty kontrol nespadají

do stanovených mezí nebo na analyzátoru byla provedena oprava, výměna nebo pravidelná údržba měřících součástí. Jako kalibrační materiál pro SAA se používá standard od firmy Siemens (N SAA Standard SY). Koncentrace standardu je vždy uvedena v příbalovém letáku pro danou šarži. Jako nulový kalibrátor se používá Diluent 1 od firmy Beckman Coulter. Kalibrátor je v lyofilizovaném stavu, proto se musí před použitím rozpustit. Lyofilizovaný obsah lahvičky se rozpustí přidáním 0,5 ml destilované vody, poté se jemně promíchá a je připraven k použití nejdříve 60 minut po rozpuštění a dokonalém promíchání. V lyofilizovaném stavu se skladuje při teplotě 2 až 8 °C v chladničce a je stabilní do expirace uvedené na obalu. Po rozpuštění se kalibrátor skladuje také při 2 až 8 °C a je stabilní nejméně 28 dní. Provádí se šestibodová kalibrace. Pro ověření správnosti kalibrace se po každé kalibraci stanoví kontrolní vzorek s deklarovaným rozmezím hodnot [26; 27].

### Limit detekce

Limit detekce je nejnižší možná měřitelná koncentrace, kterou lze odlišit od nulové hodnoty. Limit detekce pro stanovení SAA je 0,02 mg/l [26].

### Pracovní rozsah

Pracovní rozsah pro stanovení SAA je 0,8 – 40 mg/l. Pokud dojde k překročení pracovního rozsahu, je nutné vzorek naředit (přesný postup ředění viz kap. 3.2.5) [26].

### 3.2.3 Reagencie

Reagencie použité při stanovení SAA byly od firem Siemens a Beckman Coulter.

- Reagencie A – reagencie s protilátkou  
N SAA Reagent (Siemens) – lyofilizované polystyrenové částice potažené ovčími protilátkami specifickými pro lidský SAA
- Reagencie B – doplňková reagencie  
Diluent 1 (Beckman Coulter)
- Kontrola – N SAA Control SY (Siemens)

**Tabulka 6. Koncentrace a povolené rozmezí použité kontroly**

Protein	Koncentrace	Povolené rozmezí
SAA	16,7 mg/l	13,4 – 20,0 mg/l

- Standard – N SAA Standard SY (Siemens)

**Tabulka 7. Koncentrace standardu**

<b>Protein</b>	<b>Koncentrace</b>
SAA	12,4 mg/l

- Promývací roztok – Wash solution
- Destilovaná voda

### 3.2.4 Přístrojové vybavení a spotřební materiál

- Analyzátor IMAGE 800 Beckman Coulter
- Třepačka VORTEX
- Mikropipety
- Pipety
- Ředící segmenty
- Reagenční kazeta
- Stojánky na zkumavky – racky
- Zkumavky, zkumavky Eppendorf
- Kepy na kontroly
- Špičky (typ dle objemu pipety)
- Buničina

### 3.2.5 Pracovní postup

#### Příprava vzorků

U všech probandů byly během února 2012 postupně změřeny hladiny SAA vždy v sériích 20 až 30 vzorků. Vybraná série vzorků se vyndala z mrazáku a vzorky se nechaly volně rozmraznout. Po důkladném promíchání na třepačce byly vzorky připraveny k analýze.

#### Příprava reagensů

Reagencie A je v lyofilizovaném stavu. Je stabilní do expirace uvedené na obalu a skladuje se v chladničce při 2 až 8 °C. Před použitím se obsah lahvičky rozpustí přidáním 2 ml destilované vody. Lahvička se jemně promíchá, aby nedošlo k napěnění obsahu a je použitelná nejdříve za 15 minut po rozpuštění. Po rekonstituci je stabilní nejméně 4 týdny při teplotě 2 až 8 °C.

Reagencie B je připravena k přímému použití. Je stabilní do expirace uvedené na obalu a skladuje se při laboratorní teplotě.

Kontrola je v lyofilizovaném stavu. Příprava k použití je stejná jako u standardu. K lyofilizovanému obsahu lahvičky se přidá 0,5 ml destilované vody a k použití je připravena nejdříve za 60 minut. Koncentrace kontroly a povolené rozmezí je vždy uvedeno v příbalovém letáku pro danou šarži [26].

### **Vlastní postup měření**

Před každým měřením je potřeba zkontrolovat promývací roztok a kapalným odpad. Před spuštěním analýzy se automaticky kontroluje stav a funkčnost všech částí přístroje. Pokud je zjištěna chyba, analýza se nespustí a na monitoru se objeví chybové hlášení.

Nejprve se z lednice vyndá reagenční kazeta, jemně promíchá a zkontroluje se, zda je v kazetě dostatek reagensů A i B. Pokud je potřeba, reagensy se doplní, reagens A 2 ml a reagens B 6 ml. Před každým doplněním reagensů je nutné kazetu vypláchnout destilovanou vodou a jemně vysušit buničinou. Když je vše doplněno, víčka kazety se nahradí gumovými zátkami a umístí se na kteroukoliv pozici po obvodu reagenčního karuselu v levé části přístroje. Část karuselu s reagenčními sety je chlazená, proto se nechává otevřená jen po nezbytně nutnou dobu. Během analýzy musí být kryt reagenčního karuselu po celou dobu uzavřen.

Před každým měřením se musí zkontrolovat stav ředících segmentů. Na dotykové obrazovce se zjistí počet volných míst na ředících segmentech, v případě malého počtu volných míst je třeba segmenty vyměnit. Dále se musí před každou analýzou vymazat data, zadaná při předešlých měřeních pro jednotlivé vzorkové stojánky (racky).

Do vhodného vzorkového stojánku se umístí zkumavky a do každé mikrozkušavky Eppendorf bez víčka. Do zkumavky Eppendorf se mikropipetou napipetuje 200  $\mu$ l předem připraveného (rozmraženého a promíchaného) vzorku. Stojánky se zkumavkami se umístí do vzorkového karuselu. Poté se musí na dotykové obrazovce naprogramovat jednotlivé vzorky (Rack - číslo stojánku, Poz. - pozice vzorku ve stojánku a Patient ID), zvolit požadovanou metodu stanovení (SAA) a uložit.

Po provedení předchozích kroků je analyzátor připraven k měření. Po skončení analýzy se automaticky vytisknou výsledky.

Pokud je výsledná koncentrace SAA mimo pracovní rozsah, je nutné vzorek 50x naředit. Do zkumavky Eppendorf se napipetuje 980  $\mu$ l Reagensie B a 20  $\mu$ l vzorku. Směs se promíchá a znovu změří, výsledek se násobí 50x.

Vždy když je potřeba, změní se kontrola. Speciální zkumavka s čárovým kódem pro kontrolu SAA se umístí do vzorkového stojánku. Do zkumavky se vloží kepa a napipetuje se do něj 100  $\mu$ l kontroly. Poté se umístí do vzorkového karuselu. Kontrolu není potřeba zadávat ručně, analyzátor si dle čárového kódu vše automaticky načte. Pokud jsou opakovaně výsledky kontroly mimo interval spolehlivosti, musí se stanovit nová kalibrační křivka [26; 27].

### 3.3 Statistické vyhodnocení

Získaná data bylo nutné statisticky vyhodnotit. Statistika slouží ke shromažďování dat, manipulaci s nimi a jejich kvantitativnímu vyhodnocení [28, s. 10]. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Microsoft Excel 2010.

#### 3.3.1 Skupina obézních a kontrolní skupina

U této skupiny bylo potřeba porovnat naměřené hodnoty zánětlivých markerů. Cílem bylo zjistit, zda u obézní skupiny jsou hladiny SAA a CRP vyšší než u skupiny zdravých žen. Byl použit dvouvýběrový F-test pro rozptyl a nepárový dvouvýběrový t-test. Na začátku byla vymezena nulová a alternativní hypotéza. Nulová hypotéza tvrdí, že rozdíl mezi skupinami je nulový. Jako nulová hypotéza ( $H_0$ ) bylo stanoveno, že průměrné hladiny SAA a CRP u obézní skupiny budou stejné jako u zdravé skupiny. Naopak alternativní hypotéza říká, že zkoumaná vlastnost u obou skupin je rozdílná, že je mezi nimi statisticky významný rozdíl. V našem případě byla zvolena alternativní hypotéza ( $H_1$ ), která tvrdí, že hladiny zánětlivých markerů (SAA a CRP) budou u zdravé skupiny nižší než u obézních žen.

Nejdříve bylo potřeba zjistit, zda soubor dat neobsahuje odlehlé hodnoty. Pokud ano, je třeba odlehlé hodnoty ze souboru vyřadit, protože mají špatný vliv na výsledek statistiky. Proto se nejprve spočítal 1. kvartil ( $Q_1$ ) a 3. kvartil ( $Q_3$ ) a poté se odečetly. Pomocí vypočtených kvartilů a jejich rozdílu byla stanovena horní a dolní mez. Odlehlé hodnoty, které ležely mimo horní a dolní meze byly ze souboru dat vyřazeny. Horní a dolní meze byly vypočteny ze vzorců:

$$\text{dolní mez} = Q_1 - 1,5 \cdot (Q_3 - Q_1)$$

$$\text{horní mez} = Q_3 + 1,5 \cdot (Q_3 - Q_1).$$

Dále bylo nutné zhodnotit normální rozložení dat, byla tedy vypočtena šikmost a špičatost a mez šikmosti a špičatosti. Šikmost neboli kosost posuzuje nesouměrnost

rozdělení veličin. Ideální symetrická rozdělení mají nulovou šikmost a nesymetrická vykazují zešikmení. Rozdělení hodnot lze dále charakterizovat podle ostroty vrcholů – špičatosti. Čím je ostřejší maximum, tím je větší špičatost [4, s. 804]. Pokud se jedná o normálně rozložená data, měla by hodnota šikmosti ležet v intervalu,

$$-2\sqrt{\frac{\epsilon}{n}} \leq \text{šikmost} \leq +2\sqrt{\frac{\epsilon}{n}}$$

a pro špičatost v intervalu,

$$-4\sqrt{\frac{\epsilon}{n}} \leq \text{špičatost} \leq +4\sqrt{\frac{\epsilon}{n}}.$$

Hodnota  $n$  ve vzorci znamená počet probandů v souboru po vyřazení odlehlých hodnot. Pokud leží hodnoty šikmosti a špičatosti v daném intervalu, pak mají data normální rozložení.

Než se zvolí vhodný test hypotéz, musí se zhodnotit, zda se porovnává jeden či dva výběry a jestli výběry jsou na sobě závislé nebo ne. V našem případě se jedná o dva výběry, protože se porovnávají dva soubory dat. Oba soubory jsou na sobě nezávislé, protože jde o dvě úplně rozdílné skupiny pacientek, obézní pacientky a zdravé ženy. Máme tedy dva výběry metrických dat s normálním rozložením a stanovenou hypotézu. Nyní se může provést parametrický test hypotézy.

Byl použit nepárový dvouvýběrový t-test. Než byl proveden vlastní t-test, musela se ověřit shodnost rozptylu pomocí F-testu. F-test slouží k porovnání shodnosti nebo rozdílnosti rozptylů dvou výběrů. Díky F-testu se určí, jaký t-test použít, zda t-test s rovností rozptylů nebo s nerovností rozptylů. Po provedení F-testu byl použit nepárový dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů. Je-li výsledná hladina významnosti  $p$  menší nebo rovna 0,05, pak přijímáme alternativní hypotézu  $H_1$ . V opačném případě přijímáme nulovou hypotézu  $H_0$ .

### 3.3.2 Skupina kojenců a dětí a skupina prokalcitoninu

Hlavním cílem u skupiny kojenců a dětí a u skupiny prokalcitoninu bylo porovnat naměřené hodnoty zánětlivých markerů a zjistit, zda korelují. Na vyhodnocení proto byla použita korelační analýza, která vyjadřuje vzájemný lineární vztah mezi dvěma proměnnými. Úkolem statistické analýzy bylo stanovit sílu závislosti neboli korelaci. Síla závislosti se vyjadřuje prostřednictvím korelačního koeficientu. Byl použit Pearsonův korelační koeficient. U daných skupin bylo potřeba porovnat míru závislosti mezi stanovenými analyty. U skupiny prokalcitoninu se porovnávala síla korelace u tří

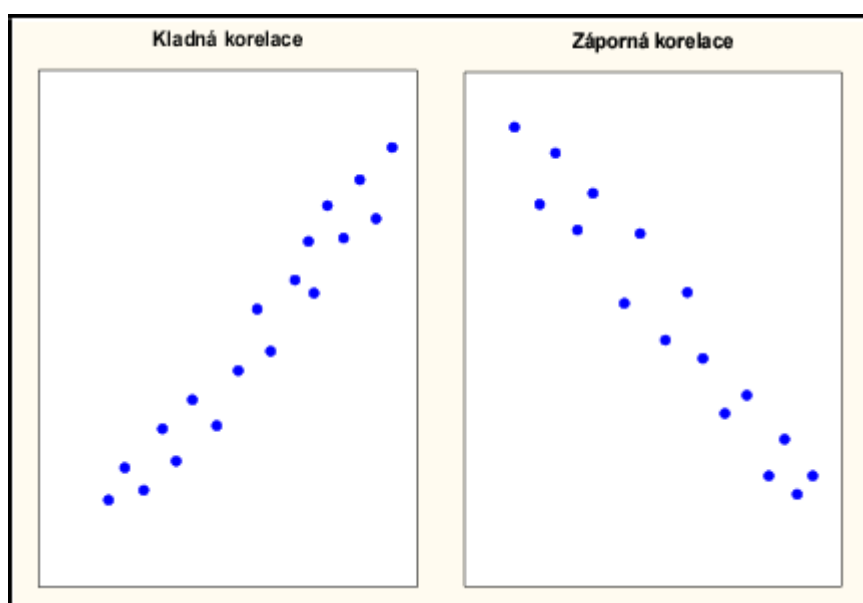


analytů - PCT, SAA a CRP. U skupiny kojenců a dětí se porovnávala závislost mezi CRP a SAA [4, s. 813].

Získaná data u skupiny prokalcitoninu a i u skupiny kojenců a dětí byla v Excelu seřazena do jednoho souboru bez ohledu na podskupiny. Nejprve bylo také potřeba vyřadit odlehle hodnoty (postup viz kap. 3.3.1), které by ovlivnily hodnotu korelačního koeficientu. Dále bylo nutné zhodnotit normálnost dat, stejně jako u předchozí skupiny obézních a zdravé kontroly. Vypočetla se také šikmost a špičatost a mez šikmosti a špičatosti.

Pearsonův korelační koeficient udává sílu korelace metrických dat a značí se  $r$ . Nabývá hodnot od -1 do +1. Pokud je jeho hodnota 0, znamená to nezávislost dat nebo nelineární závislost. Čím více je hodnota  $r$  blízká jedné, tím je větší korelace mezi oběma veličinami. Je-li hodnota  $r$  kladná, znamená to, že obě veličiny současně rostou nebo klesají. Pokud však  $r$  nabývá hodnoty záporné, tak jedna z veličin roste, zatímco druhá klesá. Příklad dat s kladným a záporným korelačním koeficientem je znázorněn na obrázku 1. Pro vizuální představu je užitečné vždy udělat bodový graf. Při hodnocení Pearsonova korelačního koeficientu tedy sledujeme znaménko a jeho velikost. Velikost udává blízkost bodů kolem přímky, zatímco znaménko udává směr, jak je vidět na obrázku 1 [28, s. 176-177]. U skupiny prokalcitoninu byl vypočítán Pearsonův korelační koeficient pro PCT a CRP, poté pro CRP a SAA a nakonec pro PCT a SAA. Korelační koeficient u skupiny kojenců a dětí byl vypočítán pro CRP a SAA.

**Obrázek 1. Příklady dat s kladným a záporným korelačním koeficientem**



*Převzato z [28, s. 177].*

Poté co byl vypočten Pearsonův korelační koeficient, byl proveden test významnosti korelačního koeficientu. Pomocí toho testu bylo zjištěno, zda je lineární vazba mezi proměnnými signifikantní (statisticky významná) nebo není signifikantní. Test významnosti korelačního koeficientu se vypočítá podle vzorce,

$$t = \frac{r(\sqrt{n-2})}{\sqrt{1-r^2}}.$$

Výsledek testu se porovná s tabelovaným kvantilem Studentova t-rozdělení pro  $n - 2$  stupně volnosti na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Pokud je  $t$  větší nebo rovno příslušné hodnotě v tabulce, tak je korelace signifikantní. Je-li hodnota menší než  $t$ , pak není signifikantní [4, s. 814]. U skupiny prokalcitoninu dochází k cyklení tří korelací, proto u této skupiny bylo nutné stanovit hladinu významnosti  $p$ . Je-li  $p$  menší nebo rovno 0,05, pak je výsledek signifikantní. Pokud je  $p$  větší, tak výsledek není statisticky významný [28, s. 109].

## 4 Výsledky

Hladiny SAA byly měřeny na analyzátoru Immage 800, ostatní výsledky byly poskytnuty Ústavem klinické biochemie a patobiochemie FN v Motole.

### 4.1 Skupina obézních a kontrolní skupina

#### 4.1.1 Naměřené hodnoty

V následujících tabulkách (tabulky 8 a 9) je uveden věk a naměřené hodnoty triacylglycerolů, cholesterolu, HDL cholesterolu, LDL cholesterolu, SAA a CRP u skupiny obézních žen a u kontrolní skupiny zdravých žen.

**Tabulka 8. Skupina obézních žen**

Číslo pacientky	Věk (roky)	Triacylglyceroly (mmol/l)	Cholesterol (mmol/l)	HDL (mmol/l)	LDL (mmol/l)	SAA (mg/l)	CRP (mg/l)
1	46	1,94	5,7	1,29	3,57	6,67	2,42
2	51	1,67	4,9	1,17	3,46	4,27	4,32
3	25	1,17	4,7	2,08	2,09	1,87	7,34
4	25	1,86	5,2	2,18	2,34	1,14	7,1
5	44	1,25	5,2	1,61	2,75	6,35	0,89
6	46	1,42	4	1,29	1,76	23,9	45,8
7	33	1,2	7,3	1,91	4,53	7,95	0,36
8	43	0,92	4,8	0,97	3,17	12,6	2,38
9	49	1,46	5	1,51	2,63	2,68	3,32
10	27	1,14	4,1	1,06	2,52	7,69	2,34
11	33	1,66	5,1	1,39	2,86	9,36	3,66
12	41	1,06	5,1	1,21	2,98	39,1	1,39
13	55	1,62	5,4	1,16	3,32	4,19	2,51
14	29	0,4	5	1,52	2,79	4,36	2,31
15	27	1,13	5,1	1,37	2,99	20,5	8,07
16	50	2,32	4,6	1,55	1,87	32,4	6,7
17	55	0,76	4,7	1,76	2,25	11,9	2,56
18	55	1,28	6,8	1,99	3,53	6,38	1,07
19	31	1,78	5	1,34	2,88	13,1	13,41
20	35	1,84	5,4	1,51	3,06	6,65	6,28
21	48	1,78	4,7	0,98	2,63	5,17	6,26
22	23	1,26	5,1	1,11	3,48	4,55	5,85
23	45	1,48	5	1,53	2,7	6,69	3,21
24	20	1,37	4,2	1,05	2,39	4,08	2,99

**Tabulka 9. Kontrolní skupina zdravých žen**

Číslo pacientky	Věk (roky)	Triacylglyceroly (mmol/l)	Cholesterol (mmol/l)	HDL (mmol/l)	LDL (mmol/l)	SAA (mg/l)	CRP (mg/l)
1	29	1	4,81	1,51	2,83	4,48	1,37
2	40	1,41	4,95	1,78	2,76	8,82	2,22
3	34	0,83	3,38	1,1	1,83	5,46	7,96
4	26	1,71	5,18	1,54	3,02	3,58	4,04
5	43	0,51	3,96	1,49	1,83	2,98	0,93
6	26	0,94	3,67	1,25	2,07	1,66	3,66
7	49	0,47	4,32	1,29	2,69	1,21	1,04
8	27	0,9	4,5	1,38	2,67	5,34	0,25
9	47	0,6	3,9	1,2	2,39	0,992	0,5
10	46	1,54	4,51	1,69	2,33	3,36	9,32
11	27	0,98	3,88	1,6	1,91	1,29	1,45
12	29	0,73	4,33	1,29	2,7	3,37	1,41
13	51	2,19	6,42	1,65	4,19	2,68	1,63
14	20	1,19	5,17	1,77	3,09	1,09	0,89
15	20	1,45	5,67	1,66	3,62	1,38	0,28
16	20	0,77	4,16	1,27	2,42	2,53	0,38
17	20	1,23	4,71	1,5	2,68	3,76	10,13
18	22	0,65	5,84	2,35	3,08	4,39	0,95
19	22	1,32	4,6	1,69	2,46	1,53	4,23
20	23	0,69	4,98	2,86	1,6	5,51	0,54

#### 4.1.2 Statistické vyhodnocení

Ve skupině obézních pacientek bylo 24 žen ve věku 20 až 55 let s BMI nad 30. Kontrolní skupinu tvořilo 20 zdravých žen také ve věku 20 až 55 let a s BMI pod 25.

Nejprve byly srovnány hladiny SAA u obézních a zdravých žen, poté byl stejným postupem porovnán CRP. Pomocí kvartilů byla stanovena horní a dolní mez a vyřazeny odlehlé hodnoty. Pro SAA u obézní skupiny byly vyřazeny dvě odlehlé hodnoty, SAA u kontrolní skupiny byl v mezích, proto nebyl vyřazen žádný vzorek. Pro CRP u obézních i u kontroly byly vyřazeny dvě odlehlé hodnoty. Dolní a horní meze jsou uvedeny v tabulce 10.

**Tabulka 10. Dolní a horní meze pro SAA a CRP u obézní skupiny a kontrolní skupiny zdravých žen**

	SAA obézní	SAA kontrola	CRP obézní	CRP kontrola
<b>Dolní mez</b>	-7,26875	-2,475	-3,6525	-3,62625
<b>Horní mez</b>	23,68125	8,005	12,4075	8,18375

Dále bylo ověřeno normální rozložení dat pomocí šikmosti, špičatosti a meze šikmosti a špičatosti. Bylo zjištěno, že data mají normální rozložení.

Byl proveden dvouvýběrový F-test pro rozptyl, který určil, že se použije nepárový dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů. Po výpočtu t-testu dostáváme hladinu významnosti  $p$ . Výsledky t-testu jsou uvedeny v tabulce 11.

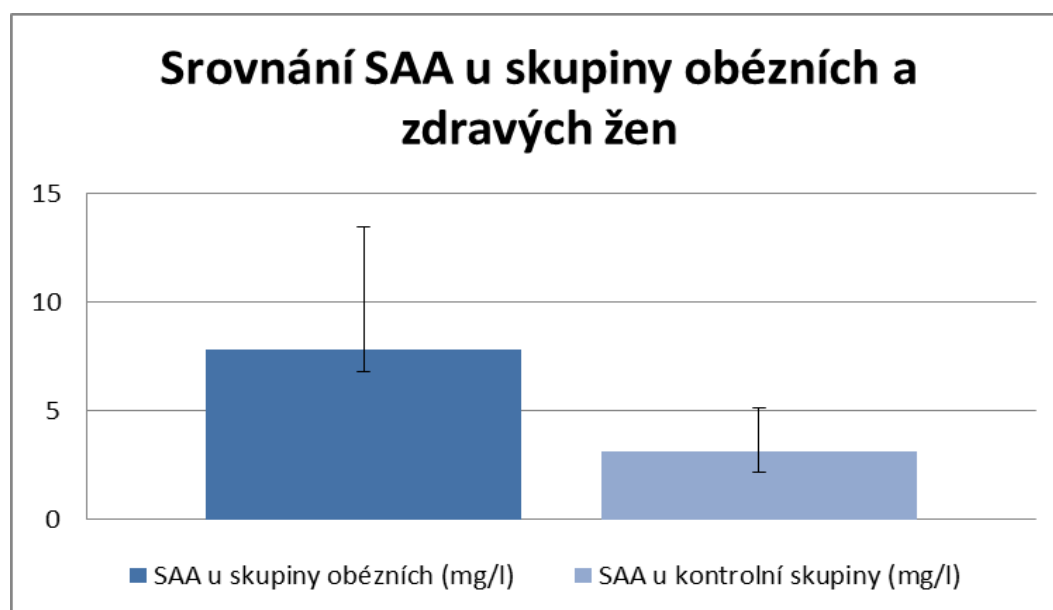
**Tabulka 11. Výsledky t-testu pro SAA a CRP**

	SAA	CRP
t-test	0,00060269	0,003766354
Výsledek	$p \leq 0,05$ přijímáme alternativní hypotézu $H_1$	$p \leq 0,05$ přijímáme alternativní hypotézu $H_1$

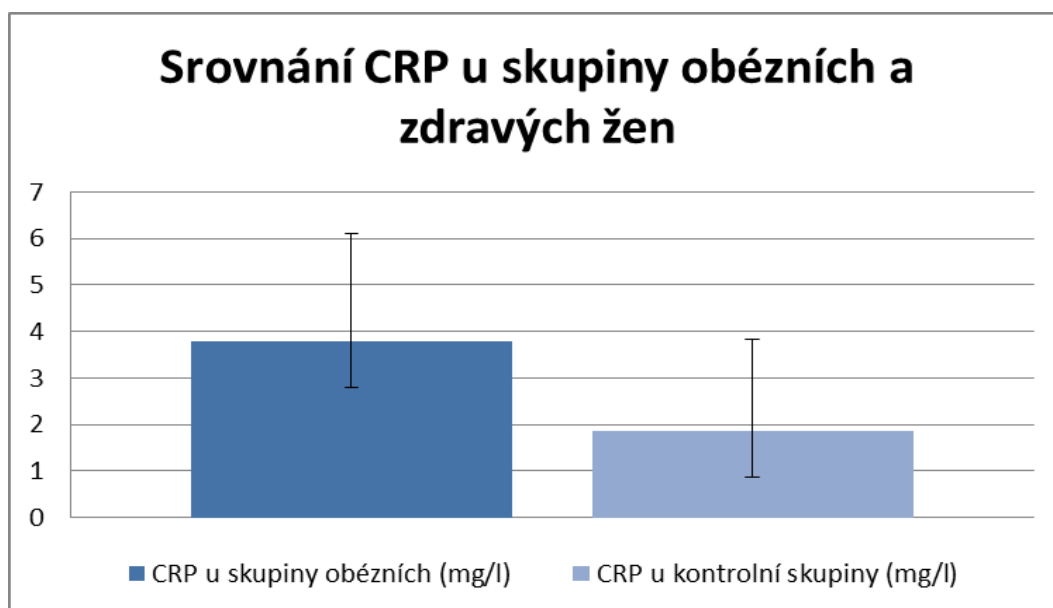
Jelikož je hladina významnosti  $p$  u SAA i CRP menší než 0,05, tak přijímáme alternativní hypotézu  $H_1$ . Na této skupině obézních a zdravých žen bylo potvrzeno, že zánětlivé markery (CRP a SAA) jsou u obézních vyšší než u zdravých žen.

Obrázky 2 a 3 znázorňují srovnání SAA a CRP u skupiny obézních žen a kontrolní skupiny zdravých žen.

**Obrázek 2. Srovnání SAA u skupiny obézních a zdravých žen**



Obrázek 3. Srovnání CRP u skupiny obézních a zdravých žen



## 4.2 Skupina kojenců a dětí

### 4.2.1 Naměřené hodnoty

V tabulce 12 jsou uvedeny naměřené hodnoty CRP, SAA, věk a pohlaví kojenců a dětí.

Tabulka 12. Skupina kojenců a dětí

Číslo pacienta	Věk (dny)	Pohlaví	CRP (mg/l)	SAA (mg/l)
1	13	muž	<0,5	<0,992
2	5	žena	<0,5	1,57
3	28	muž	<0,5	<0,992
4	7	žena	0,7	8,93
5	3	žena	1,7	1,24
6	1	muž	<0,5	<0,992
7	27	muž	0,6	<0,992
8	6	muž	<0,5	1,01
9	25	žena	2,9	10,6
10	20	muž	<0,5	2,02
11	39	muž	0,8	1,26
12	38	žena	1,5	1,86
13	36	muž	<0,5	1,81
14	57	muž	<0,5	1,32
15	35	žena	0,8	<0,992
16	34	muž	<0,5	<0,992

Číslo pacienta	Věk (dny/roky)	Pohlaví	CRP (mg/l)	SAA (mg/l)
31	139	muž	0,9	3,23
32	146	žena	<0,5	<0,992
33	145	muž	2,3	1,14
34	135	muž	2,1	<0,992
35	100	žena	<0,5	2,22
36	130	žena	1,4	1,99
37	170	žena	<0,5	<0,992
38	160	muž	2	7,13
39	102	žena	<0,5	3,53
40	97	muž	<0,5	1,44
41	258	žena	0,6	2,09
42	334	žena	<0,5	<0,992
43	330	muž	0,8	2,22
44	297	muž	<0,5	<0,992
45	259	žena	0,7	2,12
46	363	muž	2	1,42

17	59	muž	<0,5	<0,992
18	49	žena	<0,5	<0,992
19	42	žena	<0,5	<0,992
20	38	muž	<0,5	<0,992
21	70	muž	<0,5	2,04
22	89	žena	1,8	1,41
23	77	žena	<0,5	2,66
24	84	muž	<0,5	2,18
25	65	žena	0,7	<0,992
26	67	muž	<0,5	2,42
27	83	žena	<0,5	<0,992
28	84	muž	1,3	11,7
29	61	muž	<0,5	3,12
30	74	muž	1,6	<0,992

47	230	muž	<0,5	<0,992
48	281	žena	0,8	2,1
49	354	muž	<0,5	1,59
50	207	muž	1,3	16
51	2 roky	muž	2,8	5,59
52	1 rok	muž	<0,5	27,4
53	2 roky	muž	0,5	3,29
54	2 roky	muž	2,9	8,74
55	2 roky	žena	<0,5	1,89
56	2 roky	žena	<0,5	2,33
57	2 roky	muž	<0,5	3,78
58	2 roky	žena	0,5	3,27
59	1 rok	muž	2	28,4
60	2 roky	žena	0,5	1,84

#### 4.2.2 Statistické vyhodnocení

Ve skupině kojenců a dětí bylo celkem 60 probandů, z toho 35 chlapců a 25 dívek. Pomocí korelační analýzy byla vyhodnocena korelace mezi CRP a SAA.

Nejprve byla vypočtena pomocí kvartilů horní a dolní mez. Poté byly vyřazeny odlehlé hodnoty, které by jinak ovlivnily korelační koeficient. Stanovená horní a dolní mez pro CRP a SAA je uvedena v tabulce 13. Bylo vyřazeno 12 probandů. Po vyřazení odlehlých hodnot byla vypočtena šikmost, špičatost a mez šikmosti a špičatosti. Bylo zjištěno, že data mají normální rozložení.

Aby byla lépe odhadnuta možná korelace mezi analyty, byl vytvořen jednoduchý bodový graf (obrázek 4).

**Tabulka 13. Horní a dolní mez pro CRP a SAA**

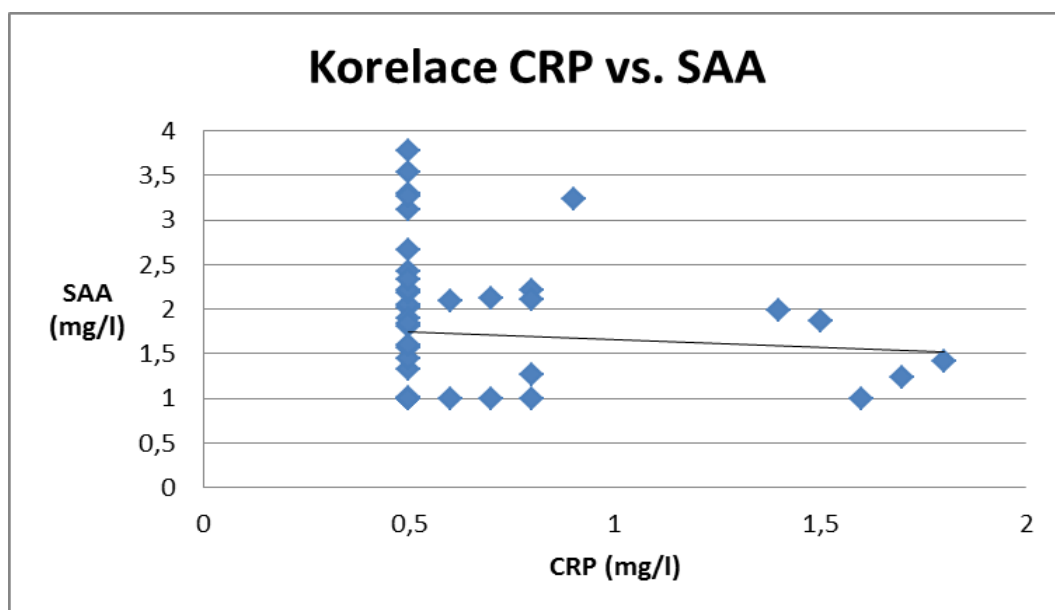
	CRP	SAA
<b>Dolní mez</b>	-0,25	-1,6825
<b>Horní mez</b>	1,75	5,4495

Na závěr byl spočítán Pearsonův korelační koeficient a test významnosti korelačního koeficientu (tabulka 14), který by měl určit, zda mezi CRP a SAA je korelace a zda je statisticky významná nebo ne. Hodnota  $t$  byla porovnána s hodnotou v tabulkách. Aby byla korelace signifikantní, tak  $t$  by muselo být větší nebo rovno 2,014.

**Tabulka 14. Pearsonův korelační koeficient a test významnosti korelačního koeficientu**

CRP vs. SAA	
Pearsonův korelační koeficient	-0,07746
Test významnosti korelačního koeficientu	-0,52692
Výsledek	<b>Korelace není signifikantní</b>

**Obrázek 4. Korelace mezi CRP a SAA**



U skupiny kojenců a dětí nebyla prokázána signifikantní korelace mezi SAA a CRP, protože výsledná hodnota testu významnosti korelačního koeficientu byla menší než hodnota v tabulkách, tedy menší než 2,014.

### 4.3 Skupina prokalcitoninu

#### 4.3.1 Naměřené hodnoty

V následujících tabulkách (tabulky 15-18) jsou uvedeny naměřené hodnoty PCT, CRP, SAA, věk a pohlaví všech probandů ze skupiny prokalcitoninu rozdělené na 4 podskupiny podle hladiny PCT.



**Tabulka 15. Skupina s hladinou PCT 0 - 0,5 µg/l**

Číslo pacienta	Věk (roky)	Pohlaví	PCT (µg/l)	CRP (mg/l)	SAA (mg/l)
1	2	muž	0,25	89,8	22,8
2	69	muž	0,27	218,3	20,7
3	44	muž	0,02	16	4,14
4	1	žena	0,07	20,4	30,4
5	1	muž	0,19	55	21,1
6	31	žena	0,27	10,9	5,5
7	9	žena	0,37	36	28,9
8	30	žena	0,3	149,9	18,2
9	55	muž	0,08	6,9	21,6
10	1	muž	0,33	2,3	1,4
11	30	žena	0,17	143,2	22,4
12	55	muž	0,07	6	24,5
13	57	muž	0,15	61,9	40,4
14	44	muž	0,02	14,7	5,12
15	55	žena	0,26	97,6	24
16	65	žena	0,36	71,7	30,8
17	60	muž	0,02	103,4	21
18	54	muž	0,02	89,2	18,9
19	66	muž	0,15	44,2	23,4
20	55	žena	0,03	5,2	11,1
21	74	žena	0,2	137,8	20,4
22	40	muž	0,1	123,4	18,2
23	67	muž	0,05	9,1	29,9
24	78	muž	0,19	140,7	19
25	16	muž	0,11	68,1	20

**Tabulka 16. Skupina s hladinou PCT 0,51 – 2,0 µg/l**

Číslo pacienta	Věk (roky)	Pohlaví	PCT (µg/l)	CRP (mg/l)	SAA (mg/l)
1	1	žena	0,59	1,7	0,992
2	4	muž	1,69	179,5	21,5
3	1	muž	0,83	15	32,1
4	3	muž	1,09	0,7	3,54
5	3	žena	0,94	74,8	170
6	65	muž	1,88	142	23,7
7	19	žena	1,23	115,7	20
8	52	muž	1,94	352,4	20,9
9	57	žena	0,89	167,6	20,6
10	1	muž	1,45	16,3	41
11	78	muž	1,45	229,5	21,9
12	17	muž	0,94	96	38,1

13	57	žena	0,82	153,5	24,1
14	67	žena	2	179,4	22,6
15	63	muž	0,6	45,4	25,7
16	65	muž	1,03	71,7	39,4
17	27	žena	1,56	347,5	21,2
18	19	muž	1,91	67,4	23,9
19	87	žena	0,72	50,7	24,8
20	1	muž	0,84	31,6	46,7
21	57	žena	0,54	101,4	22,7
22	67	žena	1,56	163,5	21,5
23	66	muž	1,7	40,4	29,4
24	62	muž	1,68	145,5	22
25	68	muž	1,53	84,2	21,4

Tabulka 17. Skupina s hladinou PCT 2,1 – 10,0 µg/l

Číslo pacienta	Věk (roky)	Pohlaví	PCT (µg/l)	CRP (mg/l)	SAA (mg/l)
1	66	muž	9,7	248,6	20,9
2	8	muž	5,23	50,2	32
3	76	muž	2,05	191,9	18,6
4	66	muž	6,9	167,1	21,8
5	1	muž	2,14	65,7	41,8
6	12	žena	8,94	25	33,1
7	4	muž	2,86	178,2	25
8	66	muž	4,47	71	24,8
9	65	muž	7,34	116	27,3
10	4	muž	2,43	146,3	23,9
11	66	muž	5,04	226,5	21,5
12	66	muž	2,85	33,2	26,6
13	65	muž	5,01	229,8	26,7
14	71	muž	5,19	270,9	20,2
15	74	muž	9,52	158,4	24,1
16	83	žena	6,21	141,7	26,6
17	57	muž	3,69	144	21,5
18	66	muž	2,7	187,1	23,4
19	54	muž	7,68	133,4	22,8
20	71	muž	3,96	222,5	26,4
21	74	muž	5,79	111,7	32,8
22	65	muž	3,27	192,9	32,6
23	58	muž	6,25	194,8	22,2
24	83	žena	2,9	94	42,4
25	57	muž	2,55	267,6	22,2

**Tabulka 18. Skupina s hladinou PCT 10,1 a více  $\mu\text{g/l}$** 

Číslo pacienta	Věk (roky)	Pohlaví	PCT ( $\mu\text{g/l}$ )	CRP (mg/l)	SAA (mg/l)
1	66	muž	30,42	309,1	22,2
2	16	žena	34,66	124,7	35,3
3	12	žena	16,32	43,8	36,5
4	60	muž	30,53	43,8	37
5	74	muž	26,44	231	23,7
6	83	žena	27,28	322,4	21,8
7	64	muž	63,64	153,6	22,2
8	82	žena	>100	326,1	21,8
9	66	muž	17,51	307,1	21,7
10	82	žena	82	311,2	23,3
11	74	muž	22,61	226,3	19,5
12	60	muž	91,64	314,8	22,8
13	70	muž	54,51	121,4	22,4
14	82	žena	52,55	303	22,3
15	74	muž	13,99	205,4	23,1
16	83	žena	10,23	214,2	26,7
17	70	muž	48,16	101,9	22,1
18	66	žena	>100	177,4	20,3
19	60	muž	35,81	148,5	33
20	70	muž	26,05	105,3	33,2
21	66	žena	63,31	139,3	35,5
22	1	žena	15,17	53,4	590
23	60	muž	18,03	139,4	28,3
24	66	žena	25,92	97,2	27,7
25	36	muž	11,33	341,9	29

### 4.3.2 Statistické vyhodnocení

Ve skupině prokalcitoninu, která zahrnovala 100 probandů, bylo 67 mužů a 33 žen ve věku od 1 roku do 87 let.

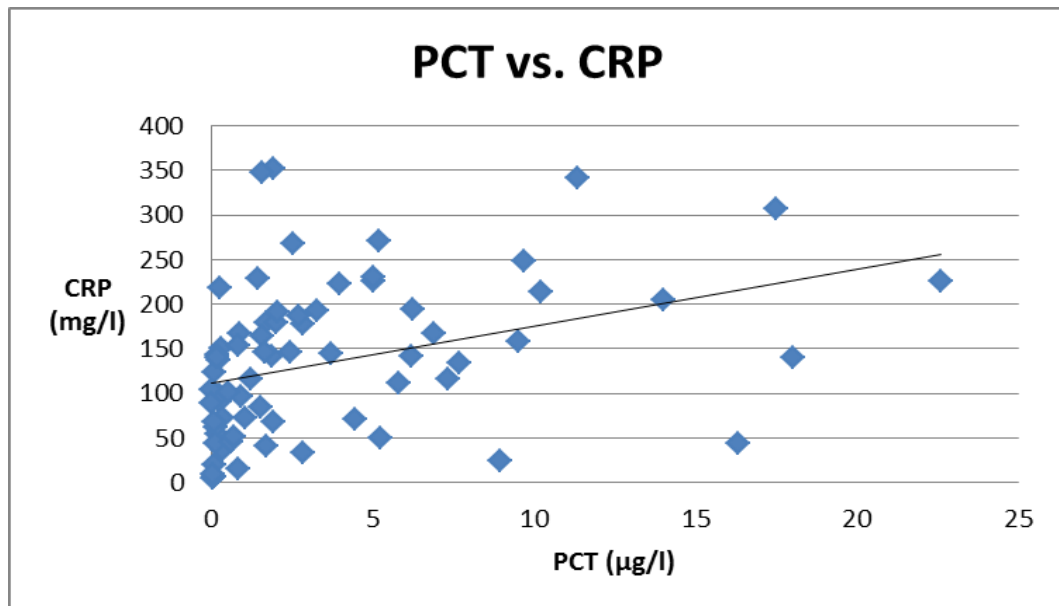
Nejprve byla pomocí kvartilů stanovena horní a dolní mez pro jednotlivé analyty. Na základě stanovených mezí byly ze souboru vyřazeny odlehlé hodnoty. Celkem bylo vyřazeno 29 probandů. V tabulce 19 jsou uvedeny vypočtené meze pro PCT, CRP a SAA. Po vyřazení odlehlých hodnot byla vypočtena šikmost, špičatost a mez šikmosti a špičatosti. Na základě těchto výpočtů bylo zjištěno, že data mají normální rozložení.

Pro první odhad korelace byly vytvořeny bodové grafy pro PCT a CRP, CRP a SAA, PCT a SAA (obrázky 5-7). Obrázky 5-7 znázorňují vztah mezi analyty.

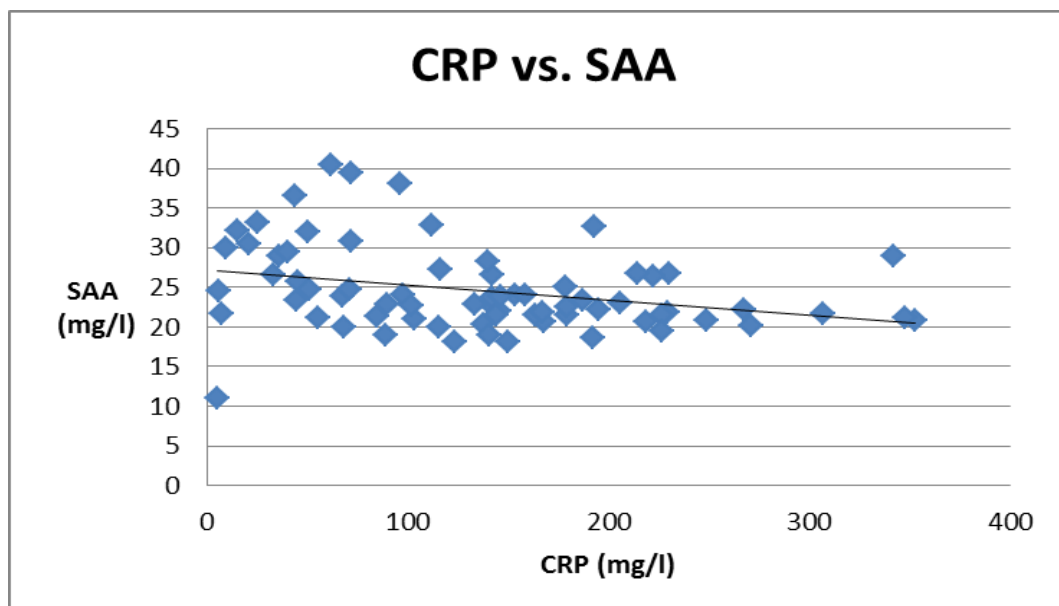
Tabulka 19. Dolní a horní mez pro PCT, CRP a SAA

	PCT	CRP	SAA
Dolní mez	-13,505	-145,95	9,9875
Horní mez	23,835	388,85	40,2875

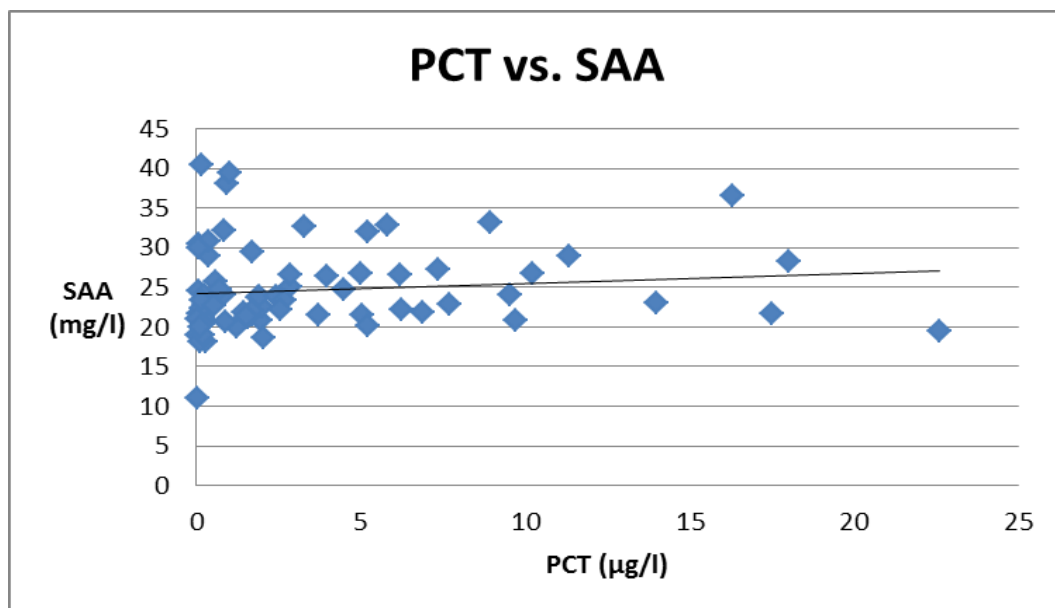
Obrázek 5. Korelace mezi PCT a CRP



Obrázek 6. Korelace mezi CRP a SAA



Obrázek 7. Korelace mezi PCT a SAA



Nakonec byl vypočten Pearsonův korelační koeficient, test významnosti korelačního koeficientu a hladina významnosti  $p$  pro PCT vs. CRP, CRP vs. SAA a PCT vs. SAA (tabulka 20). Po porovnání s hodnotou v tabulkách by  $t$  mělo být větší nebo rovno 1,994, pak by byla korelace signifikantní. Pokud je  $t$  menší než 1,994, tak nemá statistický význam. Hodnota  $p$  musí být menší nebo rovna 0,05, aby byl výsledek signifikantní.

Tabulka 20. Pearsonův korelační koeficient, test významnosti korelačního koeficientu a hladina významnosti  $p$

	PCT vs. CRP	CRP vs. SAA	PCT vs. SAA
<b>Pearsonův korelační koeficient</b>	0,36221	-0,30356	0,117847
<b>Test významnosti korelačního koeficientu</b>	3,227927	-2,6464	0,985776
<b>Hladina významnosti <math>p</math></b>	0,001899	0,010040392	0,327638
<b>Výsledek</b>	<b>Signifikantní korelace</b>	<b>Signifikantní korelace</b>	<b>Nesignifikantní korelace</b>

Na základě provedených výpočtů bylo zjištěno, že mezi PCT a CRP a mezi CRP a SAA je u této skupiny signifikantní korelace. Korelace je patrná již z grafů (obrázky 3 a 4), u CRP vs. SAA je korelace záporná. U poslední hodnocené dvojice PCT vs. SAA nebyla zjištěna signifikantní korelace.

## 5 Diskuze

### 5.1 Skupina obézních a kontrolní skupina

Na zkoumané skupině obézních pacientek a kontrolní skupině se podařilo potvrdit stanovenou alternativní hypotézu  $H_1$ , která tvrdí, že hladiny zánětlivých markerů budou u obézních vyšší než u zdravých žen. Tato alternativní hypotéza byla postulována na základě údajů v literatuře, že zánětlivé markery stoupají u obézních jedinců [29]. Jelikož výsledná hladina významnosti  $p$  po výpočtu t-testu byla menší než 0,05, tak můžeme říci, že mezi hladinami CRP a SAA u obézních a zdravých žen je statisticky významný rozdíl. U této skupiny jsme tedy došli k závěru, že hodnoty CRP a SAA jsou u skupiny obézních pacientek vyšší než u zdravých žen.

Obezita je jedním z hlavních rizikových faktorů pro vznik inzulinové rezistence, diabetu 2. typu a aterosklerózy. Chronické a subakutní záněty často doprovází hromadění přebytečného tuku v tukové tkáni a v játrech a projevují se změnami koncentrace biochemických markerů zánětu. Dochází ke zvýšení hladin cirkulujících zánětlivých markerů. Koncentrace CRP jsou považovány za rizikový ukazatel kardiovaskulárních onemocnění a také korelují s inzulinovou rezistencí. Hodnoty CRP jsou vyšší u obézních jedinců, pokud zhubnou, dochází ke snížení CRP. U obézních stoupá i koncentrace SAA. Hladiny SAA rostou i u jedinců s poruchou glukózové tolerance [29].

Autoři O'Brien et al. uvádějí, že zvýšené hladiny SAA a CRP jsou spojeny s vyšším rizikem kardiovaskulárního onemocnění a hladiny těchto zánětlivých markerů rostou u obézních jedinců. Autoři prokázali na souboru 41 obézních žen (kritériem pro zařazení do studie byl věk 18 let a více a BMI 30-35), kterým byla odebrána krev na začátku studie a poté po 3 měsících, během kterých drželo 19 žen dietu s nízkým obsahem tuků a 22 žen dietu s nízkým obsahem sacharidů, že pokles zánětlivých markerů významně koreloval s váhovým úbytkem. Změna koncentrace SAA korelovala se změnou inzulinové rezistence. Studie zjistila významnou souvislost mezi poklesem koncentrace SAA a zlepšením inzulinové rezistence. U obézních žen byla ztráta hmotnosti spojena s výrazným poklesem hladin CRP a SAA, pokles koncentrace zánětlivých markerů byl úměrný ztracené hmotnosti, ale nezávisle na dietě. Získané výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, které prokazují, že úbytek hmotnosti je spojen s poklesem CRP. Tato studie jako první hodnotila i SAA. Konečné výsledky

studie ukazují korelaci mezi hubnutím a příznivými změnami kardiovaskulárních rizikových faktorů, jako je krevní tlak a hladina triacylglycerolů v plazmě. Studie potvrzuje příznivé účinky hubnutí na krevní tlak a inzulinovou rezistenci [30].

Z mnoha studií je patrné, že u obézních lidí dochází k nárůstu koncentrace zánětlivých markerů. Nám se také podařilo na tomto malém souboru obézních žen a kontrolní skupině zdravých žen tuto skutečnost potvrdit.

Naměřené hodnoty triacylglycerolů, cholesterolu, HDL cholesterolu a LDL cholesterolu jsou ve výsledcích uvedeny jen pro doplnění a nebyly statisticky hodnoceny. Přestože v původním zadání práce bylo hodnotit i HDL cholesterol, s ohledem na rozsah práce a zaměření pouze na zánětlivé markery (SAA, CRP a PCT) nebylo nakonec provedeno statistické hodnocení dalších parametrů. Možným pokračováním této práce by bylo, zaměřit se pouze na skupinu obézních pacientek a podrobněji zhodnotit význam a souvislost lipidogramu s proteiny akutní fáze.

## 5.2 Skupina kojenců a dětí

Na skupině kojenců a dětí se nepodařilo prokázat signifikantní korelaci mezi CRP a SAA. Již z obrázku 4 je patrné, že naměřené hodnoty asi nebudou signifikantně korelovat. Výpočet Pearsonova korelačního koeficientu a testu významnosti korelačního koeficientu to jen potvrdil.

Toto zjištění je v rozporu s literaturou, protože zánětlivé markery (CRP a SAA) by měly alespoň do určité míry reagovat podobně a vykazovat určitou korelaci.

Studie autorů Lannergård et al. (bližší popis viz 5.3) mimo jiné prokázala, že mezi SAA a CRP s nižšími hladinami (CRP pod 100 mg/l) je slabší korelace než u vyšších koncentrací CRP. Studovaný soubor byl rozdělen podle hladin CRP na skupinu s CRP pod 100 mg/l a nad 100 mg/l. U skupiny s CRP pod 100 mg/l byl korelační koeficient nižší než u skupiny s vyšší hladinou CRP (nad 100 mg/l) [31, s. 269-271]. Protože u naší skupiny kojenců a dětí byly hodnoty CRP i SAA velmi nízké, je možné, že právě proto se nám nepodařilo prokázat signifikantní korelaci.

## 5.3 Skupina prokalcitoninu

U skupiny prokalcitoninu byla prokázána signifikantní korelace mezi PCT a CRP. Korelace je dobře patrná z obrázku 5. Mezi CRP a SAA byla také prokázána signifikantní korelace, ale výsledek Pearsonova korelačního koeficientu měl zápornou hodnotu. Skutečnost, že korelace CRP a SAA je zápornou korelací je názorně vidět na

obrázku 6. Poslední korelace mezi PCT a SAA nebyla signifikantně prokázána, protože výsledná hodnota  $t$  byla větší než 1,994 a hladina významnosti  $p$  také přesáhla 0,05. Proč nebyla mezi PCT a SAA prokázána signifikantní korelace lze částečně vysvětlit tím, že dochází k cyklení tří korelací a protože předchozí korelace vyšly jedna kladně a druhá záporně, může dojít k odečtení a tím poslední korelace vychází nesignifikantní.

Autoři Lannergård et al. porovnávali korelaci CRP a SAA u infekčních chorob. Hodnotili korelaci SAA a CRP u 98 pacientů s virovými a bakteriálními infekcemi, včetně hepatitidy A a B, cytomegalovirové infekce, dále pacienty s mononukleózou, chřipkou, bakteriální pneumonií, streptokokovou faryngitidou, bakteriální sepsí a těžkou bakteriální sepsí. Studovaná populace byla rozdělena podle virových a bakteriálních infekcí. Hodnoty CRP i SAA byly výrazně vyšší u skupiny bakteriálních infekcí než u virových. Autoři zjistili, že hladiny SAA významně korelují s CRP v celé studované populaci. Pozitivní korelace byla potvrzena u virových i bakteriálních infekcí. Bylo zjištěno, že SAA je mnohem citlivější než CRP pro detekci drobných zánětlivých podnětů [31, s. 267-271].

Shimetani et al. srovnávali hladiny PCT a SAA v séru u 93 pacientů s koncentrací CRP vyšší než 100 mg/l a u 26 pacientů s CRP nižší než 1,5 mg/l. Studie byla zaměřena na význam stanovení PCT. 93 vzorků s koncentrací CRP nad 100 mg/l bylo rozděleno do 3 skupin. 1. skupinu tvořily vzorky sepsí a závažných onemocnění, 2. skupinu tvořily malignity a 3. ostatní zánětlivá onemocnění. Vzorky s CRP pod 1,5 mg/l tvořily autoimunitní onemocnění, virové infekce a mykózy. Jako kontrolní skupina bylo vybráno 50 zdravých dospělých. U skupiny pacientů s vysokým CRP nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly pro SAA nebo CRP mezi různými diagnostickými skupinami. Pacienti s těžkou sepsí měli výrazně zvýšený PCT oproti skupině malignit a ostatních zánětlivých onemocnění, tento rozdíl byl signifikantní. U skupiny s nízkou hladinou CRP byly sérové hladiny PCT v referenčních mezích, ale koncentrace SAA byla vysoká u virových infekcí a autoimunitních onemocnění. Výsledky studie naznačují, že stanovení PCT je užitečné hlavně v diferenciální diagnostice závažných infekcí, včetně sepse [16, s. 469-473].

Jak dokazují uvedené studie, ale i mnoho dalších, zánětlivé markery vzájemně korelují. Síla korelace je však závislá na mnoha faktorech. My jsme na skupině procalcitoninu prokázali signifikantní korelaci mezi PCT a CRP a mezi CRP a SAA, PCT a SAA u této skupiny signifikantně nekorelovaly.



## Závěr

Na skupině obézních pacientek a kontrolní skupině zdravých žen byla potvrzena stanovená alternativní hypotéza  $H_1$ . Alternativní hypotéza říká, že plazmatické hladiny stanovených proteinů akutní fáze - SAA a CRP jsou u obézních pacientek vyšší než u skupiny zdravých žen.

Další skupina kojenců a dětí byla zaměřena na porovnání CRP a SAA. U této skupiny se nepodařilo prokázat korelaci mezi CRP a SAA.

Nakonec u skupiny procalcitoninu šlo o porovnání korelací tří zánětlivých markerů – SAA, CRP a PCT. Byla prokázána korelace mezi CRP a PCT a mezi CRP a SAA. Mezi PCT a SAA nebyla prokázána signifikantní korelace.

Vytčené cíle práce byly splněny. V průběhu mé práce jsem měla možnost proniknout do provozu v laboratoři ÚKBP FN Motol. Současně jsem si prakticky osvojila stanovení SAA na analyzátoru Immage 800, včetně běžné údržby přístroje. Také jsem se naučila základy statistické analýzy dat získaných v laboratoři. Použité statistické výpočty jsou v laboratoři nepostradatelné při porovnávání metod a analytů nebo při zavádění nových stanovení.

## Seznam literatury

1. MARUNA, Pavel. *Proteiny akutní fáze: Fyziologie, Diagnostika, Klinika*. Praha: Maxdorf, 2004. ISBN 80-85912-05-8.
2. RIDKER, P. M. C-Reactive Protein: Eighty Years from Discovery to Emergence as a Major Risk Marker for Cardiovascular Disease. *Clinical Chemistry* [online]. 2008-10-02, roč. 55, č. 2, s. 209-215 [cit. 2012-04-05]. ISSN 0009-9147. DOI: 10.1373/clinchem.2008.119214. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.119214>
3. RACEK, Jaroslav et al. *Klinická biochemie*. 2. přepracované vydání. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-3249.
4. ZIMA, Tomáš et al. *Laboratorní diagnostika*. 2. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-372-3. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1423-6.
5. HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
6. MASOPUST, Jaroslav et al. *Klinická biochemie: Požadování a hodnocení biochemických vyšetření II. část*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-649-X.
7. MARUNA, Pavel a Robert GÜRLICH. *Acute phase proteins in model situations*. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0684-4.
8. Reaktanty akutní fáze. In: *WikiSkripta* [online]. 2011, 2011 [cit. 2012-03-05]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Reaktanty\\_akutn%C3%AD\\_f%C3%A1ze](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Reaktanty_akutn%C3%AD_f%C3%A1ze)

9. YAMADA, Toshiyuki. Serum Amyloid A (SAA): a Concise Review of Biology, Assay Methods and Clinical Usefulness. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 1999, roč. 37, č. 4, s. 381-388. ISSN 1434-6621.
10. PRŮŠA, Richard et al. *Kazuistiky a stručné kapitoly z klinické biochemie*. 1. vydání. Praha: Ústav klinické biochemie a patobiochemie, UK 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Motol, 2009. ISBN 978-80-87347-01-0.
11. MAČÁK, Jiří a Jana MAČÁKOVÁ. *Patologie*. 1. vydání. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0785-3.
12. RYŠAVÁ, R., M. MERTA, V. TESAŘ a T. ZIMA. Význam sérového amyloidového proteinu A a některých cytokinů v diagnostice sekundární amyloidózy ledvin. *Česká revmatologie*. 2002, roč. 10, č. 4, s. 151-156. ISSN 1210-7905.
13. MARUNA, P. Pentraxiny I. C-reaktivní protein a sérový amyloid P. *Klinická biochemie a metabolismus: časopis České společnosti klinické biochemie*. 2001, roč. 9, č. 3, s. 100-105. ISSN 1210-7921.
14. PRÁZNÁ, Jana. Biologické funkce C-reaktivního proteinu a jeho využití v laboratorní diagnostice. *Alergie* [online]. 2006, č. 4, s. 329-332 [cit. 2012-04-01]. ISSN 1212-3536. Dostupné z: [http://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2006/04/09\\_Prazna\\_alergie\\_4\\_06\\_web\\_zabezp.pdf](http://www.tigis.cz/images/stories/Alergie/2006/04/09_Prazna_alergie_4_06_web_zabezp.pdf)
15. MARUNA, Pavel. *Procalcitonin*. 1. vydání. Praha: Triton, 2003. Levou zadní, 94. ISBN 80-7254-410-1.
16. SHIMETANI, N., K. SHIMETANI a M. MORI. Clinical evaluation of the measurement of serum procalcitonin: comparative study of procalcitonin and serum amyloid A protein in patients with high and low concentrations of serum C-reactive protein. *Scandinavian Journal of Clinical*. 2004, roč. 64, č. 5, s. 469-

474. ISSN 0036-5513. DOI: 10.1080/00365510410006658. Dostupné z:  
<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/00365510410006658>
17. DOLEŽALOVÁ, Věra et al. *Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii*. 4. přepracované vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1995. ISBN 80-7013-198-5.
18. ŠTERN, Petr. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2006, Roč. 14/35, č. 3, s. 146-151 [cit. 2012-04-02]. ISSN 1210-7921. Dostupné z:  
<http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>
19. BARTŮŇKOVÁ, Jiřina; PAULÍK, Milan et al. *Vyšetřovací metody v imunologii*. 2. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7.
20. ŠTERN, Petr et al. *Obecká a klinická biochemie: pro bakalářské obory studia*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-1025-2.
21. SCHNEIDERKA, Petr et al. *Kapitoly z klinické biochemie*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-246-0140-0.
22. SCHNEIDERKA, Petr et al. *Stanovení analytů v klinické biochemii 2. část: Praktická cvičení pro studenty lékařských fakult*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1189-9.
23. *Standardní operační postup - metodický č. VSOPM\_8ÚKBP\_56/2011-1: Stanovení C reaktivního proteinu imunoturbidimetricky*. Praha, 2011.
24. ŠTEJFA, Miloš et al. *Kardiologie*. 3. přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-80-247-1385-4.
25. *Standardní operační postup - metodický č. VSOPM\_8ÚKBP\_159/2009-1: Stanovení Prokalcitoninu elektrochemiluminiscenční metodou*. Praha, 2009.

26. *Standardní operační postup - metodický č. VSOPM\_8ÚKBP\_217/2011-1: Stanovení sérového amyloidu A imunonefelometrickou metodou.* Praha, 2011.
27. *Standardní operační postup - technický č. VSOPT\_8ÚKBP\_34/2008-1: Nefelometr Immage 800.* Praha, 2008.
28. ZVÁROVÁ, Jana. *Základy statistiky pro biomedicínské obory.* 2. doplněné vydání. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1931-6.
29. SHOELSON, Steven E., Laura HERRERO a Afia NAAZ. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology* [online]. 2007, roč. 132, č. 6, s. 2169–2180 [cit. 2012-04-10]. ISSN 0016-5085. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S0016508507005859>
30. O'BRIEN, K. D. et al. Diet-Induced Weight Loss Is Associated with Decreases in Plasma Serum Amyloid A and C-Reactive Protein Independent of Dietary Macronutrient Composition in Obese Subjects. *Journal of Clinical Endocrinology* [online]. 2005-01-18, roč. 90, č. 4, s. 2244-2249 [cit. 2012-03-23]. ISSN 0021-972x. DOI: 10.1210/jc.2004-1011. Dostupné z: <http://jcem.endojournals.org/cgi/doi/10.1210/jc.2004-1011>
31. LANNERGÅRD, A., A. LARSSON, P. KRAGSBJERG a G. FRIMAN. Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases. *Scandinavian Journal of Clinical.* 2003, roč. 63, č. 4, s. 267-272. ISSN 0036-5513. DOI: 10.1080/00365510310001636. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/00365510310001636>