

**PŘÍNOS STANOVENÍ CYTOKINŮ
U ZÁNĚTLIVÝCH POOPERAČNÍCH
KOMPLIKACÍ**

**DISERTAČNÍ PRÁCE
MUDr. Ivane Chachkhiani**

1. CYTOKINY, REGULÁTORY SYSTÉMOVÉ REAKCE ORGANIZMU

Existence eukaryotického organismu vyžaduje soudržnost buněk a jejich vzájemnou informovanost přes různé buněčné interakce. Mezi nejdůležitější patří uvolňování a přenášení informačních molekul, produkovaných jednou buňkou a rozpoznávaných specifickými receptory na jiných buňkách, kde vyvolávají příslušnou odpověď. Zvláštní pozornost v tomto smyslu je v organismu věnována mezibuněčné interakci a koordinaci v systému imunokompetentních buněk. Protektivní fyziologická imunitní reakce vzniká v odpověď na jakoukoliv škodlivinu: ať jde o antigeny zevní, nejčastěji mikrobiální, nebo antigeny vnitřní, které představují staré, poškozené či mutované buňky nebo součásti tkání organismu. Při vývoji a diferenciaci buněk imunitního systému a při imunitní nebo zánětlivé reakci spolu jednotlivé prvky imunitního systému komunikují buď přímým kontaktem, nebo prostřednictvím skupiny mediatorů, souhrnně označovaných jako cytokiny, v koordinaci s klasickými hormony a hepatálními proteiny akutní fáze (APP) (1,2,3,4).

Historie výzkumu endogenních regulátorů systémové reakce se datuje od roku 1932, kdy Rich a Lewis jako první popsali solubilní signální molekuly leukocytů. Prvním popsaným cytokinem se stal faktor inhibující migraci monocytů, 12kD protein ze skupiny chemokinů. Od 60. let byly postupně izolovány látky, jejichž produkce často nebyla omezena na jeden orgán či jednu buněčnou populaci a jejichž působení bylo zpravidla soustředěno na nejbližší okolí (parakrinní působení). Prvními takovými látkami byly některé růstové faktory, například epidermální růstový faktor (EGF) či nervový růstový faktor (NGF). V téže době byla identifikována řada peptidů produkovaných různými subpopulacemi lymfocytů (lymfokiny) a monocytů (monokiny). V následujícím desetiletí nastává rozvoj imunochemické analytiky a nomenklatura cytokinů se sjednocuje (5,6,7). Od roku 1979 byla postupně identifikována primární struktura rostoucího počtu těchto peptidových makromolekul, které byly označeny jako interleukiny a číslovány podle pořadí, v jakém byla jejich struktura poznána. Ukázalo se ale, že tyto „lymfokiny“ či „monokiny“ jsou často produkovány i jinými buňkami než lymfocyty či monocyty (například fibroblasty, endoteliálními a epiteliálními buňkami). U některých makromolekul byl z různých důvodů ponechán jejich tradiční název (například TNF- α (Tumor necrosis factor- α) či TGF- β (tumor growing factor- β), interferony, CSF (colony stimulating factor) aj.)

Tyto všechny důvody vedly k zavedení obecnějšího pojmu cytokiny, který integruje širokou škálu peptidů s převážně parakrinným nebo autokrinným působením. Kromě autokrinní a parakrinní působení, některé cytokiny (TNF, IL-1, IL-6) mají i endokrinní efekty, čili mohou ovlivňovat vzdálené orgány. Vedle interleukinů a dalších lymfokinů a monokinů

zahrnují cytokiny i některé výše zmíněné a některé nověji identifikované růstové faktory. V poslední době se navíc ukázalo, že i některé „klasické“ hormony (například růstový hormon a prolaktin) se mohou v určitých situacích chovat jako cytokiny a že jejich receptory jsou příbuzné s receptory pro některé cytokiny. Hranice mezi klasickými hormony a cytokiny je tedy neostrá.

Jednotlivé cytokiny mohou rozdílně účinkovat na různé buněčné typy a naopak různé cytokiny mohou ovlivňovat určitou buňku velmi podobným způsobem. Účinek cytokinů na určitou buňku může být různý v závislosti na stupni její zralosti a aktivačním stavu. Cytokiny mohou působit vzájemně synergicky nebo antagonisticky, mohou indukovat nebo inhibovat syntézu dalších cytokinů. Mohou působit lokálně nebo systémově v závislosti na intenzitě produkce nebo utilizace. Ovlivněním nejrůznějších orgánů a tkání zajišťují vzájemnou spolupráci imunitního systému s dalšími systémy organismu, především hemokoagulačním, nervovým a endokrinním. Tím se podílejí na řízení kompletních homeostatických mechanismů. Pro úzkou propojenost jejich vzájemných vazeb a interakcí se často v této souvislosti používá pojem cytokinová síť (cytokine network).

Prakticky všechny buňky imunitního systému mohou produkovat cytokiny. Tedy především makrofágy, lymfocyty, monocyty, neutrofilů, ale i buňky endotelu, fibroblasty, buňky hladké svaloviny, Kupferovy buňky (jaterní makrofágy), keratinocyty i další buňky (**tab. 1**)

Tab.1 Produkce cytokinů různými druhy buněk

BUŇKY	CYTOKINY
IMUNITNÍ SYSTÉM	
T lymfocyty	
Th1	IL-1,2,9, IFN γ , G-CSF,M-CSF,GM-CSF
Th2	IL-3,4,5,6,10,13,14, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF, , LIF, OSM
CTL	TNF, LT, IFN γ ,IL-2
NK	TNF, LT, IFN γ ,IL-3, G-CSF, M-CSF,GM-CSF
B lymfocyty	IL-1,5,6, LT, TNF, GM-CSF, IFN γ , IFN α
Mikrofágy	IL-1 α ,1 β ,3,6,8,G-CSF,M-CSF,GM-CSF,IL-1RA,IFN α , TNF, LIF, OSM, PDGF, MIF, MCAF,bFGF,FAF,TGF,Thymozin- α 1,M-SF,G-CSF, GM-CSF, β -endorfin,ACTH
Neutrofilly	IL-1 α , 1 β α ,3,6,8, G-CSF,M-CSF, GM-CSF, IL-1RA, IFN α , GRO α
Žírné buňky	IL-1,3,4,5,6,8,MIP-1 α , MIP-1 β , TNF, GM-CSF
Eozinofily	IL-3,5,6 TNF, MIP-1 α , GM-CSF, TGF α , TGF β
Trombocyty	PDGF, TGF- β , EGF,IL-1,HGF, GRO α ,PD-ECGF
ENDOKRINNÍ SYSTÉM	
Placentární buňky	IL-1, 2, 6, IFN α , IFN β , TNF
Buňky adeno-hypofýzy	IL-6, MIF TNF
Oocyty	IL-1, IL-6, M-CSF
Endoteliální buňky	GM-CSF, IL-1, IL-6, PDGF
Svalové buňky	IL-1 α , IL-1 β , TNF
Fibroblasty	bFGF, IL-6, IL-1 β , G-CSF
Astrocyty	IL-1,TNF

1.1 Fyzické a chemické vlastnosti cytokinů, klasifikace cytokinů

Cytokinové molekuly mají velmi různorodou strukturu. Kromě secernované formy jsou u některé cytokiny i ve vazbě na buněčnou membránu (CSF, $\text{TNF}\alpha$), na mezibuněčnou hmotu (chemokiny), čímž je zajištěno jejich výrazně lokální působení. Strukturální klasifikace cytokinů nejčastěji vychází z jejich sekundární struktury. Také sekundární struktura je pro biologický účinek cytokinů zřejmě určující (8,1,9).

Cytokiny mají především nízkou molekulovou hmotnost. Jsou sestaveny z 100 až 200 aminokyselinových zbytků, a to včetně signální sekvence, která ovlivňuje jejich sekreci do extracelulárního milieu. Molekulová hmotnost se pohybuje obvykle mezi 10000 a 20000. Sestávají z jednoho nebo dvou aminokyselinových řetězců, výjimkou je tumor nekrotizující faktor (TNF), který je trimer. Většina cytokinů má poměrně vysoký obsah struktury α -helixu (40-60%, v ostatních strukturálních charakteristikách se liší. Vnitřní stavba cytokinů je určena disulfidovými můstky a tyto kovalentní vazby výrazně zvyšují stabilitu jejich molekuly. Ve většině případů jde o glykoproteiny obsahující cukernou složku vázanou přes N nebo O. Glykosylace ovlivňuje v mnoha směrech jejich biologickou aktivitu, u každého z cytokinů však je vliv glykosylace rozdílný. Přes značnou pleiomorfnost účinků cytokinů lze nalézt některé společné rysy. Ve všech případech se biologické aktivity cytokinů dosahuje již při velmi nízkých koncentracích, řádově v oblasti pmol na litr (4,11,13,34)

Dostatečný efekt tak nízké koncentrace je dosažen interakcí s receptory, které jsou vázány na buněčné membrány a mají vysokou vazebnou afinitu. Rovněž tyto receptory mají glykoproteinovou strukturu, jejich molekulová hmotnost je však výrazně vyšší než molekulová hmotnost cytokinů a pohybuje se v oblasti 20000-50000.

Názvosloví cytokinů souvisí především s historií jejich objevu, většinou s prvním popsáním funkčním projevem. Platí to např. pro Interleukiny (IL), Faktory stimulující růst koloni (CSF), Interferony (IFN). Méně jsou používána označení cytokinů podle místa vzniku: monokiny (monocyty), lymfokiny (lymfocyty), nebo neurokiny (neurony). Název chemokiny, interkiny či chemoatraktanty zahrnuje peptidy s chemotaktickým efektem na cílovou buňku (12,17,60,75)

Podle převažující funkce lze rozdělit cytokiny do následujících skupin: cytokiny podporující zánětlivou reakci (prozánětlivé cytokiny: $\text{IL-1}\alpha/\beta$, $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-8, IL-12), včetně chemotaktických faktorů (chemokinů), cytokiny s převážně inhibičním účinkem na zánětlivé a imunitní reakce (protizánětlivé cytokiny IL-1ra , IL-4, IL-10, $\text{TGF-}\beta$), cytokiny

s aktivitou růstových faktorů hemopoetických buněk (G-CSF, GM-CSF), cytokiny uplatňující se v humorální imunitě, cytokiny uplatňující se v buněčné imunitě, cytokiny s antivirovým účinkem – interferony ($\text{INF}\alpha$, β , γ) (11,8), cytokiny jako modulatory lymfocytové funkce (IL-2, IL-4).

1.2 Bližší charakteristika základních cytokinů.

Interferony (INF) jsou glykoproteiny, poznané podstatně dříve než většina cytokinů, a proto jejich označení zachoval prvotní podobu, přestože je lze nazvat cytokiny. Interferony jsou indukovány ve všech eukaryotických jaderných buňkách po působení různých stimulů, především virem nebo i tzv. induktory interferonu (mitogeny, pyran kopolymer, dvouvláknová RNA, syntetické polyribonukleotidy, některé nízkomolekulární molekuly (tiloron)). Existují 2 typy interferonu. Mezi interferony I. typu, které se váží na společný membránový receptor, patří $\text{INF}\alpha$, $\text{INF}\beta$ a $\text{INF}\omega$. I. typ je primárně indukován virovým nebo bakteriálním inzultem. Mezi interferony II. typu patří $\text{INF}\gamma$, který se váže na odlišný receptor a má i některé zvláštní biologické vlastnosti (15,181). Interferony mají společné antivirové, antiproliferativní a imunomodulační účinky.

Dnes se interferony připravují rekombinantní technikou uměle a využívají se k léčbě některých onemocnění. Jejich antivirový efekt je využíván v léčbě chronické, aktivní hepatitidy B a C, antiproliferační efekt se využívá u některých nádorů (některé formy leukémií, Grawitzův nádor).

Interferon- α ($\text{INF}\alpha$), leukocyty derivovaný glykoprotein, je rozdělen do některých podtypů, které se liší sekvencí některých aminokyselin. Více než 20 genů je známo které kódují $\text{INF}\alpha$. Vazba $\text{INF}\alpha$ s receptorem způsobí zvýšení produkce a vyplavení různých molekul (proteinkinázy, 2,5-oligoadenylátsyntetázy, endoribonukleázy), které prostředkují změnu stability m-RNA a degradují RNA, důležitou pro virové replikace. Kromě účinků protivirových má $\text{INF}\alpha$ výrazné účinky protinádorové, což se vysvětluje antiproliferativním působením interferonů. Které se projevují jeho zásahem do buněčného cyklu (blokádou tranzitu G_1 -S), stimulací buněčné diferenciací (ačkoliv v léčbě karcinomu ledvin a chronické myelogení leukémie byl zjištěn pouze okrajový terapeutický efekt), inhibicí angiogeneze. Imunomodulační efekt $\text{INF}\alpha$ spočívá v aktivaci makrofágů, které pak zvyšují fagocytární a bakteriální schopnost a efektivnější překládání antigenů T-lymfocytům. $\text{INF}\alpha$ rovněž zvyšuje výrazně aktivitu NK-buněk, která má význam při jejich cytotoxickém působení na nádorové

změněné buňky (a samozřejmě i virem infikované). $\text{INF-}\alpha$ zvyšuje také expresi antigenů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC I a II), nutných pro indukci cytotoxické reakce.

Interferon- β ($\text{INF-}\beta$), fibroblasty derivovaný polypeptid, má stejný počet aminokyselin jako $\text{INF-}\alpha$. Vazba $\text{INF-}\beta$ s buněčným receptorem způsobují některé odlišné intracelulární reakce, vysvětlující i určitou biologickou odlišnost. Vedle hlavních biologických účinků (protivirový, protinádorový, imunomodulační), $\text{INF-}\beta$ má schopnost potlačovat produkci $\text{INF-}\gamma$ a TNF, čímž se například vysvětluje účinnost $\text{INF-}\beta$ u roztroušené sklerózy, nebo vliv $\text{INF-}\beta$ na zvýšenou expresi hormonálních receptorů na buňkách karcinomu prsu, karcinomu endometria a karcinomu prostaty. Nepřímo tak potencuje účinek hormonální léčby těchto nádorů.

Interferon- γ se strukturálními a biologickými vlastnostmi podoba ostatním interferonům, i když protivirový účinek je méně vyjádřen. Gen pro $\text{INF-}\gamma$ je lokalizován na 12. chromozomu. Jako specifický účinek výrazně stimuluje fagocytární schopnost makrofagů. Má synergický cytotoxický účinek s TNF. Zvyšuje expresi HLA-DR a Fc-receptoru a tím ovlivňuje protilátkami zprostředkovanou cytotoxicitu. Indukuje proliferaci a diferenciaci B buněk a Ig sekreci. Bylo zjištěno, že $\text{INF-}\gamma$ zvyšuje intracelulární akumulaci některých antibiotik a potencuje tak jejich účinek u některých infekcí (například u infekcí mykobakteriemi). $\text{INF-}\gamma$ v zvířecích modelu ukázal příznivý terapeutický efekt při léčbě revmatoidní a psoriatické artritidy, herpetických infekcí a parazitárních infekcí (leishmaniasis, legionellosis, schistosomiasis), hepatitidy B a C.

Hemopoetické cytokiny – nazývané jako hemopoetické růstové faktory, nebo kolonie stimulující faktory (CSF), jsou glykoproteiny a mají klíčovou úlohu v regulaci krvetvorby. Jejich komplexní síť udržuje homeostatické podmínky hemopoézy a současně adaptuje hladiny cirkulujících a novotvořících se krevních elementů podle aktuální situace (60,40,74,121,183). Základní proinflamatorní cytokiny (IL-1 , TNF, $\text{INF}\gamma$) buď přímým působením nebo útlumem syntézy erythropoetinu tlumí erythropoezu (anémie u chronických chorob).

Multi CSF (IL-3). Molekula IL-3 je tvořena 133 aminokyselinami. Je produkován zejména aktivovanými T lymfocyty, ale také WEHI-3 melanocytovými linií a aktivovanými NK buňkami, žírnými buňkami a epidurálními buňkami. (120,125). Jeho gen se nachází na chromozomu 5 v těsné blízkosti genu pro GM-CSF. Váže se na specifické receptory, které jsou dvousložkové. Podjednotka β je společná pro IL-5 a GM-CSF. IL-3 stimuluje růst buněčných kolonií časných progenitorových buněk (granulocyty, erytrocyty, megakaryocyty,

makrofagy). Ovlivňuje syntézu a uvolňování histaminu, působí degranulaci eozinofilů a zvyšuje produkci leukotrienů v neutrofilech, stimuluje proliferaci mastocytů, podporuje růst lidských T lymfocytů. IL-3 v kombinaci s IL-6 u člověka stimuluje trombopoézu. Na základě toho poznatku se uvažuje o využití IL-3 v léčbě non-Hodgkinských lymfomů a aplastické anemie.

GM-CSF je glykoprotein stimující kolonie granulocytů a makrofágů. Po vazbě na specifický membránový receptor indikuje složitou kaskádu nitrobuněčných dějů, zahrnujících aktivaci a proliferaci. Zkracuje se zejména trvání S-fáze buněčného cyklu. Proporce buněk nacházejících se v S-fázi se téměř zdvojnásobuje. Receptory pro GM-CSF kromě hemopoetických buňkách byly zjištěny i v endoteliích. Zdá se, že M-CSF tak může mít vliv i na některé reparační pochody, spojené s proliferací endotelií při neovaskularizaci (hojení ran).

M-CSF je faktor stimující kolonie makrofágů a je produkován monocyty, makrofagy, endoteliemi a fibroblasty. Aktivuje jak vzestup počtu makrofágů, tak jejich funkční, především protinádorovou činnost. Dále má antiaterogenní účinky, což se vysvětluje zvýšením produkce aktivátorů plazminogenu a uvolněním cholesterolu z makrofágů ve stěně cévní (pěnových buněk). M-CSF je lokálně produkován buňkami dělohy a vejcovodu při implantaci vajíčka a ovlivňuje fertilitu.

G-CSF je glykoprotein stimující kolonie granulocytů. Stejně jako jiné hemopoetické faktory se váže na specifické membránové receptory, které byly zjištěny na buňkách neutrofilních granulocytů a na monocyttech. Za fyziologických okolností je produkován stromálními buňkami kostní dřeně, endoteliemi a fibroblasty. Jeho produkci stimuluje IL-1, TNF a endotoxin, naopak supresivní účinek má prostaglandin PGE₂. G-CSF působí výrazný vzestup počtu neutrofilních prekurzorů i zralých neutrofilů v krvi, zvyšuje chemotaxi a fagocytární aktivitu leukocytů, dále zvyšuje jejich cytotoxickou aktivitu závislou na protilátkách (ADCC) i schopnost nitrobuněčného zabíjení fagocytovaných mikroorganismů (tzv. intracellular killing).

Erythropoetin (EPO) je hlavním regulačním faktorem erythropoézy. Je to jednořetězcový glykoprotein o molekulové hmotnosti 30-34 kD. Místem produkce EPO jsou peritubulární buňky ledvin (80-90 %), částečně i Kupfferovy buňky v játrech (10%). Rozhodujícím podnětem pro tvorbu EPO je hypoxie. Produkce EPO ovlivňují i některé cytokiny (IL-1, zvláště IL-1 β , TNF- α , IFN- γ). Specifické buněčné receptory pro EPO jsou exprimovány převážně na erytroidních progenitorových buňkách, na proerytroblastech a bazofilních erytroblastech. Po vazbě s receptory EPO inhibuje apoptozu, stimuluje proliferaci a vyžrávání červených krvinek.

Trombopoetin (TPO) je hlavním regulátorem trombopoézy, obsahuje 332 aminokyselin a je silně glykosylovaný protein. Místem produkce TPO jsou játra a ledviny, také slezina a kostní dřeň. Specifické receptory pro TPO (protoonkogen c-mpl) se nacházejí na progenitorech megakaryocytů, na zralých megakaryocytech i na krevních destičkách.

Prolaktin (PRL) je součástí neuroendokrinního systému a má významnou úlohu v regulaci imunitního systému. PRL je syntetizován v hypofýze, ale také T a B buňkami, NK buňkami i buňkami karcinomu prsu. Monomerní prolaktin má molekulovou váhu 25 kD. Prolaktinové receptory jsou lokalizované v různých orgánech a tkáních (prsí žláza, játra, ledviny, nadledviny, ovaria, testes, prostata, hypotalamus, ostrůvky pankreatu atd.). produkce PRL se výrazně zvyšuje stimulací estrogeny, melatoninem, hypoglykemií, chirurgickým výkonem, $\text{INF-}\alpha, \beta, \gamma$. PRL je autokrinní aktivátor NK buněk a zvyšuje lymfoproliferaci.

Prokalcitoninu (PCT) byl objeven před 25 lety jako prekursor kalcitoninu tvořený C buňkami štítné žlázy a intracelulárně formovaný proteolytickým štěpením do podoby aktivního hormonu. Zvláštní pozornost je věnována PCT, který se jeví jako nový specifický ukazatel bakteriálního zánětu. Jeho fyziologická úloha jako hormonálního prekursoru byla řadu let pokládána za vyřešenou. U zdravých jedinců je prokalcitonin v plasmě v neměřitelných hladinách, vyšší koncentrace jsou zaznamenávány u medulárních karcinomů štítné žlázy nebo např. u malobuněčných karcinomů plic. Od roku 1993, kdy byla poprvé zjištěna vysoká plasmatická hladina tohoto proteinu u pacientů s bakteriální infekcí, si PCT našel významné místo v diagnostice a diferenciální diagnostice zánětlivých stavů. Přes intenzivní výzkum zůstává řada nejasností ohledně metabolismu tohoto "zánětlivého" PCT a jeho fyziologického významu.

V roce 1962 byl podán první nepřímý důkaz o existenci třetího kalciotropního hormonu, později nazvaného kalcitonin. Zdroj nového hormonu byl lokalizován do štítné žlázy na základě pokusu, kdy byla štítná žláza pokusných psů promývána hyperkalcemickým roztokem. Po této stimulaci došlo k velmi rychlému poklesu kalcémie, který nebylo možno vysvětlit jen poklesem tvorby (tehdy již známého) parathormonu.

V roce 1975 byl objeven intracelulární prekursor kalcitoninu - preprokalcitonin a jeho štěpné produkty včetně PCT (10). Struktura PCT byla známa od roku 1981.

V roce 1983 PCT pronikl do diagnostiky, když byl detekován v séru krys s medulárním karcinomem štítné žlázy a následně stejné výsledky získány i u pacientů s touto chorobou.

Později byla prokázána i paraneoplastická produkce PCT buňkami malobuněčného karcinomu plic a zvýšené hladiny rovněž u pacientů s ARDS nebo u inhalačních intoxikací (11).

Většina studií, které se od roku 1991 snažily prokázat účinek PCT na osteoklasty (podobně jako je tomu u kalcitoninu), přinesla negativní výsledky.

V roce 1993 Assicot a další (13) našli extrémně zvýšené hodnoty plasmatického PCT u septických pacientů. O rok později byl za hlavního stimulantu tvorby PCT během zánětu označen bakteriální lipopolysacharid, endotoxin. Plasmatický PCT se během několika následujících let začal uplatňovat v diagnostice akutních stavů jako senzitivní a vysoce selektivní ukazatel bakteriální infekce.

PCT je protein s řetězcem o 116 aminokyselinách a molekulovou hmotností 13 kD. Struktura řetězce PCT detekovatelného v plasmě během zánětu je identická se strukturou dříve známého PCT, který je prohormonem kalcitoninu a je tvořen C-buňkami štítné žlázy. Sekvence pro kalcitonin v délce 32 aminokyselin je obsažena na 60.-91. pozici řetězce PCT.

Produktem genu CALC-I, který odpovídá za tvorbu PCT nejen v C buňkách štítné žlázy, ale pravděpodobně i za tvorbu PCT během zánětu, je 141 aminokyselinový prekursorek preprokalcitonin. Signální sekvence na N-konci svým hydrofobním charakterem umožňuje vazbu do endoplasmatického retikula, poté je endopeptidázou odstraněna za vzniku PCT. Intracelulárně je PCT v C buňkách dále štěpen - je odstraněn N-terminální úsek a C-terminální fragment (katakalcin) za vzniku hormonu kalcitoninu. Kalcitonin je uvolněn do oběhu až po dotvoření sekundární a terciální struktury. Mezi cysteinovými zbytky na 1. a 7. pozici se vytváří disulfidický můstek a na C konci se hydroxyluje prolin. Obě struktury, které jsou nezbytné pro vazbu kalcitoninu na cílový receptor, tedy nejsou obsaženy ve struktuře PCT, ale až v jeho štěpném produktu kalcitoninu.

Prakticky veškerý PCT je v endoplasmatickém retikulu C buněk štítné žlázy přeměněn v kalcitonin, takže nedochází k uvolnění PCT do oběhu a jeho hladiny u zdravých jedinců jsou pod limitem detekce. V plasmě přitom neexistují enzymy, které by cirkulující PCT mohly štěpit. Znamená to, že pokud se PCT nějakým neznámým mechanismem vyhne intracelulární proteolýze a je secernován do oběhu, zůstává zde v nezměněné podobě s poločasem 25-30 hodin. Přitom vlastní hormon kalcitonin má plasmatický poločas pouze 4-5 minut.

Gen pro prekursorek kalcitoninu, označovaný CALC-I, je u člověka lokalizován na krátkém raménku 11. chromozomu. Gen obsahuje 6 exonů, z nichž čtvrtý obsahuje sekvenci pro kalcitonin, pátý sekvenci pro kalcitonin gene related peptide I (CGRP-I) a šestý je nekódující.

Sekvence pro CGRP-I je po transkripci genu z řetězce mRNA odstraněna; proteinový řetězec o 141 aminokyselinách a 16 kDa, který je produktem translace, tedy preprokalcitonin již neobsahuje.

V sousedství genu CALC-I jsou umístěny tři další známé geny z "rodiny" kalcitoninových genů označované CALC-II až CALC-IV. Předpokládá se jejich společný evoluční původ duplikací a sekvenční divergencí z jednoho genu primordiálního. Z genů CALC-II až CALC-IV pouze CALC II kóduje prohormon, který obsahuje kompletní sekvenci kalcitoninu. Ta je ale při intracelulárním zpracování odstraněna a výsledkem translace je molekula CGRP-II, uplatňující se především jako neurotransmitter. Gen CALC-III je pseudogen nekódující žádný protein. CALC-IV neobsahuje sekvenci kalcitoninu a kóduje protein amylin - k expresi dochází především v beta buňkách Langerhansových ostrůvků.

Regulace tyreoidálního a "zánětlivého" PCT se zásadně liší.

C buňky štítné žlázy reagují na vzestup hladiny kalcia. V modulaci tvorby se uplatní i řada dalších faktorů. Jako stimulatory tvorby kalcitoninu působí glukokortikoidy, CGRP, glukagon, gastrin, beta-adrenergní podněty aj. Somatostatin a vitamin D tvorbu kalcitoninu inhibují. Hyperkalcémie ani žádný z dalších uvedených faktorů ale nemá vliv na PCT, který je uvolňován do cirkulace při zánětu.

Tvorba PCT během zánětu je úzce svázána s bakteriálním endotoxinem a s prozánětlivými cytokiny; ukazuje to rychlost vzestupu PCT po injekci bakteriálního endotoxinu nebo po podání TNF. Bakteriální endotoxin je nejsilnějším stimulatorem syntézy a uvolnění PCT do oběhu (14), pravděpodobně ale aktivuje jeho syntézu a uvolnění do oběhu zprostředkovaně přes skupinu cytokinů.

Vzestup hladiny PCT po podání endotoxinu nastává až s časovým odstupem po vzestupu TNF a IL-6. TNF dosahují vrcholu svých koncentrací 90, resp. 180 minut po podání endotoxinu v experimentu. PCT reaguje teprve po 3-6 hodinách a tvorba vrcholí po 6-8 hodinách. Díky dlouhému poločasu ale hladiny PCT kulminují až mezi 12. a 48. hodinou. Podobný časový sled zjišťujeme i v klinických situacích u pacientů s akutní bakteriální infekcí. PCT stoupá několik hodin po elevaci hladin TNF a IL-6, ale před vzestupem hladiny C reaktivního proteinu.

Vzestup hladiny PCT je možno kromě endotoxinu navodit podáním TNF, IL-1, IL-2 a IL-6. Mechanismus, kterým se cytokiny v tvorbě a sekreci PCT uplatní, není znám. Na základě znalosti procesů, ke kterým dochází v C buňkách při tvorbě kalcitoninu, se předpokládalo, že

cytokiny blokuji proteolytické štěpení PCT na kalcitonin v endoplasmatickém retikulu. Místo vzniku plasmatického PCT je ale odlišné od kalcitoninu a možností regulace je daleko více.

Na rozdíl od cytokinů, např. TNF a IL-6, jejichž elevace v zánětlivých situacích je nespecifická vůči typu zánětu, stoupá PCT s vysokou selektivitou u zánětů bakteriálních. Uplatňují se tedy i další, zatím nejasné mechanismy modulace syntézy a uvolňování PCT.

Několik let od průkazu PCT jako zánětlivého parametru jsou mechanismy regulace jeho syntézy známy jen neurčitě a o místě vzniku se spekuluje.

PCT detekovatelný v plasmě během zánětu není tvořen C-buňkami štítné žlázy. Dynamika změn při zánětu má stejný charakter i u jedinců po tyreoidektomii. Je známo, že všechny proteiny příbuzné kalcitoninu (CGRP-I a II a amylin), odvozené ze společné rodiny genů CALC-I až IV, jsou exprimovány buňkami neuroektodermálního původu. Tento původ se předpokládá i u „zánětlivého“ PCT. I když není vyloučeno, že se rodina CALC genů ještě rozroste o další členy, má se za to, že „zánětlivý“ PCT je kódován stejným genem jako PCT v C buňkách štítné žlázy, tj. genem CALC-I. Na rozdíl od C buněk ale v tomto případě nedochází k intracelulárnímu proteolytickému rozštěpení prekursoru.

Za pravděpodobné místo vzniku PCT během zánětu jsou pokládány neuroendokrinní buňky v plicích nebo ve střevě.

Expres mRNA pro PCT byla prokázána *in vitro* i v monocytech, stimulovaných endotoxinem nebo prozánětlivými cytokiny (15). Tvorba PCT v cirkulujících krevních elementech je ale zpochybňována jinou studií: po podání endotoxinu došlo v izolované plné krvi k elevaci prozánětlivých cytokinů ale nebyla zaznamenána žádná produkce PCT (16).

Etážové odběry z žilního řečiště, prováděné u pacientů po kardiochirurgickém výkonu s mimotělním oběhem, lokalizovaly zdroj PCT do hepatosplanchnické oblasti. Hladina PCT ve vzorcích z jaterních žil byla signifikantně vyšší než v ostatních vzorcích (17). Sami autoři připouští, že získané hodnoty mohou být ovlivněny specifickou situací vybraného souboru pacientů - např. ztrátou mukozní střevní bariéry a průnikem endotoxinu do portálního systému.

Leptin. Leptin je proteinový hormon. Je zapojený do zpětnovazebné regulace udržení tělesné hmotnosti a energetické rovnováhy. Byl objeven receptor pro leptin, exprimovaný zejména v hypothalamu, který zprostředkovává řadu psychických, endokrinních a

metabolických změn. Posledních několik let se diskutuje i jeho úloha, kterou zaujímá v průběhu reakce akutní fáze.

Leptin je faktorem, který není možné jednoznačně zařadit k hormonům nebo k cytokinům. Jako typický hormon je dominantně exprimován jedním typem buněk (i když adipocyty nejsou jediným zdrojem leptinu) a převažuje jeho endokrinní působení. Řada dalších biochemických a fyziologických charakteristik ale opravňuje zařazení leptinu k zánětlivým cytokinům.

Leptin je strukturně, receptorově a evolučně blízký skupině cytokinů skupiny IL-6.. Nejvýraznější podobnost primární struktury leptinu byla nalezena s G-CSF. V modelových příkladech systémové zánětlivé reakce na pokusném zvířeti, prokázala řada vědců jak vzestup plasmatické hladiny leptinu, tak i vzestup exprese mRNA pro leptin v adipocytech.

Interleukiny

Interleukin 1 (IL-1), nazývaný též hemopoetin je souborné označení pro skupinu polypeptidových cytokinů, které hrají klíčovou úlohu v regulaci imunitních pochodů a v zánětlivé odpovědi. V současné době patří sem IL-1 α , IL-1 β a antagonist IL-1 receptorů (IL-1ra), který soutěží s IL-1 o vazbu na receptory, na rozdíl od IL-1 však neaktivuje cílovou buňku. Je přirozeným inhibítoem IL-1 a reguluje jeho účinky. Rodina IL-1 cytokinů byla podrobně popsána jako první (4,51,64,78,156). IL-1 α a IL-1 β jsou sice produkovány dvěma různými geny, ale mají velmi podobné biologické účinky, včetně vazby na stejný typ receptoru. Receptory existují ve dvou typech, označovaných jako typ I a typ II, které se liší především délkou cytoplazmatické části svého řetězce.

Hlavním zdrojem IL-1 jsou monocyty a makrofágy. Další buňky které mohou tvořit tento cytokin jsou: Langerhansovy buňky, NK buňky, linie B buněk, B lymfoblasty, endoteliální buňky, dendritické buňky, mesengiální buňky, astrocyty, gliové buňky, neutrofilny, fibroblasty, epiteliální buňky atd. T CD4⁺ buňky stimulují tvorbu IL-1. Každý bioaktivní člen rodiny IL-1 je syntetizován jako proteinový prekurzor. Prekurzor pro IL-1 (pro IL-1 α a IL-1 β) má identickou hmotnost 31kD. Zralé IL-1 α a IL-1 β jsou oba polypeptidy s molekulovou váhou 17kD. Mechanismus sekrece IL-1 není zřejmý ze struktury nativních bílkovin. Převládá názor, že cirkulující formy IL-1 mohou být in vivo spíše ukazatelem závažnosti buněčného poškození nebo lýzy než endogenní sekrece. Oba druhy IL-1 se váží k jednomu ze dvou typů receptorů na buněčném povrchu.

Různé biologické účinky IL-1 jsou zprostředkovány indukcí některých genů a supresí jiných. IL-1 je spojován hlavně s indukcí genů spojených se zánětlivou reakcí organismu a jinými cytokiny, jako IL-6 a rodinou chemokinů. IL-1 má supresní účinek na geny pro sekreci albuminu, lipoproteinové lipázy a cytochromů.

IL-1 je růstovým faktorem pro lymfocyty, fibroblasty, endotelie a synoviální buňky. Má významnou roli při aktivaci T lymfocytů a označoval se proto jako LAF (Lymfocyte activating factor), IL-1 indukuje IL-2 receptor a také expresi adhezivních molekul na buňkách endotelu. IL-1 stimuluje syntézu proteinů akutní fáze v hepatocytech, stimuluje proliferaci osteoklastů a zvyšuje tělesnou teplotu (endogenní pyrogen). IL-1 také zvyšuje syntézu kolagenázy, stromelysinu a prostaglandinu fibroblasty, moduluje reparativní funkce v průběhu tkáňového poškození. Účastní se na regulaci zánětlivých pochodů a soudí se, že má úlohu v patogenezi některých chronických zánětů a autoimunních onemocnění. Podobně jako TNF může mít IL-1 při rozdílných koncentracích rozdílné účinky. Při nižších hladinách IL-1 dochází k proliferaci buněk CD4 + T a buněk B. IL-1 Je přirozeně pyrogenní a startuje syntézu proteinů akutní fáze v játrech. IL-1 také stimuluje produkci jiných cytokinových mediátorů včetně IL-2, IL-6 a IL-8.

Interleukin 2 (IL-2) byl popsán v roce 1965 jako „T cell growth factor“. IL-2 vzniká v aktivovaných Th lymfocytech, NK buňkách jako odpověď na dva podněty, které jim předaly buňky řady monocytů a makrofágů. Je to především IL-1 a antigen, prezentovaný spolu s molekulou hlavního histokompatibilního komplexu (MHC či HLA). Studie Th+Th2 modelu ukazují, že IL-4 a IL-10 výrazně ovlivňují sekreci IL-2. IL-4 také ovlivňuje expresi IL-2 receptoru α řetězce a β řetězce na T a NK buňkách. IL-2 hlavně podporuje růst T buněk a tuto svou funkci plní jak autokrinním tak parakrinním účinkem. IL-2 má tumorocidní aktivitu, aktivuje růst NK, LAK buněk a B buněk, zvyšuje produkci imunoglobulinů, $\text{INF}\gamma$, indukuje produkce IL-6 monocyty, moduluje expresi IL-2 receptoru a histaminové odpovědi stimulovaných bazofilů (35)

Základní podmínkou mitogenního, diferenciacního a aktivačního účinků IL-2 je vazba na odpovídající receptoru na povrchu buňky. Ten zprostředkuje endocytózu komplexu IL-2 a jeho receptor, který následně indukuje přechod buňky z fáze G1 do fáze S. IL-2 dále stimuluje sekreci některých dalších cytokinů (IL-3, IL-5, GM-CSF), včetně cytokinů s protinádorovým účinkem ($\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$).

Interleukin 4 (IL-4) byl popsán v roce 1982 Williamem Paulem. Jeho dřívější označení BCSF (B cell stimulatory factor) pochází od jeho hlavní funkce: je růstovým faktorem pro B lymfocyty. IL-4 je tvořen komplexem glykoproteinu. Gen pro IL-4 je lokalizován na 5. chromozomu. IL-4, stejně jako IL-2 a $\text{INF}\gamma$ je produkován malým počtem buněčných typů (48,54,154): TH2 aktivovanými T buňkami, ale také CD8+ T buňkami. Specifické receptory důležité pro účinek IL-4 jsou exprimovány na hematopoetických buňkách, včetně T a B buněk, makrofágu a mastocytů. IL-4 působí indukce diferenciaci CD4+ T helper buněk do podoby Th2 buněk. V experimentu byl zjištěn výrazný protinádorový účinek, zejména u adenokarcinomu ledviny a u maligního melanomu. IL-4 dále zvyšuje produkci IgG1, IgE a sIgM B buňkami, potencuje aktivitu LAK buněk a cytotoxických lymfocytů a působí expresi hlavního histokompatibilního komplexu (MHC II), reguluje expresi adhezních molekul na endoteliální buňce, inhibuje uvolňování mediátorů zánětu ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, PGE2) a růst buněčných kultur karcinomu prsu. Zatím nepřekonatelným problémem jsou jeho vedlejší toxické účinky, které využití v terapii prakticky znemožňují.

Interleukin 5 (IL-5) je dimer s molekulovou hmotností 45 kD. Je produkován Th2 lymfocyty a aktivovanými žírnými buňkami (18,19). Jeho gen je lokalizován na chromozomu 5. IL-5 je diferenciačním faktorem pro B lymfocyty (odtud jeho dřívější označení BCGF – B cell growth factor), stimuluje a diferencuje eozinofily (EDF-eozinophil differentiation factor), cytotoxické T lymfocyty. IL-5 má schopnost přeměňovat produkci protilátek z izotypu IgM na izotyp IgA a zvyšovat expresi receptoru pro IL-2. Reguluje vývoj eozinofilů, působí degranulaci eozinofilů v tkáních a těmito aktivitami má klíčovou úlohu v patogenezi alergických onemocnění. Terapeutické využití IL-5 je předpokládáno k ovlivnění aktivity eozinofilů, např. u schistosomiázy a předpokládá se zlepšení prognózy pacientů s nádorovým onemocněním. Antagonizování účinku IL-5 může být využito u hypereozinofilních syndromů vedoucích ke kardiálnímu poškození, nebo ke zmenšení poškození respiračního epitelu v souvislosti s astmatem.

Interleukin 6 (IL-6) byl popsán v roce 1986 a patří mezi nejlépe prozkoumané a popsané cytokiny. Obsahuje 184 aminokyselin s dvěma glykosylačními místy a čtyřmi cysteinovými zbytky. Jeho molekulová hmotnost je 26 kD a gen se nachází na chromozomu 7 (23,24,25,26,27,28). Svou sekundární strukturou se podobá erythropoetinu, G-CSF a některým dalším polypeptidům (onkostatinu M, LIF a IL-11). IL-6 působí stimulaci a diferenciaci lymfocytů T i B. Nazýval se též BCSF (B cell stimulatory factor), neboť indukce diferenciaci B lymfocytů a je jedním z klíčových faktorů produkce protilátek B buňkami. Je syntetizován mononukleární fagocyty, B lymfocyty, endotelovými buňkami, fibroblasty, žírnými buňkami

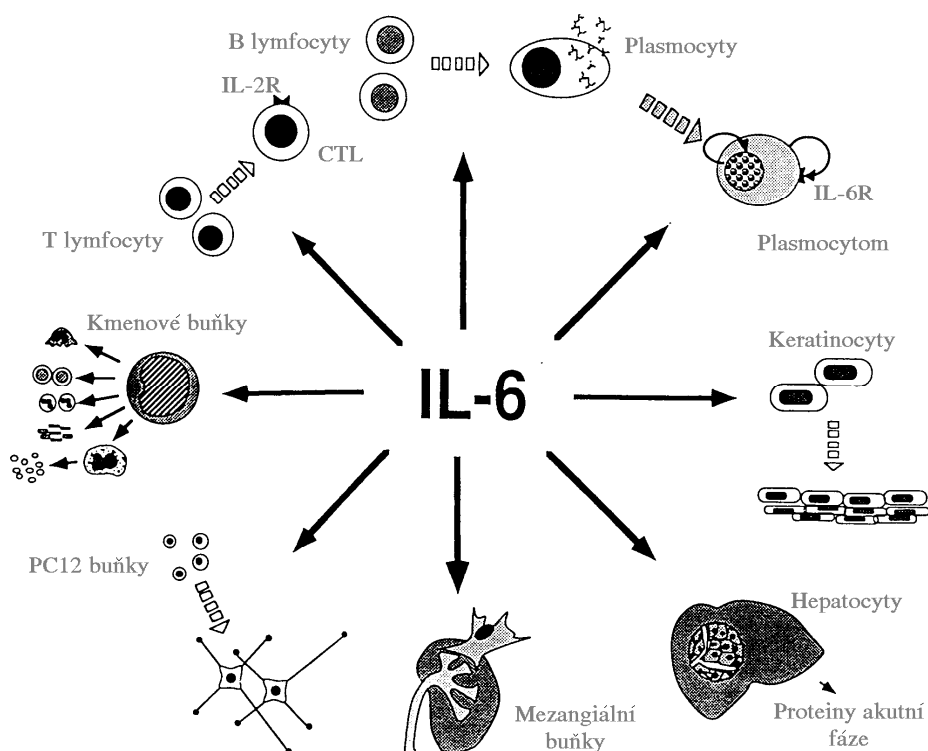
a různými typy nádorových buněk. Produkce IL-6 je stimulován mitogeny a antigeny. Jedním z nejvýznamnějších stimulačních faktorů produkce IL-6 monocyty a fibroblasty je lipopolysacharid. Tvorba IL-6 je stimulována mnoha dalšími interleukiny a cytokiny (IL-1,IL-2,TNF), ale i viry včetně HIV.

IL-6 stimuluje tvorbu receptoru pro IL-2, jakož i tvorbu a růst T-buněk a jejich diferenciaci, stimuluje hematopoézu, pravděpodobně v koordinaci s IL-3 a podílí se na stimulaci pluripotentní buňky, uvádí ji do cyklu a vytváří podmínky pro účinnost dalších hemopoetických faktorů. Inhibuje proliferaci endotelových buněk. Za patologických okolností se uplatňuje jako autokrinní růstový faktor u mnohočetného myelomu (proto se nazývá též HPGF-hybridoma plasmocytoma growth factor). Působí též aktivaci osteoklastů a podílí se na vzniku postmenopauzální osteoporózy.

Nejdůležitějším účinkem pro IL-6 je jeho klíčová úloha při vzniku reakce akutní fáze v organismu. Zvyšuje produkci IgA, IgG a IgM, ale především produkci bílkovin akutní fáze, zvláště fibrinogenu, orosomukoidu a haptoglobinu, ale i CRP a dalších. Zvyšuje i produkci superoxidodismutázy v jaterních buňkách. Koncentrace IL-6 se výrazně zvyšuje např. u pacientů v septickém šoku, především u septického šoku vyvolaného gramnegativními bakteriemi. IL-6 je v systémovém oběhu detektovatelný brzy po vzniku experimentální endotoxemie a maximum koncentrace nastává po 3 hodinách. Tento vrchol je předcházen vzestupem TNF, který pravděpodobně v koordinaci s IL-1, vyvolává produkci IL-6. U septických pacientů bývá nejvyšší koncentrace IL-6 nacházena v iniciální fázi septického šoku (23, 29,30). Cirkulující hladiny IL-6 dobře korelují s rozsahem tkáňové poškození během operace. IL-6 nejenom indukuje aktivaci neutrofilů ale v určitých situacích také akceleruje jejich autoagresivní efekty (18). IL-6 projevuje také protizánětlivé vlastnosti během tkáňové poškození stimulací sekrece solubilního receptoru TNF (sTNFr) a IL-1ra, čímž redukuje aktivitu TNF a IL-1(19).

Abnormální syntéza IL-6 se pozoruje při některých onemocněních, např. revmatoidní artritidě, systémovém lupus erytematodes, AIDS, při některých maligních onemocněních a při akutní rejekci transplantátu.

Uvažuje se, že lokální exprese IL-6 přispívá k hojení rány (33).



Obr. 1. Systémové efekty IL-6

Interleukin 7 (IL-7). V roce 1988 byl označován jako „Lymfopoetin-1“ (LP-1). Obsahuje 124 aminokyselinových zbytků a 25 signálních peptidů o celkové molekulové váze 14.5 kD. IL-7 je produkován stromálními buňkami kostní dřeně fibroblasty, endoteliemi a thymem. Působí prostřednictvím vysokoafinitních receptorů patřících do hematopoetické receptorové rodiny. IL-7 podporuje růst T buněk a synergickým působením s faktorem kmenových buněk stimuluje časnou proliferaci T buněčných progenitorů. Nepřímo zvyšuje expresi IL-2 T buňkami (140). Podporuje růst prekurzorů B buněk a tymocytů i bez přítomnosti podpůrného vazivového tkaniva. IL-7 se podílí na uvolňování IL-2 a byla potvrzena jeho úloha při maturaci megakaryocytů. Indikuje tvorbu LAK buněk a stimuluje výdej cytokinů z monocytů (IL-1, IL-6, TNF- α). IL-7 též působí jako autokrinní růstový faktor pro akutní lymfoblastovou leukémii a některé lymfomy. IL-7 může mít významnou roli v terapii stavů imunodeficitu a adjuvantní imunoterapii zhoubných nádorů. Bylo prokázáno, že v přítomnosti IL-7 se významně zvyšuje cytotoxická aktivita CD8⁺ T buněk proti HIV-1 proteinu.

Interleukin 8 (IL-8) byl objeven jako hlavní chemotaktický faktor pro neutrofile. Skupina IL-8 zahrnuje strukturálně homogenní cytokiny o malé molekulární váze 6-8 kD. IL-

8 patří do rodiny C-X-C chemokinů společně s platelet factor 4, trombomodulinem, CTAP-III, Inflammatory peptide-10. Bylo popsáno 14 strukturálně podobných chemokinů, v jejichž molekule je téměř 50% identických sekvencí aminokyselin. Podle primární struktury je dělíme na α -chemokiny, které jsou relativně specifické pro neutrofile, a na β -chemokiny, působící preferenčně na monocyty. IL-8 patří k α -chemokinům. Označení C-X-C znamená, že mezi dvěma cysteinovými zbytky je vmezeřen jiný aminokyselinový zbytek, na rozdíl od rodiny C-C chemokinů (41,67). Gen IL-8 je na chromozomu 4 a kóduje malý protein obsahující jen 79 aminokyselinových jednotek. Produkují ho zejména monocyty, makrofagy, a trombocyty. Podnětem k produkci je působení LPS cytokinů, především TNF, IL-1 a IFN- γ , ne však IL-6. Působí prostřednictvím specifického receptoru, který se nachází jen na neutrofilech, a proto je IL-8 významným chemotaktickým a aktivačním faktorem neutrofilů. IL-8 působí degranulaci neutrofilních specifických granul, za přítomnosti cytochalasinu B degranuluje azurifilní granula. IL-8 zvyšuje expresi cytoadhezivních molekul CD11/CD18. Má chemotaktický efekt pro T buněk a eozinofily. IL-8 působí inhibici migrace a tím nahromadění fagocytujících neutrofilů v zánětlivém ložisku (32). Byl popsán jako podpůrný faktor pro keratinocyty a má autokrinní růstový efekt pro buňky melanomu. Stimuluje angiogenezi. Tyto aktivity ukazují na významné působení ve zprostředkování zánětové odpovědi. Zvýšená hladina IL-8 byla prokázána u mnoha zánětlivých onemocnění spojených s akumulací leukocytů (psoriasis, zánětlivá střevní onemocnění, revmatoidní artritida, cystická fibróza, septický šok, ale také alkoholická hepatitida). Podobně jako IL-6 není tento cytokin toxický při exogenním podání.

Interleukin 9 (IL-9) byl původně identifikován u myši jako růstový faktor pro některé klony T lymfocytů. Je to glykoprotein o molekulové váze 20-30 kD. Gen pro IL-9 je na 5. chromozomu spolu s geny pro dalšími cytokiny (IL-3, IL-4, GM-CSF a M-CSF). Je uvolňován z Th-lymfocyty pod vlivem IL-1. Receptor IL-9 je integrální membránový protein o molekulové váze 64 kD (41,67,142) Působí zejména jako pomocný, kostimulační faktor, jiných cytokinů v průběhu vývoje hematopoetických buněk. Urychluje produkci imunoglobulinů E a G stimulovanou IL-4. Patologicky se může patrně uplatnit jako autokrinní stimulátor proliferace hodgkinových buněk. Potenciální terapeutické využití IL-9 bude v souvislosti s jeho působením jako autokrinního růstového faktoru T lymfocytů.

Interleukin (IL-10) byl prvně pojmenován jako Cytokine synthesis inhibitory factor-CSIF, který je produkován klonem Th buněk. Inhibuje syntézu cytokinů v jiných T helper klonech (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF). IL-10 je imunopresivním faktorem, který inhibuje některé Th1 buňky (produkce- IL-2, IFN- γ , TNF- β) ale i monocyty

(IL-1, -2, -6, -8, -12) produkované cytokiny. Inhibuje též produkci reaktivního kyslíku indukovanou IFN- γ . Má opačné postavení v dosud uvedených cytokinech (67,105,124,179). Produkují ho zejména Th2-lymfocyty a s menší intenzitou i Th0-lymfocyty, dále monocyty, makrofágy, B-lymfocyty, Th1-lymfocyty, CTL a NK–buňky. IL-10 moduluje monocytomakrofágové funkce, suprimuje produkci prostaglandinu E2. Má imunostimulační účinky pro mastocyty a expresi proteáz (synergicky s IL-3 a IL-4). Indukuje aktivovaných B lymfocyty do plazmatických buněk a sekreci protilátek. Indukuje IgA syntézu v CD40 aktivovaných buňkách.

Zkoumá se využití imunosupresivní aktivity IL-10 v transplantologii a léčení autoimunních Th1 chorob. Inhibice prozánětlivých cytokinů by mohla být využita při léčbě sepse a některých dermatologických onemocnění. Opačně hypergamaglobulinemie spojená s AIDS a B buněčnými malignitami by mohla být ovlivněna terapií IL-10 antagonisty.

Interleukin 11 (IL-11) je pleiotropní cytokin, který je produkován stromálními buňkami a buňkami podpůrného vazivového tkaniva v kostní dřeni. Je molekulové váhy 19 kD a jeho gen je na 19. chromozomu. IL-11 má významnou úlohu v hematopoéze, lymfopoéze, akutní zánětové odpovědi a ve vývoji adipocytů, neuronů a osteoklastů. (133,159, 169). Má některé biologické vlastnosti podobné IL-6 ale oba tyto cytokiny mají odlišné receptory. IL-11 působí na hemopoetické i nonhemopoetické buněčné populace. Stejně jako IL-1, IL-6, IL-12 a G-CSF působí jako růstový faktor pro blasty. Stimuluje proliferaci progenitorů megakaryocytové řady a proliferaci CD34+ progenitorových buněk. Stimuluje vývoj T buněk závislých na sekreci specifických imunoglobulinů B buňkami. IL-11 má vliv na syntézu proteinů akutní fáze v hepatocytech. Podporuje strukturální integritu epitelu gastrointestinálního traktu a významně snižuje výskyt mukozitidy po chemoterapii. Inhibuje diferenciaci adipocytů. Má význam v léčbě trombocytopenie, neutropenie, myelosuprese spojené s chemoterapií nádorů a transplantací kostní dřene.

Interleukin 12 (IL-12) byl identifikován v roce 1989 a je označován též jako CLMF (cytotoxic lymphocyte maturation factor). Struktura molekuly IL-12 je mezi cytokiny neobvyklá, molekula tvoří heterodimer dvou glykoproteinových řetězců spojených disulfidovými vazbami (150,151,160). Specifické buněčné receptory pro IL-12 mají dvě odlišné subjednotky. Receptory jsou pravidelně exprimovány na NK buňkách, zatímco na neaktivních T a B lymfocytech ani monocytech nalezeny nebyly. V přírodních T a B lymfocytech ani monocytech rovněž nalezeny nebyly. V běžných podmínkách jsou hlavními producenty IL-12 B lymfocyty, NK buňky a makrofágy. IL-12 je pleiotropní cytokin, který je funkčním mostem mezi vrozenou rezistencí a specifickou imunitou. Je klíčovým cytokinem

pro diferenciaci Th1 lymfocytů z progenitorových buněk, má synergické účinky s IL-2 na aktivaci cytotoxických lymfocytů a NK buněk. Byl zjištěn též synergický účinek s IL-3 na hemopoézu. IL-12 je účinným induktorem produkce IFN- γ a inhibítozem angiogeneze. Kromě toho IL-12 snižuje syntézu IgE lymfocyty, stimulovanou IL-4, indukuje odpověď Th1 a inhibuje syntézu IL-4 Th buňkami.

Při klinických studiích bylo nalezeno že hladina IL-12 v seru je obvykle zvýšena u pacientů s tuberkulózou a s některými typy karcinomů. IL-12 má také význam pro imunitu proti virovým nákazám. Podle dosavadních pozorování podávání IL-12 nevyvolává toxické reakce. Imunoneutralizace IL-12, který je vyplaven po operacích na střevě v myších, nejenom zvyšuje mortalitu ale zároveň přeměňuje produkci IL-12 a IFN- γ na IL-10. (31)

Podle jedné studie produkce IL-12 monocyty je relativně snížena při postoperativních septických stavech a přitom suprese sekrece IL-12 předchází začátku postoperativního sepse, což může být využito při monitorování pooperační sepse. (34)

Interleukin 13 (IL-13) je cytokin produkovaný aktivovanými T lymfocyty. Jeho gen je lokalizován na chromozomu 5 v blízkosti genů pro IL-3, IL-5, IL-9 a MG-CSF. V monocitech a makrofázích inhibuje tvorbu prozánětlivých cytokinů, a proto ho můžeme považovat za významný endogenní protizánětlivý regulátor podobně jako IL-10. V těchto buňkách inhibuje i replikaci HIV-1, čímž se odlišuje od IL-3 a GM-CSF, které replikaci tohoto původce AIDS naopak stimuluje. Kromě toho IL-13, podobně jako IL-4, stimuluje a diferenciaci B lymfocytů (1, 41, 127)

Interleukin 14 (IL-14) má synonymní označení HMV-BCGF (high molecular weight B cell growth factor). Indukuje proliferaci B lymfocytů, ale inhibuje jejich diferenciaci v buňky produkující imunoglobuliny. Má pravděpodobně důležitou úlohu v generaci a udržování „paměti“ B lymfocytů. Je produkován aktivovanými T lymfocyty a dendritickými buňkami lymfatických uzlin. Přisuzuje se mu význam v patogenezi některých lymfoproliferativních onemocnění (chronická leukémie, Burkittův tumor, trichocelulární leukémie).

Interleukin 15 (IL-15) má podobné biologické účinky jako IL-2. Je tvořen převážně monocyty, fibrocyty a epiteliálními buňkami. Specifický receptor pro IL-15 (IL-15Ra) zatím nalezen nebyl (1,69,83,104). IL-15 ale integruje s IL-2R β i IL-2R γ (podjednotka γ je zřejmě nezbytná pro přenos signálu do buňky). IL-15 indukuje proliferaci a diferenciaci T-Ly, CD4+, CD8+, LAK buněk. Aktivuje proliferaci B lymfocytů s indukcí sekrece IgM, IgG, IgA. Předpokládané terapeutické využití je zejména v možnosti stimulace růstu kosterní svaloviny při svalových atrofích.

Interleukin 16 (IL-16) byl nalezen v roce 1982. Je růstový a chemotaktický faktor pro CD4⁺ lymfocyty a proto byl pojmenován též jako LCF (lymfocyte chemoattractant factor). Je kódován jediným genem na chromozomu 15q a nijak nesousedí s jinými geny pro cytokiny (1, 104, 107). Jeho zdrojem jsou T lymfocyty (CD8⁺, CD4⁺), eozinofily a epitelové buňky astmatiků. Specifickým receptorem pro IL-16 je molekula CD4. IL-16 zvyšuje adhezi eozinofilů k proteinům mezibuněčné hmoty a ovlivňuje expresi HLA-DR molekul monocyty. Byly zjištěny též jeho inhibiční účinky na replikaci viru HIV. Jak je známo HIV virus používá vazbu CD4⁺ jako bránu ke vstupu do buňky, terapeutickou snahou je podat cytokin tak brzy, aby se navázal na CD4⁺ dříve než virus a zabránil mu tak ve vstupu. Byl prokázán klinický efekt IL-16 při bronchiálním astmatu. K perspektivním problémům patří i úloha IL-16 při tvorbě granulomatózních zánětů.

Interleukin 17 (IL-17) byl identifikován teprve v nedávné době, jako solubilní forma koaktivační molekuly ze skupiny CTLA. IL-17 produkují T lymfocyty.

Tumory nekrotizující faktor (TNF) je produkován aktivovanými lymfocyty, makrofágy, granulocyty, fibroblasty, NK buňkami a buňkami různých nádorů. Má dvě formy, α a β , které soutěží ve vazbě na společný specifický membránový receptor a řadíme je spolu s CD30, CD40L a dalšími již převažně membránovými molekulami do rodiny tumory nekrotizujícího faktoru (TNF).

TNF α je polypeptid s molekulovou hmotností 17 kD, sestavený ze 157 aminokyselin. Gen pro jeho syntézu je lokalizován na krátkém raménku 6. chromozomu. V oběhu se vyskytuje ve formě trimetru, který reaguje s jedním nebo dvěma membránovými receptory (92,112,155,166). TNF β je znám jako lymfotoxin (LT) nebo LT- α , primárně produkován aktivovanými lymfocyty. První zmínky o TNF pocházejí z minulého století a dotýkají se fenoménu, který dal tomuto cytokinu název. Dr. Willam Goley, chirurg z New Yorku, popsal hemoragickou nekrózu tumoru u pacienta který onemocněl interkurentní streptokokovou infekcí.

TNF α , kachektin, je mediátorem zánětlivé reakce, působí uvolnění dalších mediátorů (leukotrienů a PGE₂), indukuje expresi některých genů, má cytotoxické účinky a lokálně působí nekrózu nádorových buněk. Jedním z mechanismů cytotoxického účinku může být i tvorba kyslíkových radikalů indukovaná TNF. TNF α má silný katabolický účinek a je odpovědný za nádorovou kachexii. Inhibuje lipoproteinové lipázy a potlačuje diferenciaci adipocytů. Přisuzuje se mu role v patogenezi roztroušené sklerózy a některých autoimunitních onemocnění.

TNF β , lymfotoxin, má některé funkce podobné TNF α . Potencuje např. expresi cytokinů a adhezivních molekul, stimuluje proliferaci a diferenciaci mnoha buněčných typů (lymfocytů, endotelií). Hlavně však má cytotoxické a cytolytické účinky. S TNF α soutěží ve vazbě na společné membránové receptory, které se nachází na většině buněk, s výjimkou erytrocytů.

TNF zaujímá zásadní roli v cytokinové kaskadě a vzestup jeho lokální a plazmatické hladiny předchází detekovatelným hladinám IL-1 β a posléze IL-6 o několik hodin. Syntéza těchto cytokinů je akcelerována autoindukčním efektem i vzájemnou stimulací tvorby na transkripční i posttranskripční úrovni. TNF může působit v transmembránové buněčně vazané podobě i v secernované podobě (polymorfismus).

Tento cytokin se váže k některému ze dvou specifických buněčných receptorů a může vykazovat při rozdílných koncentracích různé účinky. Při nižších hladinách (10⁻⁹ mol/l) aktivuje zánětlivé neutrofile a monocyty k ničení mikrobů, stimuluje T a B buňky a expresi molekul hlavního histokompatibilního komplexu I třídy. TNF dále stimuluje tvorbu dalších prozánětlivých cytokinů (IL-1) a specializovaných cytokinů (IL-6 a IL-8), zvyšuje adhezivitu endoteliálních buněk pro leukocyty, a tím přispívá k atrahování těchto aktivovaných buněk do míst zánětu a infekce. Tyto vlastnosti TNF podtrhují významnou úlohu tohoto cytokinu v obraně organismu a v ničení mikrobů.

Tyto vlastnosti mohou rovněž sloužit k rozpoznání a supresi nádorových buněk jak přímou lýzou tumoru, tak i vyvoláním trombózy v nově vytvořených cévách tumoru. Podněty které vedou k větší produkci TNF, mohou vést k další celkové reakci, která je potenciálně negativní. Je-li přítomnost TNF ve tkáních nebo v oběhu zvýšena, může vyvolat některé prospěšné reakce, jako je zvýšení tělesné teploty a produkce proteinů akutní fáze játry. K nepříznivým systémovým účinkům nadměrné aktivity TNF patří stav oběhového selhání vyvolaný několika vlivy, k nimž patří snížení tonu hladkých svalů cév, snížená kontraktilita myokardu (35) a aktivace koagulační kaskády spojená s intravaskulární trombózou. Zásadní význam TNF při systémovém zhoršování stavu jedince při těžké infekci byl prokázán protektivním účinkem protilátek proti TNF. V in vitro studiích je pozorováno že TNF snižuje depozice a organizace kolagenu v kožních ranách v septických podmínkách (36).

Antagonisté receptorů a solubilní receptory cytokinů

Fyziologické a patofyziologické účinky cytokinů jsou zprostředkovány vazbou na receptory buněčného povrchu. Sekvenční analýza cytokinových receptorů definuje některé rodiny membránových proteinů se specifickou homologií funkční domény. Receptorové rodiny jsou popisovány následovně:

- a) imunoglobulinová superrodina je charakterizována opakováním Ig-like sekvence v extracelulární doméně. Tvoří ji např.: receptory interleukinu-1 (IL-1Rs), fibroblast growth factor (FGFRs), platelet-derived growth factor (PDGF Rs).
- b) Hematopoetická (cytokinová) receptorová superrodina vyznačuje se stabilním cysteinovým zbytkem a charakteristickým opakováním WSXWS. Tyto rodinu tvoří např.: erythropoetin receptor (EPOR), growth hormone receptor (LIFR), gp 130, IL-2R β i γ řetězec, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R atd.
- c) Třetí rodinou je rodina tumor necrosis factor (TNF) /nerve growth factor (NGF) receptoru. Zahrnuje asi 10 membránových proteinů vyznačujících se bohatým cysteinovým opakováním v extracelulárním regionu. Homologie v cysteinových extracelulárních zbytcích mezi členy této rodiny je mezi 25%-30%.

Kromě toho, některé funkční receptory jsou vytvořeny jen ve spojení s vazebnou podjednotkou společnou pro několik receptorů (51,66,80,162). Například vazebná podjednotka proteinu gp 130 vytváří funkční receptorový komplex ve spojení s IL-6R, (LIFR), OSMR a IL-11R. Společný β -řetězec tvoří funkční komplex ve spojení s IL-3R, IL-5R a GM-CSFR. Společný γ -řetězec tvoří funkční receptorový komplex ve spojení s IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-13R a IL-15R (**TAB 5**).

Interleukin 1 receptor (IL-1R) a IL-1 receptorový antagonist (IL-1ra).

IL-1 je účinný až po navázání na specifický receptor, který je strukturálně blízký IL-1 α a IL-1 β . Pro IL-1 rozeznáváme dva typy receptorů IL-1R - typ I a typ II. Receptor IL-1 typ I je 80 kD protein tvořený T buňkami a neutrofilly. Typ I přednostně a lépe váže IL-1 α a typ II lépe váže IL-1 β . Podle současných poznatků je pouze receptor typu I schopen přenosu signálu k tvorbě všech biologických efektů spojených s IL-1. Je předpoklad, že úlohou membránového receptoru typu II je vytvořit prekursor pro vazbu solubilního receptoru IL-1(sIL-R), která antagonizuje a moduluje aktivitu IL-1. Dosud byl sIL-1R typu I podáván pouze zdravým dobrovolníkům spolu s endotoxinem. Přestože došlo k poklesu hladiny IL-1 β , hemodynamické parametry, hořčeka ani leukocytóza nebyly léčbou ovlivněny. Současně došlo ke zvýšení hladiny TNF α , což dokazuje, že blokáda jednoho prozánětlivého cytokinu je kompenzována up-regulací jiných synergicky působících faktorů. Odlišný typ přirozeného inhibitoru IL-1 aktivity je antagonist receptoru IL-1 (IL-1ra). Prvně byl izolován z moči pacientů s monocytární leukemií. Je to glykoprotein, tvořený 152 aminokyselinovými zbytky. Tato molekula vykazuje z 26% homologii s IL-1 β a 19% homologii s IL-1 α . IL-1ra produkují monocyty, neutrofilly, makrofágy a fibroblasty. Experimentálně byla prokázána blokáda aktivity IL-1 jeho receptorovým antagonistou in vitro i in vivo. U myši, kterým byl nejprve

podání IL-1ra, byla pozorována signifikantně nižší mortalita septického šoku vzniklého po vpravení LPS parenterálně. IL-1 β deficitní myši reagovaly na podání endotoxinu normální zánětlivou odpovědí, ale při polytraumatu nerozvinuly odpovídající reakci. Podání IL-1ra zdravým osobám nevede k žádným laboratorním ani klinickým změnám. Aplikace IL-1ra dobrovolníkům, kterým byl současně podán endotoxin *Escherichia coli*, snížila leukocytózu, ale neměla žádný vliv na hořčku a tachykardii (37)

Ukazuje se, že IL-1 β je nezbytný pro normální průběh imunitní odpovědi. Podle dosavadních zjištění je IL-1 β nezbytný např. i k přežití chřipkové infekce. V laboratorním nálezu se deficit IL-1 β projeví sníženou podkací protilátek, omezenou odpovědí protizánětlivých cytokinů (IL-4, IL-10) a nedostatečnou aktivitou T lymfocytů. Inhibice IL-1 β tak může narušit přirozenou obrannou odpověď a způsobit u pacienta nežádoucí imunosupresi. Současné preklinické a klinické studie ověřují využití IL-1ra v léčbě sepse, kachexie, revmatoidní artritidy, chronické myeloidní leukemie a reakce štěpu proti hostiteli u transplantace kostní dřeně.

Interleukin 2 receptor (IL-2R)

Biologická aktivita IL-2 je zprostředkována vazbou na multimolekulární celulární receptor. Tento receptor se skládá ze tří glykoproteinových řetězců, alfa řetězce (IL-2R α), beta řetězce (IL-2R β) a gama řetězce (IL-2R γ), jejichž spojením vzniká vysoce afinitní receptor. Třetí (γ) podjednotku využívají i jiné cytokiny (IL-4, -7, -9, -13, -15). Zvýšená hladina IL-2R α koreluje se zvýšením T a B buněčné aktivity. V mnoha studiích je popisována korelace hladiny solubilního receptoru se zvýšením hladiny IL-2R α a rejekcí dárcovského orgánu.

Interleukin-6 receptor (IL-6R)

IL-6R byl izolován a jeho molekulová struktura byla popsána v roce 1988. Až v roce 1990 byla definována hematopoetická (cytokinová) receptorová superrodina vyznačující se stabilním a charakteristickým opakováním 4 cysteinových zbytků na N konci: tryptofan-serin-X-tryptofan-serin (WSXWS). Receptorový komplex IL-6R se skládá z dvou membránových glykoproteinů. První část je komponenta s nízkou afinitou vazby k IL-6. Druhá komponenta receptoru (protein gp 130) přenášející signál nemá schopnost samostatně vázat IL-6. Obě komponenty v komplexu tvoří vysoce afinitní receptor pro IL-6. Protein gp 130 může být exprimován v každé tkáni. Různé hematopoetické, kardioprotektivní a neurotrofické cytokiny (např. IL-6, LIF, IL-11, CT-1) využívají gp 130 jako vazebnou komponentu v receptorovém komplexu. Solubilní forma IL-6sR byla popsána v moči zdravých dospělých jedinců, v kulturách lidských myelomových buněk a u HIV pozitivních jedinců.

Solubilní receptory TNF (sTNFR I a sTNFR II)

Rekombinantní technikou připravené extracelulární části TNF α receptorů (ať už TNFR I-p55 nebo TNFR II-p75) fúznou do Fc domény imunoglobulinu G váží s vysokou afinitou cirkulující TNF α (**38**). Molekuly TNF α se obvykle vyskytují ve formě trimerů a neutralizace alespoň dvou jednotek je předpokladem deaktivace celého komplexu.

Neočekávaně se ukázalo, že u pacientů s grampozitivní sepsí vedlo podání vysokých dávek TNFR II ke zvýšení mortality a toto bylo přímo úměrné dávce léku. U pacientů s gramnegativní sepsí k tomuto jevu nedošlo, 28denní mortalita byla u léčených pacientů stejná jako u kontrolní skupiny.

Autoprotilátky proti TNFR II:Fc se vytvořily u 15% pacientů, ale nevedly k žádným nežádoucím reakcím.

Výsledky tak potvrdily, že TNF α není jenom iniciální faktor sepse a septického šoku, ale i nezbytným článkem obranyschopnosti organismu. Je zřejmě nezbytný k likvidaci intracelulárních patogenů (*Listeria*) a mykóz (*Candida* sp.) a tím k přežití abdominální sepse. Knokautovaná myš s vyřazenou tvorbou TNF α se vyvíjela normálně, ale měla sníženou neutrofilní aktivitu, byla vysoce náchylná k infekci *Candida albicans* a nebyla schopna vypořádat se s infekcí *Listeria monocytogenes*. TNFR I je nezbytný pro přežití ve zvířecím modelu sepse při peritonitidě. TNF α tvořený mastocyty má protektivní účinek a je zřejmě nutný pro zdárný průběh peritonitidy.

1.3 CITOKINY V CHIRURGII

1.3.1 MOŽNOSTI A PERSPEKTIVY TERAPEUTICKÉHO PODÁNÍ CYTOKINŮ V CHIRURGII

Protinádorové, protivirové, imunomodulační a další fyziologické účinky cytokinů vedou v posledních letech k jejich testování k možnému klinickému uplatnění jako nových farmakologických modalit. V současné době se vyhranily dvě hlavní indikační skupiny léčebního uplatnění cytokinů: 1. antitumorozní (resp. antiproliferativní léky – interferony, interleukiny-2, -4, -5 a -6). 2. skupinu tvoří léky stimulující hemopoézu (kolonie stimulující faktory GM-CSF, G-CSF, IL-3). 3. perspektivní oblastí cytokinové terapie je možné přerušení nekontrolované systémové cytokinové kaskády způsobené rozsáhlým tkáňovým traumatem, infekcím, hypoxií atd. Další možnosti nabízí cytokiny v léčbě virových onemocnění (hepatitis B a C perspektivně i AIDS), vrozených imunodeficiencí, progresivní systémové sklerózy atd.

Současné znalosti úlohy cytokinů v patogenezi kritických stavů a rostoucí možnosti molekulární biologie a technologie postupně nabízejí možnost ovlivnit kritické stavy cílenou

intervencí, zaměřenou na jednotlivé stupně postagresivní kaskády (8,16,17,32,42,45). Pro terapii septických stavů stále platí a v následujících letech bude platit zásadní podmínka, t.j. včasná diagnostika a co nejrychlejší sanace infekčních ložisek s následnou komplexní terapií. Pouze při splnění této podmínky může být terapeutické ovlivnění cytokinové kaskády pro pacienta prospěšné (41,70,81,130,141).

Použití v akutní medicíně a terapii septických stavů stále zůstává ve fázi výzkumu bez širšího klinického uplatnění.

Předpokladané využití cytokinů v akutní medicíně se zkoumá v následujících oblastech: v diagnostice systémové zánětlivé odpovědi organismu, při kontrole terapii a průběhu zánětlivé odpovědi, při monitorování kriticky nemocných, při terapeutického zásahu do mediátorových kaskádu.

Zvláště pro chirurgii jsou zajímavé následující aplikace: 1. časná diagnostika pooperačních zánětlivých komplikací. 2. Diferenciální diagnostika mezi zánětlivými onemocněními a horečkou jiného původu. 3. Monitorování některých nespecifických břišních symptomů. 4. Monitorování průběhu léčení peritonitid. 5. Monitorování kriticky nemocných na jednotkách intenzivní péče a časný záchyt rozvoje zánětlivých komplikací. 6. V transplantační chirurgii diagnostika akutní orgánové rejekce. 7. Užití rekombinantního lidského erythropoetinu (rHuEPO) u pacientů s nízkým hematokritem.

Fyziologický základ anticytokinové terapie v kritických stavech

Řada pozorování dokazuje, že TNF α je rozhodujícím mediátorem septické reakce. Experimentální aplikace endotoxinu vede k uvolnění TNF α z mikrofágů a neutrofilů do cirkulace. Terapeutické podání TNF onkologickým pacientům ve snaze využít antiproliferativní potenciál tohoto cytokinu je (v závislosti na dávce) doprovázeno charakteristickou septickou symptomatologií zahrnující pokles krevního tlaku, konzumpci koagulačních faktorů a orgánovou dysfunkci. Vyšetření septických pacientů odhalilo, že hladiny TNF α jsou zvýšené po dobu několika dnů. Jejich pokles koreluje s přežitím pacientů a vysoké koncentrace naopak úzce korelují se závažností stavu. Ukazuje se ale, že i pouhá perzistence nízkých hladin TNF α zhoršuje prognózu septických pacientů.

Recentně prokázaný polymorfismus promotorového regionu TNF β a jeho patogenetická souvislost s rozsahem septické odpovědi představuje perspektivní screeningový faktor pro výběr vysoce rizikových pacientů, např. před plánovaným chirurgickým výkonem, zatím ale nemá praktické využití. Totež platí i pro genový polymorfismus interleukinu (IL)-1,

objevený teprve v r. 2000. Intenzita IL-1 odpovědi, determinovaná tímto polymorfizmem, a s ní související kachektizace se podle dosavadních zjištění odráží především v prognóze onkologických pacientů.

Nehledě na nepochybné genetické predispozice cytokinové odpovědi se ukazuje, že TNF je dominantním cytokinem časné fáze zánětlivé odpovědi s výraznými systémovými efekty. Odpovídá za spuštění cytokinové kaskády a indukci septických symptomů. Prakticky identické biologické vlastnosti (i přes rozdílnou molekulární strukturu a receptorovou specifitu) byly zjištěny u IL-1.

Účinky uvolněného TNF jsou mediovány 55kDa 75kDa membránovými receptory (TNFR1 a TNFR2). Transmembránové komponenty těchto receptorů jsou spontánně uvolňovány do cirkulace. Bylo prokázáno, že tyto solubilní receptory TNF částečně vychytávají a inaktivují cirkulující TNF. Představují tak jednoduchou negativní zpětnou vazbu, která limituje rozsah systémového působení TNF. V případě IL-1beta se uplatňuje další fyziologický regulační faktor, biologicky inaktivní kompetitivní receptorový antagonist IL-1(IL-1ra), soutěžící s IL-1beta o vazbu na buněčný receptor.

Tyto a další solubilní receptory, cytokinový antagonist IL-1ra, cytokiny s protizánětlivou aktivitou (IL-4, IL-10) a některé proteiny akutní fáze (alfa₂-makroglobulin) tvoří základ syndromu kompenzační protizánětlivé odpovědi (CARS, compensatory antiinflammatory response syndrome), kontraregulačního, protizánětlivého procesu v cytokinové síti, indukovaného systémovou zánětlivou odpovědí a probíhající současně s ním.

Experimentální studie na selektivní blokádu cytokinové aktivity v akutních situacích se soustřeďují na dva mediatory, TNFalfa a IL-1. TNFalfa je iniciálním cytokinem v časné fázi septické reakce. AKtivity IL-1 a TNF-alfa v sepsi se do značné míry překrývají. Pokusy blokovat IL-1 se ale zaměřují i na jiné, především chronické stavy, ve kterých se patogenicky uplatní jeho role faktoru růstového (akutní a chronická myeloidní leukemie), prozánětlivého (arthritis, colitis, ulceroza, ateroskleróza) a apoptotického (destrukce beta-buněk Langerhansových ostrůvků) (39).

Inhibice obou těchto cytokinů je v experimentální i klinické rovině testována na několika úrovních s výsledky velmi rozporupnými, které zatím neodpovídají vynaloženým nákladům ani vkládaným nadějím. Zde zmíníme pouze ty anticytokinové postupy, které jsou předmětem klinických studií u septických pacientů.

Strategie ovlivnění TNF, resp. IL-1 a v širším smyslu celého průběhu systémové zánětlivé odpovědi je orientována následujícími směry: (tab 2).

Tab. 2 Možnosti terapeutického zásahu do septické kaskády

Zeměření	Terapeutické možnosti	Zaměření	Terapeutické možnosti
specifická anticytokinová terapie TNF IL-1 IL-6 IFN- γ	monoklonální protilátky solubilní receptory sTNFR monoklonální protilátky solubilní receptory sIL-1R IL-1 receptor. antagonist monoklonální protilátky monoklonální protilátky solubilní receptory sIFN γ R	eikosanoidy	inhibitory cyklooxygenázy inhibitory lipooxygenázy antagonisté leukotreinů inhibitory TxA ₂
inhibice syntézy cytokinů	inhibitory fosfodiesterázy pentoxifylin IL-4,IL-10,IL-13,TGF β	Oxid dusnatý	inhibitory iNOS
komplement	monoklon. protilátky proti C5a inhibitor C1-esterázy solubilní CR 1	Eliminace mediátorů	plazmaferáza hemofiltrace adsorbce endotoxinu
PAF	receptorový antagonist PAF	koagulační kaskáda	řada přípravků

Předcházení aktivace obranných mechanismů

Vedle široce používané antibiotické terapie sem patří cílená léčba proti bakteriálním produktům, především endotoxinu gramnegativních bakterií (neutralizační protilátky proti endotoxinu, protilátky proti CD14 receptorům na povrchu buněk). Protilátky proti cytokinovým receptorům se navazují na cytokinový receptor, zablokují tak vazbu cytokin-receptor a zabrání spuštění nežádoucí reakce plynoucí z obsazení receptorů cytokiny. První výsledky studií pokladají za významné vyřazení receptoru CD14 nejen proto, že tím je znemožněna nadměrná reakce makrofágů. Ptozánětlivé cytokiny totiž mohou být tvořeny i

jinými buňkami, které současně zvyšují expresi adhezních molekul- a to po stimulaci LPS, navázaným na solubilní CD14 receptory přítomné v plazmě.

Výsledky, které hodnotí některé studie, jsou velmi nadějné. D. Leturqua v USA používal na opicích *Macacus fascicularis* monoklonální protilátky 18E5 nebo 28C5 a pomocí nich vyřazoval makrofágový receptor CD14. 28C5 působí proti vazby receptoru CD14 na komplex LPS-LBP, 18E12 neovlivňuje možnost vazby LPS-LBP na CD14, ale inhibuje signály vysílané z obsazeného receptoru. Obě protilátky zabránily nebezpečnému poklesu krevního tlaku po i.v. podání endotoxinu, hladina hlavních prozánětlivých cytokinů byla snížena a nedošlo k zvýšení permeability plicního epitelu. Studie, která probíhala v SRN v Birstelu, byla perspektivní, ale předčasná z hlediska klinického použití (49). Blokáda endotoxinu ještě před jeho interakcí s leukocyty je bezesporu nejúčinnější, pokud je podána včas, před iniciací systémových zánětlivých projevů. Na místě je tedy především preventivní nasazení u vysoce rizikových pacientů. Teorie využití protilátek proti LPS vychází z předpokladu, že LPS nemůže na makrofágy působit přímo, ale až když se v plazmě naváže na zvláštní bílkovinu, LPS binding protein (LBP). Receptorem pro vzniklý komplex ve stěně makrofágů je molekula CD 14.

Tento postup je ale obhajován i ve fázi rozvinutého septického šoku ve snaze omezit další aktivaci zánětlivých buněk. Nevýhodou je příliš úzké zaměření léčby antiendotoxinová terapie může být účinná pouze u gramnegativní bakteriémie. V praxi je ale obvykle nemožné odhadnout identitu mikroorganismu v době zachycení prvních příznaků sepse. (40). Do současné doby byla testována celá řada preparátů v experimentu i v klinice (29,67,84).

Zaímavý představitel monoklonálních protilátek proti endotoxinu je HA-1A, který v experimentu efektivně vyvazoval LPS v seru. Komplexy protilátka-LPS byly urychleně vylučovány ledvinami. V jedné multicentrické studii podle Zieglera, jedná dávka monoklonální IgM (HA-1A) byla použita v pacientech s gram negativní sepsi bez šoku k derivaci endotoxinu *E.coli*. 49% pacientů zemřelo ve skupině léčených placebo terapií, ve srovnání s 30% mortalitou léčených septických pacientů. U pacientů s gram negativní sepsí a přítomným šokem zemřelo 57% pacientů léčených placebem oproti 33% pacientů léčených HA-1A. Ostatní studie ale nedopadly jednoznačně. Uvažuje se, že molekula lipidu A, který je tvořen různými bakteriemi, není zcela identická a proto vazba protilátky nemusela být ve všech případech dostatečně rozsáhlá a léčebně účinná. Inaktivovaný endotoxin, Tolerin-R, byl zkouman po ozáření a ukázalo se že kompetitivně inhibuje činnost LPS. Stejně schopnosti jsou sledovány v dalších testovaných látkách (antagonisté a inhibitory 5-lipoxigenázové cesty, antagonisté leukotrienu, antagonisté cyklooxygenázové cesty, inhibitory tromboxanové

syntézy, antagonisté tromboxanu...). Bohužel zatím vlastně žádný léčebný postup, který byl založen na současném chápání patogeneze septického šoku, nepřinesl zřetelný léčebný úspěch v klinice a shrnutí všech dosud provázaných léčebných metod zaměřených na modulaci účinků cytokinů by bylo zatím předčasné.

Inhibice mediátorů zánětu

Klinicky jsou v případě TNFalfa testovány především dva postupy: 1) blokáda cirkulujícího TNF monoklonálními protilátkami, 2) kompetitivní antagonismus TNF aplikací syntetických solubilních TNF receptorů. Jako nedostatečný se zatím ukazuje princip inhibice tvorby TNF nízkomolekulárními látkami, např. indometacinem (41) nebo pirlfenidonem (42). V případě IL-1beta vedle aplikace neutralizačních protilátek proti IL-1beta přichází v úvahu podání receptorového antagonisty IL-1ra (37). Dosavadní ne příliš povzbudivé výsledky preklinických studií shrnuje tabulka 3.:

Tab. 3 Výsledky anticytokinových postupů při sepsi v preklinických studiích

Aplikace	Laboratorní změny	Klinický výsledek	28denní mortalita
antiTNF α AB	pokles TNF α	úprava TK	neivlivněna
antiTNF α AB fragment	pokles IL-6	žádný	neovlivněna
sTNFR II	pokles TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-1ra	hemodynamická stabilizace	-pokles celkové mortality -zvýšení mortality na G+ infekce
IL-1ra	pokles IL-6	hemodynamická stabilizace	neovlivněna
sIL-1R	pokles IL-1 β , vzestup TNF α	-----	neovlivněna

Upraveno podle Caina, B.S. et al (207)

Solubilní cytokinové receptory, které byly dosud popsány (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 a TNF α) jsou proteinové povahy a mají schopnost se navázat na cytokiny přítomné v oběhu (nikoli navázané na receptory na cílových buňkách). Význam těchto endogenních látek nebyl dosud zcela jednoznačně definován a nebyly také dosud terapeuticky užity (63,69).

Antagonisté receptorů jsou molekuly podobné cytokinům. Tyto antagonisté se vážou na cytokinový receptor bez vyvolání odpovědi. Dosud je popsán pouze receptorový antagonista pro IL-1. IL-1ra o molekulové váze 17-22 kilodaltonu je přírodní lidský protein produkovaný makrofágy jako odpověď na endotoxin a jiné mikrobiální produkty. IL-1ra má stejnou afinitu k IL-1r jako IL-1 α a IL-1 β . Bylo prokázáno ve zvířecím modelu snížení středního arteriálního tlaku (MAP). Po experimentální endotoxemii se koncentrace IL-1ra zvyšuje paralelně se zvýšením IL-1 β koncentraci (72). Terapeuticky dosud rovněž nebyly užity.

Ukázalo se, že určit terapeutickou úroveň inhibice kaskád je složité, všechny se totiž nezbytně zúčastní na nerušeném průběhu přirozené obrany proti infekci. Terapeutický zásah proti cytokinům nad potřebnou míru paradoxně naopak výsledky výrazně zhoršuje.

Protilátky proti TNF α (anti TNF α Ab)

Testování protilátek proti cytokinům se zaměřilo na TNF α v současné době považovaný pro vznik sepse za nejdůležitější cytokin. První studie, která hodnotila efekt antiTNF α Ab v rozvoji sepse, probíhala v roce 1989. U všech 14 pacientů byla prokázána přítomnost endotoxinu v krvi, zatímco detekovatelnou hladinu TNF α měli pouze 2 pacienti. Infuze s monoklonálními protilátkami proti TNF α vedla k normalizaci krevního tlaku, snížení tachykardie a neměla výraznější účinky. Veškeré pozitivní efekty byly ale pouze přechodné, ustupující po ukončení infuze. Navíc se ukázalo, že při použití nehumánních antiTNF α Ab si většina pacientů vytvořila protilátky proti tomuto léku. Jaký mají tyto autoprottilátky vliv na účinnost léčby, tj. do jaké míry deaktivují podaný preparát, není dosud jasné.

Od roku 1991 do roku 1993 probíhala velká multicentrická studie INTERSEPT, která měla ověřit účinnost monoklonální protilátky proti TNF α RAYx1351. Výsledky však nebyly povzbudivé. Ani paralelně probíhající americká studie NORASEPT, používající stejnou monoklonální protilátku, nezjistila žádný léčebný efekt u pacientů se sepsí bez šoku (62,63).

Žádná z dosavadních studií, ať už byly antiTNF α Ab podávány v kontinuální infuzi nebo jako bolus, neprokázala snížení 28denní mortality, přestože v laboratorním nálezu došlo k významnému poklesu hladin TNF α , IL-1 β a IL-6. Pokud ale srovnáváme pouze pacienty, kteří přežili, pak podání anti TNF α Ab zřetelně zpomalilo rozvoj sepse a omezilo orgánové

selhání proti kontrolní skupině dostávající placebo. Proč se tyto pozitivní změny nepromítly do 28denního přežívání, zůstává záhadou. Studie nicméně prokázaly, že léčba je bezpečná a i když nezlepší prognózu, může přechodně zlepšit hemodynamické parametry pacienta (44).

Alternativou podání antiTNF α Ab je léčba MAK 195F, F(ab')₂-fragmentem imunoglobulinu G proti lidskému TNF α . MAK 195F je vysoce druhově specifický pro TNF α primátů a lidí. Výhodou MAK 195F proti kompletní molekule anti TNF α Ab je menší antigenicita a lepší průnik malé molekuly do tkání. Skutečně nebyla prokázána tvorba autoprotilátek proti této látce. Infuzní nebo bolusová léčba byla dobře tolerována, bez vedlejších efektů. V laboratorním spektru došlo během 1. dne léčby k signifikantnímu poklesu hladiny IL-6, opět ale bez snížení 28denní mortality.

1.3.2 CYTOKINY V ONKOCHIRURGII

Využití cytokinů v léčbě zhoubných onemocnění představuje perspektivní a nadějný směr v onkologii. To je umožněno nejen podrobnějším poznáním funkcí cytokinů, jako mediátorů v mezibuněčné komunikaci, ale i vytvoření "čistých" cytokinů cestou genetických manipulací. Cytokiny můžeme rozdělit do dvou skupin: 1. Hematopoetické růstové faktory s ochranným účinkem na kostní dřeň a 2. protinádorové cytokiny s myelosupresivním a cytotoxickým efektem. Znepokojující je skutečnost, že cytokiny jsou známy jako pleiotropní proteiny, z čehož vyplývá že cytokiny s převážně protinádorovým účinkem (IL-1, IL-3, IL-4, IL-6) podporují i hematopoézu a stejně tak hematopoetické růstové faktory (M-CSF, GM-CSF) také indukují aktivaci makrofágů s cytotoxickým účinkem na nádorové buňky.

V jedné studii byl zkoumán vliv selektivní perfuze plic s TNF α pro plicní metastázy. Krevní tlak ani srdeční výdej neměly signifikantně rozdílné hodnoty během perfuze. Během 3-6 měsíců po perfuzi bylo zjištěno zhojení metastáz u některých pacientů (melanom, karcinom ledvin) (76).

Systémové použití cytokinů bylo zkoušeno v experimentálním modelu u maligních onemocnění. IFN má perspektivu pro léčbu leukemie z vlasatých buněk a chronické myeloidní leukémie. IL-2 byl nadějný pro léčbu karcinomu ledvin, maligního melanomu a lymfomů. (firmou Chiron BV je dodáván rekombinantní IL-2 pod firemním názvem "Proleukin ®" s indkační oblastí léčby metastáz karcinomu ledvin). Cytokiny v systémovém užití jsou však problematické protože vyvolávají časté závažné toxické komplikace. Jako alternativa byla ověřena izolovaná perfuze tumoru lokalizovaného na končetinách. V této studii, v kombinaci chemoterapie s TNFalfa, IFNgama a hypertermie, bylo pozorováno 100%

zlepšení u 23 pacientů s melanomem nebo sarkomem. Jinou cestou lokoregionální terapie zhoubných nádorů je aplikace cytokinů peritumorózně nebo intratumorózně.

Experimentálně se ověřuje možný vztah růstu maligních buněk které následuje po sepsi., Bakterie a jejich toxiny, které působí v organismu při infekci a sepsi, jsou spojovány s proliferací nádorových buněk. Bylo prokázáno, že hypertermie v kombinaci s chemoterapií nebo bez ní může příznivě ovlivnit stav nemocného s přítomným sarkomem nebo tumorem gastrointestinální oblasti. Termín "zánětlivá onkotaxe" zavedl Hogopian (1) a vysvětluje agregaci nádorových buněk blízko zánětlivého ložiska

Při sledování 5-té letého přežívání dvou skupin pacientů po resekci kolorektálního karcinomu s pooperační nitrobřišní sepsí a bez ní (zhojené per primam) nebyl demonstrován signifikantní rozdíl (1). Navíc v jiné studii bylo pozorováno delší dlouhodobé přežívání pacientů s intraabdominální sepsí před nebo po kurativní resekci pro kolorektální karcinom. Leichty ukázal tyto výsledky u těch pacientů, kteří v postoperačním období měli horečky. Avšak je zřejmé, že perioperační imunosuprese dosažená různými způsoby výrazně zvyšuje mortalitu pacientů i po kurativní resekci nádoru.

Při sledování nemocných s kolorektálním karcinomem po transfuzi plné krve bylo pozorováno signifikantní zvýšení pooperačních infekčních komplikací. Aplikace plné krve výrazně snížila lymfocytární proliferaci CD+4 CD+8 a zvýšila sIL-2r, IL-6 (1). Jiná skupina pacientů obdržela krev bez leukocytů a následující změna neměla statistickou významnost.

Prokazatelným zvýšením sérových hladin IL-6, TNF a IL-2 při transtorakální „en blok“ resekci jícnu se vysvětluje extrémní redukce aktivity přirozených NK buněk. Bruns (1) ve své studii poukázal, že tato suprese imunologické nádorové rezistence ve vulnerabilní fázi po operaci jako důsledek operačního traumatu, má nepříznivý negativní efekt na zvýšení rizika hematogenních metastáz intraoperační buněčnou diseminací při manipulaci s tumorem.

Genetickou manipulací byla vytvořena hybridní molekula PIXY321 a v kombinaci s aktivní částí GM-CSF a IL-3 byla použita v terapii různých forem suprese kostní dřeně. V současné době se hledají cesty a způsoby k vytvoření hybridní molekuly TNF- α s vysokým antitumorózním efektem a nízkou systémovou toxicitou.

Velké chirurgické výkony suprimují hostitelskou imunitní reaktivitu přes alteraci monocytů a T buněk produkujících cytokiny, eikosanoidy a proteiny akutní fáze. rekombinantní IL-2 zvyšuje aktivitu T lymfocytů a monocitů in vitro (1). Rekombinantní IL-2 může mít význam pro zlepšení imunosuprese po velkých chirurgických výkonech

(43,44,107,118). signifikantní zvýšení produkce IL-6, CRP a solubilního receptoru IL-2 zvyšuje expresi aktivovaných markerů a zvyšuje aktivitu neutrofilů.

Čím dál tím častěji se začíná využívat přímý i nepřímý účinky některých cytokinů v klinické praxi. Schopnost IL-2 indukovat vznik lymfokiny aktivovaných zabíječských buněk (LAK) s cytotoxickým efektem vůči tumorózním buňkám a podporovat spuštění kaskády dalších cytokinů s imunomodulačním efektem se využívá úspěšně při léčbě karcinomů ledvin a melanomů. Bylo prokázáno že při aplikaci IL-2 až 20% karcinomů ledvin a melanomů regreduje. Avšak IL-2 má vysokou toxicitu s 4% letalitou při léčbě, což brání širšímu uplatnění. IL-4 se svou schopností přirozeného stimulatoru T lymfocytů se nadějně aplikuje při léčbě karcinomu ledvin, prsu a konečníku, ovšem byly pozorovány i významné nepříznivé efekty (arteritida, lienální kongesce, konzumpční koagulopatie...). IFN α je potenciálním lékem u solidních maligních tumorů a má příznivé efekty u pokročilých maligních melanomů (remise ve 24% případů), tumorů ledvin (remise u 16-25% pacientů) a u Kaposiho sarkomu.

IFN γ prokazuje účinné antitumorózní schopnosti při léčbě pokročilých malignit (melanom, karcinom ledvin, lymfomy). Intraperitoneální podání IFN γ po operacích pro karcinom ovária příznivě ovlivnilo léčbu. Úspěšně se využívá v kombinaci s IL-2 nebo IFN α . Hill ve své studii podával GM-CSF a již za 4 dny po zahájení léčby pozoroval snížení objemu tumorosních buněk. Hill prokázal že, GM-CSF se svým nepřímým antitumorózním účinkem indukuje tumoricidní aktivitu makrofágů, zvyšuje produkci TNF α makrofágů a aktivitu superoxidových aniontů.

TNF α působí na nádorové buňky jak stimulací protinádorové imunitní odpovědi, tak přímým protinádorovým účinkem. Avšak preklinické studie prokázaly řadu toxických systémových projevů (mohou dosáhnout až obrazy navozené septické reakce), které převažovaly nad protinádorovou aktivitou a navíc úspěšnost léčby byla nízká. IL-6 se používá v léčbě zhoubných tumorů jako aktivátor T lymfocytů. V kombinaci s TNF α a IL-2 je zkoumán jako imunoadjuvans u karcinomu plic, jater. K nepříznivým efektům IL-6 patří podpora disociace nádorových buněk s následným zvýšením rizika metastazování. Kombinace některých cytokinů je rovněž v pozornosti vědců. Ukázalo se, že tato kombinace zvyšuje efektivnost léčby a souběžně snižuje nepříznivé, toxické efekty.

1.4 Kaskáda obranné reakce organismu a cytokiny

Zánět je možno definovat jako komplexní systém obranných reakcí tkání organismu na inzult různého charakteru (fyzikální, chemický, infekční). Cílem zánětu je eliminace

vyvolávající noxy, odstranění ireverzibilně poškozené tkáně a následná reparace nebo regenerace tkáně ve snaze dosáhnout obnovení funkce postiženého orgánu do stavu dynamické rovnováhy.

Klíčovou úlohu v systémové zánětlivé reakci sehrává kooperace pěti základních systémů: endotel, trombocyty, leukocyty, komplement, plazmatický koagulační systém. Tyto systémy disponují širokým spektrem mediátorů různé povahy. Protože řada mediátorů zánětu má schopnost nespecifického poškození buněk (reaktivní formy kyslíku, hydrolytické enzymy, cytokiny), základní podmínkou zánětu jako obranného fenoménu je lokalizace a regulace procesu zánětu. Znamená to, že dysregulace a delokalizace je základem autoagresivního průběhu této primárně obranné odpovědi. Hranice kde začíná autoagrese, je těžko definovatelná. Intenzitu zánětlivé odpovědi určuje kvalita a kvantita vyvolávajícího podnětu, ale také individuální reaktivita každého jedince.

Systémová zánětlivá odpověď (Systemic Inflammatory Response Syndrome - SIRS) představuje akutní ohrožení organismu, obrannou odpověď organismu se snahou lokalizovat a eliminovat exogenní nebo endogenní patogen infekčního (seps) nebo neinfekčního původu. Je komplexním narušením homeostázy a destruktivním poškozením organismu vlastní obrannou odpovědí. K monitorování SIRS, resp. seps se využívá skóre integrující vitálně významné klinické a laboratorní parametry (APACHE II, III, TISS apod.) ve snaze anticipovat přechod do stadia multiorgánového selhání (MODS, multiorgan distress syndrome). SIRS, jako odezva na různé klinické inzulty se projevuje dvěma nebo více z následujících příznaků: 1. – teplota více než 38 st. C., nebo méně než 36 st.C., 2. tepová frekvence více než 90 tepů/min, 3. dechová frekvence více než 20 dechů/min, nebo PaCO₂ méně než 32 mmHg, 4. počet leukocytů více než 12000/mm³ nebo méně než 4000/mm³.

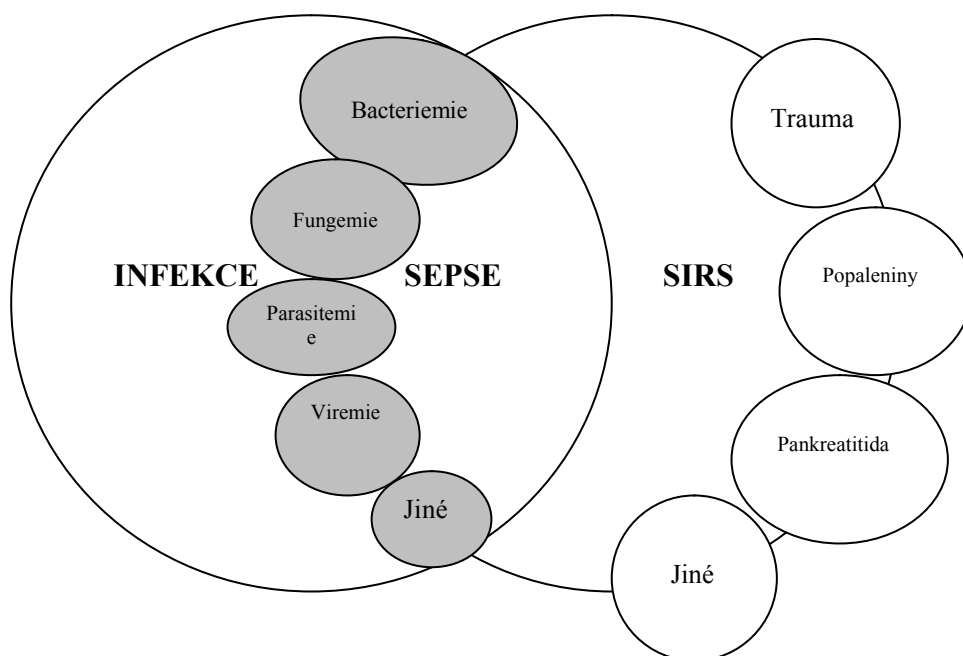
Jako seps je označován SIRS s dokumentovanou infekcí (obr. 2). Pojem těžká seps je vyhrazen SIRS infekční etiologie s alterací kardiovaskulárního systému.

SIRS může vyústit ve stav multiorgánové dysfunkce – situaci, kdy orgánové funkce nejsou dostatečující pro udržení homeostázy. Syndrom multiorgánového selhání (MODS) je systémovou hemodynamickou poruchou vedoucí k hypoperfuzi orgánů, tkáňové hypoxii event. ke smrti organismu. Porucha hemodynamiky při MODS v důsledku těžké seps má charakter kapacitní nerovnováhy (vazodilatace, hypovolemie), na tkáňové úrovni vzniká nerovnováha bilance dodávky a spotřeby kyslíku. Změny původně kompenzačního charakteru přecházejí v reverzibilní, posléze ireverzibilní dekompenzaci s letálním vyústěním. V rozvinutých fázích se jedná o uniformní sled změn mikro- a makrocirkulace, metabolismu,

neuroendokrinního systému atd. MODS je příčinou vysoké, prakticky neklesající mortality pacientů se syndromem systémové zánětlivé odpovědi (kolem 25% hospitalizovaných se SIRS na jednotkách intenzivní péče).

K definici SIRS je nutné poznamenat, že v podmínkách intenzivní péče o pacienty po velkých nitrobršních chirurgických výkonech, kdy tachykardie, tachypnoe, tělesná teplota i počet leukocytů souvisí s operačním výkonem, nemáme dostatečná kritéria pro časnou diagnostiku vzniku nitrobršní sepse, proto diagnostika této pooperační komplikace může být stanovena až ve fázi rozvinutého autoagresivního zánětu a rozvoje MODS.

Obr. 2: Vztah infekce, sepse a SIRS



Přehled hlavních systémů účastnících se zánětlivé reakce a nejdůležitější mediátory, viz (23,25,26,49,68)

a/endotel

míra systémového poškození endotelu je při systémovém zánětu limitujícím faktorem pro prognózu pacienta.

Základem je pak mechanismus konstriktce a relaxace. Mediátory působící vazokonstrikčně většinou zvyšují permeabilitu mikrovaskulární stěny, poškozují endotel a působí agresivně na destičky. Mediátory působící vazodilatačně jsou většinou endotel –

protektivní, snižují permeabilitu mikrovaskulární stěny a působí antiagregačně na krevní destičky. Hlavní vazokonstriční mediátory endotelu: endotelin 1, tromboxan A₂, vysoké koncentrace faktoru aktivujícího destičky platelet aktivating faktor (PAF) a enzymu konvertujícího angiotenzin 1(ACE). Hlavní vazodilatační mediátory endotelu: oxid dusnatý, prostacyklin (prostaglandin I₂, PGI₂).

b/ komplement

K aktivaci komplementu dochází nejméně třemi způsoby-cestami. Cesty se liší svými počátečními fázemi, tj. mechanismem spuštění aktivace komplementu, postupně se však sbíhají a výsledek aktivace je v podstatě jednotný, probíhá jednak cestou v závislosti na humorální imunitě, při níž je komponenta C1 aktivována komplexem antigenu protilátky třídy IgG a IgM, jehož výsledkem je C3 konvertáza. Lektinová cesta aktivace komplementu nevyžaduje pro start komplex Ab-Ag, protože bílkoviny podobné C1q, např. MBP (protein vážící manozu), mají povahu lektinu a vážou se na cukerné složky buněčných stěn bakterií přímo. Tím aktivují složky C1r a C1s. Potom následuje děj podobný klasické cestě. Alternativní cesta aktivace začínající aktivací komponenty C3 není závislá na imunoglobulinech. Hlavními aktivátory alternativní cesty jsou polysacharidy a lipopolysacharidy buněčné stěny bakterií. K významným aktivátorům alternativní cesty patří rovněž trombin a plazmin

c/ plazmatický koagulační systém

Hlavním mediátorem aktivace plazmatického koagulačního systému (PKS) je tkáňový faktor (TF). TF je protein exprimovaný na řadě somatických buněk, za fyziologického stavu se však nevyskytuje intravaskulárně. V komplexu s negativně nabitými fosfolipidy buněčné membrány, „zevní“ cestou aktivuje plazmatický faktor VII, a tak zahajuje aktivaci PKS. Při zánětu exprimují TF aktivované monocyty a rovněž endoteliální buňky po aktivaci IL-1 a TNF-α.

Druhou cestou aktivace PKS je kontaktní aktivace F XII, prekalkreinu a F XI na aktivním povrchu (poškozený endotel, kolagen, buněčné stěny bakterií), za účasti vysokomolekulárního kininogenu. Závěrečným enzymovým mediátorem PKS je trombin. Působením i v jiných základních liniích tkáňové odpovědi řadí TF k nejvýznamnějším primárním mediátorům zánětu.

d/ krevní destičky

Jsou velmi reaktivní elementy, jejichž hlavním úkolem v organismu je vytvořit primární hemostatickou zátku v místě porušení cévní integrity a působit při reakcích plazmatického koagulačního systému. Tím zasahují nejen do procesu krevní koagulace, ale i do zánětlivého procesu. Destičky po aktivaci mění svůj tvar na kulovitý, vytvářejí pseudopodia, adherují a agregují navzájem. Současně uvolňují řadu mediátorů (tromboxan A₂, faktor aktivující destičky – PAF, inhibitor aktivátoru plazminogenu –PAI, serotonin, β-tromboglobulin...)

e/ neutrofilní leukocyty

Vlivem chemotaktických signálů a specifických receptorových interakcí se neutrofilní leukocyty koncentrují v místě poškození, adherují na stimulovaný endotel a pronikají do intersticia (3,62,98). Neutrofilní leukocyty jsou schopny fagocytózy. Hlavní mechanismy, které se uplatňují při autoagresi:

- Membránově vázaný NADPH-oxidázový systém produkuje po aktivaci reaktivní formy kyslíku, především superoxidový anion (O₂⁻). Nejvýznamnější důsledek je poškození endotelových buněk.
- Myeloperoxidázový systém produkuje HOCl (velmi silný oxidant, patří k nejúčinnějším cytotoxickým látkám produkovaným neutrofilními leukocyty).
- Proteolytické enzymy (více než 20 enzymů v granulech neutrofilů elastáza, metaloproteázy, kolagenáza, gelatinázy a kathepsiny D a E).
- Produkty lipidového metabolismu prostaglandiny, leukotrieny a PAF.

f/ monocyto-makrofágový systém

Zahrnuje monocyty a promonocyty kostní dřeně, monocyty periferní krve a tkáňové makrofágy. Přiřazením makrofágů do retikuloendoteliálního systému (RES) k retikulárním buňkám, endotelu, fibroblastům, histiocytům a monocytům vzniká systém různého původu. Proto v současné době jsou makrofágy a monocyty řazeny odděleně od fibroblastů a endotelových buněk do systému mononukleárních fagocytů (1,40,44,66,76). Mononukleární fagocyty jsou efektivnější než neutrofilní leukocyty v případě, že fagocytovaná částice je větší v poměru k velikosti fagocytující buňky. Makrofágy tak představují hlavní obranu proti různým

mikroorganismům včetně bakterií a virů. Přesto, že neexistuje ústřední mechanismus odpovědný za patofyziologii systémové zánětlivé odpovědi a vždy se jedná o výsledek souhry aktivace několika kaskád reakcí (viz tab.4), patří podíl aktivace makrofágů k nejvýznamnějším a právě jejich aktivace zásadně odlišuje systémovou odpověď na infekci od odpovědi lokalizované. Na rozdíl od PMN makrofágy produkují TNF α a IL-1 β . Právě dlouhodobá (desítky hodin) nadprodukce těchto cytokínů vede k nevratnému poškození orgánových buněk. Mimo tyto cytokiny makrofágy produkují IL-6, IL-8, PAF, PG, CSF. Současně však makrofág produkuje i přirozeného antagonistu tohoto komplexu IL-1ra, který se podílí na určité autoregulaci uvedeného systému. U zánětlivých procesů v dutině břišní sehrávají důležitou roli mezotelové buňky peritonea, které se svým spektrem produkce působků do značné míry podobají makrofágům. Cesta od mikroorganismu k cílové buňce obvykle není přímá. Z větší části probíhají tyto reakce v určitém hierarchickém uspořádání. Přitom platí, že děj zde není zajišťován jen po jedné linii, od každé úrovně posloupnosti existuje k cíli cesta přímá, i více cest nepřímých a všechny etáže jsou navzájem provázány, což celou situaci ještě komplikuje.

Tab. 4: Úloha cytokinů v systémové odpovědi organismu.

Imun.Odpověď	TNF	IL-1	IL-2	IL-6	Interferon- γ
Neutrofilly	Produkce \uparrow Marginace \uparrow Aktivace \uparrow	Produkce \uparrow Marginace \uparrow	Produkce \uparrow		Aktivace \uparrow
Lymfocyty	Produkce lymfokinů \uparrow	Aktivace T-buněk \uparrow Prod. lymfokina z \uparrow	Prolifer. T-buněk \uparrow Cytotoxicita \uparrow Prod. lymfokinaz \uparrow	Diferenc. \uparrow Prod. B-buněk \uparrow Cytotoxicita \uparrow	Prolifer. T-buněk \uparrow Produkce Protlát. \uparrow
Monocyty	Aktivace \uparrow Cytotoxic. \uparrow	Aktivace \uparrow			Cytotoxic. \uparrow
Metabolická odpověď	Anorexie Ztráta těl.hmotn. Hořečka	Anorexie Ztráta těl.hmotn. Hořečka		Hořečka	
Játra	Lipogeneze \uparrow Synteza APP \uparrow Syntéza albuminu \downarrow	Synteza APP \uparrow Synteza albuminu \uparrow		Synteza APP \uparrow	
Kosterní sval	Klid.membr. potencial \downarrow Ztráta nitrogeneru \uparrow Produkce laktatu \uparrow	Ztráta nitrogeneru \uparrow			
Kardiovask. odpověď	Hypotenze Šok Vaskulární Permeabil. \uparrow		Vaskulární permeabilita \uparrow		
Další tkáň-Endothelium	Adherence \uparrow Aktivace prokoagulantů \uparrow Vaskulární permeabilita \uparrow	Adherence \uparrow Aktivace prokoagulantů \uparrow			

2. CÍLE PRÁCE

Syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) a doprovodné komplikace trvale zůstávají signifikantní příčinou morbidit a mortality pacientů na chirurgických jednotkách intenzivní péče. Příznivá prognóza pacientů s pooperační, zánětlivou, nitrobřišní komplikací je limitována časností diagnózy této závažné komplikace.

V současné době se chirurg nemůže opřít o dostatečně senzitivní a včasné markery, které by odlišily počátek rozvíjející se zánětlivé pooperační komplikace od ještě nekomplikovaného časného pooperačního průběhu. Proteiny akutní fáze v této diagnostice jsou limitovány nastartováním jejich syntézy v hepatocytech po stimulaci cytokiny. Proto z řady různých parametrů systémové zánětlivé odpovědi se v současné době upřela pozornost na první mediátory zánětu - cytokiny, u kterých se předpokládá dostatečná specifita a včasnost diagnostiky pooperační sepse.

Cytokiny jsou mediátory s převážně auto a parakrinním působením. V několika případech se uplatňují i endokrinní cestou. Plazmatické hladiny převážné většiny cytokinů jsou neměřitelné dokonce i v rozvinutých zánětlivých situacích. V naší práci jsme vybrali ty parametry ze skupiny cytokinů, kde je možné z dostatečnou přesností stanovit plazmatické hladiny v klidových i zánětlivých stavech.

Předložená práce, vycházející z dosavadních poznatků o cytokinech si proto kladla následující cíle:

- **Zjistit standardní dynamiku cytokinů a vybraných cytokinových receptorů v nekomplikovaném pooperačním období u modelových typů operací a stanovit dosažené hladiny sledovaných cytokinů a cytokinových receptorů u pacientů s rozvojem nitrobřišní sepse**
- **Porovnat vztah sledovaných markerů k jiným laboratorním mediátorům systémové odpovědi organismu.**
- **Zhodnotit výtěžnost stanovení sledovaných parametrů v diferenciální diagnostice rozvoje pooperační komplikací.**

Klinická práce byla realizována v letech 1999-2003 na I chirurgické klinice VFN a 1.LF UK. Zpracování vzorků a měření sledovaných parametrů proběhlo ve spolupráci s Oddělením klinické imunologie VFN 1.LF UK Praha.

3. Metodika stanovení sledovaných parametrů

3.1 Výběr pacientů

V naší práci pro sledování dynamiky cytokinů před operací a po operačním výkonu jsme vybrali následující skupiny pacientů:

1. Pacienti po radikálním Resekčním výkonu tlustého střeva, pro karcinom ve stadiu Dukes Ib-IV s následním nekomplikovaným hojením.
2. Pacienti po radikální hemipankeatoduodenektomii pro karcinom hlavy pankreatu.
3. Pacienti po laparoskopické operaci bandáže žaludku.
4. Pacienti s prokázanou pooperační nitrobřišní sepsí a
5. Kontrolní soubor zdravých osob.

Zvolené skupiny pacientů byli vybráni z důvodů zaměření kliniky na operativu zhoubných nádorů pankreatu, nádorů kolorektální oblasti a na chirurgické řešení problematiky obezity laparoskopickou operací bandáže žaludku, a proto bylo možné vytvořit dostatečně veliký soubor pacientů. Navíc, 1. a 2. skupiny jsou náročné operační výkony se značnou tkáňovou traumatizací na orgánech vysoce imunitně aktivních (střevo a peritoneum jsou ústředním producentem cytokinů v pooperační fázi). Při operačních výkonech byla použita standardní srovnatelná technika operace, což přispívalo k přesnější vědecké práci. Pacienti v rozvinutém septickém stavu tvořili model maximální stimulace zánětové obranné reakce organismu.

Hodnoty cytokinů zdravých pacientů tvořily nejprve soubor k ověření jednotlivých metodik laboratorního měření a následně jsme je použili k vytvoření bazální hladiny dosahovaných sérových hodnot u první a druhé skupiny pacientů.

Všechna vyšetření získaných vzorku krve uvedená v této práci byla provedena ve spolupráci s oddělením klinické imunologie VFN a 1.LF UK Praha.

3.2 ELISA metoda stanovení cytokinů

Imunochemické metody umožňují s velkou rozlišovací schopností vysoce citlivé stanovení proteinů. Proto jsme k měření cytokinů, jejich solubilních receptorů a receptorových antagonistů použili metodiku ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) za použití originálních kitů firem Immunotech a R&D Systéme, Quantikine TM. Vybrali jsme standardní postup v duplikátech vzorků dle firemní literatury.

Obecný princip u ELISA metodiky je následující:

Monoklonální protilátka specifická pro určitý cytokin je navázána v mikrojamce na jejím interním povrchu. Po přidání roztoku vzorku nebo standardu do mikrojamek se specifický antigen přítomný ve vzorku nebo standardu váže na protilátky absorbované na povrch mikrojamky. Tím dochází k vytvoření komplexu protein-protilátka. Výsledný komplex protein-protilátka se inkubuje s enzymově označenou specifickou protilátkou (peroxydáza) za vzniku barevné reakce. Po inkubaci se promytím odstraní nenasazené protilátky s enzymem. Následně jsme stanovili aktivitu navázaného enzymu v komplexu protilátka- protein-protilátka-enzym. Absorbance roztoku v mikrotitrační desce byla měřena při vlnové délce 450nm a byla korelována při 540nm. Zjištěná aktivita je přímo úměrná množství přítomného stanovovaného proteinu. Následně byl vypočítán průměr duplikátů pro každý standard, kontrolní skupinu i vzorek. Pro zhotovení kalibrační křivky byl využit originální, firemní počítačový program. Získaná data byla pak linearizována porovnáním hodnoty koncentrace a směrodatné odchylky.

3.3 Imunonefelometrické stanovení APP

Imunonefelometrická a imunoturbidimetrická analýza, využívající antigenní specifiky sérových bílkovin, byla základní metodou ke stanovení sérových a plazmatických koncentrací APP. Princip metody spočívá v reakci proteinu s monospecifickým antisérem za vzniku základu-nerozpustného komplexu antigen-protilátka. Nefelometrickou metodou se stanovuje rozptyl při průchodu opticky nehomogenním prostředím, zatímco obdoba této metody, turbidimetrie, měří snížení intenzity procházejícího záření.

Nefelometrie.

Stanovení jsme prováděli v kulatých umělohmotných kyvetách s obsahem měřeného vzorku 1ml. Všechna vyšetření probíhala v duplikátech a s pootáčením kyvety k vyloučení náhodné chyby v transparentní stěně kyvety. K měření byl použit nefelometr TURBOX® Orion, Finsko, využívající boční monometrické červené světlo o vlnové délce $\lambda=635$ nm. Nefelometr má zabudovaný mikroprocesor ovládající display a tiskárnu a v případě použití originálních kitů využívá i kalibrační křivky zakódovanou v magnetickém štítku. Měření je prováděno v nefelometrických jednotkách LSU (Light Scattering Units). K zavedení metodiky byly použity originální kity firmy Orion, Finsko, a to pro Alb, Trf, PA, α -1AGP a CRP.

Stejným způsobem jsme testovali použití domácích Q-antisér SEVAC, kde základní nabídka obsahovala kromě námi vyšetřovaných proteinů dále C3, C5 a imunoglobuliny. Jako standart byly použity lyofilizované přípravky SLR a ke kontrole správnosti i referenční séra Boehringer. Pro každý protein jsme našli optimální ředění zkoumaného vzorku sestavením řady kalibračních křivek. Sérové koncentrace jednotlivých proteinů jsme odečítali s využitím základního počítačového programu KIM ÚSOL. Při větší frekvenci vzorku jsme začali alternativně uskutečňovat vyšetření imunoturbidimetricky a pozdější vyšetření jsou prováděna jen touto metodou. Princip vyšetření je zcela shodný, pouze bylo nutné změnit ředění Q-antisér.

Statistické zpracování bylo provedeno počítačovými programy (Stati, Statigraf) s použitím nepárového a párového T testu (případně v neparametrické verzi Wilcoxon) a analýzou rozptylu ANOVA (23).

4.4 Imunoluminometrické stanovení prokalcitoninu

Hladiny prokalcitoninu byly stanoveny v duplikátech vzorku imunoluminometrickou analýzou v imunologické laboratoři VFN. Použili jsme kity LUMItest®PCT Kit Brahms.

LUMItest®PCT využívá principu imunoluminometrické analýzy (ILMA) ke stanovení koncentrace PCT v lidském séru a plazmě. Dvě antigen-specifické monoklonální protilátky které váží PCT a dvě vazebná místa (kalcitonin a katakalcitoninového segmentu), jsou přidána v nadbytku (viz obr. 6). Jedna z těchto protilátek je luminiscenčně označena a druhá je fixována na inertním povrchu zkumavky. Během inkubace obě protilátky reagují s PCT molekulami a ve vzorku tvoří "sendvičové komplexy". Výsledkem je navázání luminiscenčně označené protilátky na interní povrch zkumavky. Když je reakce ukončena, přebytek značené protilátky je odstraněn ze zkumavky. Potom je zbylá značená protilátka ve zkumavce změřena využitím luminometru a základního kitu LUMItest®. Intenzita luminiscenčního signálu (RLU) je přímo úměrná koncentraci PCT ve vzorku. Je vypočtena standardní křivka s využitím standardu se známou koncentrací antigenu. Neznámá koncentrace PCT ve vzorku séra nebo plazmy je pak odečtena při srovnání výsledku a standardní křivky.

4. PROTEINY AKUTNÍ FÁZE PO OPERACI

Chirurgický výkon stejně jako každé jiné integrity makroorganismu je podnětem, který spouští lokálních systémových reakcí, nutných k obranným, adaptačním a reparačním procesům. Tyto děje jsou spouštěny lokální aktivací volných či fixních buněk monocytomakrofágové řady a endotelií a vedou k uvolnění regulačních peptidů-cytokinů, aktivaci komplementu a hemokoagulační kaskády. Systémovým odrazem je horečka, anorexie, změny cirkulace a přesuny v energetickém metabolismu a vnitřním prostředí.

Aktivace cytokinové kaskády a jím vyvolané systémové přeladění organismu na úrovni imunologické, hematologické, metabolické, endokrinní či kardiovaskulární se odráží i ve změnách jaterní proteosyntézy. Hepatální odpověď je charakterizována kvantitativními a kvalitativními změnami v proteosyntéze. Dochází ke zvýšení celkové syntézy proteinů, která však nestačí k vyrovnání negativní dusíkové bilance. Z pohledu kvalitativního nastává koordinovaný vzestup exprese několika pro obranu makroorganismu nezbytných plasmatických proteinů při současném poklesu syntézy proteinů strukturálních a transportních. K těmto změnám, které tvoří integrální součást dalších procesů reakce akutní fáze, dochází pod přímým stimulačním nebo inhibičním vlivem prozánětlivých cytokinů za spoluúčasti dalších humorálních faktorů.

I když dynamika uvolňovaných cytokinů předchází pomalejším přesunům v proteosyntéze, význam jejich stanovení hlavně z hlediska dostupnosti pro akutní diagnostiku v praxi není v současné době srovnatelný, kdy APP máme již možnost vyšetřovat statimovým vyšetřením, ale cytokiny jsou stále ještě v poli výzkumu a hledání optimálního klinického využití(12,13,55,124).

Jako proteiny akutní fáze (APP) byly původně označovány ty plasmatické bílkoviny tvořené v játrech, jejichž koncentrace během prvních 7 dnů po zánětlivém stimulu stoupá o 25 % a více. Spolu s odhalováním regulačních mechanismů kontrolujících syntézu těchto proteinů a s rozšiřováním znalostí o jejich působení v místě zánětu nastala potřeba tuto definici modifikovat. Jako APP nyní označujeme ty bílkoviny, jejichž tvorba v hepatocytech a uvolnění do cirkulace jsou regulovány (stimulovány nebo inhibovány) proinflamatorními cytokiny.

Cytokiny jsou v průběhu SIRS hlavním regulátorem syntézy APP. Vzájemná provázanost systémem zpětných vazeb ale současně tyto proteiny přímo zahrnuje do sítě zánětlivých cytokinů. C reaktivní protein (CRP), ceruloplasmin, alfa₂-makroglobulin a další APP s řadou funkcí klasických cytokinů tak překračují hranici mezi těmito systémy. Evoluční

zakonzervovanost obou skupin proteinů ve fylogenezi pak zdůrazňuje jejich vzájemnou provázanost a esenciální závislost pro přežití organismu.

2. Fyziologie APP

V souhrnu jsou APP součástí nescifického obranného mechanismu první linie proti systémovému poškození. Reakce APP představuje fyziologickou odpověď, poskytující zvýšenou koncentraci proteinů v místě zánětu, kde je většina těchto proteinů v průběhu svého působení likvidována (tab. 5).

Podle známých funkcí v organismu můžeme skupinu APP rozdělit do následujících podskupin (6):

a) mediátory. CRP, složky komplementového systému, plasminogen, kalikrein a některé koagulační faktory, které můžeme řadit mezi APP, jsou součástí sítě humorálních zánětlivých mediátorů.

b) zánětlivé modulátory. Inhibiční faktory komplementové a koagulační kaskády, jako je inhibitor C1-esterázy, faktor I, faktor H, antitrombin III a α_2 -antiplasmin, modulují aktivitu zánětlivých mediátorů.

c) zametače (scavengery). Některé APP váží v cirkulaci nebo v tkáni fragmenty poškozených buněk, uvolněné z krevních elementů (fagocyty, hemolyzované erytrocyty) nebo tkání. Řadíme sem haptoglobin a hemopexin (vážící degradační fragmenty hemoglobinu), CRP (opsonizující buněčné membrány a DNA), sérový amyloid A (zvyšující clearance cholesterolu buněčných membrán z makrofágů). Jako scavenger volných radikálů se uplatňuje pluripotentní protein ceruloplasmin.

d) imunomodulátory. Existují důkazy, že některé z APP modulují imunitní odpověď. α_1 -kyselý glykoprotein například vykazuje sekvenční homologii s imunoglobuliny a je exprimován na buněčné membráně. α_2 -makroglobulin vedle dalších funkcí váže některé cytokiny a dopravuje je na místo jejich působení.

e) inhibitory serinových proteáz (tzv. SERPIN). α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin, α_1 -kyselý glykoprotein, α_2 -makroglobulin aj. inhibují uvolnění a proteolytický efekt leukocytárních enzymů během fagocytózy a limitují tak rozsah zánětlivé odpovědi a dalšího tkáňového poškození.

f) koagulační faktory. (fibrinogen)

g) proteiny reparačních dějů. Některé APP kontrolují novotvorbu pojivové tkáně. alfa₁-antitrypsin a alfa₁-antichymotrypsin jsou ukládány na příslušná místa nově formovaných elastických vláken. a₁-kyselý glykoprotein stimuluje proliferaci fibroblastů. Uvažuje se o úloze ceruloplasminu v angiogenezi.

h) transportní proteiny. Většina transportních proteinů se chová jako negativní reaktanty a jejich plasmatická koncentrace v reakci akutní fázi klesá (albumin, prealbumin, transferin, retinol vážící protein). Vzestup hladiny ceruloplasminu, hlavního transportního proteinu mědi, v akutní fázi koreluje se zvýšenou sérovou koncentrací mědi v tomto období.

Tab. 5 Charakteristiky vybraných APP (127)

Protein	elektrofor. pohyblivost	chem. charakt.	M _r (kD)	norm. hladina (g/l)	poločas eliminace (dny)	význam
alfa ₁ -antitrypsin	alfa ₁ -globulin	glykoprotein	52	1,2 - 2,4	3,9	inhibitor serinových proteáz
alfa ₁ -kys.glykoprotein	alfa ₁ -globulin	glykoprotein	44	0,33 - 1,09	5,2	inhibice T-lymfocytů, stimulace fibrocytů, vazba APP a hormonů
alfa ₂ -makroglobulin	alfa ₂ -globulin	glykoprotein	725	1,2 - 2,4	7 - 8	vazbou řady cirkulujících cytokinů zasahuje do buněčné proliferace, inhibice NK buněk, fibrinolýzy, tvorby volných radikálů apod.
haptoglobin	alfa ₂ -globulin	glykoprotein	100	0,3 - 3,0	2 - 4	vazba volného hemoglobinu při hemolýze zabraňuje ztrátám železa, inhibice lysosomálních enzymů resorpce kosti
ceruloplasmin	alfa ₂ -globulin	glykoprotein	135	0,12 - 0,28	4 - 10	transportní protein mědi, přímá antioxidační aktivita, stimulace angiogeneze
hemopexin	beta ₁ -globulin	glykoprotein	57	1,0 - 1,9	1,8 - 2,5	vazba volného hemoglobinu při hemolýze
C reaktivní protein	gama-globulin	glykoprotein	110	< 0,01	<0,05	opsonizace bakteriálních membrán, aktivace komplementové kaskády, modulace fagocytózy a chemotaxe, inhibice růstu a metastazování nádorů (?), receptor galaktózy u makrofágů, indukce apoptózy NK buňkami, přímá antioxidační aktivita
albumin	albumin	protein	67	35 - 50	19 - 20	multifunkční transportní protein, udržování onkotického tlaku
prealbumin	prealbumin	glykoprotein	61	0,19 - 0,39	1,9 - 2,7	transportní protein tyroidálních hormonů
transferin	beta ₁ -globulin	glykoprotein	80	2,2 - 3,6	7 - 9	transportní protein železa baktericidní účinky stimulace buněčné proliferace

3. Regulace APP

Poznání regulace tvorby proteinů akutní fáze je nezbytné pro posouzení jejich diagnostického významu v průběhu zánětlivé odpovědi. Řada z těchto proteinů plní úlohy (transportní či jiné) i v klidovém období, kdy ale jejich hladina podléhá jiné regulaci než během zánětu.

Hlavními regulátory syntézy APP je skupina prozánětlivých cytokinů. Humorální mikroprostředí pak dotváří řada dalších humorálních faktorů včetně hormonů a odpovídající nutriční stav. U jednotlivých proteinů se s ohledem na jejich funkce uplatňují i další regulační vazby doplňující uvedené faktory, ať už v akutním období nebo s převažujícím významem v klidovém období (3).

V současné době je známo 8 cytokinů, uplatňujících se v regulaci syntézy APP. Podle intenzity stimulace v tomto pořadí: interkeukin (IL)-6 a příbuzné cytokiny (leukémii inhibující faktor a onkostatin M), tumory nekrotizující faktor-alfa, IL-1, v menší míře pak IL-11, interferon-gama a transformující růstový faktor-beta. Hepatocyty jsou obvykle vystaveny kombinovanému působení řady cytokinů, cytokinových inhibitorů, hormonů, histaminu a dalších extracelulárních mediátorů. Odpověď APP je pak dána integrovaným součtem těchto interakcí, aditivních, synergických, inhibičních a kooperativních efektů (10).

Ústřední úlohu v regulaci APP zastává IL-6, označovaný také jako hepatocyty stimulující faktor-1. Bylo prokázáno, že pouze IL-6 je schopen rozvinout plný obraz reakce akutní fáze s charakteristickými změnami jaterních proteinů. IL-6 reguluje všechny hlavní pozitivní a negativní APP, a z dosavadních zjištění vyplývá, že další cytokiny hrají jen pomocnou modulační úlohu. IL-6 sám stimuluje tvorbu některých proteinů (alfa₁-antitrypsin, alfa₂-makroglobulin, fibrinogen, hemopexin, ceruloplasmin a další). U jiných proteinů se uplatňuje synergický stimulační efekt s dalšími cytokiny (8).

Vedle cytokinů představují druhý pilíř stimulace tvorby APP glukokortikoidy. Jejich efekt na syntézu těchto proteinů je především permisivní - umožňují plné vyjádření stimulačního efektu cytokinů, ale bez jejich účasti je efekt kortikoidů omezen na pokles negativních reaktantů (albumin, prealbumin, transferin).

Charakteristika sledovaného souboru

Pro studium dynamiky APP v pooperačním období jsme v letech 1999-2003 vyšetřili 32 nemocných, operovaných na 1. chirurgické oddělení 1. lékařské fakulty: Pacienti jsme rozdělili do následujících skupin (Tab. 6)

1. První skupinu tvořilo 20 pacientů po plánované resekci kolorektálního karcinomu ve stadiu Dukes Ib-IV laparotomickým přístupem s následným nekomplikovaným hojením (muž/žena 11/9, věk 58 ± 8.9 r.)

2. Druhou skupinu tvořilo 12 pacientů s prokázanou pooperační nitrobřišní sepsí. Všichni splňovali kritéria sepse dle R.C.Boneho (muž/žena 7/5, věk 59 ± 9.2 r.)

Byly vyšetřeny pooperační sérové koncentrace APP – CRP, α_1 –antitrypsin (α_1 -AT), α_2 -macroglobulin, haptoglobin, transferin, prealbumin, α_1 -acid glycoprotein, hemopexin a ceruloplazmin, byly stanoveny nefelometricky (Boehringer).

Sérové hodnoty APP byly změřeny před operací a 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 72, a 96 hodin po operaci (první skupina), a byly srovnány s hodnotami při sepsi (druhá skupina, odebírané ve 24 hod. intervalech). Výsledky byly uváděny jako průměr \pm SD, statisticky zpracovány Studentovým testem, hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní.

Výsledky sledování APP v pooperačním období

Při studiu sérových hladin APP nejmarkantnější změny hodnot v 1. a 2. sledované skupině nastaly u CRP, kde dosahovaly 110 ± 59 mg/l a 268 ± 118 mg/l ($p < 0.01$) a u α_1 -AT) (2.79 ± 0.6 mg/l a 5.28 ± 1.8 mg/l $p < 0.01$). Oba markery dosahovaly nejvyšší koncentrace 72hod. po operaci. Kinetika CRP a α_1 AT byla prodloužena s kontinuální elevací v 72 hod. období. U obou proteinů se maximální pooperační hodnoty statisticky významně liší od hodnot předoperačních ($p < 0.05$) (126) (Tab.6).

Mezi 3. až 5. dnem po jednorázovém nociceptivním stimulu (operační trauma) již reakce akutní fáze regreduje. Pokud přetrvávají nebo dále stoupají hladiny časných reaktantů (nejčastěji používán CRP a α_1 -antitrypsin) svědčí to, i při nepřítomnosti dalších klinických projevů pro trvající infekční stimulaci (2). Mezi časné reaktanty, jejichž vzestup lze očekávat již 1.-3. den po operaci, patří CRP, α_1 -antitrypsin, α_1 -kyselý glykoprotein (synonymum: orosomukoid) a fibrinogen. Protrahovanější je vzestup (3.-5. den), následující plateau a pokles dalších reaktantů - ceruloplasminu a α_2 -makroglobulinu.

Časné reaktanty klesají (ale nenormalizují se) i při trvání aktivní bakteriální infekce. Proto je jejich vypovídací schopnost pro monitorování akutního zánětu omezená (7).

Tab. 6: Dynamika sérových proteinů u chirurgických pacientů

PROTEINY	RESEKCE STŘEVA				POOPER. SEPSE
	-1 DEN	+1 DEN	+3 DEN	+5 DEN	
ALBUMIN	29.4±6.7	25.6±4.3	24.5±5.5	23.4±3.1	24.4±7.8
TRANSFERIN	2.33±0.63	2.03±0.39	1.46±0.32	1.51±0.34	1.87±0.65
PREALBUMIN	0.18±0.06	0.13±0.05	0.08±0.04	0.10±0.05	0.10±0.08
α1KYS.GLYKOPROTEIN	1.12±0.41	1.30±0.47	1.68±0.71	1.34±0.33	1.96±0.64
α1-ANTITRYPSIN	1.64±0.23	2.12±0.47	2.79±0.60	2.79±0.66	5.28±1.8
α2-MAKROGLOBULIN	1.55±0.22	1.83±0.37	1.58±0.24	1.62±0.26	1.73±0.50
HAPTOGLOBULIN	1.81±0.43	1.52±0.61	1.83±0.36	2.08±0.27	4.09±1.24
HEMOPEXIN	1.32±0.41	1.18±0.40	1.13±0.36	1.19±0.35	1.45±0.53
CERULOPLAZMIN	0.20±0.09	0.22±0.06	0.24±0.06	0.25±0.05	0.30±0.11
CRP mg/l	5.9±7.6	80.1±46.2	111±59	58.6±34.9	268±118

Albumin:

Albumin byl subnormální jak u skupiny 1 tak i překvapivě u skupiny 2. Po resekci střeva klesl až k hodnotám typickým pro septické pacienty.

Transferin:

Výchozí hodnoty transferinu byly významně nižší u skupiny 1 a snížení hladiny dále pokračovalo v pooperačním průběhu. Podobně jako předchozího proteinu, výchozí hodnoty zde byly také subnormální.

α 1-kyselý glykoprotein:

Hladiny α 1-kyselý glykoproteinu již v předoperačním stadiu byly zvýšené a v následujících dnech pooperačně dále narůstaly. U resekce střeva vzestup hladiny kulminoval +3. den a odpovídá již septických hodnotám 2. skupiny.

Prealbumin:

Prealbumin se svou dynamikou změn před a po chirurgickém zákroku podobá albuminu. Výchozí subnormální hodnoty u skupin 1 i 2 se po chirurgickém výkonu dále snížily.

 α 1-antitrypsin (α 1-AT):

Sérové hladiny α 1-AT stouply z normálních výchozích hodnot u skupiny 1 a kulminovaly +3 až +5 den. U septických pacientů bylo registrováno statistické významné zvýšení hladin α 1-AT vůči 1. skupině (nekomplikovaný resekce střeva).

 α 2-makroglobulin:

α 2-makroglobulin stoupl po resekci střeva ze subnormálních výchozích hodnot k normě a později v této skupině opět klesl, rozdíly jsou ale minimální. 1. skupina se přitom statisticky významně neliší od 2. skupiny (septických pacientů).

Haptoglobin:

Hodnoty haptoglobinu po resekci střeva zůstaly prakticky neutrální. Přestože haptoglobin patří mezi pozitivní APP, hladiny tohoto proteinu u skupiny 1, na rozdíl od septických pacientů spíše mírně poklesly +1 den.

Hemopexin:

Sérová hladina hemopexinu poklesl v pooperačním období u resekovaných pacientů, rozdíly však nemají statistickou významnost. Dokonce ani u septických pacientů nebyly registrovány odchylky z normy.

Ceruloplazmin:

Koncentrace ceruloplazminu stoupla pooperačně u resekovaných pacientů a kulminovala +5. den, ale dosahované hodnoty neměly statistický význam a nedosahovaly septických hodnot.

C-reaktivní protein (CRP):

Sérová hladina CRP rychle stoupl a kulminovala +3. den, kdy byl registrován přibližně 19ti násobné zvýšení hladiny vůči předoperačnímu stavu, po kterém následoval rychlý pokles.

Hladiny APP při různých onemocnění

Infarkt myokardu vede k vzestupu časných pozitivních APP. Diagnostická výtažnost APP v poinfarktovém období je ale nízká s ohledem na dostupnost specifických ukazatelů myokardiálního poškození. Fibrinogen je rizikovým faktorem předčasného rozvoje aterosklerotických změn. Patogenetická úloha akutních výkyvů hladiny fibrinogenu v důsledku zánětlivé stimulace ale není jednoznačně potvrzena (9, 11).

Ačkoli řada studií prokazuje závislost plazmatických hladin APP na pokročilosti a prognóze maligního onemocnění, v některých případech i na tumorozní mase a přítomnosti metastáz, monitoring APP u maligních pacientů nedoznal většího rozšíření a stále není dostatek důkazů, že by APP poskytovaly u onkologických pacientů relevantní informace. Opodstatněné je stanovení časných reaktantů akutní fáze u onkologických pacientů s vysokým rizikem bakteriální infekce (leukopenie po chemoterapii).

S výjimkou SLE a skupiny blízkých onemocnění, kde je jen minimální odpověď akutní fáze, dochází při exacerbaci zánětlivých onemocnění pojiva k signifikantnímu vzestupu pozitivních APP, zejména CRP. CRP je pokládán za APP první volby u revmatických onemocnění. CRP je jedním z nejcitlivějších a nejpřesnějších ukazatelů aktivity zánětu pojiva. Jeho změny v průběhu exacerbace onemocnění nebo naopak reflektující odpověď na léčbu jsou časnější než např. změny sedimentace. U SLE, kde jsou změny APP minimální, umožňuje přesto jejich stanovení odlišit exacerbaci aktivity základního onemocnění od infekce, jejíž manifestní projevy mohou být modifikovány imunosupresí

Nejvyšších koncentrací dosahuje CRP u akutních bakteriálních infekcí. Virové, mykobakteriální a parazitární infekce vedou pouze k mírnému vzestupu hladin. Akutní bakteriální infekce je rovněž silným podnětem pro vzestup α 1-antitrypsinu, α 1-antichymotrypsinu, α 1-kyselého glykoproteinu a haptoglobinu. Ostatní reaktanty stoupají s pomalejší dynamikou.

U nebakteriálních zánětů, např. viróz, je vzestup CRP řádově nižší (20-50 mg/l proti 100-300 i více mg/l bakteriálnímu zánětu), typický je u protrahovaných viróz vzestup cerulopasminu či α 2-makroglobulinu.

Dynamika negativních reaktantů závisí na jejich poločas, nejrychlejší změny zaznamenává prealbumin (signifikantní pokles již 2.-3. den), nejpomalejší albumin. Následná normalizace prealbuminu je rovněž prognosticky příznivým znamením, předcházejícím úpravu albuminémie a pozdních pozitivních reaktantů.

Syntéza CRP u novorozenců a kojenců je proti dospělým jedincům snižená. CRP je ale velmi užitečný v diferenciální diagnostice kojeneckých meningitid (koncentrace více než 20 mg/l svědčí spíše pro bakteriální původ než virový). Výběžnost stanovení APP se zvyšuje při sériovém stanovení - progresivní vzestup hladin během 48 hodin svědčí pro počínající infekci.

Adekvátní syntéza APP je zpravidla zachována i u imunosuprimovaných pacientů, kde chybí běžné známky infekce (neutrofilie, horečka). Sériové stanovení hladin APP je užitečné v časném období po transplantaci kostní dřeně nebo u onkologických pacientů s vysokým rizikem infekce.

Vztahy proteinů akutní fáze k cytokinové kaskádě se odráží i v jejich diagnostickém hodnocení. Hlavní význam stanovení těchto proteinů zůstává už řadu let ve sféře akutních stavů, ať už v oblasti interní nebo chirurgické. Proteiny akutní fáze ale nejsou pouze pasivními indikátory aktivity chronického nebo akutního zátěžového stavu; řada z nich hraje významnou roli v patogenezi chronických onemocnění, ať už se jedná o aterosklerózu, Alzheimerovu chorobu, tromboembolickou nemoc a další (20, 21).

V této studii shrnujeme výsledky měření proteinů akutní fáze u pacientů v aktivní fázi některých chronických onemocnění. Pro vzájemné porovnání byly vybrány různé typy malignit, jaterní cirhóza a dva typy chronických střevních zánětů. Na jejich příkladech hodnotíme možný přínos těchto vyšetření a specifické odlišnosti, které mohou napomoci v diferenciální diagnostice.

Vyšetřeno bylo 7 skupin chronicky nemocných pacientů, hospitalizovaných na III. interní klinice 1. LF UK. Výjimkou byli pacienti s kolorektálním karcinomem, kteří byli hospitalizováni na I. chirurgické klinice 1. LF UK. Referenční skupinu tvořila séra 20 zdravých osob. Podle pořadí v tabulkách se jednalo o skupiny nemocných s těmito onemocněními:

- (1) mnohočetný myelom
- (2) non-hodgkinský maligní lymfom ve 3. nebo 4. stádiu (pacienti nebyli dále děleni podle histologické klasifikace)
- (3) Crohnova choroba (enteritis regionalis)
- (4) ulcerózní kolitida
- (5) dekompenzovaná jaterní cirhóza (bez prokázané infekční příčiny dekompenzace, pacienti pro potřeby této studie nebyli tříděni podle etiologie cirhózy)
- (6) kolorektální karcinom v 1. a 2. stádiu onemocnění před plánovaným chirurgickým výkonem

(7) kontrolní skupina zdravých osob.

Základní demografické údaje o vyšetřovaných pacientech podává tab. 1. Ve skupinách (1) a (2) se jednalo o pacienty doporučené k přijetí Oddělením klinické hematologie VFN; vyšetření bylo prováděno před zahájením chemoterapeutické kúry. Nemocní skupin (3) a (4) byli přijati na III. interní kliniku ve fázi exacerbace onemocnění s nutností parenterální nutriční podpory.

Ze souboru byli předem vyloučeni pacienti s dalšími přidruženými onemocněními resp. léčbou, která by mohla interferovat se sledovanými parametry (kortikoidy, cytostatika a transfuze během předchozích 7 dnů).

Vzorky nesrážlivé krve byly získány jednorázovým ranním odběrem z kubitální žíly. Po centrifugaci při 3000 rpm byla získána plazma, zmrazena a uschována pro další zpracování. Po kompletaci vzorků byly v plazmě stanoveny koncentrace následujících proteinů: IL-6 (ELISA, Immunotech), alfa₁-antitrypsin (AAT), alfa₁-kyselý glykoprotein (AGP), alfa₂-makroglobulin (AM), C reaktivní protein (CRP), ceruloplazmin, haptoglobin, hemopexin, albumin, prealbumin, transferin (imunonefelometrická metoda). Intra- a interassay variační koeficient byl pod 5%. K vyhodnocení byl použit program analýzy rozptylu ANOVA.

Výsledky

Tab. 7 ukazuje věkové rozdíly mezi skupinami pacientů, zejména vůči kontrolní skupině zdravých osob. Tento faktor, související s incidencí sledovaných chorob v různých věkových skupinách nebylo možno ovlivnit.

Průměrné hladiny sledovaných proteinů u vyšetřovaných skupin pacientů shrnuje tab. 8. V tabulce jsou dále uvedeny statisticky významné rozdíly skupin pacientů vůči kontrolní skupině

Tab. 7 Základní charakteristiky chronických pacientů a kontrolní skupiny

Skupina	myelom	nonhodgk. lymfom	enteritis region.	colitis ulcerosa	cirhosis hepatis	carcinoma colorect.	kontrolní skupina
počet	14	15	18	14	16	12	25
muži / ženy	6 / 8	8 / 7	8 / 10	6 / 8	15 / 1	6 / 9	15 / 10
věk (r.)	64±9	51±17	35±10	41±12	55±10	63±9	30±5

Tab. 8 Plazmatické hladiny vyšetřovaných proteinů u skupin chronických pacientů

protein (g/l)	myelom	nonhodk. lymfom	enteritis region.	colitis ulcerosa	cirhosis hepatis	carc. colorect.	kontrol. skupina
IL-6 (ng/l)	467** ± 117	198* ± 53	656** ± 279	817** ± 287	845** ± 228	190 ± 66	114 ± 58
AAT (g/l)	2.08* ±0.43	3.03** ±0.97	2.92** ±0.98	2.82** ±0.49	3.03** ±0.82	1.64 ±0.23	1.84 ±0.30
AGP (g/l)	0.64 ±0.47	0.95 ±0.63	1.10* ±0.53	1.30** ±0.53	0.86 ±0.60	0.81 ±0.41	0.82 ±0.21
AM (g/l)	2.02 ±0.61	2.38* ±1.17	1.62 ±0.77	1.58 ±0.60	2.40* ±0.92	1.75 ±0.22	1.80 ±0.31
haptoglobin (g/l)	1.93 ±0.65	3.01** ±0.86	3.33** ±0.89	3.56** ±1.26	1.12* ±1.04	1.81 ±0.43	1.75 ±0.72
hemopexin (g/l)	1.27 ±0.47	1.58 ±0.45	1.54 ±0.49	1.62 ±0.39	0.70** ±0.51	1.32 ±0.41	1.50 ±0.25
ceruloplazmin (g/l)	0.21 ±0.05	0.30** ±0.07	0.27* ±0.08	0.28* ±0.09	0.25* ±0.06	0.24 ±0.07	0.21 ±0.04
CRP (mg/l)	38* ±15	21** ±14	23** ±13	38** ±30	20** ±17	16* ±15	5 ±5
albumin (g/l)	36.1* ±8.1	34.2* ±11.3	32.6** ±4.1	32.8** ±5.5	31.0** ±9.8	30.3** ±6.8	44.1 ±4.1
prealbumin (g/l)	0.19* ±0.08	0.20* ±0.08	0.22 ±0.09	0.22* ±0.08	0.09** ±0.08	0.18** ±0.06	0.28 ±0.04
transferin (g/l)	1.93** ±0.47	2.60 ±0.63	1.40** ±0.53	1.83** ±0.66	1.61** ±0.47	2.33* ±0.63	2.92 ±0.41

Ve výsledcích uvedeny průměry ± SD.

Statistická významnost rozdílu proti kontrolní skupině: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

DISKUZE

Ve skupině proteinů akutní fáze můžeme na základě výsledků našich měření i pozorování jiných autorů za nespecifické ukazatele chronické zátěžové situace (zánět, malignita apod.) označit především negativní reaktanty (albumin, prealbumin, transferin, dále z proteinů zde nehodnocených např. globulin vázící retinol) a z pozitivních reaktantů zejména AAT, ceruloplazmin a haptoglobin (25, 26). Srovnávací vyšetření pozitivních i negativních bílkovin akutní fáze u různých skupin chirurgických pacientů (lišící se rozsahem chirurgického zákroku, resp. komplikovaným pooperačním průběhem), je základem k hodnocení významu jejich stanovení v těchto indikacích.

První čtyři zmíněné proteiny jsou pokládány za ukazatele nutričního stavu a v některých případech za prognostické markery (například albumin v chirurgii). Albumin je ale především znám pro úlohu v mikrocirkulaci (onkotický tlak), méně pak jako ukazatel malnutrice zejména u chronických onemocnění. Jeho snížené výchozí hladiny u pacientů s kolorektálním karcinomem o tom svědčí. V akutních situacích pokles je dán především supresí syntézy zánětlivými mediátory, resp. přesunem proteosyntézy směrem k pozitivním akutním reaktantům. Hladina albuminu může být navíc ovlivněna hemodilucí nebo hemokoncentrací.

Prealbumin a transferin díky svému krátkému biologickému poločasu lépe reflektují krátkodobé odchylky a jsou časnějšími indikátory zlepšování nutričního stavu při léčbě. Kombinace vyšetření prealbuminu a transferinu může dát také nepřímou informaci o stavu zásob železa. Již vstupní hodnoty prealbuminu u resekovaných pacientů lišily od normy, což lze vysvětlit asi kombinací krátkodobé malnutrice a přítomnosti tumoru ve skupině 1. Signifikantně nižší hladiny prealbuminu a transferinu v předoperačním měření u pacientů s kolorektálním karcinomem byly popisovány (127). Pokles transferinu svědčí o tom, že sideropenie jako hlavní stimulátor jeho syntézy není v těchto stavech aktuální (rozpad erytrocytů, transfuze) a že dominuje úbytek proteosyntézy a vychytávání v mikrocirkulaci. Zvýšení transferinu dává signál o obratu k anabolickému stavu, což je v souladu s jinými autory. Pravděpodobně transferin plní funkce v reparaci tkáňového poškození a jejich úbytek nejde na úkor snížené syntézy, ale i zvýšené periferní clearance.

AAT, protein se vztahem k bakteriálním zánětům (inhibice neutrofilní elastázy), výrazně reaguje i u většiny chronických stavů, kde se neutrofilní leukocyty nezúčastní. Význam

zvýšení AAT v těchto situacích není jasný a vedle úlohy v tvorbě vazivové tkáně zřejmě odráží i další zatím neznámé fyziologické účinky tohoto proteinu.

α 2-makroglobulin (AM) na rozdíl od krysy není u člověka typicky pozitivním proteinem akutní fáze. Tomu odpovídá i jeho neutrální chování např. po chirurgickém výkonu, v časně fázi sepse nebo po ozáření. AM má nepochybně vztah k hemokoagulaci a mikrocirkulaci. Signifikantně vyšší hladiny AM jsme našli u pacientů s hematologickými malignitami a u pacientů s jaterní cirhózou. Z literatury je známo nejen zvýšení AM u maligních chorob, ale také u řady běžných viróz a u chronických hepatopatií necirhotického charakteru. Specifická diskriminační hodnota AM spočívá především v diferenciální diagnostice některých malignit, chronických chorob ledvin a aktivních viróz. Nízká hladina AM u skupiny pacientů s kolorektálním karcinomem ale ukazuje, že senzitivita zejména u solidních tumorů není vysoká. AM je pozitivně stimulován např. estrogeny, a tak se s mírným zvýšením můžeme setkat i při léčbě kontraceptivy a v těhotenství. Zvýšení koncentrace AM je popisováno u některých hematologických malignit, kde bývá nacházeno i v klidovém stádiu. Patogenetická úloha tohoto proteinu, vážícího v cirkulaci řadu cytokinů a jiných působků, přitom není známa.

Zajímavé je chování haptoglobinu v pooperačním období. U rozvinuté sepse, haptoglobin se chová jako typický akutní reaktant a jeho hladina 2-3x přesahuje globinové fragmenty hemoglobinu, uvolněné hemolýzou při operaci. U nitrobršních operací byl zaznamenán patrný pokles hladiny +1. den, který se v dalších dnech již vyrovnává a přechází do vzestupu. Pozoruhodné je také skutečnost že skupina s abdominálními resekciemi dostávala často transfuze s další dodatečnou hemolytickou složkou. Zvýšení haptoglobinu je pokládáno za užitečný marker exacerbace lymfomu, podobně jako zvýšená hladina ceruloplazmin (127). Uvedené proteiny lze využívat k monitorování aktivity onemocnění a odpovědi na cytostatickou léčbu. Pokles hladin nutričních ukazatelů je společným znakem s dalšími maligními i jinými chronickými onemocněními.

Na rozdíl od haptoglobinu (senzitivní ukazatel chronického zátěžového stavu) reaguje hemopexin, protein funkčně blízký haptoglobinu, ve všech sledovaných skupinách minimálními změnami. Protrahovaný pokles sérových hladin hemopexinu po resekcii střeva potvrzovala pomalou dynamiku změn, kdy konzumpce proteinu převážovala nad nevýraznou stimulací syntézy. Specifické je chování obou proteinů (haptoglobin a hemopexin) u jaterní cirhózy, kdy nevýrazné stimulační vlivy jsou převáženy konzumpcí v cirkulaci.

α 1-kyselý glykoprotein /orosomukoid/ je typicky indukován přes IL-6 především endotoxinem, méně při sterilním tlakovém poškození. Absolutní hodnoty vzestupu +3. resp. +5. den dovolují odlišit možnost infekční stimulace u nitrobršních výkonů.

CRP je protein akutní fáze znám s nejrychlejší a nejvýraznější dynamikou v různých akutních situacích a řadově 100-1000 násobným zvýšením. CRP nebyl u žádné ze vyšetřovaných skupin normální. Jeho vzestup odeznívá rychle, po operačním inzultu a již dřívější práce prokázaly dobrou korelaci s plazmatickými hladinami IL-6. Maximální hladiny CRP i IL-6 korelují s dobou trvání operace (6), s mírou tkáňového poškození během operace. Přitom je třeba vzít v úvahu i další údaje (potřeba a množství krevní transfuze aj.). Razantní zvýšení hladiny CRP v našem souboru +3. den a následný pokles +5. den ve vztahu k hodnotám u septických pacientů může být prognostickým faktorem a ukazatelem ohrožení septickou komplikací. Stanovení CRP za již vyvinuté klinické sepse není užitečné pro prognózu těžkého stavu. Zvýšení CRP u chronických stavů bez bakteriální zánětlivé složky bylo mírné (20-40 mg/l). Hodnota CRP kromě monitorování aktivity některých revmatických chorob (s patogenetickou účastí IL-6, jeho hlavního stimulantu), je tedy především v časném odlišení bakteriálních komplikací základního chronického onemocnění. U pacientů s kolorektálním karcinomem je spektrum změn ve sledovaných parametrech omezeno na lehké, i když statisticky signifikantní zvýšení CRP, a především na snížení tří ukazatelů viscerální proteosyntézy - nejvýraznější pokles zaznamenáváme u albuminu a prealbuminu. Zejména snížení prealbuminu, či retinol vázícího proteinu je pokládáno za nespecifický marker přítomnosti tumoru (128).

Ceruloplazmin je bílkovina s pomalou dynamikou nástupu v akutních situacích, ale vysokou senzitivitou v chronických zánětlivých stavech (kolagenózy apod.) a u některých nádorů. Hodnoty jsou vyšší u všech sledovaných skupin pacientů. U myelomu a kolorektálního karcinomu však zvýšení nedosahuje statistické významnosti $p < 0,05$. U septických pacientů jsme zaznamenaly poměrně malé zvýšení hladiny ceruloplazminu. Pravděpodobně, kulminace hladiny ceruloplazminu zaostává za rozvojem septického šoku, kdy byli pacienti této skupiny vyšetřováni. Rozvoj dynamiky hladin ceruloplazminu ukazuje že tento protein není specifickým markerem nádoru a jeho zvýšení je nutno posuzovat v kontextu s dalšími ukazateli.

Pozoruhodné je přitom zjištění Kneкта a kol., že zvýšená hladina ceruloplazminu u zdravých osob pozitivně koreluje se zvýšeným výskytem maligního onemocnění v následujících 8 letech života (129). Týká se to zejména kuřáků a karcinomu plic, ale i dalších tumorů se vztahem ke kouření. Zvýšení Ceruloplazminu je zřejmě velmi časným projevem okultního nádoru.

Zvýšení AM je popisováno u různých nezánettivých hepatopatií, pravděpodobně jde do jisté míry o kompenzační mechanismus k udržení onkotického tlaku při poklesu albuminu. Elevace AAT, ceruloplazminu a CRP může být projevem latentních infekčních komplikací při základním onemocnění s alterací imunitního stavu, ale také důsledkem zvýšené produkce IL-6, ke které dochází u různých hepatopatií i bez účasti infekce.

Snížení hladin albuminu, prealbuminu a transferinu je kromě alterované jaterní proteosyntézy jistě také odrazem střevních ztrát. Uvedené nálezy jsou srovnatelné s jinými publikovanými údaji o chování těchto proteinů při exacerbaci chronických střevních onemocnění. Přestože podle Schultze aj. je sérový amyloid A senzitivnějším ukazatelem střevních zánětů než CRP a AGP, nemá jejich specificitu (130). Ze souhrnné Thompsonovy práce plyne, že v retrospektivním sledování řady biochemických parametrů dává kombinace CRP s alfa1-antichymotrypsinem nejlepší obraz aktivity střevních zánětlivých onemocnění (30). Podle téže práce koncentrace CRP nad 50 mg/l odpovídá spíše enteritis regionalis než ulcerózní kolitidě. V remisi může dojít až k úplné úpravě všech sledovaných pozitivních reaktantů. Hodnota měření APP u střevních zánětlivých onemocnění tedy leží v diferenciaci funkčních a zánětlivých stavů; v kombinaci s dalšími ukazateli jsou přínosem k posuzování aktivity nemoci a odpovědi na léčbu. S uvedenou problematikou souvisí také zjištění, že AAT ve stolici je citlivým ukazatelem chronických nespecifických střevních zánětů s exsudací proteinů (131).

Můžeme shrnout že, hodnoty plazmatických hladin proteinů akutní fáze jsou závislé ne jen na rozsahu operační zátěže a zejména bakteriální komplikace (hlavní sledovaný parametr), ale také i na řadě dalších faktorů, a ukazuje tedy jen část komplexního klinicko-laboratorního obrazu pooperačního období.

Sériové měření (mezi +3. +5. dnem) sérového transferinu, prealbuminu, α 1-kyselého glykoproteinu, α 1antitrypsinu a CRP může napomoci k časnému rozpoznání vývoje septické komplikace u rozsáhlejšího výkonu .

5. FYZIOLOGICKÁ REAKCE CYTOKINŮ NA OPERAČNÍ VÝKON

5.1 Sérové hladiny cytokinů po nekomplikovaném operačním zákroku

Zánětlivá odpověď po chirurgickém výkonu se odehrává v rovině imunologické, metabolické, endokrinní a neuroendokrinní. Integrojícím základem všech těchto dějů je aktivace cytokinové sítě na počátku tohoto procesu, doprovázená uvolněním solubilních cytokinových receptorů. Antigenní a další stimulace imunokompetentních buněk inicijuje syntézu škály zánětlivých mediátorů, cytokinů, jejichž sekundárním projevem jsou změny v hormonální syntéze a aktivace syntézy APP. Tvorba cytokinů tedy předchází změnám APP a změnám "stresových" hormonů a je s nimi v kauzální souvislosti. Z klinického pohledu by stanovení cytokinů u vysoce rizikových pacientů mohlo přinést časnější informaci o nástupu infekčních komplikací než vyšetření APP. Dosavadní výsledky studií jsou však v tomto směru pesimistické.

Tkáňové poškození, včetně operačního výkonu, způsobuje buněčnou odpověď s aktivací mononukleárních fagocytů a následné vyplavení cytokinů a mnoho dalších zánětlivých mediátorů (metabolity kyseliny arachidonové, volné kyslíkové radikály, komplement, lysozomální enzymy atd).

Uvedené výsledky výzkumu prokazují, že efekt cytokinů závisí více než na vlastní koncentraci mediátoru na změně rovnováhy mezi synergistickými a antagonistickými faktory reakce. Je tedy ovlivněn tvorbou cytokinů s antagonistickým působením včetně receptorových antagonistů a solubilních receptorů (neutralizují části cytokinů před navázáním na membránový receptor na cílové buňky a expresí těchto receptorů na cílové buňce). Stále více experimentálních prací prokazují nezbytnost kontrolované regulace poměru cytokinů a jejich inhibitorů (133,134,135). Velký pozornost se věnuje na výzkum faktorů které inhibují rozvoj septické reakce:receptorový antagonist IL-1(IL-1ra), solubilní receptory TNF, IL-2, IL-6 (sIL-R a sIL-6R), IL-4 a IL-10.

Vlastní soubor:

Cílem studie bylo zhodnotit dynamiku a diagnostickou validitu vybraných pro- a protizánětlivých cytokinů a cytokinových receptorů při nekomplikovaném pooperačním průběhu. Údaje byly následně porovnávány s výsledky získanými u septických pacientů a dalších pooperačních komplikací. Klinicky zaměřený cíl pak vycházel z podrobnějšího poznání a srovnání dynamiky jednotlivých cytokinů a solubilních cytokinových inhibitorů v časném pooperačním období.

Mezi sledovanými parametry je trojice cytokinů, zodpovídajících za stimulaci jaterní syntézy APP - vedle interleukinu (IL)-6 i tumory nekrotizující faktor (TNF) alfa a IL-1beta. Jedním z cílů studie bylo posouzení vzájemných časových vztahů těchto skupin ukazatelů v klinických podmínkách s otázkou, zda je možné event. časový posun předpokládaný mezi nástupem cytokinů a APP využít v klinické diagnostice (1).

Vybrány byly tedy ty parametry, u kterých je podle našich předchozích zkušeností možné s dostatečnou přesností stanovit plazmatické hladiny v klidových i zánětlivých stavech. Na základě literárních údajů i vlastních zkušeností, předmětem výzkumu byla dynamika plazmatických hladin těchto cytokinů: TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, ale také solubilních receptorů IL-2 a IL-6 (sIL-2R a sIL-6R) a receptorového antagonisty IL-1 (IL-1ra).

Výběr pacientů a metodika

Klinická studie byla realizována na I. chirurgické klinice I. LF UK ve spolupráci s Ústavem klinické imunologie I. LF UK. Zpracování vzorků a měření sledovaných parametrů bylo prováděno autorem na Ústavu klinické imunologie I. LF UK Praha. Pro studium dynamiky cytokinů po operačním výkonu byly vybrány následující skupiny pacientů:

1. Pacienti po radikálním resekčním výkonu tlustého střeva pro karcinom (20 osob, muži / ženy 11/9, průměrný věk 58 ± 9 r.)
2. Pacienti po radikální hemipankreatoduodenektomii pro karcinom hlavy pankreatu (17 osob, muži / ženy 10/7, 52 ± 7 r.).
3. Pacienti s prokázanou nitrobráší sepsi (18 pacientů), podle kriteria sepse R.C.Boného. V této skupině byly zařazení pacienti se sterkorální peritonitidou (11), s tvorbou nitrobráší abscesu při akutní pankreatitidě (3) a biliární peritonitidou (4). Hodnoty sledovaných parametrů se u těchto pacientů statisticky nelišily.

4. Kontrolní soubor zdravých osob (25 osob, muži / ženy 15/10, 30 ± 5 r.)

Výběr pacientů 1. až 3. skupiny byl zvolen z následujících důvodů:

1. I. chirurgická klinika se zaměřuje na operativu zhoubných nádorů pankreatu a nádorů kolorekta. Proto bylo možné vytvořit dostatečně rozsáhlý soubor pacientů.
2. Jedná se o operační výkony se značnou tkáňovou traumatizací na orgánech vysoce imunitně aktivních (střevo a peritoneum je ústředním producentem cytokinů v pooperační fázi).
3. Operační výkony provádí malý počet chirurgů, to znamená, že byla použita standardní, srovnatelná technika operace.

Vzorky žilní krve (5 ml heparinizované krve) byly od pacientů získávány před operací a následně +12., +18., +24., +36., +48. a +72. h od začátku operačního výkonu. Krev byla bezprostředně centrifugována při 4°C a plazma uschována při -60° C k dalšímu zpracování.

Následně zjištěné hodnoty sérových hladin cytokinů byly srovnány s hladinami 4.skupiny, odebírané ve 24- hodinových intervalech. Výsledky byly uváděny jako průměr \pm SD, statisticky zpracovány Studentovým testem, hodnoty $p < 0.05$ byly považovány za signifikantní. Korelace mezi individuálními hladinami cytokinů byly analyzovány jednoduchou lineární regresí.

Vyhodnoceny byly plazmatické hladiny těchto cytokinů a solubilních cytokinových receptorů: TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, sIL-2R, sIL-6R a IL-1ra vždy v duplikátech vzorků. Plazmatické koncentrace cytokinů, solubilních receptorů a uvedených receptorových antagonistů byly stanoveny metodikou ELISA s použitím originálních kitů (Immunotech a R&D Systems, Quantikine[®] TM) při dodržení firemního postupu. Variační koeficient ELISA metod pro stanovení cytokinů se pohyboval mezi 4,5 a 7,6 %.

Tam, kde hodnoty sledovaných parametrů dosahovaly normálního rozložení, byly výsledky vyjádřeny průměrem a směrodatnou odchylkou. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly analyzovány parametrickými a neparametrickými testy pro konkrétní parametry.

Pro analýzu byl použit statistický software STATI a STATGRAF pro Windows 98. Statistická významnost byla hodnocena na hladině 0,05.

Koncepce studie a informovaný souhlas byly schválena etickou komisí v rámci schvalovacího řízení přihlášek grantové agentury MZ ČR.

Výsledky

Z pacientů zařazených do jednotlivých skupin nikdo ve sledovaném období do +72. h nezemřel. Předem byly ze statistického hodnocení vyloučeni pacienti s komplikovaným časným pooperačním průběhem, kde lze předpokládat interferenci se sledovanými parametry.

Výsledky měření jsou shrnuty v tabulkách 9 až 12 a v grafech 1 až 4. Statistická významnost rozdílu proti předoperačním hodnotám, resp. proti kontrolní skupině je uvedena na $p < 0,05$.

Předoperační koncentrace IL-6, IL-8 a TNF α u pacientů před hemipankreatektomií se statisticky signifikantně liší od hodnot kontrolní skupiny. U ostatních parametrů předoperační rozdíly nejsou významné.

U pacientů s resekcí tlustého střeva pouze předoperační hladiny IL-6 odlišovaly tuto skupinu od zdravých osob. U ostatních prozánětlivých i protizánětlivých parametrů předoperační rozdíly nedosáhly statistické významnosti na $p < 0,05$.

Amplituda změn sledovaných parametrů je u pacientů po hemipankreatektomii a po resekci tlustého střeva srovnatelná. Výjimkou je vývoj koncentrací solubilního receptoru IL-2, které u pacientů s resekcí pankreatu dosahují téměř dvojnásobných hodnot ve srovnání s druhou skupinou.

Nejvýraznější pooperační vzestup nacházíme u faktorů CARS - receptorového antagonisty IL-1 a solubilního receptoru IL-2. Další 2 faktory CARS - IL-10 a sIL-6R však reagují i na rozsáhlé operační trauma jen minimálními změnami.

Minimální vzestup zaznamenáváme u plazmatických hladin IL-1 β a IL-2. Výraznější je pooperační elevace IL-6 a IL-8 - u obou skupin operovaných pacientů je míra vzestupu těchto parametrů srovnatelná a vzájemné rozdíly nedosahují statistické významnosti. Hladiny IL-1 β u septických pacientů se neliší od hladin u nekomplikovaných pooperačních stavů.

Výsledky ukazují, že operační trauma výrazně elevuje plazmatické hladiny IL-1ra i sIL-2R. U obou těchto cytokinových receptorů dosahovaly maximální hladiny za 24 hod. po operačním výkonu až 6-násobné hladiny.

Tyto parametry spolu s IL-6 a TNF α jako první ze sledovaných cytokinových ukazatelů dosahovaly maxima. Hladiny IL-2, sIL-6R a IL-10 měly pozvolnější průběh s menší amplitudou vzestupu, přesto se jejich maximální hodnoty statisticky signifikantně odlišovaly od jejich předoperačních hladin.

Menší tkáňové poškození neovlivňuje hladinu IL-1 a zvyšuje jen sérovou hladinu jeho receptorového antagonisty IL-1ra. Sérová hladina IL-1ra u obou skupin chirurgických pacientů signifikantně koreluje s hladinou IL-6 ($r = 0,76$, $p < 0,01$).

Tab. 9 Dynamika cytokinů SIRS po resekcí tlustého střeva

Cytokin	před operací	+12 hod.	+24 hod.	+36 hod.	+48 hod.	+72 hod.	zdravé osoby
IL-1 β (ng/l)	31,2 $\pm 4,2$	37,9 ^a $\pm 8,3$	37,6 ^a $\pm 7,8$	36,5 ^a $\pm 4,8$	35,4 ^a $\pm 2,6$	33,2 ^a $\pm 4,7$	27,2 $\pm 4,6$
IL-6 (ng/l)	81 ^a ± 12	950 ^{ab} ± 140	1125 ^{ab} ± 240	1000 ^{ab} ± 180	840 ^{ab} ± 120	200 ^{ab} ± 85	12 ± 8
IL-8 (ng/l)	39,4 $\pm 12,4$	120 ^{ab} ± 48	430 ^{ab} ± 180	520 ^{ab} ± 200	480 ^{ab} ± 195	250 ^{ab} ± 72	24,2 $\pm 8,2$
TNF α (ng/l)	63,9 $\pm 8,9$	150 ^{ab} ± 18	205 ^{ab} ± 22	180 ^{ab} ± 20	120 ^{ab} ± 16	70 ^a ± 10	46 $\pm 5,3$

a ... statistická významnost rozdílu proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)

b ... statistická významnost rozdílu proti předoperačním koncentracím ($p < 0,05$)

Tab. 10 Dynamika cytokinů SIRS po hemipankreatoduodenektomii

Cytokin	před operací	+12 hod	+24 hod.	+36 hod.	+48 hod.	+72 hod.
IL-1 β (ng/l)	29,8 $\pm 4,2$	38,8 ^{ab} $\pm 9,6$	38,2 ^{ab} $\pm 9,4$	36,5 ^{ab} $\pm 8,4$	35,8 ^{ab} $\pm 7,2$	32,4 $\pm 5,8$
IL-6 (ng/l)	114 ^a ± 32	1100 ^{ab} ± 232	1290 ^{ab} ± 365	1120 ^{ab} ± 340	980 ^{ab} ± 165	300 ^{ab} ± 48
IL-8 (ng/l)	44 ^a $\pm 12,2$	140 ^{ab} ± 92	490 ^{ab} ± 122	548 ^{ab} ± 184	510 ^{ab} ± 160	280 ^{ab} ± 98
TNF α (ng/l)	64,4 ^a $\pm 8,2$	190 ^{ab} ± 21	230,4 ^{ab} ± 64	200 ^{ab} ± 28	170 ^{ab} $\pm 20,7$	120 ^{ab} ± 76

a ... statistická významnost rozdílu proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)

b ... statistická významnost rozdílu proti předoperačním koncentracím ($p < 0,05$)

Tab. 11 Dynamika IL-2 a faktorů CARS po resekcii tlustého střeva

Cytokin	před operací	+12 hod	+24 hod	+36 hod	+48 hod	+72 hod.	zdravé osoby
IL-1ra (ng/l)	386 ±74	2266 ^{ab} ±314	2288 ^{ab} ±481	1066 ^{ab} ±332	812 ^{ab} ±306	616 ^{ab} ±86	344 ± 66
IL-2 (ng/l)	12,0 ±3,7	25,4 ^{ab} ±6,4	27,1 ^{ab} ±4,8	25,4 ^{ab} ±6,3	23,4 ^{ab} ±6,2	13,2 ± 7,2	11,1 ± 4,6
sIL-2R (ng/l)	573 ±142	2265 ^{ab} ±822	3910 ^{ab} ±945	3854 ^{ab} ±801	2855 ^{ab} ±944	1950 ^{ab} ±801	488 ± 122
sIL-6R (μg/l)	25,2 ±11,2	33,4 ^a ±6,8	33,3 ^a ±4,2	37,3 ^{ab} ±4,2	33,1 ^a ±5,6	28,4 ^a ±6,6	20,8 ± 4,9
IL-10 (ng/l)	16,4 ±8,6	21,6 ±6,9	30,4 ^{ab} ±7,5	36,2 ^{ab} ±8,2	33,1 ^{ab} ±9,4	18,6 ±6,2	17,6 ± 6,4

a ... statistická významnost rozdílu proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)

b ... statistická významnost rozdílu proti předoperačním koncentracím ($p < 0,05$)

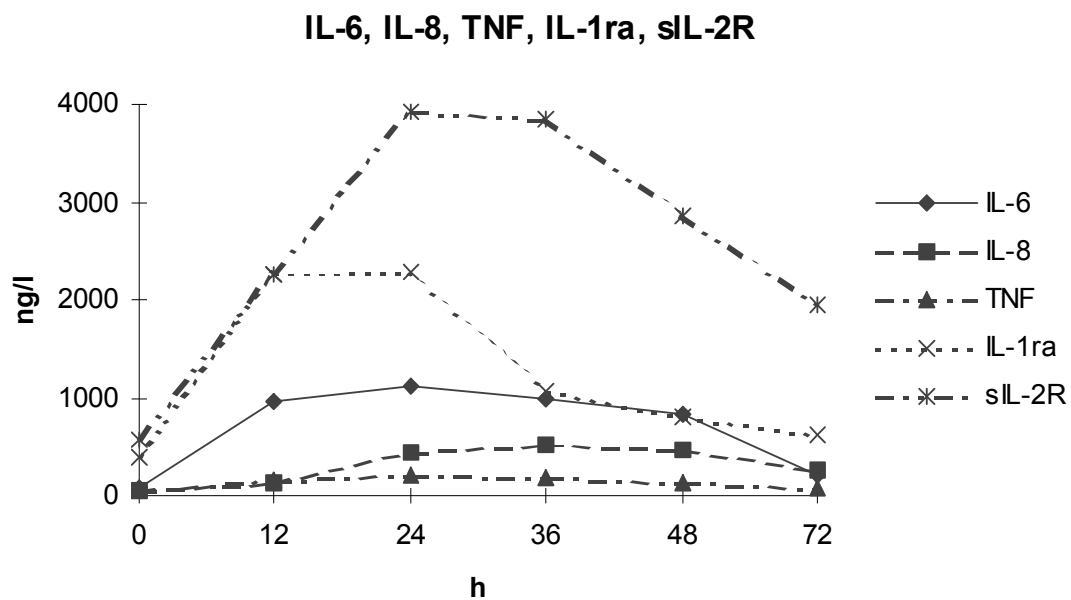
Tab. 12 Dynamika IL-2 a faktorů CARS po hemipankreatoduodenektomii

Cytokin	před operací	+12 hod	+24 hod	+36 hod	+48 hod	+72 hod.
IL-1ra (ng/l)	391 ±31	2140 ^{a b} ±286	2226 ^{a b} ±512	1144 ^{a b} ±266	715 ^b ±214	706 ^b ±64
IL-2 (ng/l)	13,8 ± 5,2	26,2 ^{a b} ±6,2	26,1 ^{a b} ±5,6	26,2 ^{a b} ±7,4	22,5 ^{a b} ±8,4	21,6 ^{a b} ±6,9
sIL-2R (ng/l)	614 ±112	1944 ^{a b} ±599	2287 ^{a b} ±855	2304 ^{a b} ±955	1955 ^{a b} ±688	1427 ±642
sIL-6R (µg/l)	24,5 ±13,4	32,5 ^a ±5,2	33,4 ^{a b} ±4,4	35,9 ^{a b} ±5,4	31,9 ±4,9	28,5 ±5,6
IL-10 (ng/l)	18,6 ±6,2	23,8 ±5,1	29,6 ^{a b} ±5,5	31,5 ^{a b} ±6,4	28,6 ^{a b} ±9,4	18,6 ±6,2

a ... statistická významnost rozdílu proti kontrolní skupině ($p < 0,05$)

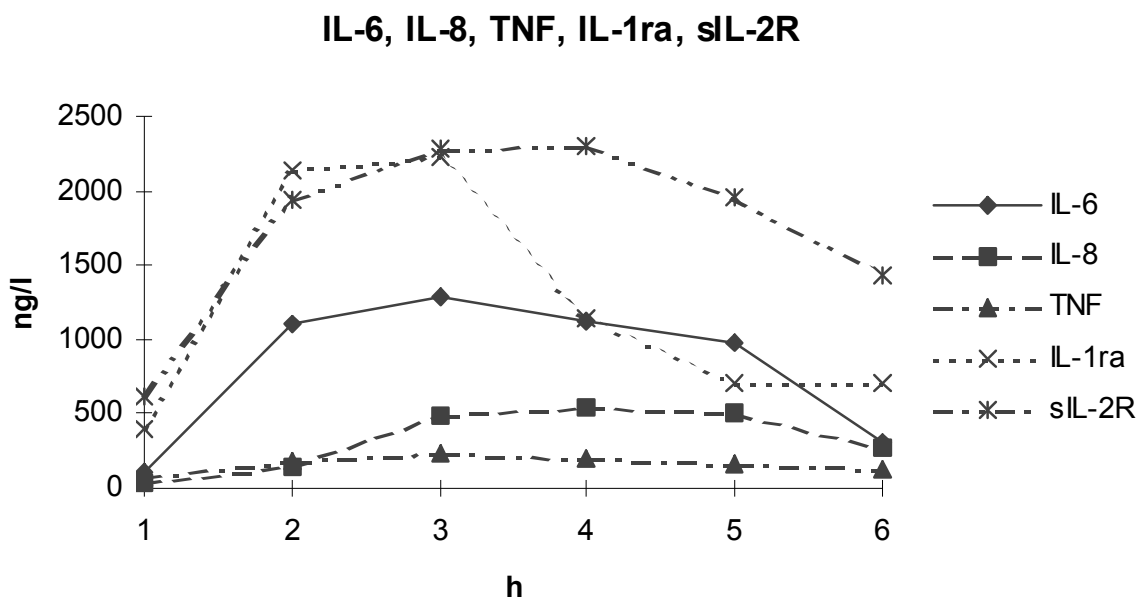
b ... statistická významnost rozdílu proti předoperačním koncentracím ($p < 0,05$)

Graf 1. Průběh vybraných zánětlivých ukazatelů po resekcí střeva. Průměrné hodnoty.



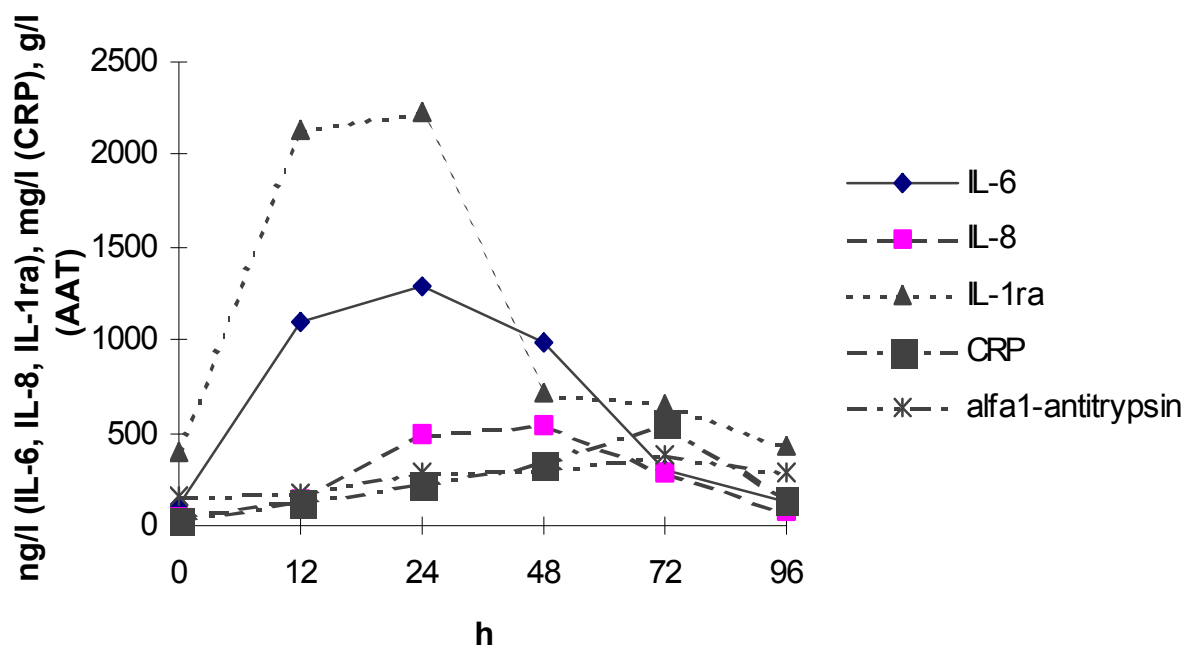
Graf 2. Průběh vybraných zánětlivých ukazatelů po resekcí pankreatu. Průměrné hodnoty.

Amplituda odpovědi je u čtyř sledovaných ukazatelů obdobná. Výjimkou jsou koncentrace solubilního receptoru IL-2, který u resekcí střeva dosahuje téměř dvojnásobných hodnot proti resekcí pankreatu.



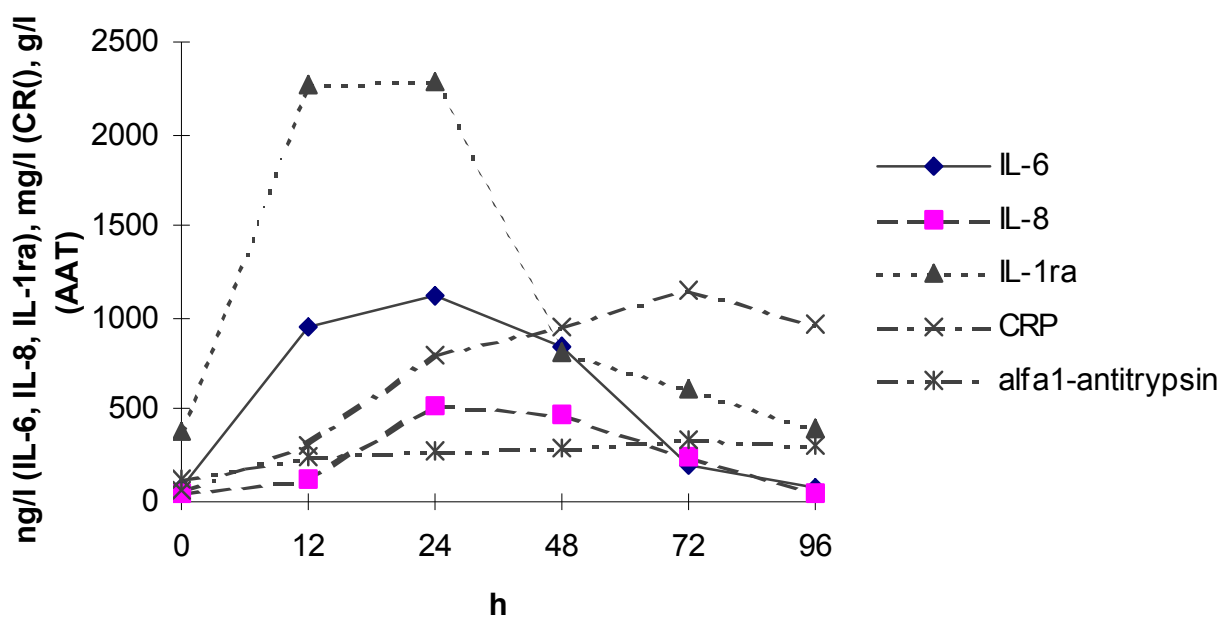
Graf 3. Dynamika vybraných cytokinů a APP po resekci střeva.

Dvouvrcholový průběh odráží časový posun mezi časnými prozánětlivými cytokiny (IL-6 a IL-8) a jejich antagonisty (zde IL-1ra) na jedné straně a hlavními APP (zde CRP a AAT) na straně druhé.



Graf 4. Dvouvrcholový průběh vybraných cytokinů a APP po resekci pankreatu.

U obou zákroků je srovnatelná amplituda zánětlivých parametrů. Vzájemný časový posun cytokinů a APP zůstává zachován. Nápadný je rovněž u obou operací nepoměr mezi dosaženými plazmatickými koncentracemi zánětlivých (IL-6 a IL-8) a protizánětlivého cytokinu (IL-1ra)



Diskuse

Příznivá prognóza pacientů s pooperační zánětlivou nitrobršišní komplikací je limitována včasnou diagnózou této závažné komplikace. Chirurg se v současné době nemůže opřít o dostatečně senzitivní a přitom včasné ukazatele, které by dokázaly odlišit počátek rozvíjející se nitrobršišní zánětlivé pooperační komplikace od ještě nekomplikovaného časného pooperačního průběhu. Možnosti využití APP v této diagnostice jsou omezeny nastartováním jejich syntézy v hepatocytech po stimulaci cytokiny (2). Proto z řady různých parametrů systémové zánětlivé odpovědi se v současné době upřela pozornost na první mediátory zánětu - cytokiny, u kterých se předpokládá dostatečná specifická a současně vysoká senzitivita pro časnou diagnostiku pooperační nitrobršišní sepse. Zájem se ale současně upírá i na nové zánětlivé parametry, jako je leptin nebo PCT, které doplňují mozaiku systémové zánětlivé odpovědi po chirurgickém výkonu (3, 4, 5)

IL-1beta dosahuje maximální hladiny již 12. hodinu po operačním zákroku. Při nekomplikovaném pooperačním průběhu se maximální hladiny významně neliší ve srovnání s předoperačními hladinami (6). Podle našich zkušeností je však významný rozdíl pooperačních hladin proti hodnotám dosahovaným v sepsi. Následkem masivní gram-negativní bakteriémie nebo endotoxémie dochází k maximální stimulaci produkce IL-1beta, která může vést až k nezvládnutelnému šoku a smrti organismu.

Interpretace některých výsledků experimentálních studií jsou stále kontroverzní. Nelze jednoznačně souhlasit s názorem, že rozvoj pooperačních adhezí je v závislosti na časném vzestupu IL-1 (30 min po laparotomii). Vzestup prozánětlivých cytokinů 30 min po laparotomii je spíše odrazem fyziologické obranné reakce organismu na operační trauma. Stejně tak názor, že příčinou signifikantně delšího času trvání pooperační atonie žaludku u pacientů je přetrvávající vyšší hladina IL-1beta, není jednoznačný. Domníváme se, že vyšší pooperační hladina IL-1beta je odrazem závažnějšího (komplikovaného) pooperačního průběhu a jeho důsledkem je mimo jiné i přetrvávající žaludeční atonie.

IL-6 patří k významným prvosledovým mediátorům akutní zánětlivé odpovědi na tkáňové poškození. Indukuje sekreci dalších cytokinů druhého sledu a APP. IL-6 dosahuje maximální sérové hladiny do 24 h po operaci. Maximální sérová hladina dobře koreluje s rozsahem »operačního stresu«, tedy u výkonů s velkým tkáňovým poškozením: ve srovnání s laparoskopickou cholecystektomií jsou u resekce kolon dokumentovány 4x vyšší hodnoty IL-

6, u gastrektomie 5x vyšší a u resekce jícnu dokonce 10 x vyšší pooperační hodnoty IL-6 (7, 8). U stejných operačních výkonů hladina IL-6 signifikantně koreluje s rozsahem perioperační ztráty krve, počtem transfuzí a délkou operačního výkonu (9, 10). K dalším významným faktorům patří vliv vedení anestézie, perioperační analgesie a tkáňová hypoxie (11).

Při hodnocení fyziologického významu IL-6 je ale nutno vzít v úvahu, že dosahované maximální lokální hladiny (např. v tekutině z drénů) jsou až 100 x vyšší než maximální plazmatické hladiny. Zvýšená hladina IL-6 způsobuje i zvýšenou tvorbu nitrobřišních adhezí po operačním výkonu v dutině břišní. Zvýšený počet adhezí se vysvětluje prozánětlivým působením IL-6, včetně aktivace proliferace fibroblastů. Po použití předoperační, selektivní blokády IL-6R byl pozorován signifikantně nižší výskyt nitrobřišních adhezí. Negativní ovlivnění hojení operační rány nebylo pozorováno. IL-6 dobře reaguje na rozsah tkáňového poškození. Podle literárních údajů i dalších našich výsledků dosahuje u srovnatelných výkonů nižších hladin u operací provedených laparoskopickou technikou.

Plazmatická hladina TNF α po nekomplikovaném nitrobřišním výkonu kulminuje 18 hodin po operaci a následně klesá 2.–3. den po operaci. Rozdíl maximální dosažené hodnoty proti předoperační je významný i u nekomplikovaného pooperačního průběhu. Toto zjištění svědčí pro to, že pro vyplavení TNF α není nutný infekční podnět.

Všeobecně je uváděn negativní vliv TNF na zhoršené hojení tkání. Byl prokázán negativní vliv TNF na hojení laparotomie. Tento efekt je zprostředkován jednak přímým působením TNF, jednak nepřímo, zvýšenou produkcí IL-1. Některé studie prokazují u pacientů se sníženými markery hojení anastomóz gastrointestinálního traktu signifikantně vyšší sérové hladiny TNFalfa. Zajímavé bylo experimentální zjištění, kdy navozením tolerance na TNFalfa byl eliminován rozdíl v hojení anastomóz vlivem zvýšené hladiny tohoto cytokinu. Pravděpodobnější vysvětlení je, že maximální hodnoty TNFalfa jsou odrazem probíhající sepse, než známkou špatného hojení anastomóz.

Pooperační maximální hodnoty IL-2 a sIL-6R dosahovaly podle našich zkušeností hodnot nacházených u septických pacientů. To znamená, že IL-2 a sIL-6 nejsou schopny odlišit významnou bakteriální stimulaci organismu od tkáňového traumatu způsobeného operačním výkonem.

IL-2 je odpovědný za aktivaci proliferace imunokompetentních buněk (T a B buňky, NK buňky). V časném pooperačním období je pozorován pokles sekrece, který přetrvává asi 4–7

dnů. Pooperační snížení hladiny můžeme sledovat i u solubilního receptoru IL-2 a odpovídá snížené proliferaci lymfocytů v odpovědi na fytohemaglutinin.

Dosud nebyl jednoznačně prokázán vliv rozsahu a délky operačního výkonu na naměřené hodnoty IL-2. Pooperační koncentrace IL-2 korelují s počtem transfúzí podaných perioperačně. Byl prokázán protektivní efekt H₂ blokátorů na pooperační pokles IL-2. Nicméně amplituda vzestupu IL-2 po operačním zákroku zůstává hluboko pod dynamikou hlavních prozánětlivých cytokinů a naměřené hodnoty nereflektují lokální tkáňové koncentrace, které mají pro efekty tohoto cytoinu rozhodující význam.

Operační trauma výrazně elevuje plazmatické koncentrace IL-1ra i sIL-2R (12). U obou těchto cytokinových receptorů dosahují maximální hladiny za 24 h po operačním výkonu několikanásobné hladiny. Tyto receptory v pooperačním období dosahují maximálních hladin synchronně s IL-6 a TNFalfa, ale dosaženými hladinami je převyšují. Hladiny IL-2, sIL-6R a IL-10 mají povlnnější průběh, ale přesto se jejich maximální hodnoty statisticky signifikantně odlišují od jejich předoperačních hladin. IL-2 a sIL-6 nejsou schopny odlišit významnou bakteriální stimulaci organismu od tkáňového traumatu způsobeném operačním výkonem.

Dosud není jasné, proč maximální hodnota sérové koncentrace IL-1ra u pacientů v septickém šoku se špatnou prognózou je 10 - 100 x vyšší než u přežívajících.

Indukce tvorby IL-1 po operaci je následována aktivací tvorby jeho membránových receptorů (IL-1R) v různých tkáních organismu. Je známo, že akcelerace tvorby membránových receptorů je větší než vlastní produkce IL-1. Složitá regulace působení IL-1, závislá nejenom na hladině IL-1, ale rovněž na hladině jeho solubilního antagonisty, stejně jako na koncentraci solubilních a membránových receptorů ukazuje, že měření plazmatických hladin jednoho parametru nemůže plně vystihnout aktuální situaci pro- a protizánětlivých ukazatelů. Kombinované vyšetření hladin prozánětlivých cytokinů (např. IL-6, IL-8) a protizánětlivých cytokinů (např. IL-1ra, IL-10) a solubilních receptorů a zejména jejich dynamika v čase pravděpodobně umožní vystihnout u septických pacientů okamžik, kdy systémová zánětlivá reakce získává autoagresivní charakter a je na místě její farmakologická inhibice (6).

Dynamika plazmatických hladin IL-8 je obdobná s dynamikou IL-6 [17]. Podnětem k produkci IL-8 je působení LPS a jiných cytokinů, především TNF, IL-1 a INF, ne však IL-6. Produkují ho zejména monocyty, makrofagy a trombocyty. Působí prostřednictvím specifického receptoru, který se nachází jen na neutrofylech a proto je IL-8 významným

chemotaktickým a aktivačním cytokinem neutrofilů. Byl popsán chemotaktický efekt pro T buňky a eozinofily. Některé studie popisují IL-8 jako podpůrný faktor pro Keratinocyty a byl popsán autokrinní růstový efekt pro buňky melanomu. In vivo byla popsána stimulace angiogeneze. Tyto aktivity ukazují na významné působení ve zprostředkování zánětlivé odpovědi. Podobně jako IL-6 není tento cytokin toxický při exogenním podání.

V cytokinové kaskádě zánětlivé odpovědi má IL-10 postavení imunosupresivního faktoru, který inhibuje některé Th1 buňkami produkované cytokiny (IL-2, IFN γ a TNF α), ale i monocyty produkované cytokiny (IL-1, IL-2, IL6, IL-8, IL-12), suprimuje prostaglandin E2 a superoxidový aniont. Naopak IL-10 stimuluje proliferaci B buněk a sekreci protilátek. experimentálně bylo prokázáno že neutralizace IL-10 během endotoxemie zvyšuje produkce TNF i mortalitu, ale podání IL-10 redukuje TNF hodnoty a asociované k tomu nepříznivé efekty. [18]. Indukce IL-10 ztenčuje systémovou zánětlivou reakci a redukuje poměr mortalita během septické peritonitidy u myši. [19]. Avšak excesivní administrace rIL-10 ve stejných myších prokázali zvýšenou mortalitu.

Plazmatické koncentrace IL-1, IL-6, IL-8 a TNF na jedné straně a IL-1ra, sIL-2R, sIL-6R a IL-10 na straně druhé odráží rovnováhu mezi prozánětlivým (SIRS, systemic inflammatory response syndrome) a protizánětlivým (CARS, compensatory anti-inflammatory response syndrome) potenciálem. Indexy, vycházející z poměrů těchto ukazatelů však zatím nepotvrdily svoji prognostickou hodnotu. Pravděpodobným vysvětlením je fakt, že plazmatické hladiny uvedených cytokinů neodráží jejich skutečnou lokální tvorbu a tkáňovou účinnost, nereflktují ani dynamiku membránových a uvolněných receptorů v různých fázích zánětu. Solubilní receptory navíc nepředstavují pouze eliminační mechanismus snižující množství cirkulujících cytokinů jejich vyvázáním z oběhu, naopak v některých situacích představují transportní proteiny chránící cytokin před urychlenou degradací a umožňující jeho vazbu na cílovou buňku. Zvláštní úlohu v této souvislosti plní AM, jeden z největších proteinů lidského séra. Přestože je klasicky řazen mezi APP, jeho význam se blíží solubilnímu cytokinovému receptoru s široce zaměřenou afinitou k řadě pro- i protizánětlivým cytokinům. AM váže v cirkulaci řadu cytokinů a hormonů. V závislosti na přítomnosti dalších faktorů, které určují konformaci molekuly AM, dochází buď k proteolytické degradaci cytokinu a hormonu nebo naopak ke stabilizaci jeho molekuly a protekci před působením dalších proteolytických enzymů.

Tyto a další skutečnosti nemohou prosté plazmatické koncentrace cytokinů, cytokinových receptorů a APP postihnout. Cytokiny tak zůstávají především v okruhu zájmu základního

výzkumu a klinických studií, zatímco jejich diagnostické uplatnění v akutních stavech, jakým je časné pooperační období, naráží nejen na technické a finanční problémy, ale i na obtížně překonatelné problémy interpretační.

Většina autorů se shoduje ve tvrzení, že pouze sériové stanovení, nejlépe ve 12 hodinových intervalech v rozmezí do 72. h po výkonu, může odlišit nekomplikovaný pooperační průběh od počínající sepse. Jednorázové vyšetření v tomto období, pokud hodnoty nejsou vysloveně septické, zpravidla nevystihuje směr dalšího vývoje hladiny, a má tedy jenom omezené opodstatnění.

Problém kitového provedení ELISA metodik pomáhá vyřešit centralizace těchto vyšetření do jednoho pracoviště v regionu nebo velké nemocnici, které je schopno jak statimového vyhodnocení, tak i odborné konzultace výsledků.

6. CYTOKINY V ROZVOJI ZÁNĚTLIVÝCH POOPERAČNÍCH KOMPLIKACÍ

6.1 Cytokiny jako spouštěcí proteiny pooperačního multiorgánového selhání

Operační zákrok, stejně jako každý jiný nociceptivní podnět (infekce, popáleniny, pankreatitida, trauma apod.) spouští kaskádu imunologických, neurologických, endokrinních, metabolických a kardiovaskulárních změn v rámci systémové odpovědi organismu na narušení integrity. Tyto změny, souhrnně označované jako reakce akutní fáze, znamenají nastartování obranných a reparačních procesů. Systémovým nespecifickým charakterem ale znamenají pro pacienta i nezanedbatelné riziko doprovodných komplikací (hyperkoagulační stav, komplikace protrahovaného stresového hyperkortisolismu apod. (136).

Na inzult systémové povahy (např. na generalizovanou infekci, ozáření) organizmus fyziologicky odpovídá celotělovou (systémovou) zánětovou odpovědí (SIRS, systemic inflammatory response syndrome). Systémová zánětová odpověď je odpovědí obrannou, ale v řadě případů nabývá autoagresivní charakter projevující se komplexní alterací homeostázy. Hranice, kde začíná autoagrese, tj. rozmezí mezi fyziologickou intenzivní, ale regulovanou odpovědí na silnější podnět a patologickou dysregulovanou reakcí, je široká a klinickými parametry obtížně definovatelná.

SIRS představuje akutní ohrožení organismu, obrannou odpověď organismu se snahou lokalizovat a eliminovat exogenní nebo endogenní patogen infekčního (sepsy) nebo neinfekčního původu. Je komplexním narušením homeostázy a destruktivním poškozením organismu vlastní obrannou odpovědí. K monitorování SIRS, resp. sepsy se využívá skóre integrující vitálně významné klinické a laboratorní parametry (APACHE II, III, TISS apod.) ve snaze anticipovat přechod do stádia multiorgánového selhání (MODS, multiorgan distress syndrome).

Jako sepse je označován SIRS s dokumentovanou infekcí. Pojem těžká sepse je vyhrazen SIRS infekční etiologie s alterací kardiovaskulárního systému.

SIRS může vyústit ve stav multiorgánové dysfunkce - situaci, kdy orgánové funkce nejsou dostačující pro udržení homeostázy. Syndrom multiorgánového selhání (MODS) je systémovou hemodynamickou poruchou vedoucí k hypoperfuzi orgánů, tkáňové hypoxii, event. ke smrti organismu. Porucha hemodynamiky při MODS v důsledku těžké sepsy má charakter kapacitní nerovnováhy (vazodilatace, hypovolémie), na tkáňové úrovni vzniká nerovnováha bilance dodávky a spotřeby kyslíku. Změny původně kompenzačního charakteru přechází v reverzibilní, posléze ireverzibilní dekompenzaci s letálním vyústěním. V rozvinutých fázích se jedná o uniformní sled změn mikro- a makrocirkulace, metabolismu, neuroendokrinního systému atd. MODS je příčinou vysoké, prakticky neklesající mortality pacientů se syndromem systémové zánětlivé odpovědi (kolem 25% hospitalizovaných se SIRS na jednotkách intenzivní péče).

Prvními pozorovanými známkami obranné reakce po inzultu jsou, nezávisle na etiologii, lokální a systémové hemodynamické změny způsobené vazodilatací nebo vazokonstrukcí. V regulaci těchto dějů sehrává systémově dominantní úlohu sympato-adrenální aktivace.

Reakce endotelových buněk na stimulaci má pak univerzální mechanismy, primární reakcí je produkce protektivních mediátorů (aktivátor plazminogenu tPA, heparinu podobné látky, oxid dusnatý a prostacyclin). Silnějším podrážděním dochází ke kontrakci buněk na bazální membráně, deskvamaci starých buněk a vzniku intracelulárních mezer se vznikem trombogenní intimy (120, 127). Endotelové buňky jsou rychle aktivní, avšak aktivita bez další stimulace během několika desítek minut odeznívá. Pokud však inzult přetrvává déle než několik hodin, dochází postupně k plné aktivaci monocytů a makrofágů a produkci řady cytokinů s nastartováním kaskády zánětlivé odpovědi (7, 53, 89). Efekty cytokinů se často překrývají, doplňují a přes řadu jednoduchých a složitých spětnovazebných mechanismů na

různých úrovních vzájemně ovlivňují, jak již bylo uvedeno. V souvislosti se vznikem sepse a MODS se nejčastěji hovoří o IL-1, IL-6, TNF α a INF γ (10, 13). Cytokiny ve spojení s neuroendokrinním systémem mají klíčovou úlohu v metabolické odpovědi organismu na chirurgický výkon a v přechodu od nekomplikovaného hypermetabolizmu k terapeuticky velmi obtížně ovlivnitelnému orgánovému selhání.

Výběr pacientů

Rozdílné výsledky publikovaných studií při použití stejného léčebného postupu jsou často důsledkem rozdílných kritérií, která lékař volí pro zařazení pacienta. Žádná z dosud publikovaných studií nevyžadovala k zařazení pacienta do septické skupiny pozitivní hemokulturu. Výběr pacientů se opírá především o klinické známky sepse – hypotenzi a různý stupeň orgánové dysfunkce. Použití klinických ukazatelů je nezbytností, protože více než 50 % septických pacientů nemá aktuálně bakteriémii a je skutečností, že těžká infekce je pouze jednou stránkou patogeneze sepse. Základem pro výběr jsou všeobecně uznávaná kritéria syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS), přijatá v roce 1992 a opírající se o čtyři parametry: tělesnou teplotu, srdeční frekvenci, dechovou funkci a hladinu leukocytů. Požadovaná kritéria SIRS ale splňuje většina pacientů jednotek intenzivní péče a zřejmě dokonce někteří ambulantní pacienti. K dalšímu matení pojmů přispívá místy užívané dělení na »sepsi«, »těžkou sepsi« a »septický šok«. Výsledkem jsou další překážky při srovnávání a hodnocení jednotlivých studií. Nejčastějšími požadavky pro zařazení pacienta do testované skupiny jsou: klinické známky těžké infekce, teplota > 38 stupňů C nebo < 36 stupňů C, srdeční frekvence > 90/min, tachypnoe > 20/min nebo mechanická ventilace, systolický tlak < 90 torr nebo setrvalý pokles o 40 torr. nereagující na léčbu, dysfunkce 2 a více orgánů (s hypoxémií, oligurií, trombocytopenií, alterací CNS apod.).

Vlastní soubor:

Na 1. chirurgické klinice VFN jsme vyšetřili 18 pacientů s prokázanou nitrobrišní sepsí, všichni splňovali kriteria sepse dle R.C.Boneho. V této skupině byli zařazení pacienti se sterkorální peritonitidou /11/, s tvorbou nitrobrišního abscesu při akutní pankreatitidě /3/ a biliární peritonitidou /4/. Vzhledem k velikosti souboru nebyla možná vzájemná statistická analýza těchto skupinek pacientů. Sledovali jsme u těchto pacientů IL-1, IL-6, IL-8 a TNF α .

Absolutní hodnoty vyšetřovaných markerů se v této skupině vzájemně výrazně nelišily (Tab 13). Sledované hodnoty nebyly déle sledovány v čase ani v závislosti na terapii. Měření byla prováděna ve stádiu rozvinuté sepse a měla význam pro utvoření modelové situace-

maximální stimulace obranné reakce organismu. Předpokládali jsme, že tato modelová situace je již spojena s dysregulací produkce cytokinů, jejich solubilních receptorů a receptorových antagonistů.

6.2 Přínos cytokinů v diagnostice pooperační nitrobřišní sepse

Průměrná hodnota IL-6 u plně rozvinutého septického stavu dosahovala 3258 ± 98 ng/l a byla statisticky signifikantně vyšší $p < 0.01$ ve srovnání s hladinou ve 24. hodině po výkonu u 1. a 2 skupiny.

Hladina IL-1 β dosahovala v sepsi 41.2 ± 8.2 ng/l. Tato hladina signifikantně nelišila od hladiny ve 12 hodině po výkonu u předchozích 2 skupin.

Průměrnou hladinu IL-8 u septických pacientů jsme naměřili 916 ± 322 ng/l, na $p < 0.05$ signifikantně vyšší proti hladinám 36. hodiny u nekomplikovaných pacientů.

Hladina TNF α v septickém období dosahovala 416 ± 225 ng/l a byla na $p < 0.05$ vyšší než maximální hladina /tj. 18. hodina po operaci/ u nekomplikovaných skupin.

Dosahované hladiny cytokinů u septických pacientů uvádíme v tab.13.

Tab.13 Hladiny vybraných cytokinů u septických pacientů

Cytokin	Pooperační sepse	Zdravé osoby
IL-1 β (ng/l)	$41,2 \pm 8.2$	27 ± 4.6
IL-6 (ng/l)	3258 ± 1845	12 ± 8
IL-8 (ng/l)	916 ± 322	24.2 ± 8.3
TNF α (ng/l)	416 ± 225	46 ± 5.3

Diskuze

Je známo, že cytokiny a ostatní mediátory působí ve složitých sítích a kaskádách. Úlohy cytokinů se mnohdy překrývají a je těžké označit jeden mediátor za hlavní a klíčový. Nicméně právě TNF α je považován s vysokou pravděpodobností za rozhodující mediátor při rozvoji sepse, a to na základě těchto faktů:

- Hladiny TNF α jsou zvýšené u většiny septických nemocných,
- Koncentrace TNF α rychle stoupá po aplikaci endotoxinu v experimentu na zvířatech,
- Aplikace vysokých dávek TNF α v experimentu na zvířatech vyvolává příznaky podobné septickému šoku.

Prozánětlivé cytokiny, IL-1, IL-6, IL-8, INF γ , pravděpodobně nemají tak zásadní postavení v rozvoji patogenetických mechanismů sepse a MODS a jejich účinek se zdá spíše modulující. Vysoká plazmatická koncentrace TNF α je signifikantní pro rozvoj MODS, ale nikoliv pro prognózu vyléčení. Ukazuje se, že mnohem důležitější v patogenezi MODS je rovnováha mezi TNF α a jeho inhibitory. Biologická signifikace vysoké plazmatické hladiny přirozených TNF α inhibitorů je dosud nejasná, kromě neutralizace biologické aktivity TNF α .

Časná detekce pooperační zánětlivé komplikace, to znamená ještě před zafixováním důsledků neregulované produkce zánětlivých mediátorů, má zcela zásadní vliv na prognózu terapeutického zásahu.

6.3 Srovnání úloh vybraných cytokinů a APP během inzultu

Hladiny cytokinů a APP jsou v těsném poměru, jak ke systémové reakci organismu na zánětlivý podnět a k anatomickému rozsahu zánětlivé tkáně, tak k aktivitě imunitní reakce. Ale chirurgická operace také způsobuje vzestup jak cytokinových (hlavně IL-6), tak APP hladin. [5]. I když vědecké a klinické studia ukazují tyto odpovědi, přesný mechanismus iniciace, regulace a udržování této stresové reakce prozatím není objeven. Nedávno byly prostudovány interakce mezi imunitní a neuroendokrinní systémy. Tento komplex interakce mezi prozánětlivými cytokiny a hypothalamo-hypofyzo-adrenální osou (částečný synergismus, částečný antagonismus) podmiňuje APP syntézu v játrech a elevaci sérových hladin CRP, α_1 AT, α_1 -acid glycoproteinu a jiných APP. Přestože možná účast disbalance mezi prozánětlivými cytokiny, zánětlivými cytokiny, solubilními cytokinovými receptory a APP, v rozvinutí pooperační stresové odpovědi byl předpokládán, patofyziologický význam těchto faktorů není zcela jasný.

Odpověď akutní fáze je zpuštěna zánětlivými mediátory – cytokiny, zvláště TNF a IL-1 [4], centrální úlohu má v této odpovědi IL-6 (např. v indukci syntézy APP

v játrech.). Ve srovnání s CRP (kulminuje na 3. den v nekomplikovaných pacientech), IL-6 je vylučován v časné období fáze akutní odpovědi (18-24hod.). Přestože CRP je považován za užitečný klinický indikátor akutního zánětu [6], jeho hladiny jsou zvýšeny později než IL-6 a TNF. Produkce APP v hepatocytech může být zhoršena dysfunkcí jater a proto APP mohou být nespolehlivým parametrem u některých nemocných s chronickou nemocí jater. Monitorování IL-6, TNF a IL-8 má nejvyšší diagnostickou hodnotu 72.hodinu po operaci [7]. Je známo, že, spíše perzistence TNF [8,9] a IL-6 v séru, než jejich vrcholové hodnoty, ukazují na iniciaci sepse a předpoví špatný výsledek u septických nemocných[10,11].

Z hlediska kvantitativních změn po intenzivním zánětlivém nebo jiném nociceptivním stimulu můžeme odlišit 3 skupiny pozitivních APP:

- vzestup koncentrací kolem 50% (ceruloplasmin, C3 a C4 složka komplementu)
- vzestup koncentrací 2-4x (alfa₁-antitrypsin, alfa₁-antichymotrypsin, haptoglobin, fibrinogen)
- vzestup koncentrací až 1000x (CRP, serový amyloid A)

U některých zánětlivých onemocnění mohou být určité APP aktivněji katabolisovány než u nekomplikovaného průběhu zánětu. Důsledkem je neproporcionálně nižší koncentrace vzhledem k aktivitě zánětu, posuzované podle dalších ukazatelů. To platí zejména pro haptoglobin a hemopexin (při hemolýze), pro fibrinogen (za přítomnosti intravaskulární koagulace) a pro α₁-antitrypsin (u vaskulitidy s uvolněním leukocytárních enzymů). Taková disharmonická odpověď může svědčit pro přítomnost komplikací základního onemocnění, ale snižuje validitu jednotlivých proteinů jako markerů aktivity zánětu.

Pro odhalení časné pooperační septické komplikace je nejlepší sledovat následující parametry: CRP a α₁AT po 72 hod. My doporučujeme pozorovat tyto parametry v nemocných se zvýšenou nebezpečí pooperační septické komplikace.

Hladiny proteinů akutní fáze stejně jako hladiny cytokinů odráží systémovou zánětlivou aktivaci a jejich vzestup v časném období je nespecifický k vyvolávající příčině (operační trauma, krvácení, infekce) (4). V rozvaze u lůžka pacienta, které z vyšetřovacích metod dát přednost, je třeba zvážit následující aspekty:

- řádově kratší poločas cytokinů může vést k "falešně" negativním výsledkům v pozdějších fázích zánětlivé odpovědi, na druhou stranu umožňuje dříve zachytit časné změny - zejména v perioperačním období;

- spektrum APP poskytuje i další informace - nutriční stav, případná hemolýza (haptoglobin, hemopexin), sideropenie (transferin), hyperkoagulace (fibrinogen) ;
- rozdílná dynamika jednotlivých APP, časných a pozdních reaktantů, spolu s rozdílnými poločasy eliminace dává plastičtější obraz o průběhu zánětu;
- destičkové ELISA metodiky měření cytokinů nejsou vhodné pro statimové rutinní vyhodnocení, které jediné má pro chirurga diagnostický význam; nově zaváděné sety již tento zásadní problém řeší a umožňují i stanovení jednotlivých vzorků v reálném čase;
- stanovení APP nefelometrickou analýzou je výrazně levnější než stanovení cytokinů ELISA metodikou, je dostupnější i v menších zdravotnických zařízeních;
- analýza APP je méně náročná na podmínky odběru a zpracování vzorku krve, odběr na cytokiny vzhledem k jejich rychlé degradaci *ex vivo* vyžaduje po odběru krve její bezprostřední zpracování.

Dynamika změn APP v průběhu reakce akutní fáze odráží s příslušným časovým posunem aktivaci cytokinové kaskády a vzestup hladiny cytokinů (Tab 14).

Fyziologická úloha některých APP není zcela objasněna. Nepochybný je ale především jejich diagnostický význam zejména v urgentní medicíně. Toto postavení si zachovávají i v době zavádění rutinních metodik stanovení plasmatických koncentrací cytokinů. Naopak kombinace vyšetření hladin vybraných cytokinů s APP poskytuje plastičtější obraz odpovědi organismu na operační trauma a přispívá k diferencální diagnostice pooperačních komplikací.

Tab. 14 Diagnostická výtěžnost APP (132)

protein	reaktant akutní fáze	další diagnostický význam	genetická abnormalita
alfa ₁ -antitrypsin	pozitivní, časné změny	hepatocelul.karcinom (vzestup)	emfysém, hepatopatie novorozenců, degenerativní artritida, fibróza pankreatu
alfa ₁ -kys.glykoprotein	pozitivní, časné změny		-
alfa ₂ -makroglobulin	minimální dynamika		-
haptoglobin	pozitivní, pozdní změny	hemolýza (pokles) - hemorhagická pankreatitida, porfýrie, hemolytické anémie	řada subtypů, bez klinické symptomatologie
ceruloplasmin	pozitivní, pozdní změny		syndrom hepatolentikulární degenerace (Wilsonova choroba)
hemopexin	pozitivní, nevýrazné pozdní změny	hemolýza (pokles) - viz haptoglobin	-
C reaktivní protein	pozitivní, časné změny (až 1000-násobný vzestup)		-
albumin	negativní, pozdní změny	exsudativní enteropatie, proteinurie, hepatopatie, malnutrice, diluce při infuzích (pokles)	-
prealbumin	negativní, časné změny	malnutrice, katabolismus, hepatopatie (pokles)	-
transferin	negativní, časné změny	sideropenie (vzestup) malnutrice, hepatopatie (pokles), kvalitativní změny (asialotransferinémie) u alkoholiků	vrozená atransferinémie

7. PROCALCITONIN JAKO UKAZATEL BAKTERIÁLNÍHO ZÁNĚTU

Procalcitonin (PCT) je protein s molekulovou váhou 13 kD. Plazmatická koncentrace u zdravého organismu je nižší než 0.1 ng/ml a poločas rozpadu *in vivo* je asi 25-30 hod.

(137,138). Vzestup sérové hladiny PCT je indukován bakteriálním zánětem, sepsí a MODS. PCT detekovatelný v plazmě během zánětu není tvořen C-buňkami štítné žlázy. Dynamika změn při zánětu má stejný charakter i u jedinců po tyreoidektomii. „Zánětlivý“ PCT pravděpodobně vzniká v neuroendokrinních buňkách plic nebo střeva. Hlavním stimulem jeho tvorby jsou časně prozánětlivé cytokiny, zejména IL-1, a IL-6. Sekrece PCT je indikována rozsáhlým operačním výkonem (139). Přesto signifikantně vysoké hladiny PCT po nekomplikovaném rozsáhlém operačním výkonu byly řádově nižší než při probíhající sepsi. Nejvyšších plazmatických hladin dosahuje PCT u akutních bakteriálních infekcí a při sepsi. PCT je vysoce selektivní vůči systémovému bakteriálnímu zánětu, nikoliv k lokální infekci. Výhodou PCT je uváděná schopnost odlišit bakteriální zánětlivou odpověď organismu od nezánnětlivé systémové reakce. Na rozdíl od cytokinů akutní fáze zánětu (TNF, IL-1, IL-6), jejichž sérové hladiny jsou efektivně snižovány přítomností přirozených inhibitorů, většinou solubilních receptorů [24přehledový článek], u PCT žádná publikovaná data nedemonstrují podobné mechanismy regulace jeho hladin. U pacientů s chronickými zánětlivými chorobami (revmatoidní artritida) nebyly nalezeny zvýšené hodnoty PCT.

Dosavadní studie neprokázaly, že by se plasmatický PCT vázal s významnější afinitou na buněčné receptory kalcitoninu, a nebyly nalezeny ani specifické receptory pro PCT. Přestože je nepravděpodobné, že by organismus v průběhu zánětu plynul proteosyntetickou kapacitou na tvorbu afunkčního mediátoru, nebyl do současné doby podán důkaz o fyziologické úloze plasmatického PCT. Dosavadní hypotézy, opírající se o zvířecí modely nebo o experimenty *in vitro*, se zaměřují na potenciální úlohu PCT v následujících oblastech:

- metabolismus kalcia
- cytokinová síť a modulace syntézy oxidu dusnatého
- analgetický účinek

Hypotetická úloha PCT v regulaci metabolismu kalcia a fosfátů v průběhu sepse vychází ze strukturální podobnosti PCT a hormonu kalcitoninu. PCT obsahuje aminokyselinovou

sekvenci kalcitoninu. Podobnost primární struktury proteinového řetězce je ale méně významná než zřetelné odlišnosti sekundární a terciální struktury. Tvar molekuly kalcitoninu je formován disulfidickým můstkem mezi cysteinovými zbytky na 1. a 7. pozici. Takto utvořený cyklus 7 aminokyselin na N-konci spolu s hydroxylovaným prolinovým zbytkem na C-konci přitom umožňuje vysoce afinní vazbu kalcitoninu na cílový receptor. N-terminální fragment zachovaný v molekule PCT brání vzniku tohoto disulfidického můstku. To vysvětluje i dosavadní experimentální výsledky podle kterých se plasmatický PCT neváže na receptory pro kalcitonin. Vztah mezi PCT a metabolismem kalcia a fosfátů nebyl dosud prokázán. I když u septických pacientů dochází často k hypokalcémii, hladiny kalcia a fosfátů s hladinou PCT významně nekorelují.

Zapojení PCT do cytokinové sítě by mělo opodstatnění. Cytokiny hrají rozhodující roli v regulaci syntézy PCT během zánětu a hladiny hlavních prozánětlivých cytokinů u septických pacientů významně korelují s hladinou PCT. Zvažuje se i možná úloha PCT v modulaci tvorby oxidu dusnatého, kde se prozánětlivé cytokiny rovněž uplatňují. Důkazy ale zatím chybějí.

Jedna z posledních studií přisuzuje PCT úlohu „nesteroidního analgetika“ během zánětu. Řadu let je znám analgetický efekt kalcitoninu a terapeuticky zejména u osteolytických metastáz využíván, i když jeho mechanismus není zcela jasný. Podobně by se mohly uplatnit i vysoké hladiny PCT při zánětu. *In vitro* byl prokázán pokles koncentrace tromboxanu B₂ po přidání kalcitoninu nebo PCT. Efekt je závislý na koncentraci obou hormonů a je výraznější u PCT než u kalcitoninu. K významnému snížení koncentrace tromboxanu dochází již při hladinách, které jsou u pacientů obvykle dosahovány. Tento účinek, pravděpodobně daný inhibicí prostaglandin-G,H-syntetázy, podobný působení nesteroidních analgetik, přitom nevyžaduje vazbu hormonu na buněčný receptor.

Úlohu PCT jako „pozitivního“ faktoru v zánětlivé odpovědi zpochybňují výsledky recentní studie. Je známo, že přetrvávající elevace hladiny PCT u septických pacientů svědčí pro špatnou prognozu. Přitom je hypoteticky možné, že PCT tuto špatnou prognozu nejen reflektuje, ale přímo se na ní dosud neznámým mechanismem podílí. Experiment, při kterém byl pokusným zvířatům při sepsi dodáván exogenní PCT, prokázala zvýšení jejich mortality ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat s navozenou sepsí bez podání PCT. Podobně blokáda endogenní tvorby PCT mortalitu septických zvířat signifikantně snížila (140).

Hladiny PCT v různých patologických stavech

Nejvyšších plasmatických hladin dosahuje PCT u akutních bakteriálních infekcí a při sepsi. Plasmatická hladina PCT se zvyšuje u bakteriálních infekcí s celkovou zánětlivou reakcí. Lokální bakteriální záněty, stejně jako opouzdřené abscesy PCT významně nezvyšují. Zvýšení hladiny je úměrné typu a rozsahu zánětu (tab. 15).

PCT se nezvyšuje nebo jen mírně u zánětů virových a autoimunitních a u neoplastických projevů. Kromě bakteriálních zánětů jsou vysoké plasmatické hladiny PCT popisovány i u medulárního karcinomu štítné žlázy nebo u malobuněčného karcinomu plic, kde se jedná o paraneoplastickou produkci. Zvýšené hladiny PCT jsou dále známy u pacientů s renálním selháním. Vyloučeny byly nejrůznější lékové interakce, hladinu neovlivňuje ani vlastní operační trauma ani extrakorporální oběh.

Při těžkých bakteriálních infekcích dosahují plasmatické hladiny PCT až 1000 µg/l. Normální koncentrace v plasmě nebo v séru u zdravých jedinců přitom nepřesahují 0,5 µg/l (tab. 16).

Pokles hladiny PCT na konci akutního zánětlivého období je ovlivněn dlouhým plasmatickým poločasem proteinu ve srovnání s výrazně kratším poločasem eliminace cytokinů.

Tab. 15 Hladiny prokalcitoninu v zánětlivých stavech

<0,5 µg/l	zdravé osoby
0,5-1 µg/l	chronický zánět
0,5-2 µg/l	viróza (hepatitis B)
0,5-2 µg/l	lehká, lokalizovaná bakteriální infekce
5-20 µg/l	SIRS
10-1000 µg/l	sepsy, multiorgánové selhání

SIRS = syndrom systémové zánětlivé odpovědi

Tab. 16 Hodnocení plasmatických koncentrací prokalcitoninu

<0,5 µg/l	normální hodnoty
0,5-2 µg/l	mírné zvýšení
2-30 µg/l	vysoké hodnoty
30-100 µg/l (a vyšší)	velmi vysoké hodnoty

Výběr pacientů pro stanovení prokalcitoninu

Pro sledování dynamiky sérových hladin PCT v pooperačním období jsme použili vzorky stejného souboru jako pro cytokiny.

Sérová hladina PCT byla stanovena imunoluminometrickou analýzou v duplikátech (LUMItest ® PCT Kit Brahms) ve spolupráci s imunologickou laboratoří VFN. Statistické zpracování bylo vyhodnoceno počítačovými programy Stati a Statigraf-nepárového a párového T Testu a analýzou rozptylu ANOVA.

Výsledky

Výchozí (předoperační) hladiny prokalcitoninu byly stejné u 1. a 2. skupiny a signifikantně se nelišily od sérových hladin u zdravých osob. V prvním případě (1. a 2. skupina) koncentrace PCT pohybovala v rozmezí 0.3 ± 0.2 ng/ml. U zdravých osob koncentrace PCT byla naměřena v hodnotě 0.2 ± 0.1 ng/ml. Sérové hladiny PCT dosahovaly nejvyšších hodnot 24. hodinu po nekomplikovaném resekčním zákroku 1.2 ± 0.5 ng/ml u 1. skupiny a 1.3 ± 0.6 ng/ml u 2. skupiny. Tyto hodnoty se statisticky významně lišily od pooperačních septických sérových hodnot PCT ($P < 0.01$). Hladiny PCT u pacientů s pooperační sepsi dosahovaly v průběhu 44.5 ng/ml. (Tab. 17, 18).

Tab.17 Dynamika PCT po resekci tlustého střeva – průměrné hodnoty

	Před operací	+12 hod.	+24 hod.	+36 hod.	+48 hod.	+72 hod.	Pooper. sepse	Zdravé osoby
PCT ng/ml	0.3	1.0	1.1	0.9	0.7	0.4	44.5	0.2

Tab. 18 Dynamiky PCT po hemipankreatoduodenektomii – průměrné hodnoty

	Před operaci	+12 hod.	+24 hod.	+36 hod.	+48 hod.	+72 hod.	Pooper. sepse	Zdravé osoby
PCT ng/ml	0.3	1.1	1.2	1.0	0.8	0.6	44.5	0.2

8. LEPTIN - NOVÝ ZÁNĚTLIVÝ UKAZATEL

Leptin je hormon a reaktant akutní fáze s pleiotropními efekty v klidovém i zánětlivém období. Efekty leptinu v reakci akutní fáze pravděpodobně zahrnují i modulaci stresové hypotalamo-pituito-adrenální osy. V této práci hodnotíme dynamiku akutních změn leptinu a glukokortikoidů v modelových situacích infekční a neinfekční zánětové reakce.

Leptin byl identifikován před několika lety jako produkt Ob genu lokalizovaného na 7. lidském chromozomu. Leptin je tvořen především tukovými buňkami a endokrinními účinky je zapojen do mechanismu regulace množství tělesného tuku a udržení tělesné hmotnosti. Receptory pro leptin jsou exprimovány především v hypotalamu, ale jejich přítomnost byla prokázána i v řadě dalších tkání. Prostřednictvím svých receptorů leptin indukuje řadu metabolických, psychických a endokrinních dějů.

U myší s vyřazenou syntézou leptinu nebo receptoru pro leptin docházelo k excesivnímu nárůstu tělesné hmotnosti pokusných zvířat spolu s rozvojem inzulínové rezistence. Navzdory těmto experimentálním poznatkům se ale nepotvrdily představy o narušené sekreci leptinu jako etiologickém faktoru tzv. primární obezity u lidí (152). Hladiny leptinu jsou prakticky u všech obézních pacientů zvýšené, výrazně korelují s body mass indexem (BMI) a s množstvím tělesného tuku (163). Obezita spojená s defektní tvorbou leptinu nebo jeho receptoru u lidí je v literatuře známa jen z několika kazuistik.

V posledních letech přibývají znalosti o působení leptinu v různých fyziologických i patologických situacích. Vedle své základní role regulátoru množství tělesného tuku a příjmu potravy je leptin nově řazen i mezi mediátory reakce akutní fáze ovlivňující neuroendokrinní děje systémové zánětlivé odpovědi. *In vitro* na buněčných liniích i v experimentu na zvířeti bylo prokázáno, že exprese leptinu je stimulována řadou zánětlivých faktorů. Zcela nejasná ale zůstává úloha leptinu v těchto stavech.

Především se předpokládá, ale experimentálně to nebylo jasně doloženo, že vzestup leptinu v průběhu systémové zánětlivé reakce přispívá k anorexií a kachexií, která doprovází akutní a chronické zánětlivé stavy (169). Stejně tak leptin s vlastnostmi endogenního pyrogenu může prostřednictvím svých receptorů v hypotalamu potencovat pyrogenní efekt IL-1. Konečně stimulační hematopoetický efekt leptinu na prekursorů lymfocytární řady (159, 160) a jeho stimulační vliv v angiogenezi, prokazovaný *in vitro*, může modifikovat průběh akutní i reparační fáze zánětlivé odpovědi (171).

Leptin je strukturně, evolučně a podle současných názorů i funkčními charakteristikami blízký IL-6 a cytokinům této skupiny, kam řadíme IL-13, onkostatín M, granulocytární kolonie stimulující faktor (G-CSF), leukémii inhibující faktor, ciliární neurotrofinní faktor, kardiostrofin-1 a neurotrofin-1. Spolu s G-CSF je ale leptin jediným členem této skupiny, který k transdukcii signálu na membráně cílové buňky nevyužívá receptorovou podjednotku gp130. Tzv. dlouhá forma receptoru pro leptin (150 kD) je ale uspořádáním polypeptidového řetězce podobná molekule gp130 a její intracelulární segment má stejné vlastnosti jako gp130 včetně indukce JAK/STAT3 mechanismu (Janus kinase / signal transducer and activator of transcription). Tento mechanismus je společný pro všechny cytokiny skupiny IL-6.

Vyjasněný zatím není vztah leptinu ke stresové hypotalamo-pituito-adrenální (HPA) ose. Dosavadní poznatky jsou dokonce v určitém rozporu. Zatímco všechny cytokiny ze skupiny IL-6 indukují *in vitro* na buněčných liniích, v některých případech i *in vivo* v experimentu na zvířeti aktivitu HPA osy a syntézu glukokortikoidů, u leptinu je popisován efekt opačný. Leptin za bazálních koncentrací pravděpodobně inhibuje aktivitu HPA osy. Kortikoidy tvorbu leptinu v adipocytech *in vitro* i *in vivo* stimulují (153, 158, 174). Toto pojetí negativní zpětné vazby (hypotalamus - kortizol - leptin) v průběhu reakce akutní fáze je nyní zpochybňováno. Je dokonce možné, že leptin v koncentracích, které jsou dosahovány v časně fázi zánětlivé reakce, syntézu kortizolu stimuluje (173).

Vlastní soubor

V této práci hodnotíme dynamiku akutních změn leptinu a glukokortikoidů ve dvou modelových situacích zánětové reakce: v časném pooperačním období (u pacientů po bandáži žaludku a po operaci kolorektálního karcinomu) bez přítomnosti infekčního faktoru a u pacientů v rozvinuté sepsi. Jako ukazatel intenzity a charakteru systémové zátěžové reakce byl sledován vývoj hladin dalších reaktantů akutní fáze - IL-6, TNF α , CRP a AAT.

Soubor pacientů a metodika

Do prospektivní studie byly zahrnuty 3 skupiny pacientů - mužů hospitalizovaných na I. chirurgické klinice 1. LF UK a VFN v Praze:

1. pacienti s kolorektálním karcinomem ve stádiu I a II, indikovaní k resekčnímu výkonu
2. obézní pacienti (III. st. obezity podle BMI) indikovaní k neadjustabilní laparoskopické bandáži žaludku
3. pacienti s prokázanou pooperační intraabdominální sepsí.

Zařazení pacientů stejného pohlaví bylo dáno rozdílnými fyziologickými hladinami leptinu u mužů a žen. Schéma odběrů u pacientů mělo dále za cíl eliminovat vliv diurnálního rytmu sledovaných parametrů, především kortizolu a leptinu. Kontrolní skupinu tvořilo 18 mužů - zdravých osob, dárců krve.

Pooperační intraabdominální sepse je modelovou situací vysoce intenzivní infekční zánětlivé stimulace. Laparoskopická bandáž žaludku a resekce kolorektálního karcinomu byly vybrány jako modelové příklady jednorázového neinfekčního stresového stimulu rozdílné intenzity. Postup provedení neadjustabilní laparoskopické bandáže žaludku je podrobně popsán v publikacích Fieda (156) a Holéczyho et al. (151). Základní charakteristiky vyšetřovaných skupin shrnuje tab. 19.

Tab. 19 Základní charakteristiky vyšetřovaného souboru

Charakteristika	resekce kolorektálního karcinomu	laparoskopická bandáž žaludku	pooperační intraabdominální sepse	kontrolní skupina
počet	16	13	22	18
věk	52 – 66 r.	34 - 51 r.	34 - 66 r.	19 - 42
BMI	23,5 ± 2,6 kg. m ⁻²	46,1 ± 6,4 kg.m ⁻²	24,8 ± 3,4 kg.m ⁻²	23,1 ± 2,2 kg.m ²

Ve 3. skupině pacientů s prokázanou pooperační bakteriální sepsí po rozsáhlém chirurgickém výkonu bylo 7 pacientů po hemipankreatektomii (34 - 52 r.), 12 pacientů po resekcii kolorektálního karcinomu (52 - 66 r.) a 3 pacienti s polytraumatem (36 - 48 r.)

S výjimkou pacientů 3. skupiny (pooperační sepse) nebyli do studie zařazováni pacienti, u kterých došlo k jakékoli operační nebo časné pooperační komplikaci. Hodnoty urey a kreatininu u sledovaných pacientů rovněž vylučovaly, že by koncentrace leptinu mohly být ovlivněny renální insuficiencí s prodloužením poločasu eliminace.

Diabetes mellitus byl uváděn v dokumentaci 2. pacientů 1. skupiny (resekce kolorektálního karcinomu), u 6 pacientů 2. skupiny (bandáž žaludku), u 5 pacientů 3. skupiny (sepse) a u žádného pacientka kontrolní skupiny. Arteriální hypertenze na farmakoterapii byla dokumentována u 2 pacientů 1. skupiny, 6 pacientů 2. skupiny a 4 pacientů 3. skupiny. V kontrolním souboru nebyli pacienti s hypertensí.

U 1. a 2. skupiny pacientů byly vzorky krve odebírány na lačno 7 dnů před operací a dále -24, +12, +24, +48 a +72 h vzhledem k začátku operačního výkonu.

U 3. skupiny (sepse) byla krev odebírána 2. den po objevení se příznaků sepse (kritéria SIRS), v 8 h ráno na lačno.

Vzorky krve kontrolní skupiny byly nabírány rovněž na lačno v 8 h.

10 ml žilní krve bylo odebíráno do zkumavky s EDTA a okamžitě centrifugováno při 3000 ot. /min. Vzorky plasmy byly uchovány při -80°C k dalšímu zpracování.

Plazmatické koncentrace leptinu byly stanoveny ELISA analýzou (BioVendor). Senzitivita metodiky je 0,5 ng/ml. K měření ACTH byla využita komerčně dostupná

RIA metodika. Dále byly měřeny plazmatické koncentrace kortizolu (RIA) a koncentrace TNFalfa a IL-6 (ELISA kity Immunotech / Coulter Company, Hamburg). Vzorky byly ve všech případech analyzovány v duplikátech. Intra- a interassay variační koeficient byl pod 5%. Hladiny C reaktivního proteinu a AAT byly měřeny nefelometrickou analýzou s využitím monoklonálních protilátek Boehringer.

Pro statistické vyhodnocení byl použit program ANOVA[®] pro Windows 95. Získaná data vykazovala normální rozložení, proto bylo možno použít Mann-Whitneyho U test pro srovnání kontrol a preoperačních hodnot, resp. Friedmanův test pro zhodnocení průběžných údajů u operovaných pacientů. Studentův test byl použit k zjištění statistické signifikance pro jednotlivá časová období operovaných pacientů. Spearmanův test a korelační analýza byly použity pro stanovení vztahu mezi různými parametry.

Výsledky

V tab. 20 jsou uvedeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky sledovaných parametrů v perioperačním období a u septických pacientů. Prezentovány jsou plazmatické koncentrace leptinu, kortizolu, ACTH, TNFalfa, IL-6, CRP a AAT.

Tab. 20 Průměrné hodnoty (\pm SD) sledovaných parametrů v perioperačním období (1 a 2), u septických pacientů (3) a u kontrol (4).

Parametr	leptin (ng/ml)	ACTH (ng/l)	P-kortizol (ng/l)	TNF α (ng/l)	IL-6 (ng/l)	CRP (mg/l)	AAT (g/l)
1. pacienti s resekcí střeva pro ca coli							
- 7. den	4,0 \pm 1,9	91 \pm 14	491 \pm 98	39 \pm 13,6 ⁺	96 \pm 51,8	22 \pm 8 ⁺	1,30 \pm 0,50
-24 h	4,1 \pm 1,8	110 \pm 22	796 \pm 106 ⁺	41 \pm 11,7 ⁺	98 \pm 53,7	24 \pm 8 ⁺	1,29 \pm 0,38
+12 h	3,0 \pm 1,1 [*]	264 \pm 88 ⁺⁺	3015 \pm 1350 ⁺⁺	158 \pm 84,4 ⁺⁺	314 \pm 68,2 ⁺⁺	45 \pm 14 ⁺⁺	1,52 \pm 0,36 ⁺⁺
+ 24 h	27,5 \pm 8,6 ⁺⁺	178 \pm 59 ⁺⁺	1989 \pm 850 ⁺⁺	258 \pm 68,1 ⁺⁺	745 \pm 217,2 ⁺⁺	61 \pm 22 ⁺⁺	1,88 \pm 0,63 ⁺⁺
+ 48 h	7,9 \pm 3,9	164 \pm 38 ⁺⁺	1552 \pm 822 ⁺⁺	241 \pm 88,6 ⁺⁺	722 \pm 188,1 ⁺⁺	76 \pm 28 ⁺⁺	2,45 \pm 0,96 ⁺⁺
+ 72 h	4,8 \pm 3,0	139 \pm 22 ⁺⁺	1450 \pm 754 ⁺⁺	128 \pm 38,9 ⁺⁺	480,2 \pm 71,7 ⁺⁺	92 \pm 29 ⁺⁺	2,82 \pm 0,64 ⁺⁺
2. oběžní pacienti s laparoskopickou neadjustabilní bandáží žaludku							
- 7. den	18,1 \pm 4,9 ⁺	79 \pm 22	647 \pm 96 ⁺	42 \pm 18,9 ⁺	102 \pm 64,4	4 \pm 4	1,08 \pm 0,51
- 24 h	18,4 \pm 5,2 ⁺	92 \pm 18	814 \pm 112 ⁺	44 \pm 16,4 ⁺	96 \pm 64,4	4 \pm 4	1,11 \pm 0,40
+ 12 h	16,9 \pm 4,2 ⁺	217 \pm 91 ⁺⁺	2647 \pm 928 ⁺⁺	114 \pm 58,6 ⁺⁺	217 \pm 78,8 ⁺⁺	38 \pm 10 ⁺⁺	1,61 \pm 0,35 ⁺⁺
+ 24 h	32,2 \pm 10,2 ⁺⁺	155 \pm 50 ⁺⁺	1452 \pm 644 ⁺⁺	214 \pm 76,5 ⁺⁺	414 \pm 214,4 ⁺⁺	59 \pm 18 ⁺⁺	1,80 \pm 0,52 ⁺⁺
+ 48 h	21,4 \pm 14,9 ⁺	130 \pm 31 ⁺⁺	1206 \pm 629 ⁺⁺	186 \pm 88,8 ⁺⁺	296 \pm 124,2 ⁺⁺	68 \pm 22 ⁺⁺	2,35 \pm 0,64 ⁺⁺
+ 72 h	19,6 \pm 8,4 ⁺	106 \pm 29 ⁺⁺	1218 \pm 968 ⁺⁺	94,6 \pm 31,4 ⁺⁺	184 \pm 74,8 ⁺⁺	72 \pm 24 ⁺⁺	2,41 \pm 0,48 ⁺⁺
3. pacienti v sepsi							
	36,8 \pm 11,2 ⁺	276 \pm 48 ⁺	2865 \pm 1568	422,4 \pm 214,5 ⁺	3321 \pm 1821 ⁺	240,8 \pm 86,6 ⁺	3,9 \pm 1,1 ⁺
4. kontrolní skupina							
	4,5 \pm 2,2	76 \pm 16	418 \pm 144	28,4 \pm 13,6	114,2 \pm 58,7	5 \pm 4	1,12 \pm 0,62

+ = statistická významnost rozdílu proti kontrolní skupině ($p < 0,05$);

* = statistická významnost rozdílu proti výchozím předoperačním hodnotám ($p < 0,05$)

V tabulce jsou uvedeny statisticky významné rozdíly proti předoperačním hodnotám (u skupin 1 a 2), resp. proti kontrolní skupině na hladině významnosti $p > 0,05$.

U 1. i 2. skupiny bylo prokázáno statisticky významné zvýšení leptinu 24 h po operaci ve srovnání s předoperačními hodnotami ($p < 0,01$, resp. $p < 0,05$) i ve srovnání s kontrolní skupinou ($p < 0,01$, resp. $p < 0,001$). Míra vzestupu v porovnání s výchozími hodnotami (výraznější u 1. skupiny) reflektuje rozsah operačního zákroku a dobu trvání operace. U 1. skupiny, ale nikoli u 2. skupiny je na 5% hladině významnosti dokumentován přechodný pokles koncentrace leptinu +12 h po operačním zákroku. Plasmatické koncentrace leptinu 48 a 72 h po operaci se u obou skupin již statisticky významně neodlišovaly od předoperačních hodnot. Elevace hladiny leptinu u septických pacientů (3. skupina) je srovnatelná s maximálními hladinami v pooperačním období u 2. skupiny, resp. na $p < 0,05$ převyšuje maximální koncentrace leptinu 1. skupiny.

Plasmatická koncentrace kortizolu a ACTH byla v prvních náběrech pacientů 1. skupiny (odběry 7 dnů před operací) v mezích normy, odpovídající kontrolní skupině, u 2. skupiny byla koncentrace kortizolu -7. den zvýšená ($p < 0,05$). Předoperační hodnoty kortizolu -1. den před výkonem byly u obou skupin zvýšené ($p < 0,05$). Hladiny kortizolu dosahovaly maxima ve vzorcích získaných 12 h po operaci ($p < 0,001$), kdy u 1. skupiny převyšovaly i průměrné koncentrace naměřené u septických pacientů, rozdíl mezi 1. a 3. skupinou ale nebyl statisticky významný. Plasmatické koncentrace kortizolu a ACTH zůstávaly u 1. i 2. skupiny zvýšené i 72 h po výkonu ($p < 0,05$).

Předoperační koncentrace TNFalfa -7. i -1. den před výkonem se signifikantně lišily od nálezů u kontrolní skupiny jak u pacientů před bandáží žaludku, tak i u pacientů s kolorektálním karcinomem. U 1. i 2. skupiny hladiny stoupaly již +12 h po výkonu a maxima dosahovaly +24 h s následným velmi mírným poklesem +48 h a výraznějším poklesem +72 h po výkonu. Koncentrace TNF α u septické skupiny byly nejvyšší ze sledovaného souboru pacientů a statisticky významně se odlišovaly jak od kontrolní skupiny ($p < 0,001$), tak i od maximálních hladin 1. a 2. skupiny ($p < 0,01$).

Dynamika vývoje IL-6 u 1. a 2. skupiny byla obdobná jako u TNFalfa, s tím rozdílem, že koncentrace IL-6 v předoperačním období byly v mezích normy. U obou skupin hladina IL-6 kulminovala 24 h po operaci, nedosahovala ale úrovně septických pacientů. Pokles koncentrací od 24 h pokračoval po celou dobu sledování do 72 h.

Koncentrace CRP byly s výjimkou předoperační fáze u 2. skupiny zvýšené ve všech vzorcích krve 1. , 2. i 3. skupiny. Vzestup 12 h od operace byl statisticky významný ($p < 0,05$). Maximálních hodnot dosahovaly hladiny CRP + 48 h po výkonu, nedosahovaly ale úrovně septických pacientů (rozdíl na hladině významnosti $p < 0,01$). Dynamika AAT měla podobný charakter, předoperační hodnoty u 1. a 2. skupiny byly ale srovnatelné s kontrolní skupinou.

Všechny sledované parametry reagovaly na operační trauma zvýšením 12 h od začátku operace s výjimkou leptinu. Maximálních koncentrací dosahovaly jednotlivé ukazatele 12 h po výkonu (kortizol), 24 h po výkonu (leptin, TNF α , IL-6), resp. narůstaly až do 72 h (CRP, AAT). Maximální pooperační koncentrace kortizolu u operovaných pacientů s resekcí tlustého střeva dosahovaly hodnot septických pacientů, stejně tak i maximální koncentrace leptinu u pacientů po bandáži žaludku. Maximální koncentrace ostatních parametrů 1. a 2. skupiny se od septických hodnot odlišovaly na hladině významnosti $p < 0,01$ (ACTH, TNF α , IL-6), resp. $p < 0,001$ (CRP, AAT).

Graf 5 znázorňuje pooperační dynamiku IL-6, CRP, leptinu a kortizolu u pacientů s resekcí tlustého střeva vyjádřenou relativními čísly vztaženými k septickým hodnotám. Zřejmý je časový posun maximálních hladin jednotlivých reaktantů v pořadí kortizol (12 h po výkonu), leptin a IL-6 (24 h), CRP (protrahovaný vzestup do 72 h po operaci).

Prokazujeme statisticky významnou závislost koncentrací TNF α a leptinu ($r = 0,49$, $p < 0,05$), IL-6 a leptinu ($r = 0,46$, $p < 0,05$), resp. leptinu a CRP ($r = 0,48$, $p < 0,05$) u septické skupiny. U žádné ze sledovaných skupin nebyly prokázána statisticky významná korelace mezi leptinem a kortizolem, resp. mezi leptinem a ACTH. Rovněž nebyla u žádné ze sledovaných skupin nalezena statisticky významná závislost koncentrace kortizolu a dalších zánětlivých parametrů (TNF α , IL-6, CRP, AAT).

Diskuse

Podle recentních poznatků je do sítě zánětlivých mediátorů zapojen i leptin, humorální produkt tukových buněk. Leptin byl objeven v r. 1995 brzy poté charakterizován jako endokrinní faktor regulující prostřednictvím receptorů v hypotalamu příjem potravy a množství tělesného tuku. Současné znalosti o fyziologickém významu leptinu přesahují toto pojetí. Leptin je součástí regulačních vazeb endokrinních a lokálních mediátorů. V průběhu syndromu systémové zánětlivé

odpovědi jeho koncentrace vlivem prozánětlivých mediátorů stoupá (154). Mechanismus této zánětlivé indukce není znám, podle experimentů *in vitro* aktivační kaskáda zahrnuje IL-1beta (155), ale nikoliv IL-6. IL-1beta paradoxně *in vitro* inhibuje syntézu leptinu, zatímco *in vivo* ji zvyšuje. Jeho stimulační efekt, který dominuje v prvních dnech zánětu, je tedy zřejmě mediován „cytokiny druhého sledu“, např. transformujícím růstovým faktorem beta (158).

Ještě méně je známo o fyziologickém významu této zánětlivé stimulace leptinu. S ohledem na hlavní roli leptinu jako regulátoru příjmu potravy se diskutuje především anorektický efekt leptinu např. u septických pacientů. Nové studie ale neprokázaly, že by se leptin významněji podílel na tomto procesu. *In vitro* prokázané, ale svým významem sporné jsou i další efekty leptinu v reakci akutní fáze – stimulace hematopoézy lymfocytární řady, stimulace angiogeneze a indukce syntézy proteinů akutní fáze. Tyto efekty - spíše než fyziologický význam leptinu - mohou reflektovat strukturální a evoluční podobnost tohoto proteinu s cytokiny skupiny IL-6, zejména s G-CSF.

Do stejné skupiny efektů lze zařadit i interakce leptinu a kortikoidní stresové osy. Řada hormonů včetně glukokortikoidů, inzulínu, inzulínu podobného růstového faktoru 1 a růstového hormonu ovlivňuje syntézu leptinu v klidovém období (152) a pravděpodobně i v průběhu zánětové odpovědi (172). Zvýšené hladiny kortizolu stimulují tvorbu leptinu v adipocytech a jeho sekreci (156). Tento stimulační efekt byl ale prokázán především při vysokých, stresových koncentracích kortizolu (170), v klidovém období kortizol hladinu leptinu prakticky neovlivňuje.

V experimentech na zvířeti, ale i u člověka bylo prokázáno, že vysoké hladiny leptinu na úrovni hypotalamu inhibují senzitivitu HPA osy na stresové podněty. Leptin rovněž působí přímo na kůru nadledvin a inhibuje sekreci kortizolu (155). Tento efekt byl prokázán i u koncentrací leptinu, které se vyskytují *in vivo*, a může mít fyziologický význam (157). Oboustranná interakce kortizolu a leptinu tak má charakter negativní zpětné vazby – stresové koncentrace kortizolu zvyšují citlivost tukových buněk na cytokiny, zvýšená hladina leptinu přímo (působením na nadledviny) i nepřímou (ovlivněním hypotalamu) inhibuje stresovou osu.

Proti této koncepci je ale vznášena řada námitek. Ukazuje se, že přímý účinek leptinu na kůru nadledviny je protražovaný. Může mít význam pro dlouhodobé nastavení bazální kortizolémie, ale ne pro modulaci kortizolémie ve stresovém období (151). Dále se zdá, že modulace tvorby CRH v hypotalamu souvisí především

s kontrolou apetitu a nikoli s aktivací stresové osy (154). Ve srovnání s IL-1beta je stimulační efekt na syntézu CRH mnohem slabší. Konečně někteří vědci jsou přesvědčeni, že leptin syntézu CRH neinhibuje, ale v závislosti na koncentraci naopak stimuluje (173). Leptin je z biochemického pohledu cytokin skupiny IL-6. Všech 7 dalších cytokinů této skupiny *in vitro* prokazatelně stimuluje tvorbu CRH v hypotalamu (tab. 21). Přesto u řady z nich tento efekt pravděpodobně nemá fyziologický význam, protože působí především jako lokální faktory s hematopoetickým, imunomodulačním či neurotrofním účinkem.

Role leptinu v modulaci stresové HPA osy v průběhu zánětlivé odpovědi není tedy dosud objasněná. Rozdílná dynamika leptinu a plazmatického kortizolu po operačním zákroku, resp. v pooperační sepsi ji rovněž zpochybňuje. Je pravděpodobné, že na změnách leptinu a kortizolu v pooperačním období se podílí nějaký třetí faktor, v první fázi přechodně snižující leptin a zvyšující kortizol. Tímto faktorem může být právě IL-1beta nebo TNFalfa. K vzestupu hladiny leptinu dochází až v době, kdy hladina kortizolu a ACTH stoupá. Stimulace syntézy leptinu po operaci tedy zřejmě není závislá na kortizolu.

Pokles hladiny leptinu v časném perioperačním období může být poněkud zkreslen sníženým příjmem potravy před operací, všichni pacienti byli po dobu 24 h po operaci nalačno. U hlodavců leptin během hladovění výrazně klesá, stejně tak u lidí s normálním BMI vede 24 hodinové hladovění k poklesu hladiny leptinu.

Naše studie potvrzuje, že dynamika leptinu v pooperačním období je charakteristická pro reaktanty akutní fáze. Maximální koncentrace v pooperačním období mohou dosáhnout až hodnot nacházených u septických pacientů. Koncentrace leptinu nedokáže odlišit počínající pooperační sepsi od nekomplikovaného průběhu.

Výsledky dále ukazují, že hladiny leptinu a kortizolu v perioperačním období spolu významně nekorelují. HPA osa je indukována nejenom přímým efektem cytokinů (zejména IL-1) na hypotalamická jádra, ale i aferentní nervovou stimulací z periferie. Ta může hrát zejména u operačních výkonů rozhodující roli. Psychoemotivní složka v aktivaci HPA osy je zřejmá z dynamiky kortizolu mezi -7. a -1. dnem před operačním zákrokem.

Konečně naše výsledky ukazují, že pooperační dynamika leptinu je odlišná od CRP a dalších proteinů akutní fáze. Rozdílná dynamika leptinu a CRP tak reflektuje odlišnou regulaci syntézy těchto parametrů. Vzestup leptinu odráží změny IL-1 a TNFalfa, tedy cytokinů prvního sledu, v další fázi - při měnících se poměrech pro- a

protizánětlivých cytokinů - je leptin zřejmě tonicky inhibován. Hladiny CRP a AAT, jako typických proteinů akutní fáze II. typu naproti tomu odráží s určitým časovým posunem dynamiku IL-6.

Vzestup koncentrace leptinu v pooperačním období a u septických pacientů odráží odlišnou regulaci syntézy leptinu v klidovém období a v průběhu systémové zánětové odpovědi. Fyziologický význam leptinu v zánětlivé reakci není znám. Inhibiční efekt leptinu na stresovou HPA osu byl dokumentován *in vitro*, ale jeho význam *in vivo* je zpochybňován. V naší studii nebyla prokázána statisticky významná závislost plazmatického kortizolu ve vztahu k leptinu ani k dalším měřeným zánětlivým parametrům (TNFalfa, IL-6, CRP, AAT). Rozdílná dynamika leptinu a kortizolu po chirurgickém zákroku ukazuje, že oba faktory podléhají odlišné regulaci.

Tab. 21 Funkční podobnost cytokinů skupiny IL-6 (účinky *in vitro*) (upraveno podle Maruny et al. [17])

cytokin	indukce CRP	stimulace HPA osy	hematopoéza	aktivace makrofágů	neurotrofní efekt	aktivace B lymfocytů
leptin		?	+	+		
IL-6	+	+	+	+	+	+
IL-11	+	+	+	-	+	
G-CSF	+	+	+	+		
LIF	+	+	+	+	+	
OSM	+	+	+	+	+	
CNTF	+	+		+	+	
CT-1	+	+		+	+	
NNT-1	+	+		+	+	+

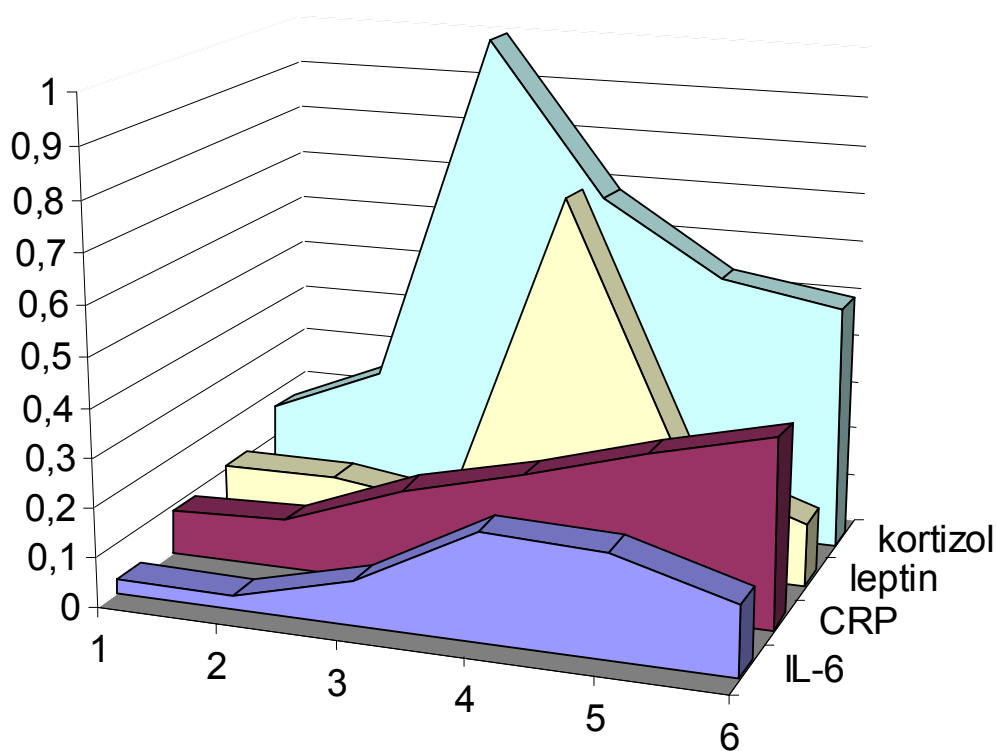
CNTF = ciliární neurotrofní faktor; CRP = C reaktivní protein; CT-1 = kardiotrofin-1; G-CSF = granulocytární kolonie stimulující faktor; HPA osa = hypotalamo-pituito-adrenální osa; IL = interleukin; LIF = faktor inhibující leukémii; NNT-1 = neurotrofin-1; OSM = onkostatin M. + = stimuluje, - = inhibuje, ? = rozporné údaje

Graf 5 Pooperační dynamika IL-6, CRP, leptinu a kortizolu u pacientů s resekcí tlustého střeva.

Koncentrace jsou vyjádřeny relativními čísly vzhledem k septickým hodnotám.

Pořadí náběrů: 1. (-7. den), 2. (-24 h), 3. (+12 h), 4. (+24 h), 5. (+48 h), 6. (+72 h vzhledem k začátku operačního výkonu)

Kortizol dosahuje maximálních hladin při 3. náběru (12 h po výkonu), leptin a IL-6 při 4. náběru (24 h po operaci), CRP stoupá v celém sledovaném období do 72. h (6. náběr).



9. POOPERAČNÍ ZMĚNY BUNĚČNÉ A HUMORÁLNÍ IMUNITY

Kaskáda neurologických, endokrinních, metabolických a kardiovaskulárních změn, při operačním zákroku, znamenají systémové přeladění organismu na změněné podmínky. Tyto změny, souhrnné označované jako reakce akutní fáze, znamenají nastartování obranných a reparačních procesů. Systémovým nespecifickým charakterem ale znamenají pro pacienta i nezanedbatelné riziko doprovodných komplikací (hyperkoagulační stav, komplikace protražovaného stresového hyperkortisolismu apod.) (181).

Tyto změny nejsou iniciovány infekcí, ale mohou být pooperační infekcí modifikovány a svým imunopresivním charakterem i riziko infekce zvyšují.

Pooperačnímu období dominuje výrazná suprese T-lymfocytárních funkcí, jak jejich proliferačního, tak i funkčního potenciálu, podmíněná funkční dysbalancí subpopulací T_H (helper, pomocných) lymfocytů. T_H lymfocyty hrají ústřední roli ve fyziologické regulaci imunitní odpovědi. Zánětlivá stimulace, zprostředkovaná interleukinem-1 (IL-1) a dalšími humorálními faktory, navodí klonální expanzi T_H buněk. Amplifikované T_H buňky produkcí humorálních mediátorů stimulují rozvoj B lymfocytů do podoby zralých, protilátky produkujících buněk a stimulují zrání a cytotoxicitu T lymfocytů. Jednotlivé subpopulace T_{H1} a T_{H2} lymfocytů se odlišují spektrem produkovaných cytokinů, směrováním imunitní odpovědi i indexovými ukazateli této aktivace (Tab. 22). Konverze do T_{H1} fenotypu je usnadněna působením IL-12, naopak konverze do T_{H2} fenotypu je usnadněna IL-4. Jakmile se projeví dominance některého z obou T_H fenotypů, je tento stav v dalším období udržován pozitivními zpětnovazebnými mechanismy. Tyto humorální mechanismy udržují produkci příslušné třídy cytokinů a současně představují překážku případné imunoterapeutické intervence.

Tab. 22 T_{H1} a T_{H2} odpověď

	T _{H1} odpověď	T _{H2} odpověď
Stimulující faktor	DHEA, DHEAS, IL12	kortizol, IL-4
Dominující cytokiny	produkce IL-2, IFN- γ , TNF-	produkce IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13
Imunologické projevy	buněčná imunitní odpověď, inhibice T _{H2} odpovědi	produkce imunoglobulinů B buňkami, inhibice T _{H1} odpovědi
CD23+ / HLA-DR+ index	< 1	> 1
IL-4 / IFN gama index	< 1	> 1
solubilní CD30	pokles	zvýšení

DHEA, DHEAS = dehydroepiandrosteron (sulfát), IL = interleukin, IFN = interferon, TNF = faktor nekrotizující tumory

Cytokinová dysbalance v pooperačním období.

Stres navozený infekcí, fyzikálními faktory či akutním onemocněním vede k posunu T_{H1}/T_{H2} rovnováhy ve prospěch T_{H2} odpovědi (182). Toto konstatování je možno vztáhnout i na stresovou odpověď navozenou operačním traumatem. Inhibice T_{H1} odpovědi je podkladem nerovnováhy cytokinové kaskády a hlavním patogenetickým faktorem pooperační imunosuprese (183).

V časném pooperačním období, dochází k humorálním změnám cytokinové a neuroendokrinní sítě podobného charakteru jako u rozsáhlých popálenin či polytraumat. Rozsah těchto změn je přímo úměrný operačnímu traumatu, jak je opakovaně dokumentováno srovnávacími studii laparoskopických a laparotomických výkonů (184,185).

Dokumentován je pokles syntézy a sekrece IL-2, TNF-alfa a IFN-gama stimulovanými T-lymfocyty po operačním zákroku, popáleninách nebo jiném poranění (186). Změny nastávají již několik hodin po traumatu. Nemění se přitom výrazněji stimulovaná produkce IL-4 a IL-10. Nemění se ani exprese buněčných receptorů IL-2 (i když některé starší studie prokazovaly jejich pokles).

Základní vlastnosti cytokinů T_{H1} a T_{H2} odpovědi shrnují tabulky 23 a 24.

Tab. 23 Cytokiny T_{H1} odpovědi

Cytokin	Synonyma	Zdroj	Cílové buňky	Charakteristika
IL-2	Killer helper factor T cell growth factor T cell replacing factor	T _{H1} lymfocyty	T a B lymfocyty, NK	růstový a aktivizační faktor lymfocytů
IL-12	Thymocyte stimulating factor Cytotoxic lymphocyte matur. factor	Makrofágy, PMN, NK, B lymfocyty	T lymfocyty	Proliferace a aktivace T _{H1} lymfocytů
TNF-alfa	NK cell stimulating factor	Monocyty, fibroblasty, T _{H1} lymfocyty	Systémové působení	Indukce lokálních a systémových zánět. projevů,
IFN-gama	Cachectin Immune interferon Type-II interferon	T _{H1} lymfocyty, NK	Systémové efekty	endogenní pyrogen Imunomodulační, méně výrazný antivirový účinek

PMN = polymorfonukleární buňky, NK = přirozené zabíječské lymfocyty (natural killers)

Tab. 24 Cytokiny T_{H2} odpovědi

Cytokin	Synonyma	Zdroj	Cílové buňky	Charakteristika
IL-4	B cell stimulating factor-1 Mast cell growth factor-2 T cell growth factor-2	T _{H2} lymfocyty, bazofily	Lymfocyty, monocyty/makrofágy	Proliferace, diferenciací a aktivace B a T lymfocytů, součást CARS (inhibice funkcí makrofágů)
IL-5	B cell growth factor-II Eosinophil CSF Eosinophil differentiating factor IgA enhancing factor	T _{H2} lymfocyty, eosinofily	Eosinofily	Proliferace a aktivace eosinofilů
IL-6	T cell replacing factor B cell stimulating factor-2 Hepatocyte stimulating factor Hybridoma/plasmacytoma growth factor	T _{H2} lymfocyty, makrofágy, PMN, ...	Systémové účinky	Stimulace lokálních a systémových zánět. projevů, hlavní aktivátor syntézy proteinů akutní fáze, proliferace T lymfocytů, hemopoetická aktivita ...
IL-10	Interferon 2 Monocyte granulocyte inducer type 2 Cytokine synthesis inhibitory factor	Makrofágy, T _{H2} lymfocyty, PMN	Makrofágy, lymfocyty	Součást CARS, inhibice syntézy a prozánětlivých aktivit řady cytokinů, indukce diferenciací B lymfocytů do plazmocytů
IL-13	P-600 (m)	T _{H2} lymfocyty	Lymfocyty, makrofágy	Proliferace, diferenciací a aktivace B lymfocytů, součást CARS (inhibice funkcí makrofágů)

CARS = syndrom kompenzační protizánětlivé odpovědi (compensatory antiinflammatory response syndrome), PMN = polymorfonukleární buňky

Mnohé imunologické reakce vyžadují rychlou proliferaci malého počtu buněk do počtu několika milionů, tedy klonální expanzi; tento děj je do velké míry iniciován a kontrolován IL-2 (187). Navíc IL-2 je zapojen do mechanismu rozvoje T-buněk, rozvoje specifické T-buněčné cytotoxicity a nespecifické cytotoxicity buněk z lymfocytární populace „přirozených zabíječů“ (natural killers, NK lymfocytů). U pacientů v pooperačním období stejně tak jako u pacientů po rozsáhlých popáleninách a polytraumatech dochází ke zřetelnému poklesu produkce IL-2 periferními mononukleáry, často až do neměřitelných hodnot. Snížená produkce IL-2 vysvětluje opakovaně dokumentovaný pokles počtu a aktivity cytotoxických lymfocytů a NK buněk po operačním výkonu.

K poklesu hladiny IL-2 dochází již 1. den po operaci, normalizace hladin je protrahovaná a koreluje s hojením poranění.

Inhibice tvorby IFN-gama a TNF-alfa vede ke snížení fagocytární a proliferační aktivity monocyto/makrofágových buněk v pooperačním období.

Ukazatele T_{H1} a T_{H2} odpovědi

Balance T_{H1}/T_{H2} odpovědi je charakterizována *indexem* $CD23^+$ B-lymfocytů / $HLA-DR^+$ monocytů. HLA-DR je antigen II. třídy MHC. II. třída MHC na monocytech je regulována velkou škálou faktorů, ale IFN-gama, tvořený T_{H1} cytokiny hraje v jejich regulaci rozhodující roli (188). Naopak exprese CD23 (IgE receptor FcεRII) na B lymfocytech je stimulována IL-4, tedy cytokinem z T_{H2} skupiny působků. Zvýšení počtu cirkulujících $CD23^+$ buněk je zaznamenáváno již 2 hodiny od začátku chirurgického výkonu a přetrvává více než 48 hodin.

Poměr indexu větší než 1 odpovídá posunu k T_{H2} odpovědi, naopak hodnoty pod 1 odpovídají převaze T_{H1} imunitní odpovědi. Po rozsáhlých chirurgických výkonech dosahuje poměr $CD23^+$ / $HLA-DR^+$ buněk hodnot kolem 3. Hodnota indexu kulminuje v prvních hodinách po operaci – Decker a kol. [3] uvádí nejvyšší hodnoty 2 hod. po výkonu. Hodnota indexu zhruba odpovídá rozsahu operačního výkonu, stejná práce (183) dokumentuje u klasické cholecystektomie hodnotu $CD23^+$ / $HLA-DR^+$ indexu $2,98 \pm 0,37$, u laparoskopické cholecystektomie $1,51 \pm 0,21$.

Podobnou výpovědní hodnotu odrážející T_{H1} / T_{H2} bilanci vykazuje *index* $IL-4$ / *IFN-gama*. Hodnoty vyšší než 1 ukazují posun k T_{H2} odpovědi, hodnoty menší než 1 odpovídají T_{H1}

odpovědi. Podobně jako v předchozím případě po chirurgickém výkonu stoupá hodnota IL-4 / IFN-gama indexu a hodnota opět zhruba odpovídá rozsahu operačního zákroku (188).

Aktivitu T_{H2} odpovědi reflektuje i exprese CD30 antigenu na paměťových T-buňkách a *solubilní CD30* v plazmě. Molekula CD30 strukturou patří do TNF-NGF receptorové superrodiny a je selektivně exprimována T_{H2} lymfocyty. Plazmatická hladina solubilních CD30 antigenů, resp. exprese povrchových CD30 odpovídá T_{H2} odpovědi. CD30+ T buňky kulminují již v prvních hodinách po začátku operaci (vzestup na 350 % výchozích hodnot 2 hodiny po incizi) (183). CD30 je uvolňována z aktivovaných T-buněk a dostává se do plazmy. Hladina solubilních CD30 ale vrcholí až 24 hod. po výkonu. Solubilní CD30 jsou hrubším ukazatelem T_{H2} odpovědi, po menších chirurgických výkonech k vzestupu nedochází, rozsáhlé výkony vedou k asi dvojnásobnému zvýšení hladiny.

Neurohumorální regulace T_{H1}/T_{H2} odpovědi

Chirurgický stres je indukován aferentními nervovými signály směřujícími do hypotalamu, které stimulují uvolnění kortikoliberinu (CRH) a antidiuretického hormonu (AVP, arginin-vasopressin). CRH a AVP neurokrinní cestou uvolňované v portálním systému hypofýzy stimulují v předním laloku hypofýzy produkci adrenokortikotropního hormonu (ACTH). Kůra nadledvin pod stimulačním vlivem ACTH produkuje glukokortikoidy a androgeny.

Časné prozánětlivé cytokiny uvolněné při tkáňovém poškození nebo infekci (IL-1, IL-6, TNF-alfa) mohou také stimulovat stresovou hypotalamo-pituito-adrenální osu a zvyšovat produkci glukokortikoidů a androgenů. Syntéza uvedených cytokinů ale vrcholí až několik hodin po výkonu, časné změny T_{H1} / T_{H2} balance, dokumentované již 2 hod. od začátku operace, tak pravděpodobně tímto mechanismem nejsou přímo indukovány.

T_{H1} i T_{H2} lymfocyty jsou vybaveny receptory pro glukokortikoidy. Glukokortikoidy zvyšují aktivitu T_{H2} buněk a současně synergicky s IL-4 inhibují T_{H1} aktivitu (189,190). Adrenokortikální androgeny – dehydroepiandrosteron (DHEA) a jeho metabolit dehydroepiandrosteron sulfát (DHEAS), které fyziologicky stimulují T_{H1} aktivitu a kontraregulují tak účinky glukokortikoidů, jsou různými mechanismy vlivem glukokortikoidů inhibovány (191, 192).

Překvapivé je, že mírný posun T_{H1}/T_{H2} odpovědi ve směru T_{H1} odpovědi je pozorován po zavedení operační anestezie, ale ještě před zahájením výkonu. Ukazuje se, že mírná stresová reakce (která může být iniciována anestezií nebo psychickými faktory) začíná T_{H1} typem odpovědi a poté se spolu s elevací hladiny glukokortikoidů přesouvá do T_{H2} odpovědi (193).

Možným vysvětlením by byla úloha DHEA a DHEAS, jejichž produkce z kůry nadledvin je rovněž stimulována ACTH (194). DHEA je efektivní antagonist glukokortikoidů na řadě metabolických, imunitních a hematologických úrovní. Tento „antiglukokortikoid“ stimuluje T_{H1} odpověď. V následujících fázích je ale stoupající hladinou glukokortikoidů DHEA účinnost blokována.

Glukokortikoidy jednak přímo inhibují tvorbu DHEA v kůře nadledvin, dále down-regulují DHEA receptory na T-buňkách, jednak regulací DHEAS sulfatázové aktivity zvyšují odbourávání DHEA a jeho metabolitů, jednak na úrovni T_{H1} buněk inhibují DHEA stimulovanou produkci IL-2 a IFN-gama (195,196).

Poslední experimentální výsledky nepotvrdily dřívější úvahu, podle které chirurgický stres blokuje jak T_{H1} , tak i T_{H2} odpověď (mluvilo se o tzv. T_{H0} odpovědi). Z dosavadních nálezů ale nelze vyloučit, že extrémní posttraumatický stres s extrémní stimulací hypotalamo-pituito-adenální osy může inhibovat nejen T_{H1} , ale i T_{H2} odpověď.

Klinické důsledky pooperační imunosuprese

Skutečný klinický dopad časných pooperačních změn imunitní rovnováhy není znám a dosavadní závěry se opírají o experimentální studie na zvířecím modelu.

Studie se zaměřují na dva aspekty suprese buňkami zprostředkované imunity:

1. zvýšení rizika pooperačních infekčních komplikací
2. reaktivace zbytkové nádorové choroby po (radikálním) onkochirurgickém výkonu

Je experimentálně prokázáno, že indexy vyjadřující snížení poměru T_{H1}/T_{H2} aktivity (index IL-4/IFN-gama, index CD23+ B-lymfocytů/HLA-DR+ monocytů) korelují s časnou pooperační mortalitou. Podobnou prediktivní hodnotu má i dynamika tvorby IL-2 nebo IFN-gama. Naopak zvířata, kterým byly v perioperačním období podávány nízké dávky IL-2, měla

prognózu signifikantně lepší. Obdobné výsledky mělo i podávání IL-12, který stimuluje proliferaci a aktivitu T_{HI} lymfocytů (197).

U více než 40 % onkologických pacientů po radikálním chirurgickém odstranění tumoru jsou přítomny zbytkové maligní buňky v regionálních uzlinách nebo vzdálených orgánech. Vyplývá to z průřezových studií u pacientů, kteří z nejrůznějších důvodů zemřeli do měsíce po kompletní resekci nádoru. Na prognóze onkologických pacientů po radikálním výkonu se pooperační imunosuprese monocyto/makrofágových a lymfocytárních funkcí nepříznivě podílí (198).

Porušená regulace monocyto/makrofágové odpovědi u nádorových pacientů je operačním výkonem dále zhoršena. Na zvířecím modelu bylo prokázáno, že pooperační období po laparotomii je obdobím zvýšené proliferace nádorových buněk. Současně se snižuje počet imunokompetentních buněk, ale především dochází k funkčním změnám makrofágů – poruše fagocytární aktivity a snížení tvorby superoxidových aniontů. Přesný tumoricidní mechanismus není znám. Makrofágy uvolňují více než 60 substancí, z nichž některé mají cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám. Mezi nejvýznamnější známé faktory s touto aktivitou patří TNF a superoxidové anionty.

Adjuvantní imunostimulační cytokinová terapie v perioperačním období

Rekombinantní humánní cytokiny s imunostimulační aktivitou, řadu let využívané jako součást adjuvantní terapie především v onkologii (IL-2, IFN-gama), jsou v posledních letech klinicky testovány i u pacientů v perioperačním období – opět zejména v onkologických stavech se zaměřením na minimální nádorové reziduum. Do této skupiny je možno zařadit i GM-CSF, stimulátor monocyto/makrofágových funkcí, jehož hlavní terapeutický potenciál ale představuje aktivace granulocytární a monocytární hematopoézy.

Nevýhodou -zejména v případě podávání IL-2- je vysoká toxicita. Rozpracovávají se alternativní způsoby aplikace (IL-2 in vitro stimulované tumor infiltrující lymfocyty, lymfokiny aktivované zabíječské buňky), které zachovávají vysokou účinnost léčby při snížení frekvence závažných vedlejších účinků.

Adjuvantní imunostimulační terapie rekombinantními cytokiny, zaměřená na úpravu protinádorové imunity v pooperačním období, má u těchto pacientů své opodstatnění, ale o

její skutečné účinnosti nejsou do současné doby přesvědčivé důkazy. Otevřená zůstává i zásadní otázka cytokinové terapie v pooperačním období. Bude zachována současná podoba monokomponentní cytokinové terapie, nebo budou pro každou klinickou situaci existovat koktejly cytokinových a anticytokinových přípravků?

Interleukin-2. Největší klinické zkušenosti jsou v současné době s rekombinantním IL-2, přirozeným stimulatorem a růstovým faktorem buněk lymfocytární řady (199,200). Nevýhodou systémového podání využití IL-2 je vysoká toxicita v široké škále od dyspeptických a chřipkovitých příznaků, přes horečku až po tzv. syndrom zvýšené propustnosti kapilár (capillary-leak syndrom), ohrožující pacienta oběhovými selháními a smrtí (201). Je důsledkem zvýšení permeability kapilár a úniku tekutiny do intersticia s obrazem otoků, ascitu, fluidotoraxu, případně plicního edému s poklesem krevního tlaku. Tento obraz je pozorován při intravenózním podání vyšších dávek IL-2, u subkutánní aplikace nebývá (202). Alternativní postupy léčby IL-2, jako je adoptivní buněčná imunoterapie toto riziko omezují.

Adoptivní imunoterapie tumor infiltrujícími lymfocyty (TIL) a IL-2 je jednou z progresivních variant léčby IL-2 (203). Z tumoru, odebraného při chirurgickém výkonu, jsou separovány lymfocyty. Získané buňky jsou in vitro aktivovány IL-2 a následně infuzí vpraveny do organismu spolu s vysokou dávkou IL-2. Metoda je tedy založena na arteficiální aktivaci TIL jejich přirozeným stimulačním faktorem IL-2 a jejich následné infiltraci v neodstraněném zbytku nádoru. Proti standardnímu schématu pooperačního podání IL-2 k potlačení pooperační imunosuprese T-lymfocytů a k likvidaci zbytkových nádorových buněk umožňuje tento postup snížit celkovou dávku rekombinantního cytokinu a omezit tak jeho toxicitu. Metoda adoptivní imunoterapie našla uplatnění v pooperační léčbě bronchogenních karcinomů, karcinomů tlustého střeva a ledvin (204).

IL-12, jeden z hlavních stimulátorů T_{H1} odpovědi a tvorby IL-2, je preklinicky testován k urychlení restituce pooperační imunosuprese. Předchozí výsledky na zvířecím modelu byly srovnatelné s podáváním IL-2 (197).

Granulocyto-makrofágová kolonie stimulující faktor. Nedávná zjištění ukazují, že přínos perioperačního podávání GM-CSF onkologickým pacientům nespočívá jen ve snížení rizika infekčních komplikací, ale i v antitumorózní aktivitě cytokinu. Může se tak uplatnit jako součást adjuvantní terapie k pooperační eliminaci zbytkových nádorových elementů (205).

GM-CSF zvyšuje počet makrofágů a stimuluje jejich funkce včetně tumoricidní aktivity. GM-CSF mimo jiné zvyšuje tvorbu a uvolňování IL-6, který má vedle dalších efektů rovněž tumoricidní vlastnosti. GM-CSF rovněž stimuluje na protilátkách závislou cytolýzu nádorových buněk zralými neutrofily a eozinofily (206).

GM-CSF v experimentálním modelu inhibuje růst nádoru v pooperačním období a eliminuje nežádoucí supresi monocyto/makrofágových buněk v tomto období. Zvyšuje se produkce TNF a IL-6 i superoxidových radikálů.

GM-CSF jako růstový faktor granulocytární a monocyto/makrofágové řady je s úspěchem používán jako terapeutický prostředek k restituci hemopoézy bílé krevní řady např. po protinádorové chemoterapii nebo po transplantaci kostní dřeně. Možnosti využití GM-CSF v pooperační protinádorové a imunostimulační terapii se ale zatím opírají pouze o experimentální výsledky. Klinické aplikaci musí předcházet dořešení mnoha nejasností, např. pozorovaný pokles účinnosti během léčby, vysvětlovaný down-regulací membránových receptorů GM-CSF.

Interferon α (INF α). Probíhá testování intraperitoneální aplikace IFN- α po resekcii epiteliálního karcinomu ovaria s minimálním nádorovým reziduem. Lokální aplikace v pooperačním období má vést k eliminaci zbytkových nádorových elementů nikoli restitucí imunitní rovnováhy, ale především přímým cytotoxickým účinkem IFN. Nežádoucí projevy léčby jsou mírné, nejčastěji gastrointestinální projevy (15 %), horečka (10 %), neutropenie (8 %), a leukopenie (8 %), ale ve srovnání se standardní chemoterapií není efekt léčby zřetelně lepší.

10. VYUŽITÍ CYTOKINŮ V DIAGNOSTICE ZÁNĚTU POBŘÍŠNICE

Difúzní zánět pobříšnice patří k nejzávažnějším akutním stavům v břišní chirurgii. Správná diferenciální diagnóza a indikace k chirurgickému výkonu v počátečních stádiích klinických příznaků vždy patřila a patří k vrcholu "diagnostického umění" nejzkušenějších chirurgů. Zásadní změnu na náhled na systémovou reakci organismu při zánětu pobříšnice přinesly poznatky o obranné mediátorové kaskádě organismu s vymezením pojmů sepse, syndromu systémové zánětové odpovědi (SIRS), syndromu multiorgánového selhání (MOF). V současné době známe několik set mediátorů které se uplatňují při rozvoji systémové zánětlivé odpovědi organismu. V dnešní době je tak nabídka možnosti sledování nejrůznějších laboratorních parametrů téměř nevyčerpatelná. Pro chirurga vzniká obtížná situace, kdy je nezbytné oddělit výběr parametrů klinicky využitelných od parametrů vhodných pouze k vědeckému sledování. To znamená parametrů v současné době dobře poznaných se známými závislostmi kolísání jejich koncentrací. Současně vzniká i druhé dilema významu zjištěných patologických hodnot těchto parametrů při stanovení diagnózy. Klinik se dostává do obtížné situace v okamžiku, kdy musí zhodnotit, zda indikací k operačnímu výkonu může být zřejmá patologická hodnota laboratorního ukazatele, nebo zda tato hodnota má význam pouze signální. Současně se ale domníváme, že v současné době charakteristika systémových zánětlivých stavů základními laboratorními parametry (leukocytóza, iontová rovnováha, urea, kreatinin, acidobazická rovnováha...) je dostatečně známá a již dlouho tvoří nezbytnou a samozřejmou podmínku správné intenzivní terapie o tyto stavy. Proto je nezbytné se zaměřit na nové ukazatele, které dočasně nejsou rutinně dostupné (hlavně z ekonomických příčin), ale nepochybně v krátké době bude i ekonomicky zdůvodněno jejich použití v chirurgické praxi. Proto bychom v našem příspěvku rádi předložili možnosti využití cytokinů v diagnostice a monitoraci zánětu pobříšnice. Cytokiny jsme si vybrali ze dvou důvodů: 1. dle současných znalostí to jsou mediátory uplatňující se na počátku lokální i celkové obranné reakce organismu při rozvoji peritonitidy, 2. máme vlastní zkušenosti se sledováním dynamiky koncentrací těchto mediátorů.

Zaměříme se pouze na využití cytokinů při peritonitidě sekundární, pooperační a terciární. O peritonitidě primární se nezmiňujeme z důvodů, že nemáme vlastní zkušenosti se změnou dynamiky koncentrací cytokinů u této jednotky. Nebudeme se zmiňovat ani o dalších působících účastnících se obranné reakce organismu.

Obecně diagnostika zánětu pobřišnice a monitorování léčby vzájemně úzce souvisí. Prvním důvodem je používání shodných laboratorních parametrů pro diagnostiku i monitoraci. Druhým důvodem je neoddělitelnost diagnostiky a monitorace tohoto systémového stavu. Diagnóza zánětlivého procesu plynule přechází v monitoraci účinnosti léčby a zpětně se vrací k diagnóze komplikací.

Sekundární peritonitida vzniká následkem kontaminace z orgánů peritoneální dutiny. Projevuje se přítomností hnisu nebo gastrointestinálního obsahu v dutině břišní ve formě lokalizovaného abscesu nebo difúzní peritonitidy. Diagnostika se v tomto případě zaměřuje na diferenciální diagnózu klinicky se rozvíjejícího souboru symptomů, při plně rozvinuté mediátorové odezvě organismu.

Odlišnost **pooperační peritonitidy** od sekundární peritonitidy je hlavně v působení tzv. druhého inzultu (second - hit – theory) na aktivovanou mediátorovou odpověď organismus. Je příkladem, kdy monitorace léčby primárního stavu přechází zpět v diagnostiku rozvoje komplikujícího zánětu.

Terciální peritonitidou rozumíme pozdní komplikaci v průběhu léčby sekundární nebo pooperační peritonitidy. Je charakterizovaná zejména vysoce aktivovanou systémovou zánětovou odpovědí organismu (hypercytokinemií).

Vývoj zánětu pobřišnice probíhá od příčiny lokalizované na jeden orgán (např. tlusté střevo) s rozšířením na celou peritoneální dutinu. Obrannou reakci organismu tvoří systémová mediátorová odpověď s celkovými projevy a možným vývojem v SIRS – sepsi a MODS (terciární peritonitidu). V mediátorovém pojetí vývoje peritonitidy rozeznáváme tři stádia:

1. stádium: odpověď na inzult. Probíhá lokální produkce cytokinů které jako první startují zánětovou odpověď, podporují hojení rány a aktivují buňky retikuloendoteliálního systému.

Ve 2 stádiu jsou cytokiny uvolněny do cirkulace a zvyšují lokální odpověď.

Jsou aktivovány makrofágy a destičky a je stimulováno vyplavení růstových faktorů.

Akutní zánětová odpověď je kontrolována současným snížením prozánětlivých mediátorů a vyplavením endogenních antagonistů. To umožňuje hojení tkáně, ústup infekce a obnovení homeostázy.

Ve 3. stádiu při selhání homeostatických mechanismů dochází k nekontrolované systémové reakci. Převažuje destrukční efekt cytokinů nad protektivním. Záplava prozánětlivých cytokinů spouští mnoho humorálních kaskád s následkem ztráty mikrocirkulační integrity a

rozvojem poškození vzdálených orgánů. Smrt nastává v okamžiku, když přemrštěné vyplavování cytokinů vede k “mediátorové nemoci”, a je příčinou generalizované autodestrukční zánětové odpovědi, která je rezistentní na všechny terapeutické zásahy.

Diagnostika

Rozhodující pro prognózu pacienta je včasná diagnostika. Diagnostický postup se snaží odpovědět na dvě základní otázky:

- diferenciální diagnóza septického stavu (diagnostika nitrobřišní infekce),
- určit stádium vývoje peritonitidy (obrané reakce)– kontrolovaná x nekontrolovaná.

Topická laboratorní diagnostika počátku peritonitidy není možná, protože

- není možnost laboratorní diagnostiky specifického orgánového poškození,
- pacient přichází na ambulanci pro rozvinutou peritonitidu (klinický obraz kopíruje vývoj mediátorových změn),

Laboratorně hodnotíme rozsah obranné reakce organismu na rozvíjející se lokální onemocnění.

Sekundární peritonitida

Zvýšené hladiny jednorázového vyšetření IL-6, TNF-alfa signalizují aktivaci cytokinové odpovědi. Z jednorázového vyšetření nelze stanovit diagnózu nitrobřišního zánětlivého procesu. Laboratorní výsledek může tuto diagnózu učinit pravděpodobnější. Vyšetření ostatních cytokinů samostatně nemá vyšší výpovědní hodnotu pro diagnózu. Předoperačně zvýšené hladiny hlavně prozánětlivých cytokinů mohou signalizovat vyšší riziko komplikovaného pooperačního průběhu.

Na rozdíl od cytokinů i jednorázově zjištěná vyšší hladina PCT ukazuje na systémovou bakteriální infekci. Zvýšené hodnoty tohoto laboratorního ukazatele v návaznosti na klinické vyšetření může diagnózu zánětu pobřišnice potvrdit.

Pooperační peritonitida

Jednorázové vyšetření cytokinů v tomto období (pokud hodnoty nejsou vysloveně septické) nemusí vystihovat tendenci dalšího vývoje. Posouzení dynamiky vyžaduje opakované vyšetření mezi 12.-72. hod. po operačním výkonu. Dostatečnou výpovědní hodnotu má sledování IL-6. Tento parametr dostatečně specificky do 48 hodin odliši počínající sepsi od nekomplikovaného pooperačního stavu. V současné době je zřejmé, že ostatní prozánětlivé cytokiny (IL-1 ra, sIL-2R, IL-8 a TNF-alfa) nemají samostatně vyšší výpovědní hodnotu a jsou opodstatněny pouze v kombinaci s IL-6 a ostatními imunologickými parametry.

Stanovení PCT v pooperačním období je vhodné alespoň 24. a 36. hodinu po operačním výkonu. Získané hodnoty mohou včasné a specificky upozornit na rozvíjející se systémovou infekční komplikaci.

Terciární peritonitida

Diagnóza terciární peritonitidy je možná pouze na základě dynamického sledování vývoje koncentrací zánětlivých ukazatelů. Sledování dynamiky spektra pro- a protizánětlivých ukazatelů má význam v podrobném mapování vývoje mediátorové odpovědi organismu. Přetrvávání zvýšených hodnot bez výrazné tendence k normalizaci svědčí o rozvoji SIRS a MODS.

Sledování hladiny PCT nás může včasné upozornit na rozvoj bakteriální infekční komplikace.

Pro diagnózu difúzních zánětů pobřišnice nadále zůstává nejdůležitější klinická zkušenost chirurga. Laboratorní vyšetření cytokinů - pokud by byla prováděna statimově - mohou v tomto rozhodovacím procesu výrazně napomoci. Lze shrnout, že pro diagnózu systémového bakteriálního zánětu je specifický ukazatel – prokalcitonin, PCT. Pro rozvoj septického stavu a systémové aktivace mediátorové odpovědi je přínosné vyšetření IL-6. Sledování dynamiky ostatních pro a protizánětlivých cytokinů má význam pouze v rozvoji kritických stavů.

Pro diagnostiku sekundární peritonitidy je nejdůležitější klinické vyšetření a zkušenost chirurga. Jednorázové vyšetření PCT potvrdí diagnózu systémového bakteriálního zánětu. Vyšetření dalších mediátorů může podrobněji popsat aktuální stav organismu, ale zásadně terapeutický postup neovlivní.

U pooperační peritonitidy nabývá vyšetření PCT a ostatních cytokinů na významu a dynamickým sledováním vývoje jejich hladin můžeme časné (před rozvojem klinických známek) diagnostikovat hrozící katastrofu.

PCT doporučujeme vyšetřovat 24. až 36 hodinu po operačním výkonu. IL-6 při dynamickém monitorování hladin do 48 hodin dostatečně specificky odliší počínající sepsi od nekomplikovaného pooperačního stavu. Pro IL-6, IL-1ra, sIL-2R, IL-8 a TNF-alfa platí, že po kulminaci hladin mezi 16. - 36. hodinou nastává mezi 48. - 72. hodinou u nekomplikovaného pooperačního průběhu návrat k výchozím hodnotám nebo alespoň výrazný pokles hladiny.

V diagnostice terciální peritonitidy je zásadní poznání míry aktivace mediátorové kaskády. Nabývá na významu komplexní monitorování rozsahu mediátorové aktivace. Klinické vyšetření v tomto případě nemá zásadní diagnostický význam.

11. ZÁVĚR

Práce shrnuje změny cytokinů v časné fázi systémové pooperační zánětlivé reakce a dále jsme ukázali úlohu cytokinů, PCT, leptinu a APP v časné diagnostice zánětlivých pooperačních komplikací. Zánětlivá odpověď je umožněna cytokiny, které jsou uvolněny do systémové cirkulace. Plazmatické koncentrace specifických cytokinů, TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 jsou zvýšeny a jejich maximální hladina koreluje s velikostí tkáňového poškození. Solubilní cytokinové receptory, antagonisté cytokinových receptorů jsou vyplavovány 10-100 násobně větším množstvím než vlastní vytokány. Tento jev, ani jeho příčina a specifická úloha zatím není zcela objasněna. Komplex vzájemných reakcí cytokinů a jejich neutralizujících molekul určuje aktuální klinický stav a další rozvoj komplikací.

Je důležité brát v úvahu nerovnováhu buňkami zprostředkované a humorální imunity, fyziologického procesu, součásti stresové neurohumorální odpovědi na operační trauma. Její potenciální patologické důsledky, byť prokazované zatím pouze v experimentální rovině, z ní vytváří na jedné straně významný faktor pro hodnocení míry rizika pooperačních komplikací, na straně druhé možný objekt terapeutického zásahu u vysoce rizikových pacientů.

Využití cytokinů v chirurgii může být přínosné v následujících situacích:

- Časná diagnostika pooperačních zánětlivých komplikací.
- Sledování kriticky nemocných na jednotce intenzivní péče a časný záchyt rozvoje zánětlivých komplikací i sepse.
- Diferenciální diagnostika mezi zánětlivými onemocněními a horečkou nebakteriálního původu. Sledování některých nespecifických břišních symptomů.
- Diagnostika zánětů pobřišnice a monitorování průběhu léčení peritonitidy..
- Diagnostika akutní orgánové rejeckce v transplantační chirurgii a diferenciatní diagnostika systémové zánětlivé odpovědi.
- Možnosti užití anticytokinové terapie v kritických stavech.

Pro odhalení časné pooperační septické komplikace je nejlepší sledovat následující parametry: IL-6 a IL-8 mezi 24-72 hod, CRP a α_1 -AT po 72 hod. Doporučujeme vyšetřit tyto parametry v nemocných se zvýšenou nebezpečí pooperační septické komplikace. Kombinace

vyšetření hladin vybraných cytokinů s APP poskytuje plastičtější obraz odpovědi organismu na operační trauma a přispívá k diferenciální diagnostice pooperačních komplikací.

Vedle „klasických“ cytokinů se v současné době jeví PCT jako vysoce senzitivní parametr k odlišení počínající sepse od nekomplikovaného pooperačního stavu i při jednorázovém vyšetření je velmi selektivní vůči systémovému bakteriálnímu zánětu.

Ani leptin není pouze adipostatickým hormonem, součástí negativní zpětné vazby regulace tělesné hmotnosti a příjmu potravy, ale také stresovým hormonem, strukturně, funkčně a možná evolučně blízkým prozánětlivým a hematopoetickým cytokinům. Prozánětlivé cytokiny, zejména IL-1beta a TNF, jsou hlavními regulátory exprese leptinu v reakci akutní fáze. Leptin je faktorem zánětlivé mediátorové sítě, pravděpodobně nezbytným pro adekvátní průběh infekční i neinfekční zánětlivé odpovědi.

I když dynamika uvolňovaných cytokinů předchází pomalejším přesunům v proteosyntéze, význam stanovení APP hlavně z hlediska dostupnosti pro akutní diagnostiku v praxi není v současné době srovnatelný. Cytokiny jsou stále ještě v poli výzkumu a hledání optimálního klinického využití. Výzkum ukazuje, že se jedná o perspektivní a nesporně nadějně sledování pooperačního průběhu u rizikových pacientů.

Literatura

1. Aggarval BB: Human cytokines: their role in disease and therapy, Blackwell Science, Oxford, 1995.
2. Akira S, Kishimoto T: IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol Rev* 1992; 127: 25-50.
3. Andersen UO, Bog-Hansen TC, Kirkeby S: Lectin-like receptor for alpha 1-acid glycoprotein in the epithelium of the rat prostate gland and seminal vesicles. *Prostate* 1996; 29: 356-61.
4. Armstrong PB, Quigley JP: Alpha2-macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system. *Dev Comp Immunol* 1999; 23: 375-390.
5. Badolato R, Wang JM, Kelvin D, Oppenheim JJ: Serum amyloid A is a potent chemotactic factor for monocytes. *J Immunol* 1993; 150: 216A.
6. Baigrie RJ, Lamont PM, Kwiatkowski D, Dallman MJ, Morris PJ: Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg.* 1992; 79: 757-760.
7. Baruch Y: The liver: a large endocrine gland. *J Hepatol* 2000; 32: 505-507.
8. Baumann H., Richards C., Gauldie J.: Interaction among hepatocyte-stimulating factors, interleukin 1 and glucocorticoids for regulation of acute phase proteins in human hepatoma (Hep G2) cells. *J Immunol* 1987; 139: 4122-4128.
9. Baumann H., Prowse K.R., Marinkovic S., Won K-A., Jahreis G.P.: Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids. *Ann. NY Acad Sci* 1989; 557: 280-296.
10. Moya F. et al.: Calcitonin biosynthesis: evidence for a precursor. *Eur J Biochem.* 1975; 55: 407-13
11. Nylen E.S. et al.: Serum procalcitonin as an index of inhalation injury in burns. *Horm Metab Res.* 1992; 24: 439-43
12. Baumann H, Gauldie J: Regulation of hepatic acute phase protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Mol Biol Med* 1990; 7: 147-160.
13. Assicot M. et al.: High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet.* 1993; 341: 515-8
14. Dandona P. et al.: Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 79: 1605-8.
15. Oberhoffer M. et al.: Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med.* 1999; 134: 49-55.
16. Monneret G. et al.: Procalcitonin is not produced by circulating blood cells. *Infection* 1999; 27: 34-5
17. Silomon M. et al.: Procalcitonin after extracorporeal circulation. Synthesis in the hepatosplanchnic region. *Anaesthesist* 1999; 48: 395-8.

18. Biffl WL, Moore E.E., Moore F.A. et al.: IL-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch. Surg.* 131, 1996, p. 24-30.
19. Tilg H., Trehu E. et al.: IL-6 as an antiinflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood* 83,1994, 113-118.
20. Concoan MI, Stetlersteverson WG.: Interleukin-4 inhibition of prostaglandin-E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type-VI collagenase production by human monocytes. *J Biol Chem* 1992, 267, 515-519.
21. Deehan d,Hryz D.: Modulation of the cytokine and acute phase response to majorsurgery by recombinant inteleukin-2. *Br J Surg* 1995,82, 86-90.
22. Paul SR, Schendel P.: The cloning and biological characterization of recombinant human interleukin-11. *Int J Cell Clon* 1992, 10, 135-143.
23. Biffle W, Moore E.: Interleukin-6 in the injured patients.Marcer of injury or mediator of inflammation? *Annals of Surgery*, 1996, 224(5), 647-664.
24. Biffle W, Moore E.: Interleukin-6 stimulates neutrophil production of platelet – activating factor. *J Leukoc Biol* 1996,59,569-574.
25. Castell GV, Gomez-Lechon NJ.: Interleukin-6 is the major regulátor of acute phase protein synthesi in adult human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1989, 242, 237-239.
26. Castell GV, Gomez-Lechon NJ.: Recombinant human inteleukin-6 /IL-6/ BSF-2/HSF/ regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett* 1988, 232,347-350.
27. Gross V, Zhang B.: Regulation of interleukin-6 expressing evidence for a tissue specific role of protein kinase. *S J Clin Immuno* 1993,13,310-320.
28. May LT, Viguet M, Kenney GS: High levels of “complexed” IL-6 in human blood. *G Biol. Chem* 1992,267, 19698-19704.
29. Berger , Buolke E.: Aspects concerning the regulation of the postoperative acute phase reaction during cardiac surgery. *Clin Chem Acta* 1995, 239,1221-130.
30. Panogiotis V, Giannoudis, Malcolm R Smith, Tevans R.: Serum CRP and IL-6 levels aftertrauma. *Acta orthop Scand* 1998, 69(2), 184-188.
31. Matthew L Steinhauser, Cory M Hogaboan, Nikolas W Lukacs Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. *J Immnol* 1999,162(9)
32. Kimikazu H, Hideror G, Hiroshi N, Incresed serum Interleukin-8: correlation with poor prognosis in patiens with postoperative multiple organ failure. *Warld J Surgery* 1998, 22, 1077-1081
33. Ishimura K, Trsubouchi T, Okan K et al. Waund healing of intestinal anastomosis after digestive surgery under septic conditions: participation of local interleukin-6 expression . *Warld J Surg* 1998, 22(10) 1069-75)
34. Hensler T, Heidecke CD, Hecker H et al. Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production. *J Immunol* 1998,1,161(5), 2655-2659.

35. Cain BS, Meldrum, Dinarello CA, Meng Xet al.: Tumor necrosis factor- α and IL-1 β synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* 1999, 27(7), 1309-1318.
36. George O. Maish et al. Tumor Necrosis Factor binding protein improves incisional wound healing in sepsis. *J of Surg Research* 1998,78, 108-117.
37. Knaus WA, Harrell FE Jr, LaBrecque JF a ost.: Use of predicted risk of mortality to evaluate the efficacy of anticytokine therapy in sepsis. The rhIL-1ra Phase III Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med*, 24, 1996, s 46-56.
38. Bendele AM, Chlipala ES, Scherrer J a ost.: Combination benefit of treatment with the cytokine inhibitors interleukin-1 receptor antagonist and PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43, 2000, s. 2648-59.
39. Heumann D, Glauser MP: Anticytokine strategies for the treatment of septic shock: relevance of animal models. *Curr Top Microbiol Immunol*, 216, 1996, s. 299-311.
40. Blackwell TS, Christman JW: Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth*, 77, 1996, s. 110-7.
41. Gogos CA, Maroulis J, Zoumbos NC a ost.: The effect of parenteral indomethacin on T-lymphocyte subpopulations and cytokine production in patients under major surgical operations. *Res Exp Med Berl*, 195, 1995, s. 85-92.
42. Cain WC, Stuart RW, Lefkowitz DL a ost.: Inhibition of tumor necrosis factor and subsequent endotoxin shock by pirfenidone. *Int J Immunopharmacol*, 1998; 20, 1998, s. 685-95.
43. Cain BS, Meldrum DR, Harken AH a ost.: The physiologic basis for anticytokine clinical trials in the treatment of sepsis. *J Am Coll Surg*, 186, 1998, s. 337-50.
44. Cohen J, Heumann D, Glauser MP: Do monoclonal antibodies and anticytokines still have a future in infectious diseases? *Am J Med*, 29, 1995, s. 45S-52S.
45. Baumann H, Marinkovic-Pajovic S, Won KA, Jones VE, Campos SP, Jahreis GP, Morella KK: The action of interleukin 6 and leukaemia inhibitory factor on liver cells. *Ciba Found Symp* 1992; 167: 100-114.
46. Beato M, Klug J: Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 225-236.
47. Boosalis MG, Gray D, Walker S, Sutliff S, Talwalker R, Mazumder A: The acute phase response in autologous bone marrow transplantation. *J Med*. 1992; 23: 3-4.
48. Bucurenci N: Alpha 1-antitrypsin: controversial role in pathological states. *Arch Microbiol Immunol* 1992; 51: 27-32.
49. Burger W, Ewald C, Fennert EM: Increase in C-reactive protein in the serum of piglets (pCRP) following ACTH or corticosteroid administration. *Zentralbl Veterinarmed* 1998; 45: 1-6.

50. Buttenschoen K, Buttenschoen DC, Berger D, Vasilescu C, Schafheutle S, Goeltenboth B, Seidelmann M, Beger HG: Endotoxemia and acute-phase proteins in major abdominal surgery. *Am J Surg* 2001; 181: 36-43.
51. Cengiz M, Akbulut S, Atahan IL, Grigsby PW: Acute phase response during radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49: 1093-6.
52. Clyne B, Olshaker JS: The C-reactive protein. *J Emerg Med* 1999; 17: 1019-1025.
53. Dinarello CA: Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 1991; 77: 1627-1632.
54. Dobryszczyka W: Biological functions of haptoglobin - new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 647-54.
55. Fitch CA, Song Y, Levenson CW: Developmental regulation of hepatic ceruloplasmin mRNA and serum activity by exogenous thyroxine and dexamethasone. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 221: 27-31.
56. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D: Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482: 157-171.
57. Fransen EJ, Maessen JG, Elenbaas TW, van Aarnhem EE, van Dieijen-Visser MP: Enhanced preoperative C-reactive protein plasma levels as a risk factor for postoperative infections after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 134-138.
58. Foa R, Gustini A.: IL-2 treatment for cancer: from biology to gene therapy *Br J Cancor* 1992,66,992-998
59. Gaillard JP, Mani JC, Liautard J, Klein B, Brochier J: Interleukin-6 receptor signaling. *Eur Cytokine Netw* 1999; 10: 43-48.
60. Gendrel D: Biochemical markers of bacterial infection. *Arch Pediatr* 2000; 7: S322-S324.
61. Gibbs J, Cull W, Henderson W, Daley J, Hur K, Khuri SF: Preoperative serum albumin level as a predictor of operative mortality and morbidity: results from the National VA Surgical Risk Study. *Arch Surg* 1999; 134: 36-42.
62. Gitlin JD: Aceruloplasminemia. *Pediatr Res* 1998; 44: 271-276.
63. Gürlich R, Maruna P, Čermák J, Výborný J, Mašek Z: Acute phase proteins in an early diagnosis of septic complications in postoperative period. *Rozhl Chir* 1993; 72: 235-238 ,in Czech).
64. Gürlich R, Maruna P, Čermák J, Mašek Z: The diagnostic value of proinflammatory cytokines and acute phase proteins in postoperative sepsis. 9th European Congress on Intensive Care Medicine, Glasgow. 1996. Abstracts. 429-433.
65. Gürlich R, Maruna P, Čermák J: Serum levels of cytokines during the early postoperative period. *Intensive Care Med* 1996; 22: S335.
66. Gürlich R, Maruna P, Čermák J: The role of cytokines in diagnosis of postoperative sepsis. *Acta Anaest Scand* 1996; 40: S239.
67. Harris ZL, Migas MC, Hughes AE, Logan JI, Gitlin JD: Familial dementia due to a frameshift mutation in the caeruloplasmin gene. *Q J Med* 1996; 89: 355-9.

68. Hellgren G, Jansson JO, Carlsson LM, Carlsson B: The growth hormone receptor associates with Jak1, Jak2 and Tyk2 in human liver. *Growth Horm IGF Res* 1999; 9: 212-8.
69. Hulthe J, Wikstrand J, Fagerberg B: Relationship between C-reactive protein and intima-media thickness in the carotid and femoral arteries and to antibodies against oxidized low-density lipoprotein in healthy men: the Atherosclerosis and Insulin Resistance (AIR) study. *Clin Sci (Colch)* 2001; 100: 371-8.
70. Jeffrey D, Eskew, Roberto M, Vanacore, LokMan Sung, Pedro J. Morales, and Ann Smith: Cellular Protection Mechanisms against Extracellular Heme. *J Biol Chem* 1999; 274: 638-648.
71. Jensen LE, Muzio M, Mantovani A, Whitehead AS: IL-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the IL-1 receptor accessory protein. *J Immunol* 2000; 164: 5277-6.
72. Jeschke MG, Herndon DN, Wolf SE, DebRoy MA, Rai J, Lichtenbelt BJ, Barrow RE: Recombinant human growth hormone alters acute phase reactant proteins, cytokine expression, and liver morphology in burned rats. *J Surg Res* 1999; 83: 122-9.
73. Jeschke MG, Wolf SE, DebRoy MA, Herndon DN: The combination of growth hormone with hepatocyte growth factor alters the acute phase response. *Shock* 1999; 12: 181-7.
74. Karzai W, Reinhart K: Sepsis: definitions and diagnosis. *Int J Clin Pract.* 1998; 95: S44-S48.
75. Klener P: Cytokines in internal medicine, Avicenum, Praha, 1997 (in Czech)
76. Langlois MR, Delanghe JR: Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 1996; 42: 1589-1600.
77. Lieber CS: Carbohydrate deficient transferrin in alcoholic liver disease: mechanisms and clinical implications. *Alcohol* 1999; 19: 249-254.
78. Lin ZY, Wang LY, Yu ML, Chen SC, Chuang WL, Hsieh MY, Tsai JF, Chang WY: Role of serum C-reactive protein as a marker of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 417-421.
79. Loudianos G, Gitlin JD: Wilson's disease. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 353-364.
80. Lyoumi S, Puy H, Tamion F, Bogard C, Leplingard A, Scotte M, Vranckx R, Gauthier F, Hiron M, Daveau M, Nordmann Y, Deybach JC, Lebreton JP: Heme and acute inflammation role *in vivo* of heme in the hepatic expression of positive acute-phase reactants in rats. *Eur J Biochem* 1999; 261: 190-6.
81. Mackiewicz A, Laciak M, Gorny A, Baumann H: Leukemia inhibitory factor, interferon gamma and dexamethasone regulate N-glycosylation of alpha 1-protease inhibitor in human hepatoma cells. *Eur J Cell Biol* 1993; 60: 331-6.
82. Mackiewicz A, Mackiewicz K: Glycoforms of serum alpha 1-acid glycoprotein as markers of inflammation and cancer. *Glycoconj J* 1995; 12: 241-7.
83. Maes M: A review on the acute phase response in major depression. *Rev Neurosci* 1993; 4: 407-16.

84. Mahadeva R, Lomas DA: Genetics and respiratory disease. 2. Alpha 1-antitrypsin deficiency, cirrhosis and emphysema. *Thorax* 1998; 53: 501-5.
85. Mahadeva R, Stewart S, Bilton D, Lomas DA: Alpha-1 antitrypsin deficiency alleles and severe cystic fibrosis lung disease *Thorax* 1998; 53: 1022-1024.
86. Marinkovic S, Baumann H: Structure, hormonal regulation, and identification of the interleukin-6- and dexamethasone-responsive element of the rat haptoglobin gene. *Mol Cell Biol* 1990 Apr; 10(4): 1573-83.
87. Marková M, Haluzík M, Rosická M, Svobodová J: Serum leptin levels in patients with sideropenic and pernicious anemia: the influence of anemia treatment, *Phys Res* 2000; 49: 679-684.
88. Marková M, Haluzík M, Jiskra J, Rosická M, Svobodová J, Haluzíková D: The influence of sideropenic anaemia and its treatment on serum leptin levels. *Čas Lék čes* 2001; 140: 767-769 (in Czech)
89. Maruna P, Mašek Z, Schreiber V: The enzymatic and immunochemic analysis of ceruloplasmin in serum. *Biochem Clin Bohemoslov* 1992; 21: 218-224 (in Czech).
90. Maruna P: Acute phase proteins in model situations. Kandidátská dizertační práce, Prague, 1993 (in Czech).
91. Maruna P, Mašek Z, Gürlich R, J Dohnalová: Acute phase proteins in postoperative period. *Klin Biochem Metab* 1993; 1: 39-44 (in Czech).
92. Maruna P, Mašek Z, Schreiber V: Methylene blue inhibition of estradiol-induced increase of ceruloplasmin serum level in rats. *Physiol Res* 1994; 43: 219-221.
93. Maruna P, Gürlich R: The selection of proinflammatory cytokines and acute phase proteins for detection and monitoring of postoperative intraabdominal sepsis. Abstracts of the 38th World Congress of Surgery, Wien, 1999.
94. Maruna P, Mašek Z: Acute phase proteins in patients with Cushing's disease. *Diabet Metab Endokrin Výž* 1999; 2: S41 (in Czech)
95. Maruna P, Gürlich R, Fraško R, Chachkhiani I: Acute phase proteins in emergency medicine. *Trendy v Med* 2000; 2, 73-77 (in Czech).
96. Maruna P: Pentraxins I. C reactive protein and serum amyloid P. *Klin Biochem Metab* 2001; 9: 100-105 (in Czech).
97. Maruna P: Pentraxins II. Long pentraxins. *Klin Biochem Metab.* 2001; 9: 106-110 (in Czech).
98. Maruna P, Gürlich R, Chachkhiani I, Fraško R: Diagnostic output of proinflammatory cytokines and acute phase proteins in detection and monitoring of postoperative intraabdominal sepsis. *Trans J Immun* 2001; 2: 89-97.
99. Maruna P, Marunová M, Owen K: Changes of acute phase protein levels in patients with central hypercortisolism. *Čas Lék čes* 2002; 141: 207-210 (in Czech).
100. Maruna P, Kofránek J, Marunová M, Svačina Š: Changes of acute phase protein synthesis depend on overproduction of growth hormone. *Trendy v Med.* 2002; 4: 75-79 (in Czech).

101. Mašek Z, Maruna P, Schreiber V: Acute phase proteins. *Sborník lék.* 1995; 96: 451-454 (in Czech)
102. Mejdoubi N, Henriques C, Bui E, Durand G, Lardeux B, Porquet D: Growth hormone inhibits rat liver alpha-1-acid glycoprotein gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Hepatology* 1999; 29: 186-94.
103. Milano G: Serum prealbumin, retinol-binding protein, transferrin and albumin levels in patients with large bowel cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1978; 61: 687-691.
104. Moshage H: Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol* 1997; 181: 257-266.
105. Nakamura K, Moriyama Y, Kariyazono H, Hamada N, Toyohira H, Taira A, Yamada K: Influence of preoperative nutritional state on inflammatory response after surgery. *Nutrition* 1999; 15: 834-841.
106. Nilsson LN, Bales KR, DiCarlo G, Gordon MN, Morgan D, Paul SM, Potter H: Alfa-1-antichymotrypsin Promotes {beta}-Sheet Amyloid Plaque Deposition in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 2001; 21: 1444-1451.
107. Nishiyama T, Hanaoka K: Free hemoglobin concentrations in patients receiving massive blood transfusion during emergency surgery for trauma. *Can J Anaesth* 2000; 47: 881-885.
108. O'Riordain MG, Ross JA, Fearon KCH, Maingay J, Farouk M, Garden OJ, Carter DC: Insulin and counterregulatory hormones influence acute-phase protein production in human hepatocytes. *Am J Physiol* 1995; 269: E323-E330.
109. Oberhoffer M, Vogelsang H, Russwurm S, Hartung T, Reinhart K: Outcome prediction by traditional and new markers of inflammation in patients with sepsis. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 363-368.
110. Ochrietor JD, Harrison KA, Zahedi K, Mortensen RF: Role of STAT3 and C/EBP in cytokine-dependent expression of the mouse serum amyloid P-component and C-reactive protein genes. *Cytokine* 2000; 12: 888-99.
111. Patrick L, Uzick M.: Cardiovascular disease: C-reactive protein and the inflammatory disease paradigm: HMG-CoA reductase inhibitors, alpha-tocopherol, red yeast rice, and olive oil polyphenols. A review of the literature. *Altern Med Rev* 2001; 6: 248-71.
112. Pepys MB, Booth SE, Tennent GA, Butler PJ, Williams DG: Binding of pentraxins to different nuclear structures: C-reactive protein binds to small nuclear ribonucleoprotein particles, serum amyloid P component binds to chromatin and nucleoli. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 152-7.
113. Percival SS: Regulation of Cu,Zn-superoxide dismutase with copper. Coeruloplasmin maintains levels of functional enzyme activity during differentiation of K562 cells. *Biochem J* 1991; 274: 153-158.
114. Peters M, Roeb E, Pennica D, Meyer zum Buschenfelde KH, Rose-John S: A new hepatocyte stimulating factor: cardiostrophin-1 (CT-1). *FEBS Lett* 1995; 372: 177-80.

115. Polentarutti N, Picardi G, Basile A, Cenzuales S, Rivolta A, Matteucci C, Peri G, Mantovani A, Introna M: Interferon-gamma inhibits expression of the long pentraxin PTX3 in human monocytes. *Eur J Immunol* 1998; 28: 496-501.
116. Pous C., Chauvelotmoachon L., Lecoustillier M., Durand G.: Recombinant human interleukin-1b and tumor necrosis factor affect glycosylation of serum a1-acid glycoprotein in rats. *Inflammation* 1992; 16: 197-203.
117. Ramadori G, Armbrust T: Cytokines in the liver. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 777-784.
118. Raynes JG, Eagling S, McAdam KP: Acute-phase protein synthesis in human hepatoma cells: differential regulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6. *Clin Exp Immunol* 1991; 83: 488-91.
119. Richards CD, Brown TJ, Shoyab M, Baumann H, Gauldie J: Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J Immunol* 1992; 148: 1731-6.
120. Richards CD, Kerr C, Tanaka M, Hara T, Miyajima A, Pennica D, Botelho F, Langdon CM: Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in fibroblasts and acute phase proteins in hepatocytes in vitro by mouse oncostatin M, cardiotrophin-1, and IL-6. *J Immunol* 1997; 159: 2431-7.
121. Richards CD, Langdon C, Pennica D, Gauldie J: Murine cardiotrophin-1 stimulates the acute-phase response in rat hepatocytes and H35 hepatoma cells. *J Interferon Cytokine Res* 1996; 16: 69-75.
122. Rintala E, Remes K, Salmi TT, Koskinen P, Nikoskelainen J: The effects of pretransplant conditioning, graft-versus-host disease and sepsis on the CRP levels in bone marrow transplantation. *Infection* 1997; 25: 335-338.
123. Robledo O, Guillet C, Chevalier S, Fourcin M, Froger J, Pouplard-Barthelaix A, Pennica D, Gascan H: Hepatocyte-derived cell lines express a functional receptor for cardiotrophin-1. *Eur Cytokine Netw* 1997; 8: 245-52.
124. Rosická M, Kršek M, Haluzík M, Svobodová J, Kotrlíková E, Justová V, Lacinová Z, Jarkovská Z: Plasma ghrelin levels in patients with short bowel syndrome. *Endocr Res* 2002; 28: 27-33.
125. Rossbacher J, Wagner L, Pasternack MS: Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. *Scand J Immunol* 1999; 50: 399-404.
126. P. Maruna, R. Gurlich, I. Chachkhiani, R. Fražko.: Diagnostic output of proinflammatory cytokines and acute phase proteins in detection and monitoring of postoperative intra-abdominal sepsis. *TCJI* 2001, 2: 89-99
127. Thompson D, Milford-Ward A, Whicher JT: The value of acute phase protein measurements in clinical practice. *Ann Clin Biochem*, 29, 1992, s. 123-131
128. Milano G: Serum prealbumin, retinol-binding protein, transferrin and albumin levels in patients with large bowel cancer. *J Natl Cancer Inst*, 61, 1978, s. 687-691.

129. *Knekt P, Aromaa A, Maatela J, Rissanen A, Hakama M, Aaran RK, Nikkari T, Hakulinen T, Peto R, Teppo L: Serum ceruloplasmin and the risk of cancer in Finland. Br J Cancer, 65, 1992, s. 292-296*
130. *Schultz DR, Arnold PI: Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, α 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. Semin Arthr Rheum, 20, 1990, s. 129-147.*
131. *Bucurenci N: Alpha1-antitrypsin: controversial role in pathological states. Arch Microbiol Immunol, 51, 1992, s. 27-32.*
132. *P.Maruna, R.Gurlich, R.Frško, I.Chachkiai : Proteiny akutní fáze v urgentní medicíně, Trendy v medicíně 2000, 2: 73-77.*
133. *Engerwall P. et al.: Monitoring of endotoxin IL-6, CRP serum concentrations in neutropenic patients with fever. Eur. J. Haematol. 54, 1995, p. 226-234.*
134. *Bendele A.M., Chlipala E.S. et al.: Combination benefit of treatment with the cytokine inhibitors IL-1 receptor antagonist and PEGylated soluble TNF receptor type I in animal models of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 43, 2000 p. 2648-2659.*
135. *Cain B.S. et al.: The physiologic basis for anticytokine clinical trails in the treatment of sepsis. J.Am.Coll.Surg. 186, 1998, p. 337-350.*
136. *Tashiro, T., et al. Changes in immune function following surgery for esophageal carcinoma. Nutrition, 1999, roè. 15, s. 760-766.*
137. *Giroir P.: Mediators of septic shock. Critical Care Medicine. 1993, 5, 780-789. 100
Huttemeier P.C., Titter E.F.: Calcitonin gene-related peptide mediates hypotension and tachycardia in endotoxin rats. Am J Physiol 1993, 265, 4767-9.*
138. *Meisner M.: Procalcitonin, a new innovative infection parameter, Berlin, Prhms-Diagnostica 1996, 80.*
139. *Oberhoffer M., Karzai W.: Procalcitonin a new diagnostic parameter for severe infections and sepsis . Anaesthesist. 47, 1998, p. 581-587.*
140. *Clyne B, Olshaker JS: The C-reactive protein. J Emerg Med, 17, 1999, s. 1019-25.*
141. *Foglar C, Lindsey SL: C-reactive protein in orthopedics. Orthopedics, 21, 1998, s. 687-91.*
142. *Fouad FM, Mamer OA, Shahidi F: Biogenesis of hepatic acute-phase response to trauma. Med Hypotheses, 47, 1996, s. 157-77.*
143. *Gürlich R, Maruna P, Lindner J. a j.: Hodnocení laparoskopické a laparotomické cholecystektomie srovnáním dynamiky proteinů akutní fáze. Rozhl Chir, 73, 1994, s. 214-217.*
144. *Maruna P, Mašek Z, Gürlich R., aj.: Dynamika proteinů akutní fáze v pooperačním období. Klin Biochem Metab, 1, 1993, s. 39-44.*
145. *Mašek Z, Maruna P, Schreiber V: Proteiny akutní fáze. Sborník lék, 96, 1995, s. 451-454.*
146. *Ryan TA, Rady MY, Bashpur CA a j.: Predictors of outcome in cardiac surgical patients with prolonged intensive care stay. Chest, 112, 1997, s. 1035-42.*

147. Salzet M, Vieau D, Stefano GB: Serpins: an evolutionarily conserved survival strategy. *Immunol Today*, 20, 1999, s. 541-4.
148. Sumeray MS, Montgomery HE, Humphries SE: Beyond coagulation: fibrinogen as a cause of cardiovascular surgical disease. *Cardiovasc Drugs Ther*, 12, 1998, s. 261-5.
149. Urieli-Shoval S, Linke RP, Matzner Y: Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Curr Opin Hematol*, 7, 2000, s. 64-9.
150. Woodburn KR, Rumley A., Lowe GD aj.: Fibrinogen and markers of fibrinolysis and endothelial damage following resolution of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 10, 1995, s. 272-8.
151. Cizza G, Lotsikas AJ, Licinio J, Gold PW, Chrousos GP: Plasma leptin levels do not change in patients with Cushing's disease shortly after correction of hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2747-50.
152. Dallongeville J, Fruchart JC, Auwerx J: Leptin, a pleiotropic hormone: physiology, pharmacology, and strategies for discovery of leptin modulators. *J Med Chem* 1998; 41: 5337-52.
153. De Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B: Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* 1995; 270: 15958-61.
154. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK: Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 1999; 23: 775-86.
155. Faggioni R, Fantuzzi G, Fuller J, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C: IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation. *Am J Physiol* 1998; 274: R204-8
156. Fried M: Open and Laparoscopic Non-Adjustable Gastric Banding in: Deitel, M. : Surgery for morbidly obese patient. Mothersill printing 2000 inc. Bowmanvill, on Canada, 333-350.
157. Glasow A, Haidan A, Hilbers U, Breidert M, Gillespie J, Scherbaum WA, Chrousos GP, Bornstein SR: Expression of Ob receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4459-66.
158. Granowitz EV: Transforming growth factor-beta enhances and pro-inflammatory cytokines inhibit ob gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240: 382-5.
159. Haluzík M, Marková M, Sulková S, Haluzíková D, Svobodová J, Bednářová V, Jiskra J.: Vztahy mezi sérovými hladinami leptinu, parametry krevního obrazu a hladinou erythropoetinu u hemodialyzovaných pacientů. *Čas Lék čes* 2000; 139: 731-4.
160. Haluzík M, Marková M, Jiskra J, Svobodová J: Má leptin fyziologický význam v regulaci hematopoézy ? *Čas Lék čes* 2000; 139: 259-262.
161. Holéczy P, Payer Jr. J, Králová A: Laparoscopic adjustable gastric band: first experience in Slovakia. *Obes Surg* 1999; 8: 198-201.

162. Janssen JA, Huizenga NA, Stolk RP, Grobbee DE, Pols HA, de Jong FH, Attanasio AM, Blum WF, Lamberts SW: The acute effect of dexamethasone on plasma leptin concentrations and the relationships between fasting leptin, the IGF-I/IGFBP system, dehydroepiandrosterone, androstenedione and testosterone in an elderly population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998; 48: 621-6.
163. Jiskra J, Haluzík M, Svobodová J, Haluzíková D, Nedvídková J, Pařízková J, Kotrlíková E: Sérové koncentrace leptinu a solubilního leptinového receptoru u pacientek s mentální anorexií. *Čas Lék čes* 2000; 139: 660-663.
164. Kain ZN, Zimolo Z, Heninger G: Leptin and the perioperative neuroendocrinological stress response. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2438-42.
165. Kruse M, Bornstein SR, Uhlmann K, Paeth G, Scherbaum WA: Leptin down-regulates the steroid producing system in the adrenal. *Endocr Res* 1998; 24: 587-90.
166. Leal-Cerro A, Considine RV, Peino R, Venegas E, Astorga R, Casanueva FF, Dieguez C: Serum immunoreactive-leptin levels are increased in patients with Cushing's syndrome. *Horm Metab Res* 1996; 28: 711-3.
167. Maruna P, Gürlich R, Fraško R: Leptin – nový reaktant akutní fáze. *Inter. Lék.* 2001; v tisku.
168. Miell JP, Englaro P, Blum WF: Dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal human subjects. *Horm Metab Res* 1996; 28: 704-7.
169. Plata-Salaman CR: Cytokine-induced anorexia. Behavioral, cellular, and molecular mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 856: 160-70.
Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B, Gaillard RC: Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 1998; 139: 4264-8.
170. Purnell JQ, Samuels MH: Levels of leptin during hydrocortisone infusions that mimic normal and reversed diurnal cortisol levels in subjects with adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3125-8.
171. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Poverini PJ, Flores-Riveros JR: Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998; 281: 1683-6
172. Sliker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW: Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem* 1996; 271: 5301-4.
173. van Dijk G, Donahey JC, Thiele TE, Scheurink AJ, Steffens AB, Wilkinson CW, Tenenbaum R, Campfield LA, Burn P, Seeley RJ, Woods SC: Central leptin stimulates corticosterone secretion at the onset of the dark phase. *Diabetes* 1997; 46: 1911-1914
174. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, Rascher W, Teller W, Tornqvist H, Hauner H: Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 1996; 45: 1435-8.

175. Ryšavá R, Merta M, Tesař V, Jirsa M, Zima T: Can serum amyloid A or macrophage colony stimulating factor serve as marker of amyloid formation process? *Biochem Mol Biol Int* 1999; 47: 845-850.
176. Salaspuro M: Carbohydrate-deficient transferrin as compared to other markers of alcoholism: a systematic review. *Alcohol* 1999; 19: 261-71.
177. Sandford AJ, Chagani T, Spinelli JJ, Pare PD: Alpha₁-antitrypsin genotypes and the acute-phase response to open heart surgery. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1624-1628.
178. Sapolsky RM, Romero M, Munck AU: How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative action. *Endocr Rev* 2000; 21: 55-89.
179. Sato M, Schilsky ML, Stockert RJ, Morell AG, Sternlieb I: Detection of multiple forms of human ceruloplasmin. *J Biol Chem*. 1990; 265: 2533-2537.
180. Seery LT, Schoenberg DR, Barboux S, Sharp PM, Whitehead AS: Identification of a novel member of the pentraxin family in *Xenopus laevis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1993; 253: 263-70.
181. Tashiro, T., et al. Changes in immune function following surgery for esophageal carcinoma. *Nutrition*, 1999, roè. 15, s. 760-766.
182. Faist, E., et al. Depression of cellular immunity after major injury. *Arch. Surg.*, 1986, roè. 1986, s. 1000-1005.
183. Decker, D., et al. Surgical stress induced a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery*, 1996, roè. 119, s. 316-325.
184. Brune, L. B., et al. Downregulation of T helper type 1 immune response and altered pro-inflammatory and anti-inflammatory T cell cytokine balance following conventional but not laparoscopic surgery. *Am. J. Surg.*, 1999, roè. 177, s. 55-60.
185. Gitzelmann, C. A., et al. Cell-mediated immune response is better preserved by laparoscopy than laparotomy. *Surgery*, 2000, roè. 127, s. 65-71.
186. Horgan, A. F., et al. Altered gene transcription after burn injury results in depressed T-lymphocyte activation. *Ann. Surg.*, 1994, roè. 220, s. 342-352.
187. Lee, S. W., et al. Time course of differences in lymphocyte proliferation rates after laparotomy vs CO₂ insufflation. *Surg. Endosc.*, 2000, roè. 14, s. 145-148.
188. Livingston, D. H., et al. Depressed interferon gamma production and monocyte HLA-DR expression after severe injury. *Arch. Surg.*, 1988, roè. 123, s. 1309-1312.
189. Svec, F., et al. The action of exogenous dehydroepiandrosterone in experimental animals and humans. *PSEBM*, 1998, roè. 218, s. 174-189.
190. Šterzl, L., et al. 7Beta-OH-DHEA counteracts dexamethasone induced suppression of primary immune response in murine spleenocytes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 1999, roè. 71, s. 133-137.

191. Kroboth, P. D., et al. DHEA and DHEA-S: a review. *J. Clin. Pharmacol.*, 1999, roè. 39, s. 327-348.
192. Schmidt, M., et al. Conversion of dehydroepiandrosterone to downstream steroid hormones in macrophages. *J. Endocrinol.*, 2000, roè. 164, s. 161-169.
193. Sablotzki, A., et al. Dysregulation of immune response following neurosurgical operations. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 2000, roè. 44, s. 82-87.
194. Kumpfel, T., et al. Dehydroepiandrosterone Response to the Adrenocorticotropin Test and the Combined Dexamethasone and Corticotropin-Releasing Hormone Test in Patients with Multiple Sclerosis. *Neuroendocrinology*, 1999, roè. 70, s. 431-438.
195. Longcope, C. Metabolism of dehydroepiandrosterone. *Ann. NY, Acad. Sci.*, 1995, roè. 774, s. 143-148.
196. MacPhee, L. A., et al. The role of endogenous steroid hormones in the generation of T helper 2-mediated autoimmunity in mercuric chloride-treated Brown-Norway rats. *Immunology*, 2000, roè. 99, s. 141-146.
197. O'Sullivan, S. T., et al. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann. Surg.*, 1995, roè. 222, s. 482-492.
198. Pidgeon, G. P., et al. The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumour growth in a murine model of metastatic disease. *Br. J. Cancer*, 1999, roè. 81, s. 1311-1317.
199. Wigmore, S. J., et al. Modulation of the cytokine and acute-phase response to major surgery by recombinant interleukin 2. *Br. J. Surg.*, 1995, roè. 82, s. 1289-1290.
200. Zissel, G., et al. Induction of accessory cell function of human alveolar macrophages by inhalation of human natural interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother.*, 1996, roè. 42, s. 122-126.
201. McCarty, M. F. Promotion of interleukin-2 activity as a strategy for „rejuvenating“ geriatric immune function. *Med. Hypotheses*, 1997, roè. 48, s. 47-54.
202. Deehan, D. J., et al. Modulation of the cytokine and acute-phase response to major surgery by recombinant interleukin-2. *Br. J. Surg.*, 1995, roè. 82, s. 86-90.
203. Ratto, G. B., et al. A randomized trial of adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 versus standard therapy in the postoperative treatment of resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 1996, roè. 78, s. 244-251.
204. Figlin, R. A., et al. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 1999, roè. 17, s. 2521-2529.
205. Meropol, N. J., et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as infection prophylaxis in high-risk oncologic surgery. *Am. J. Surg.*, 1996, roè. 172, s. 299-302.
206. Hill, A. D., et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inhibits tumor growth during the postoperative period. *Surgery*, 1996, roè. 119, s. 178-185.

207. Cain BS, Meldrum DR, Harken AH and others: The physiologic basis for anticytokine clinical trials in the treatment of sepsis. *J Am Coll Surg*, 186, 1998, s. 337-50.
208. Senior K: IL-6 and gp130 signalling: its role in chronic disease. *Mol Med Today* 1999; 5: 283.
209. Shipulina N, Smith A, Morgan WT: Heme binding by hemopexin: evidence for multiple modes of binding and functional implications. *J Protein Chem* 2000; 19: 239-48.
210. Shokeir MHK: Nature of ceruloplasmin deficiency in the newborn. *Clin Genet*. 1971; 2: 223.
211. Shrive AK, Metcalfe AM, Cartwright JR, Greenhough TJ: C-reactive protein and SAP-like pentraxin are both present in *Limulus polyphemus* haemolymph: crystal structure of *Limulus* SAP. *J Mol Biol* 1999; 290: 997-1008.
212. Schaper F, Siewert E, Gomez-Lechon MJ, Gatsios P, Sachs M, Birchmeier W, Heinrich PC, Castell J: Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) signals via the STAT3/APRF transcription factor in human hepatoma cells and hepatocytes. *FEBS Lett* 1997; 405: 99-103.
213. Schlimgen AK, Helms JA, Vogel H, Perin MS: Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system. *Neuron* 1995; 14 (3): 519-26.
214. Schultz DR, Arnold PI: Properties of 4 acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, α 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthr Rheum* 1990; 20: 129-147.
215. Schumann RR, Zweigner J: A novel acute-phase marker: lipopolysaccharide binding protein. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 271-4.
216. Schwenk W, Jacobi C, Mansmann U, Bohm B, Muller JM: Inflammatory response after laparoscopic and conventional colorectal resections - results of a prospective randomized trial. *Lang Arch Surg* 2000; 385: 2-9.
217. Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KJ, Dorner AJ: Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia* 1999; 13: 1307-15.
218. Smith A, Eskew JD, Borza CM, Pendrak M, Hunt RC: Role of heme-hemopexin in human T-lymphocyte proliferation. *Exp Cell Res* 1997; 232: 246-254.
219. Smith JW, McDonald TL: Production of serum amyloid A and C-reactive protein by HepG2 cells stimulated with combination of cytokines or monocyte conditioned media: the effects of prednisolone. *Clin Exper Immunol* 1992; 90: 293-299.
220. Sudhoff T, Giagounidis A, Karthaus M: Evaluation of neutropenic fever: value of serum and plasma parameters in clinical practice. *Chemotherapy* 2000; 46: 77-85.
221. Svobodová J, Haluzík M, Rosická M, Kotlíková E, Kábrt J: The relation of plasma leptin to the regulation of basal energy output. *Vn Lék* 1999; 45: 703-7 (in Czech)
222. Taaffe DR, Harris TB, Ferrucci L, Rowe J, Seeman TE: Cross-sectional and prospective relationships of interleukin-6 and C-reactive protein with physical performance in

- elderly persons: MacArthur studies of successful aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000; 55: 709-15.
223. Taketani S, Immenschuh S, Go S, Sinclair PR, Stockert RJ, Liem HH, Muller-Eberhard U: Hemopexin from four species inhibits the association of heme with cultured hepatoma cells or primary rat hepatocytes exhibiting a small number of species specific hemopexin receptors. *Hepatology* 1998; 27: 808-812.
 224. Thompson D, Harrison SP, Evans SW, Whicher JT: Insulin modulation of acute-phase protein production in a human hepatoma cell line. *Cytokine* 1991; 3: 619-626.
 225. Thompson D, Milford-Ward A, Whiher JT: The value of acute phase proteinm measurements in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 123-131.
 226. Tobler A., Meier R., Seitz M., Dewald B., Baggiolini M., Fey M.F.: Glucocorticoids downregulate gene expression of GM-CSF, NAP-1/IL-8, and IL-6, but not of M-CSF in human fibroblasts. *Blood* 1992; 79: 45-51.
 227. Tripodi A, Chantarangkul V, De Stefano V, Mannucci P: Alpha2-macroglobulin levels are high in adult patients with congenital antithrombin deficiency. *Thromb Res* 2000; 98: 117-22.
 228. Turner GA: Haptoglobin. A potential reporter molecule for glycosylation changes in disease. *Adv Exp Med Biol* 1995; 376: 231-8.
 229. Uhlar CM, Whitehead AS: Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999; 265: 501-23.
 230. Umans L, Serneels L, Overbergh L, Stas L, Van Leuven F: (6) Alpha2-macroglobulin- and murinoglobulin-1- deficient mice. A mouse model for acute pancreatitis. *Am J Pathol* 1999; 155: 983-993.
 231. Urano T, Ihara H, Suzuki Y, Takada Y, Takada A: Coagulation-associated enhancement of fibrinolytic activity via a neutralization of PAI-1 activity. *Semin Thromb Hemost* 2000; 26: 39-42.
 232. van Dijk W: Alpha 1-Acid glycoprotein. A natural occurring anti-inflammatory molecule? *Adv Exp Med Biol* 1995; 376: 223-9.
 233. Walsh MT, Divane A, Whitehead AS: Fine mapping of the human pentraxin gene region on chromosome 1q23. *Immunogenetics* 1996; 44: 62-9.
 234. Wang Y, Robledo O, Kinzie E, Blanchard F, Richards C, Miyajima A, Baumann H: Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 2000; 275: 25273-85.
 235. Wernerman J, Barle H, Hammarqvist F: Tissue-specific effects of growth hormone on protein metabolism. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8: 111-3.
 236. Wiegers GJ, Reul JMHM: Induction of cytokine receptors by glucocorticoids: functional and pathological significance. *Trends Pharmacol.* 1998; 19: 317-321.
 237. Wigmore SJ, Fearon KC, Maingay JP, Lai PB, Ross JA: Interleukin-8 can mediate acute-phase protein production by isolated human hepatocytes. *Am J Physiol* 1997; 273: E720-6.

238. Wigmore SJ, Fearon KC, Ross JA: Modulation of human hepatocyte acute phase protein production in vitro by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Ann Surg* 1997; 225: 103-11.
239. Wigmore SJ, McMahon AJ, Sturgeon CM, Fearon KC: Acute-phase protein response, survival and tumour recurrence in patients with colorectal cancer. *Br J Surg.* 2001; 88: 255-260.
240. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL: Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Res* 2000; 887: 80-89.
241. Yiangou M, Paraskeva E, Hsieh CC, Markou E, Victoratos P, Scouras Z, Papaconstantinou J: Induction of a subgroup of acute phase protein genes in mouse liver by hyperthermia. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1396: 191-206.
242. Yu SJ, Boudreau F, Desilets A, Houde M, Rivard N, Asselin C: Attenuation of haptoglobin gene expression by TGFbeta requires the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 544-9.
243. Zhong W, Zen Q, Tebo J, Schlottmann K, Coggeshall M, Mortensen RF: Effect of human C-reactive protein on chemokine and chemotactic factor-induced neutrophil chemotaxis and signaling. *J Immunol* 1998; 161: 2533-2540.
244. Zima T, Štípek S, Tesař V, Němeček K, Měchurová A: Free radicals in pathogenesis of selected disorders. *Čas Lék čes* 1995; 134: 291-295 (in Czech)
245. Zuraw BL, Lotz M: Regulation of the hepatic synthesis of C1 inhibitor by the hepatocyte stimulating factors interleukin 6 and interferon gamma. *Biol Chem* 1990; 265: 12664-70.
246. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J: C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001; 103: 1194-1197.
247. Chachkhiani I, Gurlich R, Maruna M, Fraško R, Lindner J The Postoperative Stress Response and Its Reflection in Cytokine Network and Leptin Plasma levels *Physiol. Res.* 54: 279-285, 2005
248. I.Chachkhiani, R.Gulich, H.Marechkova: Cytokines: role in infection, inflammation and early diagnosis of postoperative complications. *TCJI*, 2000
249. I.Chachkhiani, R.Fraško, R.Gurlich, P. Maruna: Cytokines as useful parameters in diagnostics of postoperative complications. *TCJI*, 2002
250. I.Chachkhiani: Přínos stanovení cytokinů u zánětlivých pooperačních komplikací. *Sb. Lék.* 2003
251. I.Chachkhiani, R. Gurlich, P. Maruna, R. Fraško: The postoperative reaction of leptin and cortizol with infectious complications and without complications. *Exper. Onkol.* 2003.

List of Abbreviations

Note: this list doesn't include abbreviations of measurement units of SI system, the chemical formulas and abbreviations of companies' and institutions' names. It also doesn't list abbreviations used rarely in some of the figures; these are explained in the appropriate table's legend.

AAT	α_1 -antitrypsin
ACTH	adenocorticotropic hormone
AGP	α_1 -acid glycoprotein (orosomukoid)
Alb	albumin
AM	α_2 -macroglobulin
APP	acute phase proteins
AS	atherosclerosis
AST	aspartate aminotransferase
BMT	bone marrow transplant
C1EI	C1 esterase inhibitor
cAMP	cyclic adenosinemonophosphate
CARS	compensatory antiinflammatory response syndrome
cGMP	cyclic guanosinemonophosphate
CML	chronic myeloid leukemia
CNTF	ciliary neurotrophic factor
Cpl	ceruloplasmin
CRH	corticotropin releasing hormone
CRP	C reactive protein
CSF	colony stimulating factor
CT-1	cardiotrophin-1
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylendiamintetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
Fbg	fibrinogen
FGF	fibroblast growth factor
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
G-CSF	granulocytic colony stimulating factor
GH	growth hormone
GM-CSF	granulocyto-macrophage colony stimulating factor
GVHR	graft versus host reaction
GVL	graft versus leukaemia
Hp	haptoglobin
HPA	hypothalamo - pituitary – adrenal
Hpx	hemopexin
IFN	interferon
IGF	inzulin-like growth factor
IL	interleukin
IL-1ra	interleukin-1 receptor antagonist
IL-6R	interleukin-6 receptor
kD	kilodalton
LD ₅₀	50% lethal dose
LH	luteinizing hormone
LIF	leukemia inhibitory factor

LPS	lipopolysaccharide
MB	methylen blue
M-CSF	makrophage colony stimulating factor
MDA	malonyldialdehyd
M _r	molecular weight
mRNA	messenger ribonucleic acid
NAD	nikotinaminadenindinucleotide
NE	neutrophilic elastase
NK	natural killers
NNT-1	neurotrophin-1
NO	nitric oxide
OSM	oncostatin M
PA	prealbumin
PDGF	platelet derived growth factor
PG	prostaglandin
PMN	polymorphonuclears
POMC	proopiomelanocortin
RBP	retinol binding protein
SAA	serum amyloid A
SAP	serum amyloid P
SD	standard deviation
SERPIN	serine protease inhibitor
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SOD	superoxiddismuthase
TEP	tetraetoxypyropane
TGF	transforming growth factor
TNF	tumou necrotising factor
Trf	transferrin
TSH	thyreotropic hormone
XOD	xanthinoxidase

Obsah

1.	Cytokiny, regulátory systémové reakce organismu	2
1.1	Fyzické a chemické vlastnosti cytokinů, klasifikace cytokinů	5
1.2	Bližší charakteristika základních cytokinů	6
1.3	Cytokiny v chirurgii	25
1.3.1	Možnosti a perspektivy terapeutického podání cytokinů v chirurgii	25
1.3.2	Cytokiny v chirurgii	32
1.4	Kaskáda obranné reakce organismu a výtokány	34
2.	Cíle práce	41
3.	Metodika stanovení sledovaných parametrů	42
3.1	Výběr pacientů	42
3.2	ELISA metoda stanovení cytokinů	43
3.3	Imunonefelometrické stanovení APP	44
3.4	Imunoluminometrické stanovení procalcitoninu	45
4.	Proteiny akutní fáze po operaci	46
5.	Fyziologická reakce cytokinů na operační výkon	62
5.1	Sérové hladiny cytokinů po nekomplikovaném operačním zákroku	62
6.	Výtokány v rozvoji zánětlivých pooperačních komplikací	78
6.1	Cytokiny jako spouštěcí proteiny pooperačního multiorgánového selhání	78
6.2	Přínos cytokinů v diagnostice pooperační nitrobřišní sepse	81
6.3	Srovnání úloh vybraných cytokinů a APP během inzultu	82
7.	Procalcitonin jako ukazatel bakteriálního zánětu	86
8.	Leptin – nový zánětlivý ukazatel	90
9.	Pooperační změny buněčné a humorální imunity	102
10.	Využití cytokinů v diagnostice zánětu pobřišnice	112
11.	Závěr	117
	Literatira	119

Poděkování

Nový vědecký lékařský poznatek nikdy nemůže být pouze výsledkem práce jednotlivce. Lékař navazuje na výzkumu a objevy svých předchůdců. Mladý lékař při své práci nezbytně potřebuje cenné rady a doporučení nejvzdělanějších kolegů, kteří tak směřují jeho další medicínský vývoj. Současně je pro něj nenapravitelná podpora celé rodiny a zejména jejích nejmladších členů.

Proto bych eád na tomto místě poděkoval všem, kteří se jakkoli podíleli na zdokonalení této práce.

Panu doc. MUDr Robertu Gürlichovi, CSc. a panu doc. MUDr. Pavlu Marunovi, CSc. za systematickou výuku a cenné podněty a připomínky směřující ke zkvalitnění mé práce.

Paní prof. MU8Dr. Marii Peškové, DrSc., a panu doc. Janu Švábovi, CSc. za vytvoření podmínek pro výzkumnou činnost a zásadní podporu při zpracování disertační práce.

Můj dík patří mé manželce s Timurkem a Giorgiem i celé rodině za nezastupitelnou podporu v průběhu výzkumné práce.

Těmto váženým spolupracovníkům, rodině a mnohým dalším nejmenovaným děkuji.

Ivane Chachkhiani.