

**Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biologických a lékařských věd**

## **Definice, epidemiologie a diagnóza sepse**

**Bakalářská práce**

**Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.**

**Školitel specialista: MUDr. Tomáš Hrnčíř, Ph.D.**

**Hradec Králové, 2012**

**Iva Šplíchalová**

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci „Definice, epidemiologie a diagnóza sepse“ vypracovala samostatně. Veškerá literatura a zdroje, které jsem při zpracování použila, jsou uvedené v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne 24.4. 2012

Podpis:

#### Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé práce PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za odborné vedení, školiteli specialistovi MUDr. Tomáši Hrnčířovi, Ph.D. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. za možnost pracovat na takto zajímavém tématu. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala Ing. Bc. Igoru Šplíchalovi, CSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. za podnětné diskuze a cenné rady při vypracování bakalářské práce.

Tato práce byla vypracována v rámci rozvoje výzkumné organizace Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. (RVO: 61388971) a za podpory grantu Grantové agentury České republiky (grant 524/09/0365).

## ABSTRAKT

**Iva Šplíchalová**

Název bakalářské práce: Definice, epidemiologie a diagnóza sepse

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní program/Obor v rámci kvalifikace:

Zdravotnická bioanalytika/Zdravotní laborant

**Současný stav:** Syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) je odpověď imunitního systému na poškození tkání různého původu. Může vést k syndromu mnohočetného orgánového selhání (MODS), který může končit smrtí. Sepse je definována jako SIRS vyvolaná infekcí. Markery sepse patří do různých skupin, jako jsou proteiny akutní fáze, zánětlivé cytokiny, povrchové buněčné znaky, solubilní receptory, faktory koagulační kaskády, alarminy a jiné. Využitelnost zvířecích modelů lidské sepse bývá někdy zpochybňována.

**Metody:** Srovnání literárních údajů, finančních nákladů a pracnosti ELISA a xMAP technologie.

**Výsledky:** Připravili jsme přehled o definici, epidemiologii a diagnóze sepse a porovnali jsme dvě metody pro detekci zánětlivých cytokinů – ELISA a xMAP technologii. ELISA je široce rozšířená a levnější než xMAP single-plex metoda, s méně nákladnými přístroji a má vyšší reprodukovatelnost. V posledních deseti letech užívání xMAP technologie postupně vzrůstá. xMAP technologie umožňuje stanovit více cytokinů najednou se snižujícími se náklady na každý další přidaný cytokin.

**Závěr:** 1) Sepse patří mezi nejčastější příčiny smrti u kriticky nemocných pacientů, 2) sepsa je způsobená přehnanou imunitní odpovědí na infekční podnět, 3) sepsa může být ovlivněna specifická imunita, 4) sepsa je složitý a ne zcela prozkoumaný proces, 5) pro účinnější léčbu je potřebné lepší pochopení mechanismů sepse, 6) *in vitro* modely nedokáží postihnout složitost sepse, 7) jsou potřebné více propracované zvířecí modely, 8) není známý žádný univerzální marker sepse.

## ABSTRACT

**Iva Šplíchalová**

Title of bachelor thesis: Definition, epidemiology a diagnosis of sepsis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Study programme/Subject of qualification:

Healthcare bioanalytics/Medical Laboratory Technician

**Background:** The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is an immune system response to tissue damage of different origin. It can lead to multiple organ dysfunction syndrome (MODS) and ultimately death. Sepsis is defined as SIRS in response to infection. Markers of sepsis belong to different groups as acute phase proteins, inflammatory cytokines, cell surface markers, soluble receptors, coagulation cascade factors, alarmins and others. A validity of animal models of human sepsis has been sometimes disputed.

**Methods:** Comparison of literature data, financial expenses, and laboriousness between ELISA and xMAP technology.

**Results:** Definition, epidemiology and diagnosis of sepsis were reviewed and two methods for detection of inflammatory cytokines – ELISA and xMAP technology - were compared. ELISA is widely spread, less expensive than an xMAP single-plex assay with lower-cost equipment requirements and higher reproducibility. The use of xMAP technology has been gradually increasing during last ten years. xMAP technology enables multiplex cytokine detection with lower cost per each additional cytokine.

**Conclusions:** 1) Sepsis belongs to the most frequent causes of death in critically ill patients, 2) sepsis is caused by an extreme immune system response to an infection, 3) a specific immunity can be influenced by sepsis, 4) sepsis is complex not fully unraveled process, 5) better understanding of mechanisms of sepsis is needed for more effective therapy, 6) *in vitro* models do not reflect the complexity of sepsis, 7) more sophisticated animal models are needed, 8) no universal marker of sepsis is known.

## OBSAH

1. Úvod.....	3
2. Literární přehled.....	4
2.1. Imunitní systém.....	4
2.1.1. Rozpoznávání vlastního a cizího .....	4
2.1.2. Rozpoznávání nebezpečného .....	5
2.2. Základní pojmy .....	6
2.2.1. Syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) .....	6
2.2.2. Sepse.....	7
2.2.3. Těžká sepe .....	9
2.2.4. Septický šok .....	9
2.2.5. Syndrom mnohočetného orgánového selhání (MODS) .....	9
2.3. Patofyziologie sepse.....	10
2.4. Epidemiologie sepse.....	14
2.5. Diagnostika sepse.....	15
2.5.1. Markery sepse .....	15
2.5.2. Metody používané pro diagnostiku sepse.....	17
2.5.3. Zvířecí modely sepse .....	21
3. Cíl - zadání práce.....	23
4. Materiál a metody.....	24
4.1. Odborné databáze PubMed .....	24
4.2. Reference manager .....	24
4.2.1. Rozšiřování xMAP technologie pro stanovení cytokinů .....	24

4.2.2.	Stanovení prasečích cytokinů xMAP technologií.....	25
4.3.	Náklady stanovení metodami ELISA a xMAP technologií .....	25
4.3.1.	Náklady na pořízení přístrojové vybavení .....	25
4.3.2.	Náklady na kity pro stanovení 6 cytokinů .....	26
5.	Výsledky.....	27
6.	Diskuze.....	29
7.	Závěr.....	35
	Zkratky, odborné termíny a klíčová slova.....	36
8.	Použitá literatura.....	37

# 1. ÚVOD

Mikroorganismy, které se objevily na zemi o více než 3 miliardy let dříve než člověk, jsou téměř všudypřítomné. Jejich symbiotický vztah k člověku se pohybuje od mutualistického, kdy jsou si s člověkem - svým hostitelem navzájem prospěšní, až po parazitický, kdy svého hostitele nejen využívají, ale dokonce jej poškozují. Kniha Roitt's Essential Immunology začíná dlouhou a ne příliš optimistickou větou „Žijeme v potenciálně nepřátelském světě plném nepředstavitelného množství infekčních agens různých tvarů, velikostí, složení a záludnosti charakterů, proti jejichž účinnosti a intenzitě nedokážeme vyvinout dostatečné obranné mechanismy a které by nás sobecky s velkým potěšením využily jako útočiště pro šíření svých vlastních genů“ (Delves et al., 2011). Sepse, která je tématem této bakalářské práce, je důsledkem takovýchto infekcí, tedy extrémního vztahu mezi mikroorganismy a hostitelem.

Sepse je systémová zánětlivá odpověď organismu na infekci. Jedná se složitý proces, ve kterém se prolínají kaskády reakcí zahrnující zánětlivé a nezánětlivé procesy, humorální a buněčné reakce a oběhové abnormality. Základními předpoklady pro úspěšnou terapii a zvyšující se naději pacienta na přežití je proto včasná diagnóza sepse a její závažnosti. V roce 1991 se proto konala v Nortbrookku konference, jejímž cílem bylo shodnout se na definici sepse a sjednotit terminologii, což jsou nezbytné předpoklady pro dorozumění se mezi vědci, kteří se sepsí zabývají a lékaři, kteří léčí pacienty v sepsi. Navzdory používání moderních antibiotik a resuscitačních postupů zůstává sepsa i nadále jednou z hlavních příčin úmrtí u kriticky nemocných pacientů. Proto pochopení příčin a mechanismů sepse a nalezení účinnějších terapeutických postupů zůstávají i nadále aktuálním tématem základního a aplikovaného výzkumu a klinické praxe.



## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Imunitní systém

Dlouhá desetiletí byla funkce imunitního systému popisována pouze jako rozpoznávání cizích a vlastních struktur. Koncem minulého století však Polly Matzingerová navrhla nový model fungování imunitního systému, tzv. „danger model“, jenž je založený na rozpoznávání vlastních struktur, které signalizují nebezpečí a které za normální fyziologické situace jsou skryty imunitnímu rozpoznávání (alarminy) (Matzinger, 2002). Stručně lze imunitní systém popsat jako soubor struktur a mechanismů, které dokáží rozpoznat a omezit vliv cizích nebo vlastních molekulárních struktur, které mohou být pro organismus škodlivé nebo signalizovat nebezpečí (Kono a Rock, 2008).

#### 2.1.1. Rozpoznávání vlastního a cizího

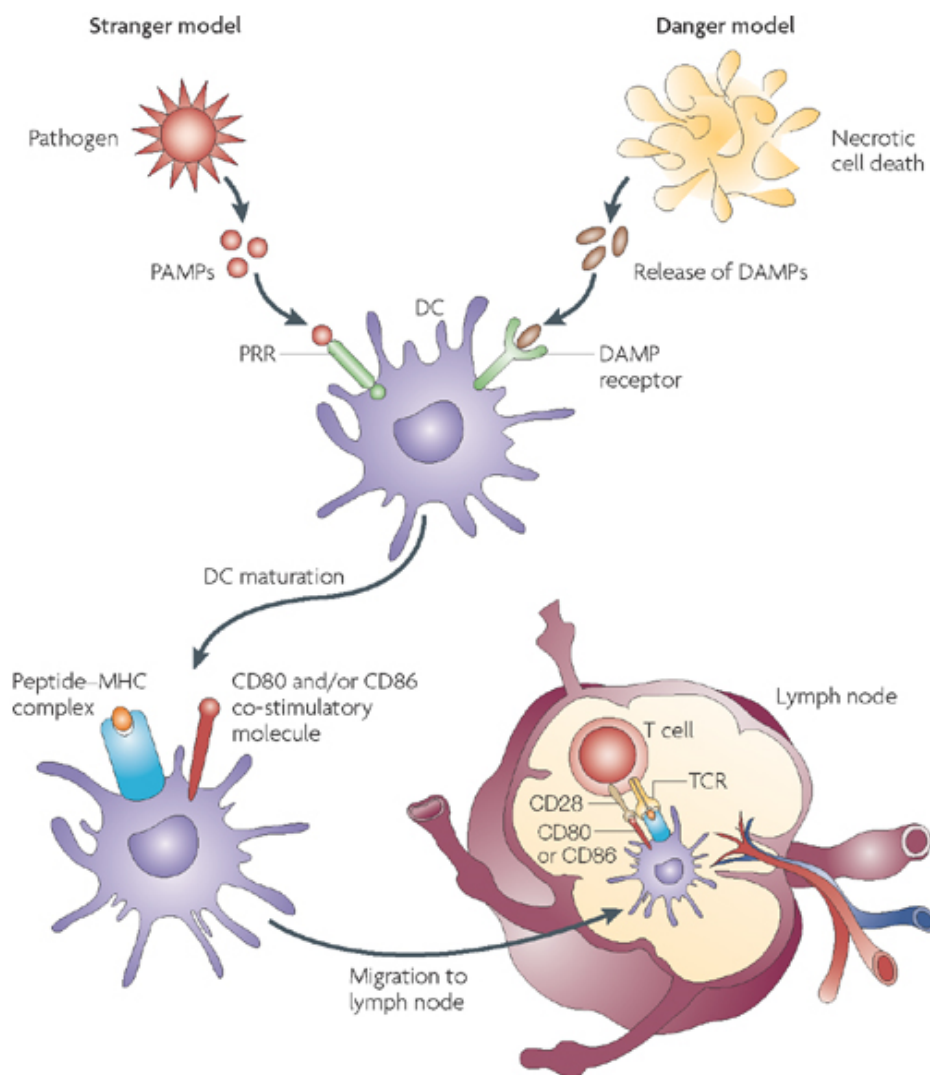
Molekuly, které jsou cizí organismu hostitele, mají často charakteristické molekulární struktury, které se běžně ve vlastním organismu nevyskytují. Tyto charakteristické molekulární struktury/vzory, přítomné např. na bakteriích a virech, se nazývají PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Protože jsou tyto struktury často přítomny i na mikroorganismech, které nejsou patogenní, bývají někdy označovány obecnějším názvem MAMP (Microbe Associated Molecular Patterns). PAMPs/MAMPs<sup>1</sup> jsou rozlišovány specializovanými receptory PRRs (Pattern Recognition Receptors) (Balk, 2011; Kono a Rock, 2008). Po rozlišení těchto struktur dojde k přenosu signálu, který většinou vede k aktivaci jaderného faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B), který je základním transkripčním faktorem pro tvorbu cytokinů – signalizačních molekul mezibuněčné komunikace.

---

<sup>1</sup> Pro zjednodušení bude v dalším textu uváděno pouze PAMPs.

### 2.1.2. Rozpoznávání nebezpečného

Některé molekulární struktury, které jsou organismu vlastní, zůstávají za normálních okolností skryty imunitnímu rozpoznávání. Při poškození organismu se uvolňují a jsou rozlišeny jako molekuly signalizující poškození – DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) tzn. alarminy. Příkladem těchto molekul je high mobility group box 1 (HMGB1), což je DNA-vazebný protein nezbytný pro transkripci DNA (Agnello et al., 2002; Lamkanfi et al., 2010).



Nature Reviews | Immunology

Obrázek č. 1. Rozpoznávání cizího (stranger) a nebezpečného (danger) (Kono a Rock, 2008).

HMGB1 je uvolňován z rozpadlých buněk při buněčné nekróze a rozlišován příslušnými PRRs. Druhou možností uvolnění je jeho sekrece aktivovanými makrofágy (Xiang et al., 2012). Při apoptóze, která je fyziologickým procesem, zůstává HMGB1 skryt v apoptotických tělíscích a fagocytován. Nedochozí tedy k jeho uvolnění mimo buňku a signalizaci nebezpečí (Dumitriu et al., 2005).

Při sepsi dochází k neúměrné aktivaci přirozené složky imunitního systému, která místo aby organismus chránila, ho poškozuje (Castellheim et al., 2009; Rittirsch et al., 2008).

## **2.2. Základní pojmy**

### **2.2.1. Syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS)**

Pro pochopení termínu sepse je důležité se nejprve seznámit s pojmem syndromu systémové zánětlivé odpovědi, který bude dále v textu označován zkratkou SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome). SIRS je stav, kdy systémová zánětlivá odpověď organismu vznikne na nějaký podnět, bez ohledu na to, zda je infekční nebo neinfekční povahy (Nathens a Marshall, 1996). Z neinfekčních podnětů to mohou být: pankreatitida, ischemie, mnohočetné trauma, poranění tkáně, hemoragický šok, imunitou zprostředkované orgánové poranění nebo mediátory zánětlivého procesu (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003).

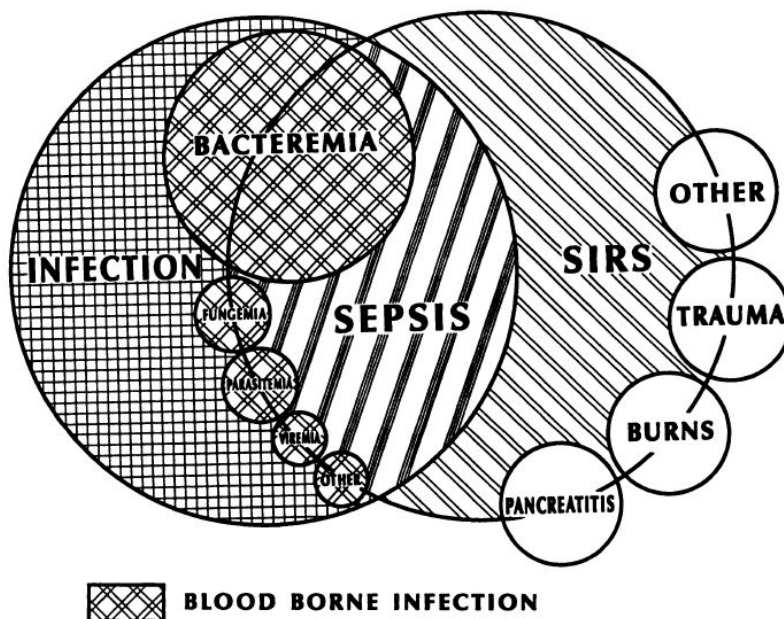
O SIRS se jedná, pokud jsou přítomné alespoň dvě z následujících kritérií (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003):

- tělesná teplota vyšší než 38°C nebo nižší než 36°C
- srdeční tep vyšší než 90 úderů za minutu
- dechová frekvence vyšší než 20 dechů za minutu nebo hyperventilace, kdy PaCO<sub>2</sub> je nižší než 32 mm Hg
- počet bílých krvinek je vyšší než 12 000/μl nebo je nižší než 4 000/μl z toho více jak 10% neutrofilů je nezralých

Komplikací, která může při SIRS nastat je rozvinutí MODS - syndromu mnohočetného (multiorgánového) orgánového selhání, jehož následkem může být úmrtí pacienta (Castellheim et al., 2009).

### 2.2.2. Sepsis

Sepsis je systémová zánětlivá odpověď organismu na infekční podnět (Lever a Mackenzie, 2007). Tato definice sepsis a s ní souvisejících pojmů byla doporučena na Konsenzuální konferenci pořádané v Chicagu v roce 1991 (Bone et al., 1992) a používá se již více než dvě desetiletí v téměř nezměněné podobě (v r. 2001 byla částečně doplněna na Mezinárodní konferenci definice sepsis ve Washingtonu (Levy et al., 2003)). Vztahy mezi sepsí a ostatními případy SIRS vyjadřuje následující diagram.



Obrázek č. 2. Vztah mezi systémovou zánětlivou odpovědí (SIRS), sepsí a infekcí (Bone et al., 1992).

Sepsis je častou příčinou úmrtí u kriticky nemocných pacientů a u pacientů s oslabeným imunitním systémem bez rozdílu věku (Manship et al., 1984;

Qu et al., 2011). Standardizace pojmů je proto důležitá především z hlediska jednoznačnosti terminologie klinické praxe a zároveň přispívá k dorozumění se mezi klinickými pracovníky a pracovníky ve výzkumu, kteří se sepsí zabývají.

Pro lepší pochopení sepse je důležité definovat následující pojmy (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003):

- **Infekce** je stav, kdy dojde k zánětlivé odpovědi v důsledku přítomného mikroorganismu v těle hostitele.
- **Bakteriémie** nastane, pokud jsou v krevním oběhu hostitele životaschopné bakterie.
- **Septikémie** je termín, který se užíval především v minulosti pro popis přítomnosti mikroorganismů, nebo jejich toxinů v krevním řečišti hostitele.

Abychom mohli říct, že se jedná o sepsi, musí být potvrzena přítomnost infekčního agens v hemokultuře a stejně jako u SIRS splněna alespoň dvě z těchto kritérií (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003; Nystrom, 1998):

- tělesná teplota vyšší než 38°C nebo nižší než 36°C
- srdeční tep vyšší než 90 úderů za minutu
- dechová frekvence vyšší než 20 dechů za minutu nebo hyperventilace, kdy PaCO<sub>2</sub> je nižší než 32 mm Hg
- počet bílých krvinek je vyšší než 12 000/μl nebo je nižší než 4 000/μl z toho více jak 10% neutrofilů je nezralých

První známkou sepse je nejčastěji zvýšení teploty (O'Grady et al., 1998).

### **2.2.3. Těžká sepse**

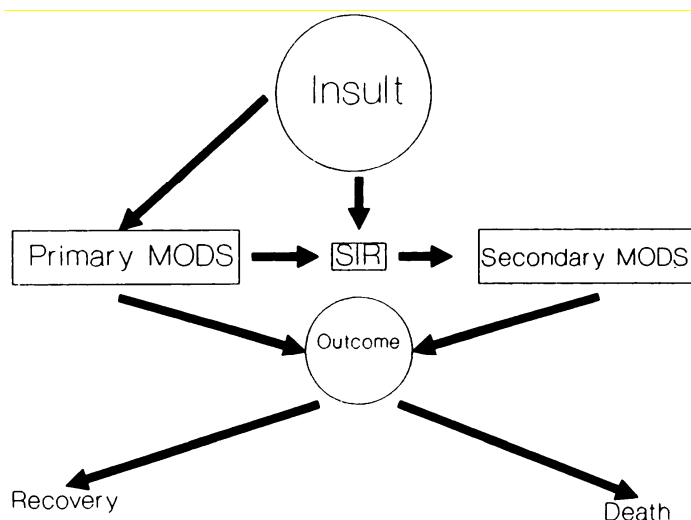
Těžká sepse je spojená s orgánovou dysfunkcí, hypoperfuzí tkání nebo hypotenzí, které jsou vyvolány sepsí, což vede k laktátové acidóze, oligurii a hypotenzí (Bone et al., 1992; Levi et al., 2004; Levy et al., 2003).

### **2.2.4. Septický šok**

Pokud se terapeuticky nepodaří podchytit těžkou sepsi, tak může vyústit až v septický šok. Šok je nepoměr mezi dodávkou kyslíku a jeho potřebou ve tkáních. Nedostatečné zásobování tkání kyslíkem je způsobeno abnormální redistribucí krve v krevním řečišti při zachovaném nebo i zvýšeném srdečním výdeji (Černý et al., 2005). Septický šok je definovaný jako sepsí vyvolaná hypotenze, kterou nelze zvrátit dostatečným příjmem tekutin (Tavernier et al., 1998). Na rozvoji septického šoku se hlavní měrou podílí mediátory zánětu. Jeden z nejdůležitějších je oxid dusnatý (Jeanneret et al., 2011). Známkou zhoršeného zásobování kyslíkem je oligurie, zpomalení kapilárního návratu nebo zhoršení mentálního stavu (Ramchandra et al., 2009). Ukazatelé porušených funkcí orgánů nebo systému jsou poruchy koagulace, zvýšené hodnoty močoviny, kreatininu, porucha vědomí, vzestup funkčních jaterních testů a poruchy funkce gastrointestinálního traktu, které se projevují poruchou absorpční schopnosti střeva (Černý et al., 2005). Kvůli anaerobnímu metabolismu se zvyšuje také hladina laktátu v krvi nad 2 mmol/l, což má vysokou výpovědní hodnotu ve vztahu k prognóze pacientů v septickém šoku (Vincent et al., 1983).

### **2.2.5. Syndrom mnohočetného orgánového selhání (MODS)**

MODS vede k poškození orgánů a tím k následné poruše homeostázy (Nystrom, 1998) a je nejčastějším důvodem úmrtí na jednotkách intenzivní péče (Baue, 2003). Je možné rozlišit primární a sekundární MODS. Primární MODS vzniká jako následek traumatu, sekundární MODS je následek těžké sepse (Bone et al., 1992).

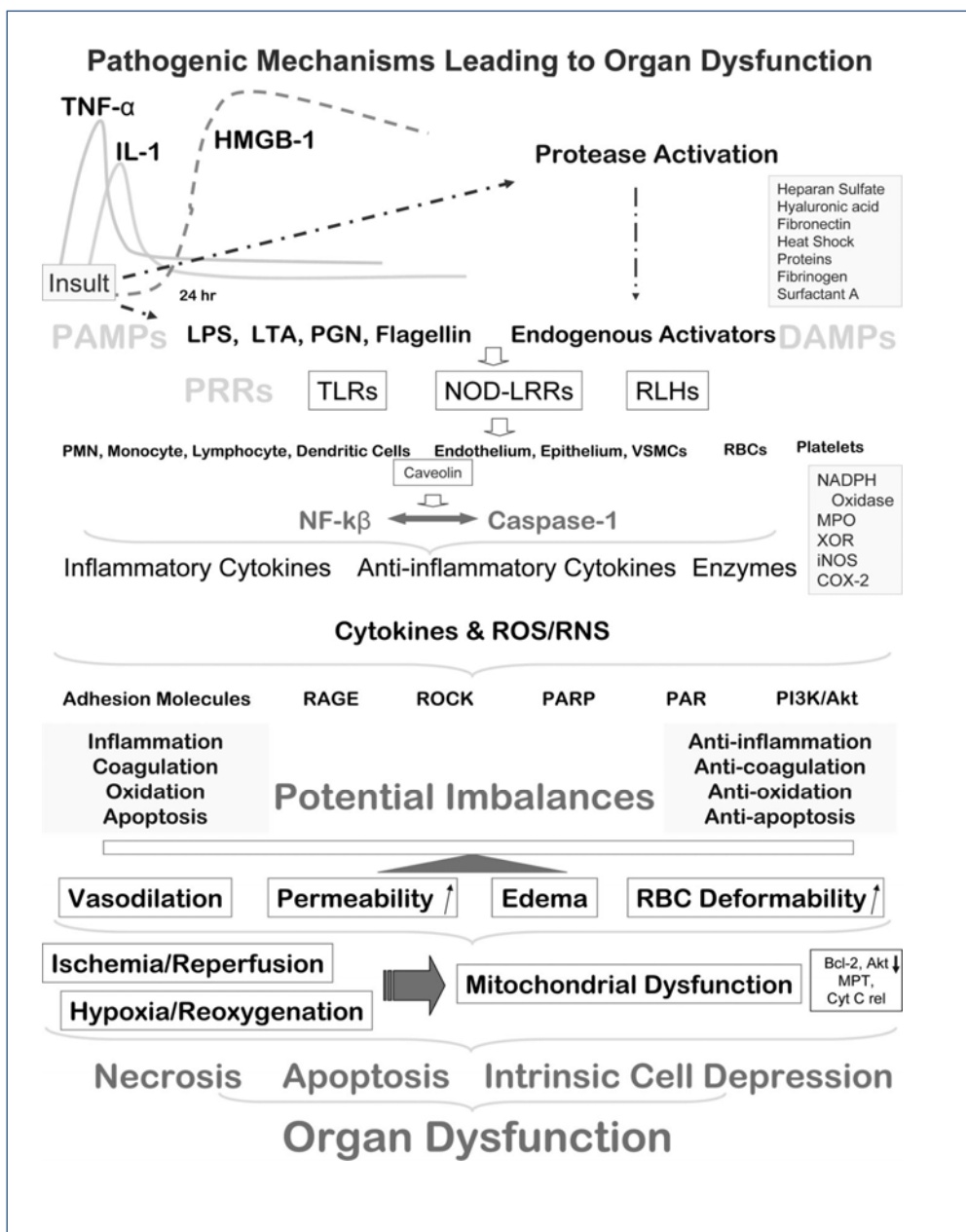


Obrázek č. 3. Vztahy mezi SIRS a primárním a sekundárním MODS (Bone et al., 1992).

### 2.3. Patofyziologie sepse

Sepse představuje dynamický proces, který je charakterizován řadou protichůdných jevů. Zánět, který je pro vznik sepse charakteristický, může nabýt takových rozměrů, že poškodí celý organismus (Rittirsch et al., 2008). Podmínkou pro vznik sepse je vstup mikroorganismu do těla hostitele, kde první obrannou linií tvoří reakce, kterou zprostředkuje přirozená imunita (Cinel a Opal, 2009). Hlavní roli zde hrají toll-like receptory (TLRs) a buněčné regulátory (van der Poll a Opal, 2008). Pokud je reakce namířená proti patogenu dost silná, může vést až k těžké sepsi, která se mimo jiné manifestuje silným prokoagulačním stavem. Silná zánětlivá systémová reakce a ischemie způsobí poškození buněk, které může vést až k mnohočetné orgánové dysfunkci (Cinel a Opal, 2009).

Iničiační fázi imunitní odpovědi zprostředkují PRRs a to: TLRs nebo NOD-LRRs (nucleotide-binding oligomerization domain, leucine-rich repeats) (Creagh a O'Neill, 2006; Uematsu a Akira, 2006), které rozpoznávají PAMPs (Granucci et al., 2005).



Obrázek č. 4. Patofyziologie sepse (Cinel a Opal, 2009).

TLRs se vyskytují zejména na dendritických buňkách, monocytech a makrofázích. Rozpoznání PAMPs na TLRs vyvolá přes adaptorové molekuly, jako je např. MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88), aktivaci NF- $\kappa$ B a dojde k přepisu genů, jehož výsledkem je produkce zánětlivých cytokinů a chemokinů (Takeda a Akira, 2005). Cytokiny a chemokiny jako komunikační molekuly aktivují různé buněčné populace (Schnare et al., 2001). Pokud je buňka v klidu je na NF- $\kappa$ B navázán inhibiční  $\kappa$ B protein (I $\kappa$ B), který se po stimulaci buňky z NF- $\kappa$ B uvolní



a může dojít k přepisu genů (Cinel a Opal, 2009; Hitzler et al., 2012).

NOD-LRRs jsou receptory, které se nachází v cytoplazmě buněk. Pokud NOD-LRRs rozpozná bakteriální peptidoglykan nebo flagelin, tak se aktivuje NF- $\kappa$ B a kaspáza 1 (Fritz et al., 2006; Miao et al., 2007). Kaspáza 1 proteolyticky štěpí prekurzor interleukinu (IL) 1 $\beta$  a tím ho přetváří na zralou formu biologicky aktivního IL-1 $\beta$  (Hitzler et al., 2012).

Při sepsi se z poškozené tkáně uvolní fibrinogen, fibronectin, HMGB1 a Hsp (Heat shock protein) které se také řadí mezi DAMPs (Cinel a Opal, 2009). Z poškozených endoteliálních buněk se uvolňuje NO (oxid dusnatý), který způsobí vazodilataci (Feng et al., 2010).

Obsazení TLRs molekulárními strukturami aktivuje zranění dendritických buněk, které jsou nezbytné pro aktivaci získané imunitní odpovědi (Ausubel, 2005). Aktivace neutrofilů a monocytů/makrofágů cytokiny vede k odstranění patogenu, ale také k poškození tkání neutrofilů, které může vést k ischemii/reperfuzi (Brown et al., 2006). Stimulované neutrofilů uvolňují myeloperoxidázu, xantin oxidázu a adenin dinukleotid fosfát oxidázu, které působí baktericidně. Mediátory zánětu stimulují adenin dinukleotid fosfát oxidázu k tvorbě O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Ten reaguje s NO z poškozených tkání za vzniku <sup>-</sup>OONO (peroxynitrit), který je velmi cytotoxický a hraje významnou roli při rozvoji mnohočetné orgánové dysfunkce (Ozdulger et al., 2002; Taner et al., 2001).

Leukocyty dokáží z cévního řečiště přestoupit do místa poškozené tkáně díky adhezivním molekulám, jako jsou selektiny a integriny, které slouží k přilnutí na endoteliální buňky (Chandra et al., 2006). Např. L-selektin, který je na neutrofilech slouží k přichycení k endotelu a E-selektin je zase na buňkách endotelu. Přichycené neutrofilů se po endotelu pohybují jako by se kutálely (rolling). Na krevních destičkách je exprimován P-selektin, který slouží k vazbě leukocytů ke krevním destičkám. Neutrofilů tak při rozvoji sepse přispívají ke koagulaci (Brown et al., 2006; Cinel a Dellinger, 2007; van der Poll a Opal, 2008) tvorbou bílého trombu (Astiz et al., 1995). Elastázy, proteázy, glykázy a cytokiny, které uvolňují neutrofilů přispívají ke koagulaci také tím, že zeslabují

fibrinolytickou a antiagregační aktivitu organismu (van der Poll a Opal, 2008).

Role endotelu při rozvoji sepse je klíčová, protože je součástí cév a vlásečnic, které zasahují do nejzazších míst organismu a tvoří komunikační bariéru mezi krví a buňkami ve tkáních. Jednou z funkcí, kterou má endotel je regulace hemostázy (Aird, 2008). Při sepsi je správná funkce endotelu narušena prozánětlivými cytokiny, dochází k jeho aktivaci a povrch endotelu získá prokoagulační ráz (Esmon, 2005). Prozánětlivé mediátory, jako jsou například faktor nekrotizující nádory  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), IL-1 a IL-6 nebo složka komplementu C5a, mohou aktivovat koagulační systém. Z poškozených endoteliálních buněk se uvolňuje řada mediátorů, které jsou schopné aktivovat koagulaci. Narušené endoteliální buňky na svém povrchu exprimují tkáňový faktor (TF), pokud jsou nevratně poškozené, tvoří se mikropartikelky, které také obsahují TF. Při koagulaci je TF exprimován i na monocitech. Význam TF spočívá v tom, že aktivuje koagulaci přes faktor VIIa a následně je aktivován faktor X buď přímo, nebo nepřímo přes faktor IX. Aktivovaný faktor X konvertuje protrombin na trombin, který finálně štěpí fibrinogen na fibrin. Další působek, který se uvolní z poškozeného endotelu je vWF (von Willebrand factor), který přispívá ke zvýšené adhezi a agregaci krevních destiček (Schouten et al., 2008).

Prokoagulační stav je též umocněn inhibicí antikoagulačních faktorů, jako jsou TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), antitrombinu III a proteinu C. Během těžké sepse jsou hladiny antitrombinu III sniženy, protože se jedná o negativní protein akutní fáze, který se při zánětu syntetizuje v menší míře. Snižování aktivovaného proteinu C je v sepsi zejména důsledkem zvýšené spotřeby proteinu C a S a snížené aktivace proteinu C při internalizaci trombomodulinu, který je exprimován na povrchu endotelií. Silně prokoagulační stav může vyústit až v diseminovanou intravaskulární koagulopatii (Levi et al., 2004; Zeerleder et al., 2006), kdy se mikrotromby šíří do celého těla a mohou způsobit ischemii tkání. Tento stav silně přispívá k rozvoji mnohočetné orgánové dysfunkce.

## 2.4. Epidemiologie sepse

Po konferenci v Nortbrookku (Bone et al., 1992), jejímž výsledkem bylo vytvoření definice sepse a s ní souvisejících pojmů, se mohly začít zpracovávat epidemiologická data. Výsledky se však velmi liší, protože se studovaly odlišné populace na odlišných odděleních (Černý et al., 2005).

Incidence SIRS se pohybuje mezi 55% - 95%, 16% – 49% u sepse, u těžké sepse 0% – 18% a u septického šoku 0% – 20%. Úmrtnost nemocných, kteří mají SIRS je 6% – 27%, u sepse 0% – 36%, u těžké sepse 0% – 52% a u septického šoku 0% – 82% (Bossink et al., 1998; Jones a Lowes, 1996; Pittet et al., 1995; Rangel-Frausto et al., 1995; Salvo et al., 1995).

Sepse mohou být vyvolány širokou škálou mikroorganismů – od obligátních patogenů až po probiotika. V 60. a 70. letech byla většina infekcí způsobena gram-negativními bakteriemi. Od 80. let se objevovalo stále více případů, které byly způsobené gram-pozitivními bakteriemi (Brun-Buisson et al., 1996). V současnosti je sepsa způsobená ze 42% gram-negativní infekcí kde nejčastější je nález *Escherichia coli*, která se vyskytuje u 13% gramnegativních infekcí, následuje ji *Klebsiella pneumoniae* 8%. Třetí nejčastější gramnegativní bakterii je *Pseudomonas aeruginosa* 8% (Černý et al., 2005).

Ze 34% je sepsa způsobená gram-pozitivní infekcí, kde až polovinu činí stafylokoky, 8% enterokoky a 4% pneumokoky. Ze 14% jde o infekci smíšenou. Kvasinky se vyskytují u 5% pacientů. Anaerobní bakterie se vyskytují pouze ve 2% (Černý et al., 2005).

Zvláštními případy sepsí jsou sepsa vyvolané probiotickými bakteriemi. Jedná se většinou o sepsu po aplikaci probiotik nedonošeným dětem (Guenther et al., 2010), dětem se syndromem krátkého střeva (De Groote et al., 2005), kardiologickým pacientům (Kochan et al., 2011) nebo imunodeficitním pacientům (Ledoux et al., 2006).

Sepsa je nejčastěji způsobená mikrobiální infekcí v respiračním traktu, dutině břišní nebo v krevním oběhu (Černý et al., 2005). Stanovit původce sepse je velmi důležité, protože to umožní zvolit správnou léčbu. Pacienti, kteří jsou správně léčeni, mají vyšší pravděpodobnost přežití.

## **2.5. Diagnostika sepse**

### **2.5.1. Markery sepse**

Přehled markerů sepse obsáhle zpracovali Pierrakos a Vincent (2010). Rozdělují je podle jejich struktury nebo funkcí na markery chemokinové/cytokinové povahy, buněčné znaky (většinou CD), buněčné receptory (mohou být občas shodné s buněčnými znaky – např. CD14, receptor pro lipopolysacharid). Dále markery koagulace, cévního poškození, vasodilatace, znaky orgánové dysfunkce a proteiny akutní fáze. V našem rozdělení se budeme věnovat omezenému počtu zjednodušeně rozdělených markerů používaných pro diagnózu sepse. Zaměříme svou pozornost také na prezentaci „klasických“ znaků sepse (např. C-reaktivní protein, CRP) a nových markerů.

Obecně průnik infekčního agens do těla hostitele nejprve vyvolá jako odezvu vyplavení zánětlivých mediátorů, které mohou být různé povahy a které jsou často používány jako markery sepse.

#### **2.5.1.1. Cytokiny a chemokiny**

Při infekci dojde nejprve k vyplavení primárních prozánětlivých cytokinů jako je TNF- $\alpha$ , následují ho interleukiny (IL) IL-1, IL-6 a IL-8 do krve (Michie et al., 1988; Nystrom, 1998). Cytokiny a chemokiny jsou malé (glyko)proteiny, které regulují buňkami zprostředkovanou imunitní odpověď tím, že se váží na své buněčné receptory a spouští tak pomocí transkripčních faktorů různé procesy (O'Shea et al., 2002). Prozánětlivé cytokiny a mnoho dalších faktorů aktivuje další (sekundární) cytokiny, růstové faktory a různé buněčné populace (Michie et al., 1988). Zvýšené hladiny cytokinů lze detekovat při lokálním i systémovém zánětlivém procesu, proto se využívají jako markery zánětu (O'Shea et al., 2002). Mohou se vyskytovat v různých tělních tekutinách jako je plazma, bronchoalveolární tekutina, mozkomíšní mok, amniová tekutina, synoviální tekutina nebo moč (de Jager a Rijkers, 2006).

Mezi cytokiny se v posledních letech řadí také HMGB1 (Dumitriu et al., 2005), který má jednak cytokinovou aktivitu a jednak svým působením zesiluje zánětlivou reakci. Bývá označován jako pozdní mediátor sepse (Pierrakos a Vincent, 2010).

#### **2.5.1.2. Povrchové buněčné znaky**

Většina povrchových buněčných znaků jsou receptory, které po navázání příslušného ligandu pomocí transkripčních faktorů přenášejí signál a výsledkem je např. produkce NF- $\kappa$ B jako ústředního faktoru produkce cytokinů.

Mezi povrchové znaky využívané jako markery sepse se řadí např. CD11b – integrin (Genel et al., 2012), **CD14** - receptor pro lipopolysacharid (Shozushima et al., 2011), **CD25** - receptor pro IL-2 (Venet et al., 2011), **CD64** - receptor pro Fc fragment imunoglobulinů na neutrofilních granulocytech (Genel et al., 2012; Venet et al., 2011), **CD 163** – „scavengerový“ receptor pro komplex hemoglobin-haptoglobin (Onofre et al., 2009).

#### **2.5.1.3. Solubilní receptory**

Jako solubilní receptory jsou většinou označovány receptory, které jsou enzymaticky odštěpeny z buněčné membrány a jsou přítomné v plazmě a dalších tělesných tekutinách. V posledních letech se začíná využívat presepsin. Jedná se o solubilní formu CD14, který váže lipopolysacharid. Membránová forma receptoru se vyskytuje na monocytech, makrofázích a granulocytech, tedy buňkách bezprostředně spjatých se zánětlivou reakcí (Shozushima et al., 2011). Jiným solubilním receptorem je sCD163 (s – soluble) (Gaini et al., 2008; Kolackova et al., 2009).

#### **2.5.1.4. Proteiny akutní fáze**

Jsou proteiny syntetizované v játrech. Dělí se na pozitivní a negativní proteiny akutní fáze (Gabay a Kushner, 1999). Koncentrace pozitivních proteinů akutní fáze stoupá při zánětu, infekci nebo poranění (Eckersall a Bell, 2010). Pro diagnostiku sepse jsou důležité proteiny jako je sérový amyloid, ceruloplasmin, C-reaktivní protein,  $\alpha$  1 kyselý glykoprotein, hepcidin, protein vázající lipopolysacharidy a prokalcitonin (Pierrakos a Vincent, 2010). Pravděpodobně nejvyužívanějším reaktantem akutní fáze pro diagnostiku sepse je C-reaktivní protein. Jeho hladina stoupá nejen při bakteriálních infekcích, ale stoupá i při neinfekčních stavech jako je např. pooperační stav nebo angina pectoris (Povoa et al., 1998; Soysal et al., 2010). U virových infekcí v porovnání s bakteriální infekcí se zvyšuje jen mírně nebo vůbec (Sasaki et al., 2002). C-reaktivní protein má nízkou specifitu, slouží tedy jako doplňující údaj (Silvestre et al., 2009).

V posledních letech se pro diagnostiku sepse hojně používá prokalcitonin, který se řadí mezi reaktanty akutní fáze. Prokalcitonin je prekurzor hormonu kalcitoninu, který je za normálního stavu syntetizovaný ve štítné žláze. Jeho hladina se zvyšuje při sepsi, pokud je způsobená bakteriální, plísňovou nebo parazitární infekcí (Becker et al., 2008). Ke zvýšené hladině prokalcitoninu při sepsi výrazně přispívá aktivace jeho syntézy v játrech (Meisner et al., 2003).

Negativní proteiny akutní fáze naopak při stejných procesech klesají. Jedná se např. o albumin, prealbumin a transferin (Gabay a Kushner, 1999).

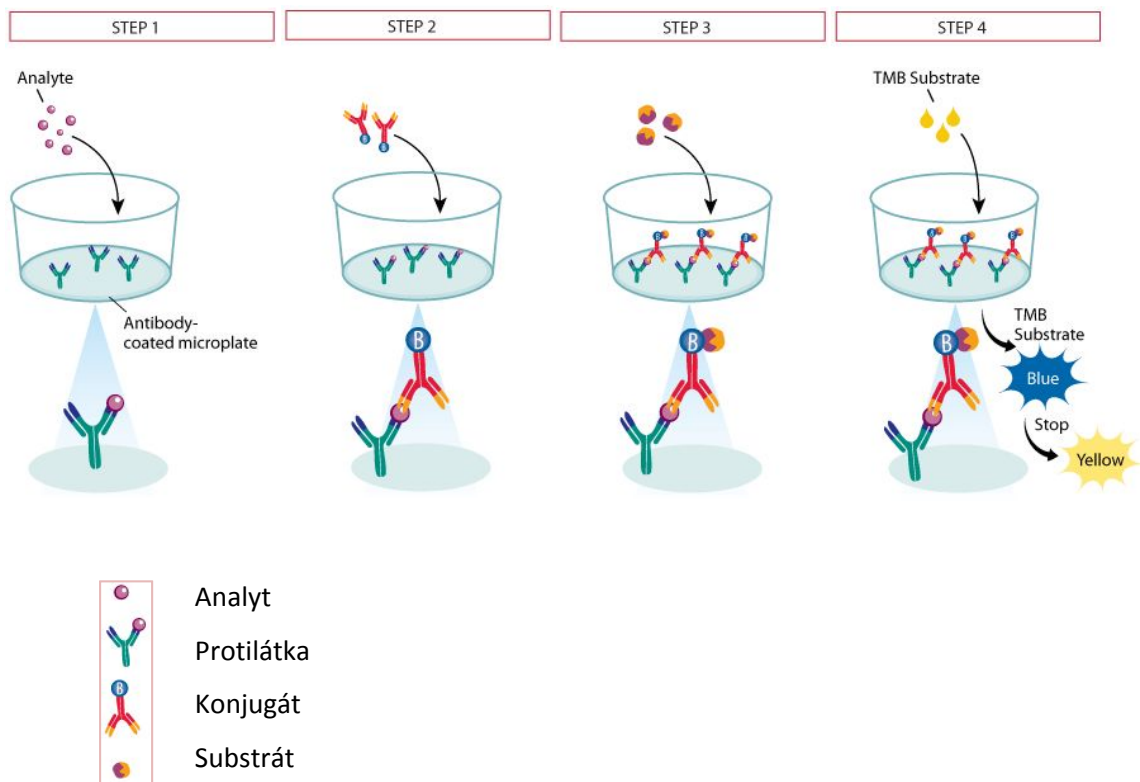
#### **2.5.2. Metody používané pro diagnostiku sepse**

Pravděpodobně nejrozšířenější pro diagnostiku sepse je stanovení markerů v krevní plazmě nebo séru. Pro měření hladin cytokinů se nejčastěji používá metoda ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), která však umožňuje detekovat pouze jeden cytokin ve vzorku. Dnes zažívají velký rozmach metody, které dokáží detekovat více cytokinů v jednom vzorku najednou. Mezi takové metody patří například xMAP

technologie (extended **MutiAnalyte Profiling**) (Fulton et al., 1997; Mosmann a Fong, 1989).

### 2.5.2.1. ELISA

První sendvičové metody, které se objevily koncem 70. let minulého století, používaly radioaktivního značení (Salmon et al., 1969). Později se od těchto metod upustilo, protože byly zdraví nebezpečné a náročné na přístrojové vybavení. Nahradila je metoda ELISA, která využívá enzymu místo radioaktivní značky (Engvall a Perlmann, 1971).



Obrázek č. 5. Princip metody ELISA (Anonym 1, 2012).

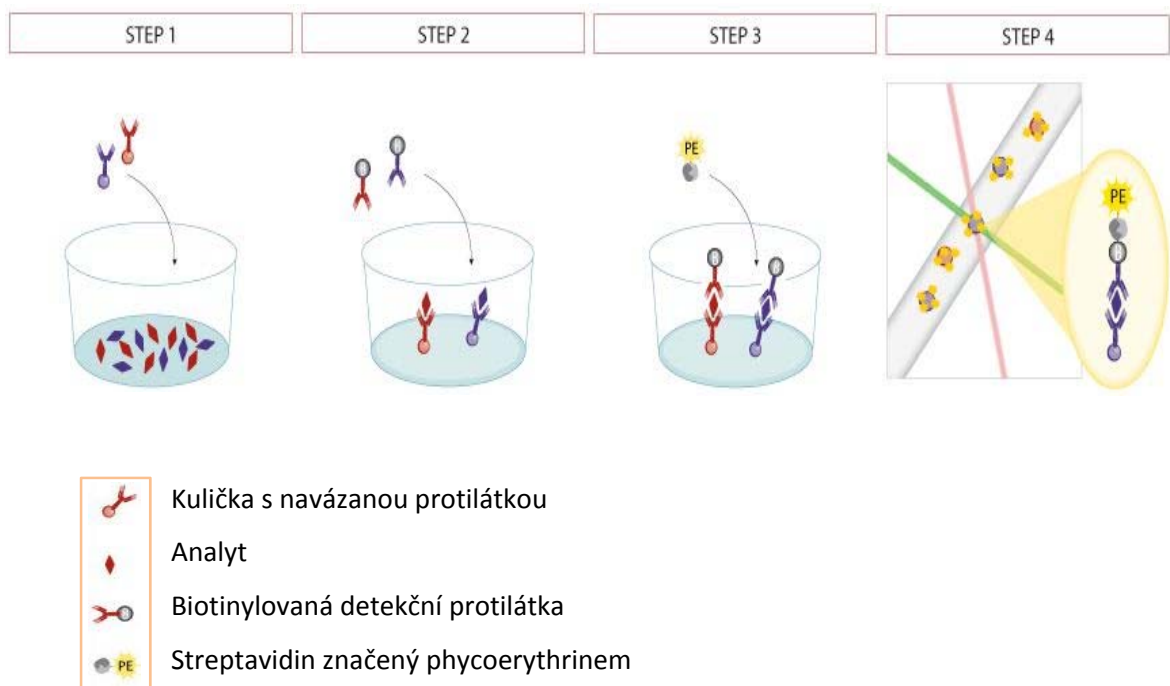
V případě ELISA je protilátka, na kterou se váže hledaný antigen, navázaná na dno jamky mikrotitrační destičky. Na komplex antigen-protilátka se váže konjugát (protilátka s navázaným enzymem, nejčastěji křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). Do takto vytvořené směsi se přidá substrát. Enzym katalyzuje chemickou přeměnu substrátu na barevný produkt. Po inkubaci se do jamky přidá látka, která

změnou pH zastaví reakci – např. kyselina sírová. Vzniklý barevný produkt je možné detekovat fotometricky (fluorimetricky), podle typu použitého substrátu. Výsledná absorbance produktu je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu (Voller et al., 1976).

### 2.5.2.2. xMAP technologie (extended MultiAnalyte Profiling)

První zmínka o metodách, které využitím principu průtokové cytometrie detekují značené kuličky se, objevila v roce 1977 (Horan a Wheelless, Jr., 1977).

xMAP technologie byla vyvinuta firmou Luminex Corporation (Austin, TX, USA) a kombinuje principy používané v ELISA a v průtokové cytometrii.



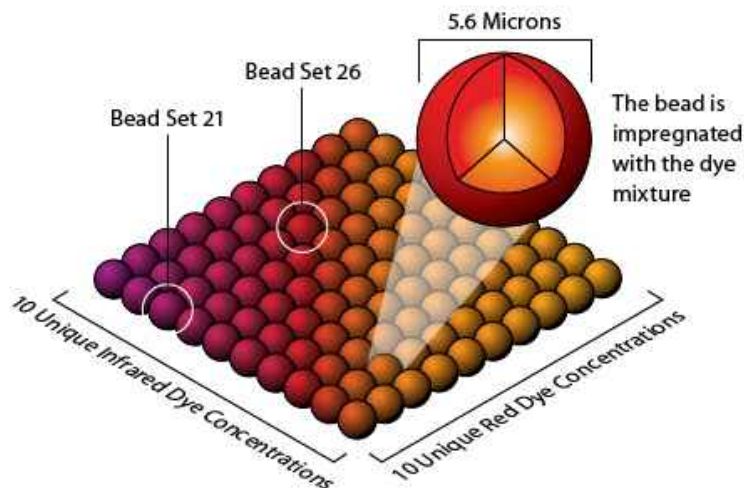
Obrázek č. 6. Princip xMAP technologie (Anonym 3, 2012).

Místo polystyrénové destičky, jakou známe z metody ELISA, jsou pro navázání vazebných protilátek použity polystyrenové kuličky (průměr 5,6  $\mu\text{m}$ ) nebo magnetické kuličky (průměr 6,5  $\mu\text{m}$ ), což jsou polystyrenové kuličky obalené navíc



paramagnetickou vrstvou. Magnetické kuličky zjednodušují automatizaci promývání při vazbě analytů, protilátek a streptavidinu značeného phycoerithrinem.

Tato metoda umožní identifikovat a kvantifikovat teoreticky až 100 různých analytů v jednom vzorku (Dunbar, 2006). To je možné díky dvěma fluorochromům, které svou kombinací vytvoří specifickou spektrální adresu pro každou kuličku.



Obrázek č. 7. Spektrální adresy kuliček (na obrázku je vyobrazena polystyrenová kulička) se specifickou kombinací dvou fluorochromů, která určuje její spektrální adresu) (Anonym 2, 2012).

K detekci a identifikaci kuliček slouží přístroj Luminex, což je modifikovaný průtokový cytometr. Obsahuje dva lasery, které excitují jednotlivé kuličky v kvetě z křemičitého skla. První laser je pro identifikaci průchozí částice. Excituje při 635 nm červený fluorochrom obsažený v kuličce a určuje její spektrální adresu. Druhý laser, který excituje při 532 nm (Nd-Yag laser) fluorochrom phycoerithrin, slouží k měření intenzity fluorescence jednotlivých kuliček a tím čte intenzitu signálu, která odpovídá koncentraci analytu (Earley et al., 2002). Optické signály jdou potom k jednotlivým detektorům s fotonásobičem.

xMAP technologie dokáže detekovat v tělních tekutinách cytokiny jak na úrovni molekulární (mRNA) (Halminen et al., 1999), tak na úrovni buněčné (de Jager et al., 2003; Prussin a Metcalfe, 1995).

### 2.5.2.3. Ostatní používané metody

ELISA a xMAP jsou jen jedny z možných metod používaných pro stanovení markerů sepse. Dalšími metodami jsou např. mozaiková ELISA, průtoková cytometrie pro stanovení exprese povrchových znaků, microarraye, metody pro stanovení koagulace, imunohistochemie, biochemické metody (laktát, glukóza) apod. Pro sledovanou problematiku a námi uvažované srovnání ELISA a xMAP technologie však nejsou podstatné, a proto se jimi nebudeme podrobněji zabývat.

### 2.5.3. Zvířecí modely sepse

Navzdory více než 20 let trvajícím rozsáhlému studiu jsou sepsa a SIRS stále hlavními příčinami úmrtí pacientů na jednotkách intenzivní péče. Na rozdíl od mnohých různých onemocnění, která je možné modelovat na buněčných nebo tkáňových kulturách, je sepsa natolik složitý proces, který vyžaduje mezibuněčnou kooperaci, produkci zánětlivých mediátorů a receptorovou signalizaci, že je prakticky nemožné sepsi simulovat *in vitro*. Jsou proto využívány různé zvířecí modely sepse (Dyson a Singer, 2009; Freise et al., 2001; Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Zanotti-Cavazzoni a Goldfarb, 2009).

Poznatky patogeneze sepse byly bez sporu rozšířeny studiem zánětlivých mediátorů sepse na zvířecích modelech. Přes tento nesporný přínos se zdá, že terapeutické postupy vypracované na zvířecích modelech nejsou účinné při léčbě sepse u člověka. Jednou z možných příčin je skutečnost, že experimenty jsou prováděny na mladých zdravých zvířatech, zatímco sepsa postihuje spíše starší lidi nebo lidi oslabené zdravotními komplikacemi (diabetes, hypertenze, nádory). U zvířecích modelů sepse, je také snaha o léčbu sepse v počátečních stádiích, což je odlišné od lidských pacientů. Navíc jsou zvířecí modely příliš heterogenní na to, aby bylo možné zevšeobecnit získané zkušenosti a aplikovat je v medicíně. Jednou z cest se tedy jeví standardizace zvířecích modelů sepse (Dyson a Singer, 2009; Esmon, 2004).

Přes tyto uvedené nedostatky zůstávají zvířecí modely sepse základem pro vývoj nových terapeutických postupů sepse, protože poskytují důležité údaje o farmakokinetice, toxicitě a mechanismu působení léčiv, které nemohou být nahrazeny

použitím jiných metod (Poli-de-Figueiredo et al., 2008; Zanotti-Cavazzoni a Goldfarb, 2009).

### **3. CÍL - ZADÁNÍ PRÁCE**

Sepse je systémová zánětlivá odpověď organismu vyvolaná infekcí, při které dochází vlivem nadprodukce zánětlivých mediátorů k poškození organismu.

Základem bakalářská práce je zpracování literární rešerše o problematice definování sepse, její epidemiologii a diagnostice. Dále posoudíme možnost využití xMAP technologie pro stanovení markerů sepse, např. cytokinů.

Součástí práce bude také srovnání stanovení cytokinů metodami ELISA a xMAP včetně ekonomického zhodnocení.

Práce bude zpracována v těchto hlavních kapitolách: 1. Úvod, 2. Literární přehled, 3. Cíl, 4. Materiál a metody (ELISA a xMAP technologie), 5. Výsledky, 6. Diskuse (zhodnocení výsledků v kontextu s literárními údaji), 7. Závěr a 8. Použitá literatura.

Hlavním cílem bakalářské práce je připravit přehled o sepsi – její definici, epidemiologii a diagnózu se zaměřením na markery sepse.

## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1. Odborné databáze PubMed

Odborná databáze US National Library of Medicine National Institutes of Health umožňuje přístup k více než 21 milionům referencí pro biomedicínskou literaturu. Využívali jsme přístup Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v rámci areálu biologických ústavů AV ČR v Praze Krči (<http://d360prx.biomed.cas.cz:2259/pubmed/>), který nám umožnil přístup k odborným článkům z oblasti imunologie a mikrobiologie.

Články, ke kterým jsme přístup neměli, jsme získali jako „autorsky výtisk“ v podobě pdf souboru od korespondujících autorů na základě našeho dopisu (e-mail):

Dear Dr. XY,

Will you send me a reprint of your paper, please?

*Název článku, rok, časopis, ročník, strany.*

Sincerely yours.

Iva Splichalova

### 4.2. Reference manager

Reference manager, verze 12.0.3., software firmy Thomson Reuters umožňuje vyhledávání literárních referencí v odborných databázích a jejich zpracování pro potřeby odborných textů. Volili jsme vyhledávání v databázi PubMed.

#### 4.2.1. Rozšiřování xMAP technologie pro stanovení cytokinů

Pro posouzení rozšiřování metody xMAP technologie v průběhu posledních 10 let pro stanovení cytokinů jsme volili pro jednotlivé roky 2002-2011 vyhledávání – příklady jsou pro rok 2002:

a) pro **ELISA**:

(elisa) AND (cytokine) AND (2002)

b) pro **xMAP technologii**:

(xmap) AND (cytokine) AND (2002)

c) pro označení **Luminex**:

(luminex) AND (cytokine) AND (2002)

d) pro **xMAP a Luminex**:

ad b) AND ad c)

#### **4.2.2. Stanovení prasečích cytokinů xMAP technologií**

Pro stanovení prasečích cytokinů jsme v jednotlivých letech vyhledávali údaje – příklad pro rok 2002:

a) pro **ELISA**:

(elisa) AND (cytokine) AND (2002) AND (pig) NOT (guinea)

b) pro **xMAP technologii**:

(xmap) AND (cytokine) AND (2002) AND (pig) NOT (guinea)

c) pro označení **Luminex**

c) (luminex) AND (cytokine) AND (2002) AND (pig) NOT (guinea)

d) pro **xMAP a Luminex**:

ad b) AND ad c)

#### **4.3. Náklady stanovení metodami ELISA a xMAP technologií**

Vycházeli jsme z potřebného přístrojového vybavení pro ELISA a xMAP technologii a ceníku firmy Biomedica ČS s.r.o., která zastupuje firmy R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) - ELISA kity a Panomix/Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) - Procarta xMAP technology.

##### **4.3.1. Náklady na pořízení přístrojové vybavení**

**ELISA**: promývačka (např. HydroFlex, Tecan, Grödung, Rakousko) - 120 tis. Kč, ELISA reader (100 tis. Kč).

**xMAP technologie**: promývačka + magnetický modul (např. HydroFlex, Tecan, Grödung, Rakousko) - 155 tis. Kč, Luminex – 1,5 mil. Kč

#### 4.3.2. Náklady na kity pro stanovení 6 cytokinů

Tabulka č. 1. Ceny ELISA kitů pro stanovení prasečích cytokinů (R&D Systems)

Individuální stanovení	Popis	Cena s DPH
PLB00B Porcine IL-1beta /IL-1F2 Quantikine ELISA kit	1 × 96 jamek	14 761 Kč
P6000B Porcine IL-6 Quantikine ELISA Kit	1 × 96 jamek	14 761 Kč
P8000 Porcine CXCL8/IL-8 Quantikine ELISA Kit	1 × 96 jamek	14 761 Kč
P1000 Porcine IL-10 Quantikine ELISA Kit	1 × 96 jamek	14 761 Kč
PIF00 Porcine IFN-gamma Quantikine ELISA Kit	1 × 96 jamek	14 761 Kč
PTA00 Porcine TNF alpha Quantikine ELISA kit	1 × 96 jamek	14 761 Kč
6 cytokinů celkem	6 × 1 × 96 jamek	88 556 Kč

Tabulka č. 2. Kit pro multiplexové stanovení prasečích cytokinů

(Affymetrix/Pannomics)

Multiplexové stanovení cytokinů	Popis	Cena s DPH
AF-PC4506M/1PLATE Procarta Cytokine Assay Kit, Porcine 6 Plex (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )	6 plex, 1 × 96 jamek	57 167 Kč

#### Náklady na jedno stanovení jsme vypočítali nebo odhadli:

- bez ohledu na přístrojové vybavení
- s ohledem na přístrojové vybavení
- s ohledem na časovou náročnost stanovení a pracnost

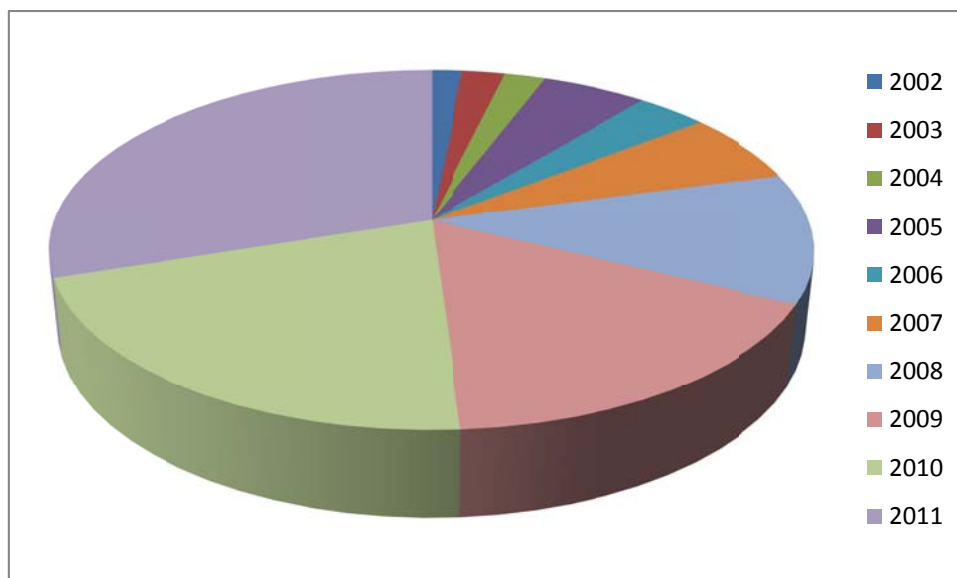
## 5. VÝSLEDKY

Tabulka č. 3. Počty stanovení cytokinů metodami ELISA a xMAP technology v posledních 10 letech.

SROVNÁNÍ POČTŮ LITERÁRNÍCH REFERENCÍ PRO STANOVENÍ CYTOKINŮ METODAMI ELISA A xMAP TECHNOLOGY V OBDOBÍ 2002 - 2011										
Reference	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
ELISA	2889	3257	5124	3932	10460	7420	7965	8385	6694	7779
xMAP	0	0	0	2	5	6	13	19	15	32
Luminex	4	6	9	18	30	38	78	114	116	192
xMAP a Luminex	4	6	9	18	32	41	81	122	123	205
Podíl ELISA/ xMAP a Luminex	0,14	0,18	0,18	0,46	0,31	0,55	1,02	1,45	1,84	2,64

- a) V posledních 10 letech dochází ke zvyšování počtu citací používající multiplexové stanovení cytokinů.
- b) Nesprávné označení „metoda Luminex“ je rozšířenější než správný název metody xMAP technology.

Graf č. 1. Vzrůstající podíl xMAP technologie na stanovení cytokinů v posledních 10 letech.



Relativní podíl multiplexového (Luminex nebo xMAP) stanovení cytokinů vztažený k metodě ELISA se v posledních 10 letech zvyšuje.



Tabulka č. 4. **Počet prací používající multiplexové stanovení cytokinů (Luminex, xMAP) u prasete v posledních 10 letech.**

SROVNÁNÍ POČTŮ LITERÁRNÍCH REFERENCÍ PRO STANOVENÍ CYTOKINŮ PRASETE METODAMI ELISA A xMAP TECHNOLOGY V OBDOBÍ 2002 - 2011										
Reference	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
ELISA	33	56	63	58	132	90	103	86	75	77
xMAP	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Luminex	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
xMAP a Luminex	0	0	0	1	1	2	0	1	1	0

Rozšiřování stanovení cytokinů xMAP technologií u prasete v posledních 10 letech stagnuje.

#### **Posouzení nákladů na ELISA a xMAP technologii:**

a) bez ohledu na přístrojové vybavení

Cena na stanovení jednoho cytokinu je výrazně nižší u xMAP technologie ve srovnání s ELISA

b) s ohledem na přístrojové vybavení

Požizovací náklady pro xMAP technologii jsou výrazně vyšší než pro ELISA.

c) s ohledem na časovou náročnost stanovení a pracnost

Rozpipetování reagensů, promývání a kultivace jsou časově srovnatelné jak pro destičku pro ELISA, tak pro xMAP technologii. Při ELISA bychom potřebovali pracovat se 6 destičkami. Proto je multiplexové stanovení 6 cytokinů xMAP technologií podstatně méně náročné na lidskou práci.

Změření jedné destičky na ELISA readeru je téměř okamžité. Přečtení jedné destičky na Luminexu je v desítkách minut. Jedná se však o automatickou práci přístroje.

Čím více analytů by se stanovovalo xMAP technologií najednou, tím výhodnější by bylo její použití ve srovnání s ELISA.

## 6. DISKUZE

V 80. letech minulého století se začaly objevovat publikace o různých těžkých tkáňových poškozeních a ischemii – podobajících se klinickými symptomy sepsi, které však nebyly infekčního původu. To vedlo k potřebě rozlišit patofyziologické příčiny sepse od dalších příčin systémové zánětlivé imunitní odpovědi (SIRS) neinfekčního původu. Na konferenci v Nortbrookku v r. 1991 bylo proto zavedeno názvosloví pro rozlišování SIRS různého původu (Bone et al., 1992).

Vrozená imunitní odpověď je nespecifická, ale obecně méně účinná než specifická (získaná) imunitní odpověď. I přesto je velikým přínosem pro organismus, protože je okamžitě připravená zasáhnout proti širokému spektru infekčních agens, které proniknou do organismu (Delves et al., 2011). Je proto považována za první obrannou linii proti infekci. Charakteristické pro vrozenou složku imunity je, že se dědí a není proto typická pro jedince, ale pro druh. Daní za to, že je okamžitě připravená k zásahu je skutečnost, že je méně účinná a při opakovaném setkání se stejnými antigeny nedochází k jejímu zesílení, jako tomu je v případě specifické imunitní odpovědi, která je při opakovaném setkání se stejnými antigeny výrazně účinnější, a to především díky paměťovým buňkám (Delves et al., 2011).

Lokální zánět je imunitní reakce vedoucí ke snaze neutralizovat působení agens, které tuto reakci vyvolalo. Významnou roli v zánětlivé reakci hrají prozánětlivé chemokiny (např. IL-8), které přitahují efektorové buňky do místa zánětu, a prozánětlivé cytokiny, např. IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ , které řídí fagocytózu patogenů nebo cizích částic či zničení a odstranění poškozených buněk. V případě nadměrného výskytu chemokinů/cytokinů/alarminů/PAMPs může dojít k lokální trombóze a infekční agens nebo jeho části zůstanou lokalizovány a nerozšíří se krevním oběhem do organismu (Fry, 2012).

Ne vždy se podaří zánětlivou reakci izolovat a zabránit tak jejímu systémovému rozšíření a cytokiny, chemokiny, nekrotické buňky, alarminy, infekční agens a jejich možné toxické produkty se rozšíří do celého organismu. Sepse je tedy extrémně vystupňovaná systémová obranná reakce, která se svým bouřlivým průběhem vymkne kontrole organismu. Místo toho, aby ho ochránila, ho poškodí. Nepřiměřené a

neregulované vyplavení cytokinů bývá označováno jako cytokinová bouře (cytokine storm). Taková bouře může vést až k mnohočetnému orgánovému poškození (MODS), které může končit smrtí pacienta (Vennemann et al., 2012). Proto bývají vysoké hladiny cytokinů v krevním oběhu považovány za důležitý průvodní jev sepse.

Produkcí zánětlivých mediátorů indukují charakteristické molekulární struktury. Tyto molekulární struktury mohou být buď organismu cizí, jako jsou např. PAMPs nebo struktury organismu vlastní, které jsou za běžného stavu skryty imunitnímu rozpoznávání. Tyto molekuly se nazývají alarminy a jejich typickým představitelem je HMGB1. HMGB1 je DNA vazebný jaderný protein, který je důležitý pro transkripci. Z tohoto důvodu se nachází prakticky ve všech jaderných buňkách. Jeho objevení se mimo buňku může být buď sekrecí aktivovanými buňkami (především makrofágy), nebo se uvolní při buněčné nekróze. Z důvodu, že buněčné poškození a rozpad buňky nějakou dobu trvá je HMGB1, uvolňován ve srovnání např. TNF- $\alpha$  výrazně později. Je proto popisován jako pozdní mediátor zánětu (Cinel a Opal, 2009).

Plejáda markerů sepse je obrovská (Pierrakos a Vincent, 2010). Přesto je těžké najít univerzální marker, který by byl typický pouze pro sepsi, a proto se používá stanovení více markerů sepse. Z tohoto důvodu se popisují stále nové a nové markery nebo se hledají nové souvislosti markerů spojených s infekcí, které jsou známy desítky let. Příkladem takového markeru může být presepsin, což je solubilní forma dávno známého povrchového znaku CD14, tedy receptoru pro lipopolychacharid, který je součástí buněčné stěny gram-negativních bakterií (Caroff a Karibian, 2003). Např. v roce 2011 byly v odborné literatuře popsány objevné práce v diagnostickém využití solubilní formy tohoto léta známého markeru (Mussap et al., 2011; Okamura a Yokoi, 2011).

Sepse i přes velké úsilí výzkumných a klinických týmů stále ohrožuje pacienty na životě a je provázena vysokou úmrtností. Zatímco v 60. – 70. letech byla věnována pozornost podpoře dostatečné ventilace septických pacientů, úpravě objemů tělesných tekutin, výživě, podpoře činnosti srdce a léčbě širokospektrými antibiotiky, v současnosti se větší pozornost věnuje neutralizaci infekčních agens, jejich charakteristických molekulárních struktur (PAMP), receptorům (TLRs, NODs), aby se zabránilo molekulární signalizaci spouštějící nekontrolovanou sebedestrukční obrannou reakci vedoucí k MODS (Parrish et al., 2008).

Pro studium mechanismů sepse a hledání účinných postupů pro její léčbu je třeba používat vhodné modely. Sepsí, jako mimořádně složitý proces postihující celý organismus není prakticky možné modelovat v *in vitro* experimentech. Z těchto důvodů se používají zvířecí modely. Velice rozšířené laboratorní zvířecí modely v biomedicíně jsou hlodavci (myš a potkan), a to především pro jejich nenáročnost na chov a existenci různých knockautovaných linií s odstraněnými geny např. pro prozánětlivé cytokiny (Moreno et al., 2006; Ogiku et al., 2012), které umožňují sledovat význam toho kterého faktoru pro vznik a závažnost sepse. Přes nesporné výhody chovu a využití laboratorních hlodavců jsou tyto fylogeneticky velice vzdáleni člověku. Není proto divu, že výsledky a terapeutické postupy, které jsou získávány v experimentech, jsou jen výjimečně aplikovatelné v humánní medicíně (Dyson a Singer, 2009). Přesto je obecný souhlas o nezbytnosti používání experimentálních modelů sepse (Poli-de-Figueiredo et al., 2008). V posledních letech stále roste obliba prasete jako infekčního modelu lidských onemocnění, které je svou fyziologií, výživou a anatomickými poměry podstatně bližší člověku (Fairbairn et al., 2011; Meurens et al., 2012). Zavedení určitého zvířecího modelu s sebou také nese potřebu dostupnosti diagnostických reagensů, což jsou v případě sepse především zánětlivé cytokiny.

První laboratorně připravené rekombinantní proteiny a protilátky proti zánětlivým cytokinům prasete se začaly objevovat počátkem 90. let minulého století. Hlavním cílem zájmu byl v té době poměrně nedávno popsán a intenzivně studovaný faktor nekrotizující nádory alfa – TNF- $\alpha$  (Beutler et al., 1985; Jesmok et al., 1992; Von Niederhausern et al., 1993). První komerčně dostupné protilátky proti prasečímu TNF- $\alpha$  nabízela firma Endogen (později součást Pierce, dnes vlastněné firmou Thermo Fischer Scientific). Firma Endogen také nabídla první ELISA kit pro stanovení prasečího TNF- $\alpha$ . Další firmy, které následovaly s nabídkou ELISA souprav, byly firmy BioSource (Camarillo, CA, USA, později Invitrogen, dnes Life Technologies) a R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Jako evropský výrobce se k nim později připojila firma IBL-Habmurg (Hamburg, SRN) (Šplíchal, 2012). V současnosti existuje mnoho firem s nabídkou pokrývající široké spektrum prasečích

zánětlivých cytokinů a chemokinů (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ ).

Složitost zánětlivého procesu vedla k potřebě stanovit více zánětlivých markerů najednou, což bylo podnětem pro rozvoj multiplexových stanovení. Kombinací sendvičového složení známého z ELISA a principu průtokové cytometrie vyvinula firma Luminex Corporation (Austin, TX, USA) metodu, kterou nazvala xMAP technologie (Extended Multialyte Profiling). Toto multiplexové stanovení se, po počátečních ojedinělých pokusech, začalo opravdu rozvíjet a rozšiřovat do klinické praxe na přelomu tohoto tisíciletí (Carson a Vignali, 1999; de Jager et al., 2003; Vignali, 2000).

Protože je prase klíčovým zvířecím modelem pro gnotobiologické pracoviště Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Novém Hrádku, zaměřili jsme svou pozornost na možnost multiplexového stanovení prasečích cytokinů. První multiplexovou analýzu prasečích cytokinů provedli ve Švédsku v r. 2006, kdy použili polystyrénové kuličky s navázanými anti-myšími Ig (imunoglobulin) protilátkami dodávanými firmou R&D Systems (Johannisson et al., 2006). Tyto reagenty jsou sice univerzální pro všechny živočišné druhy, pokud je použita specifická myší monoklonální protilátka. Zdá se však, že se tento přístup v praxi příliš neujal. Uvedené multiplexové stanovení cytokinů bylo pro IL-1 $\beta$ , IL-8 a TNF- $\alpha$  s limity detekce v rozsahu 180-12000 pg/ml, což je dostatečné pro stanovení cytokinů za sepse, kdy dosahují vysokých hodnot, ale pro jiné výzkumné práce je možné hodnotit citlivost stanovení jako nedostatečnou. V r. 2009 Bjerre et al. (2009) popsali 4-plexový systém pro stanovení IL-6, IL-8, IL-10 a TNF- $\alpha$ , přičemž se jim nepodařilo začlenit stanovení IL-1 $\beta$  pro neznámé interference. V tomto případě již dosáhli detekce hodnot řádově v jednotkách a desítkách pikogramů, tedy srovnatelných s metodami ELISA. Kromě použitých protilátek se oba uvedené systémy lišily od systému Johannissona et al. (2006) tím, že použili polystyrénové kuličky pokryté paramagnetickou vrstvou. Za průlomovou práci multiplexového stanovení prasečích cytokinů xMAP technologií je možné považovat práci Lawsona et al. (2010), kteří připravili 8-plex s požadovanou citlivostí a vhodným zastoupením zánětlivých cytokinů. První komerčně dostupný multiplexový systém pro stanovení cytokinů prasete nabídla v loňském roce firma Panomics/Affymetrix (Santa Clara, CA,

USA) pro IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  a TGF- $\beta$ . Systém je možné si objednat jako stanovení jednotlivého cytokinu či více cytokinů až po 8-plex. Poněkud nejasná je přítomnost TGF- $\beta$ , protože vyžaduje okyselení vzorku a je tedy nevhodný pro společné stanovení s ostatními cytokiny v multiplexovém provedení. Jediným vysvětlením je skutečnost, že TGF- $\beta$  je fylogeneticky vysoce konzervovaná molekula (Burt a Law, 1994) a se stejnými reagensy je možné stanovit TGF- $\beta$  u více živočišných druhů, jejichž multiplexová stanovení má firma Panomics/Affymetrix v nabídce.

Vypracování systému pro multiplexové stanovení analytů xMAP technologií je velice nákladná záležitost, protože je třeba zkoušet možné kombinace protilátek a zároveň je volit tak, aby si navzájem neinterferovaly. Dr. de Jager (Oddělení dětské imunologie, Lékařské centrum, Utrecht, Nizozemsko), který popsal 15-plex pro stanovení lidských cytokinů (de Jager et al., 2003) a později jej rozšířil na 30-plex nám sdělil, že v případě cytokinů potkana není schopen najít vhodné protilátky pro současné stanovení IL-10 a IFN- $\gamma$  (de Jager, 2009). Detailní popis použitých protilátek pro stanovení prasečích cytokinů jako to důsledně udělala skupina Dr. Saif (Lawson et al., 2010) je proto nesmírně cenná.

Různé laboratorně připravené systémy jsou, i při znalosti potřebných protilátek, časově a finančně nákladné. Otázkou potom je, jestli není vhodnější, a nakonec s ohledem na úsporu lidské práce i ekonomičtější, si koupit komerčně dostupné systémy. V každém případě je ale dobrá znalost systému a možnost doplnění n-plexového systému o požadované cytokiny (např. IL-12/23 p40, IL-17A, IL-23) jednou z výhod multiplexového stanovení analytů založeného na principu průtokové cytometrie.

xMAP technologie je, tak jako se to stalo např. u výrobků firem Xerox nebo Elextrolux, známá více pod nesprávným a „zlidovělým“ označením jako „metoda Luminex“. Tuto očekávanou skutečnost jsme si ověřili srovnáním výskytů odborných prací s klíčovými slovy xMAP a Luminex. Z tohoto důvodu jsme pro vyhledávání prací pro multiplexové stanovení cytokinů použili jako klíčová slova jak xMAP tak Luminex. Vzhledem k malým rozdílům mezi počtem prací takto vyhledaných jsme se nesnažili důsledně najít, ve které práci se vyskytují zároveň oba termíny. Tato naše záměrná

nedůslednost podle našeho názoru nijak neovlivnila představu o rozšiřování xMAP technologie pro stanovení zánětlivých cytokinů v posledním desetiletí.

Výhodou xMAP technologie je skutečnost, že se jedná o multianalytové stanovení nenáročné na objem vzorku ve srovnání s ELISA. Např. pro stanovení 30 zánětlivých cytokinů a růstových faktorů v obtížně dostupné folikulární tekutině vystačíme s 25-50  $\mu$ l vzorku. Pro srovnatelné stanovení 30 cytokinů metodou ELISA by potřeba vzorku byla mnohonásobně větší (cca 30 x 50  $\mu$ l) a tedy naprosto nereálná. Jinou otázkou je oprávněnost takto rozsáhlých stanovení, protože rozsáhlé údaje, pokud nejsou interpretovány, zůstávají pouze změtí čísel a srovnávat a vysvětlit závislost 30 analytů na experimentálních podmínkách rozhodně není jednoduché. První výhodou tedy je, že nám xMAP technologie umožňuje stanovení tam, kde bychom v případě ELISA měli nedostatek vzorku. Další výhodou je skutečnost, že stanovením více analytů najednou v jednom vzorku dochází ke snížení pracnosti a tedy i snížení časové náročnosti na určitá stanovení.

Při srovnání cenových nákladů při stanovení 6 cytokinů jsme zjistili, že stanovení jednoho cytokinu vyjde výrazně levněji pro multiplexové stanovení. Obecně platí „pravidlo“, že čím více cytokinů je v multiplexovém stanovení, tím se mi náklady na jednotlivý cytokin snižují. Např. zatímco stanovení 4 cytokinů 4-plexem vyjde okolo 30 tis. Kč, tak stanovení 30 cytokinů 30-plexem stojí okolo 100 tis. Kč (informace z ceníků Bio-Rad, Millipore, Panomics/Affymetrix a dalších). Nevýhodou pro zavádění multiplexového stanovení xMAP technologií je vysoká pořizovací cena přístroje firmy Luminex, která je mnohonásobně vyšší než cena ELISA readeru. Příklad však zároveň umožňuje i další stanovení např. v oblasti nukleových kyselin. Při srovnání reprodukovatelnosti výsledků (intra-assay či inter-assay přesnost) vychází lépe ELISA, což v některých případech není na závadu stanovení. Takovým případem je např. sepse, kdy se jedná buď o fyziologické hodnoty cytokinů, nebo hodnoty doslova extrémní.

## 7. ZÁVĚR

V předložené práci jsme zpracovali téma sepse. Svou pozornost jsme věnovali také srovnání metod ELISA a xMAP technologie pro stanovení zánětlivých cytokinů. Z odborné literatury získaných poznatků vyvozujeme:

- 1) Sepse patří mezi nejčastější příčiny úmrtí kriticky nemocných pacientů.
- 2) Při sepsi dochází k poškození pacienta mechanismy přirozené imunity, které se vymkly regulaci.
- 3) V posledních letech se objevují zmínky o možném významnějším ovlivnění specifické imunity v sepsi (např. deplece CD4 buněk).
- 4) Sepse je složitý a doposud ne úplně objasněný proces.
- 5) Další získané poznatky mechanismů vzniku a průběhu sepse mohou přispět k terapeutickému ovlivnění sepse.
- 6) Sepse je velmi složitý proces, a proto se *in vitro* systémy zdají být nedostatečné pro studium sepse.
- 7) Zvířecí modely sepse zatím neplní očekávání pro aplikaci získaných poznatků pro léčbu člověka. Jsou potřebné sofistikovanější a člověku podobnější zvířecí modely.
- 8) Není známý žádný univerzální marker sepse. Při studiu sepse je proto vhodné sledovat více markerů charakterizujících zánětlivou reakci v širších souvislostech.

Výše uvedené poznatky chceme zúročit ve výzkumné práci na pracovišti Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Novém Hrádku při modelování sepse na gnotobiotickém selecím modelu sepse. Téma sepse, ke kterému jsem si osvojila základní poznatky, studované na selecím modelu, se tak může stát tématem mé předpokládané diplomové práce.



## ZKRATKY, ODBORNÉ TERMÍNY A KLÍČOVÁ SLOVA

**CD** (Cluster Designation) povrchový znak

**DAMPs** (Damage Associated Molecular Patterns) molekuly signalizující poškození či nebezpečí tzn. alarminy tj. zkratka je někdy používána i jako danger associated molecular patterns – v literatuře panuje nejednotnost)

**DNA** (deoxyribonucleic acid) deoxyribonukleová kyselina

**ELISA** (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

**HMGB1** (High Mobility Group Box 1) alarmin

**Hsp32** (Heat shock protein 32) protein teplotního šoku 32

**IFN- $\gamma$**  interferon gama

**IL** interleukin

**MAMPs** (Microbe Associated Molecular Patterns) molekulární vzory spojené s mikroby

**MyD88** (Myeloid Differentiation primary-response protein 88) adaptorový protein

**Nd-YAG laser** (Neodymium/Yttrium-Aluminum-Garnet laser) neodým/yttrium-hliníkovo-granátový laser

**NF- $\kappa$ B** (Nuclear Factor kappa B) jaderný faktor kappa B

**NOD-LRRs** (Nucleotide-Oligomerization Domain Leucine-Rich Repeat) cytosolový receptor

**PAMPs** (Pathogen Associated Molecular Patterns) molekulární vzory spojené s patogeny

**PRRs** (Pattern Recognition Receptors) receptory rozpoznávající struktury

**TF** tkáňový faktor

**TFPI** (Tissue Factor Pathway Inhibitor) inhibitor tkáňového faktoru

**TGF- $\beta$**  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) transformující růstový faktor beta

**TNF- $\alpha$**  (Tumour Necrosis Factor  $\alpha$ ) faktor nekrotizující nádory alfa

**vWF** (von Willebrand factor) von Willebrandův faktor

**xMAP technologie** (Extended Multianalyte Profiling technology); nesprávně nazýváno „metoda Luminex“

## 8. POUŽITÁ LITERATURA

1. Agnello D., Wang H., Yang H., Tracey K. J., Ghezzi P., 2002. HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion. *Cytokine*, roč. 18, č. 4, s. 231-236.
2. Aird W. C., 2008. Endothelium in health and disease. *Pharmacol.Rep.*, roč. 60, č. 1, s. 139-143.
3. Anonym 1, 2012. DuoSet® ELISA Development Systems Assay Principle. *Materiály firmy R&D Systems*,  
[http://www.rndsystems.com/product\\_detail\\_objectname\\_duasetelisaassayprinciple.aspx](http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_duasetelisaassayprinciple.aspx).
4. Anonym 2, 2012. xMAP Technology. *Materiály firmy Panomics/Affematrix*,  
[http://www.panomics.com/index.php?id=product\\_96](http://www.panomics.com/index.php?id=product_96).
5. Anonym 3, 2012. Luminex® Bead-based Multiplex Assay Principle. *Materiály firmy R&D Systems*,  
[http://www.rndsystems.com/product\\_detail\\_objectname\\_MultiplexAssayPrinciple.aspx](http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_MultiplexAssayPrinciple.aspx).
6. Astiz M. E., DeGent G. E., Lin R. Y., Rackow E. C., 1995. Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med*, roč. 23, č. 2, s. 265-271.
7. Ausubel F. M., 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*, roč. 6, č. 10, s. 973-979.
8. Balk R., 2011. Roger C. Bone, MD and the evolving paradigms of sepsis. *Contrib.Microbiol*, roč. 17, s. 1-11.
9. Baue A. E., 2003. Sepsis, systemic inflammatory response syndrome, multiple organ dysfunction syndrome, and multiple organ failure: are trauma surgeons lumpers or splitters? *J Trauma*, roč. 55, č. 5, s. 997-998.
10. Becker K. L., Snider R., Nylén E. S., 2008. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med*, roč. 36, č. 3, s. 941-952.

11. Beutler B., Greenwald D., Hulmes J. D., Chang M., Pan Y. C., Mathison J., Ulevitch R., Cerami A., 1985. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*, roč. 316, č. 6028, s. 552-554.
12. Bjerre M., Hansen T. K., Flyvbjerg A., Tonnesen E., 2009. Simultaneous detection of porcine cytokines by multiplex analysis: development of magnetic bioplex assay. *Vet Immunol Immunopathol*, roč. 130, č. 1-2, s. 53-58.
13. Bone R. C., Balk R. A., Cerra F. B., Dellinger R. P., Fein A. M., Knaus W. A., Schein R. M., Sibbald W. J., 1992. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, roč. 101, č. 6, s. 1644-1655.
14. Bossink A. W., Groeneveld J., Hack C. E., Thijs L. G., 1998. Prediction of mortality in febrile medical patients: How useful are systemic inflammatory response syndrome and sepsis criteria? *Chest*, roč. 113, č. 6, s. 1533-1541.
15. Brown K. A., Brain S. D., Pearson J. D., Edgeworth J. D., Lewis S. M., Treacher D. F., 2006. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*, roč. 368, č. 9530, s. 157-169.
16. Brun-Buisson C., Doyon F., Carlet J., 1996. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*, roč. 154, č. 3 Pt 1, s. 617-624.
17. Burt D. W., Law A. S., 1994. Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily. *Prog Growth Factor Res*, roč. 5, č. 1, s. 99-118.
18. Caroff M., Karibian D., 2003. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res*, roč. 338, č. 23, s. 2431-2447.
19. Carson R. T., Vignali D. A., 1999. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods*, roč. 227, č. 1-2, s. 41-52.
20. Castellheim A., Brekke O. L., Espevik T., Harboe M., Mollnes T. E., 2009. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol*, roč. 69, č. 6, s. 479-491.

21. Chandra A., Enkhbaatar P., Nakano Y., Traber L. D., Traber D. L., 2006. Sepsis: emerging role of nitric oxide and selectins. *Clinics.(Sao Paulo)*, roč. 61, č. 1, s. 71-76.
22. Cinel I., Dellinger R. P., 2007. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr Opin Infect Dis*, roč. 20, č. 4, s. 345-352.
23. Cinel I., Opal S. M., 2009. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med*, roč. 37, č. 1, s. 291-304.
24. Creagh E. M., O'Neill L. A., 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*, roč. 27, č. 8, s. 352-357.
25. De Groote M. A., Frank D. N., Dowell E., Glode M. P., Pace N. R., 2005. Lactobacillus rhamnosus GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. *Pediatr Infect Dis J*, roč. 24, č. 3, s. 278-280.
26. de Jager W., 2009. Možná úskalí při přípravě multiplexové metody pro stanovení cytokinů, chemokinů a růstových faktorů. *Ústní sdělení*.
27. de Jager W., Rijkers G. T., 2006. Solid-phase and bead-based cytokine immunoassay: a comparison. *Methods*, roč. 38, č. 4, s. 294-303.
28. de Jager W., te V. H., Prakken B. J., Kuis W., Rijkers G. T., 2003. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. *Clin Diagn Lab Immunol*, roč. 10, č. 1, s. 133-139.
29. Delves, P. J., Martin S. J., Burton D. R., a Roitt I. M., 2011, Roitt's Essential Immunology, West Sussex, Willey-Blackwell, 546 s., ISBN 978-1-4051-9683-3.
30. Dumitriu I. E., Baruah P., Manfredi A. A., Bianchi M. E., Rovere-Querini P., 2005. HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol*, roč. 26, č. 7, s. 381-387.
31. Dunbar S. A., 2006. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. *Clin Chim Acta*, roč. 363, č. 1-2, s. 71-82.
32. Dyson A., Singer M., 2009. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med*, roč. 37, č. 1 Suppl, s. S30-S37.

33. Earley M. C., Vogt R. F., Jr., Shapiro H. M., Mandy F. F., Kellar K. L., Bellisario R., Pass K. A., Marti G. E., Stewart C. C., Hannon W. H., 2002. Report from a workshop on multianalyte microsphere assays. *Cytometry*, roč. 50, č. 5, s. 239-242.
34. Eckersall P. D., Bell R., 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J*, roč. 185, č. 1, s. 23-27.
35. Černý V., Kula R., Novák I., Cvachovec K. a kolektiv, 2005, Sepse v intenzivní péči, Praha, Maxdorf, 212 s., ISBN 80-7345-054-2.
36. Engvall E., Perlmann P., 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, roč. 8, č. 9, s. 871-874.
37. Esmon C. T., 2004. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med*, roč. 32, č. 5 Suppl, s. S219-S222.
38. Esmon C. T., 2005. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol.*, roč. 131, č. 4, s. 417-430.
39. Fairbairn L., Kapetanovic R., Sester D. P., Hume D. A., 2011. The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *J Leukoc Biol*, roč. 89, č. 6, s. 855-871.
40. Feng J., Damrauer S. M., Lee M., Sellke F. W., Ferran C., Abid M. R., 2010. Endothelium-dependent coronary vasodilatation requires NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, roč. 30, č. 9, s. 1703-1710.
41. Freise H., Bruckner U. B., Spiegel H. U., 2001. Animal models of sepsis. *J Invest Surg*, roč. 14, č. 4, s. 195-212.
42. Fritz J. H., Ferrero R. L., Philpott D. J., Girardin S. E., 2006. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*, roč. 7, č. 12, s. 1250-1257.
43. Fry D. E., 2012. Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues. *Am.Surg.*, roč. 78, č. 1, s. 1-8.
44. Fulton R. J., McDade R. L., Smith P. L., Kienker L. J., Kettman J. R., Jr., 1997. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem*, roč. 43, č. 9, s. 1749-1756.

45. Gabay C., Kushner I., 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, roč. 340, č. 6, s. 448-454.
46. Gaini S., Pedersen S. S., Koldkaer O. G., Pedersen C., Moestrup S. K., Moller H. J., 2008. New immunological serum markers in bacteraemia: anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis. *Clin Exp Immunol*, roč. 151, č. 3, s. 423-431.
47. Genel F., Atlihan F., Gulez N., Kazanci E., Vergin C., Terek D. T., Yurdun O. C., 2012. Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection. *World J Pediatr*, roč. 8, č. 1, s. 72-75.
48. Granucci F., Foti M., Ricciardi-Castagnoli P., 2005. Dendritic cell biology. *Adv Immunol*, roč. 88, s. 193-233.
49. Guenther K., Straube E., Pfister W., Guenther A., Huebler A., 2010. Sever sepsis after probiotic treatment with Escherichia coli NISSLE 1917. *Pediatr Infect Dis J*, roč. 29, č. 2, s. 188-189.
50. Halminen M., Sjoroos M., Makela M. J., Waris M., Terho E., Lovgren T., Ilonen J., 1999. Simultaneous detection of IFN-gamma and IL-4 mRNAs using RT-PCR and time-resolved fluorometry. *Cytokine*, roč. 11, č. 1, s. 87-93.
51. Hitzler I., Sayi A., Kohler E., Engler D. B., Koch K. N., Hardt W. D., Muller A., 2012. Caspase-1 Has Both Proinflammatory and Regulatory Properties in Helicobacter Infections, Which Are Differentially Mediated by Its Substrates IL-1beta and IL-18. *J Immunol*, roč. 188, č. 8, s. 3594-3602.
52. Horan P. K., Wheelless L. L., Jr., 1977. Quantitative single cell analysis and sorting. *Science*, roč. 198, č. 4313, s. 149-157.
53. Jeanneret S., Sanchez B., Liaudet L., 2011. [Pathophysiological mechanisms and treatment of septic shock-induced vasoplegia]. *Rev Med Suisse*, roč. 7, č. 321, s. 2435-2438.
54. Jesmok G., Lindsey C., Duerr M., Fournel M., Emerson T., Jr., 1992. Efficacy of monoclonal antibody against human recombinant tumor necrosis factor in E. coli-challenged swine. *Am J Pathol*, roč. 141, č. 5, s. 1197-1207.

55. Johannisson A., Jonasson R., Dernfalk J., Jensen-Waern M., 2006. Simultaneous detection of porcine proinflammatory cytokines using multiplex flow cytometry by the xMAP technology. *Cytometry A*, roč. 69, č. 5, s. 391-395.
56. Jones G. R., Lowes J. A., 1996. The systemic inflammatory response syndrome as a predictor of bacteraemia and outcome from sepsis. *QJM*, roč. 89, č. 7, s. 515-522.
57. Kochan P., Chmielarczyk A., Szymaniak L., Brykczynski M., Galant K., Zych A., Pakosz K., Giedrys-Kalemba S., Lenouvel E., Heczko P. B., 2011. Lactobacillus rhamnosus administration causes sepsis in a cardiosurgical patient--is the time right to revise probiotic safety guidelines? *Clin Microbiol Infect*, roč. 17, č. 10, s. 1589-1592.
58. Kolackova M., Lonsky V., Trojackova K. M., Mandak J., Kunes P., Svitek V., Jankovicova K., Vlaskova D., Andrys C., Krejsek J., 2009. Serum level of sCD163, a soluble receptor for hemoglobin, is influenced by cardiac surgery. *Perfusion*, roč. 24, č. 4, s. 263-269.
59. Kono H., Rock K. L., 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*, roč. 8, č. 4, s. 279-289.
60. Lamkanfi M., Sarkar A., Vande W. L., Vitari A. C., Amer A. O., Wewers M. D., Tracey K. J., Kanneganti T. D., Dixit V. M., 2010. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol*, roč. 185, č. 7, s. 4385-4392.
61. Lawson S., Lunney J., Zuckermann F., Osorio F., Nelson E., Welbon C., Clement T., Fang Y., Wong S., Kulas K., Christopher-Hennings J., 2010. Development of an 8-plex Luminex assay to detect swine cytokines for vaccine development: assessment of immunity after porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccination. *Vaccine*, roč. 28, č. 32, s. 5356-5364.
62. Ledoux D., Labombardi V. J., Karter D., 2006. Lactobacillus acidophilus bacteraemia after use of a probiotic in a patient with AIDS and Hodgkin's disease. *Int J STD AIDS*, roč. 17, č. 4, s. 280-282.
63. Lever A., Mackenzie I., 2007. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ*, roč. 335, č. 7625, s. 879-883.

64. Levi M., de J. E., van der Poll T., 2004. New treatment strategies for disseminated intravascular coagulation based on current understanding of the pathophysiology. *Ann Med*, roč. 36, č. 1, s. 41-49.
65. Levy M. M., Fink M. P., Marshall J. C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S. M., Vincent J. L., Ramsay G., 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*, roč. 29, č. 4, s. 530-538.
66. Manship L., McMillin R. D., Brown J. J., 1984. The influence of sepsis and multisystem and organ failure on mortality in the surgical intensive care unit. *Am.Surg.*, roč. 50, č. 2, s. 94-101.
67. Matzinger P., 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science*, roč. 296, č. 5566, s. 301-305.
68. Meisner M., Muller V., Khakpour Z., Toegel E., Redl H., 2003. Induction of procalcitonin and proinflammatory cytokines in an anhepatic baboon endotoxin shock model. *Shock*, roč. 19, č. 2, s. 187-190.
69. Meurens F., Summerfield A., Nauwynck H., Saif L., Gerdts V., 2012. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol*, roč. 20, č. 1, s. 50-57.
70. Miao E. A., Andersen-Nissen E., Warren S. E., Aderem A., 2007. TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol*, roč. 29, č. 3, s. 275-288.
71. Michie H. R., Spriggs D. R., Manogue K. R., Sherman M. L., Revhaug A., O'Dwyer S. T., Arthur K., Dinarello C. A., Cerami A., Wolff S. M., ., 1988. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery*, roč. 104, č. 2, s. 280-286.
72. Moreno S. E., Alves-Filho J. C., Alfaya T. M., da Silva J. S., Ferreira S. H., Liew F. Y., 2006. IL-12, but not IL-18, is critical to neutrophil activation and resistance to polymicrobial sepsis induced by cecal ligation and puncture. *J Immunol*, roč. 177, č. 5, s. 3218-3224.
73. Mosmann T. R., Fong T. A., 1989. Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods*, roč. 116, č. 2, s. 151-158.
74. Mussap M., Noto A., Fravega M., Fanos V., 2011. Soluble CD14 subtype presepsin (sCD14-ST) and lipopolysaccharide binding protein (LBP) in neonatal



- sepsis: new clinical and analytical perspectives for two old biomarkers. *J Matern.Fetal Neonatal Med*, roč. 24 Suppl 2, s. 12-14.
75. Nathens A. B., Marshall J. C., 1996. Sepsis, SIRS, and MODS: what's in a name? *World J Surg*, roč. 20, č. 4, s. 386-391.
  76. Nystrom P. O., 1998. The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J Antimicrob Chemother*, roč. 41 Suppl A, s. 1-7.
  77. O'Grady N. P., Barie P. S., Bartlett J., Bleck T., Garvey G., Jacobi J., Linden P., Maki D. G., Nam M., Pasculle W., Pasquale M. D., Tribett D. L., Masur H., 1998. Practice parameters for evaluating new fever in critically ill adult patients. Task Force of the American College of Critical Care Medicine of the Society of Critical Care Medicine in collaboration with the Infectious Disease Society of America. *Crit Care Med*, roč. 26, č. 2, s. 392-408.
  78. O'Shea J. J., Ma A., Lipsky P., 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, roč. 2, č. 1, s. 37-45.
  79. Ogiku M., Kono H., Hara M., Tsuchiya M., Fujii H., 2012. Interleukin-17A Plays a Pivotal Role in Polymicrobial Sepsis According to Studies Using IL-17A Knockout Mice. *J Surg Res*, roč. 174, č. 1, s. 142-149.
  80. Okamura Y., Yokoi H., 2011. Development of a point-of-care assay system for measurement of presepsin (sCD14-ST). *Clin ChimActa*, roč. 412, č. 23-24, s. 2157-2161.
  81. Onofre G., Kolackova M., Jankovicova K., Krejsek J., 2009. Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica.(Hradec Kralove)*, roč. 52, č. 2, s. 57-61.
  82. Ozdulger A., Cinel I., Unlu A., Cinel L., Mavioglu I., Tamer L., Atik U., Oral U., 2002. Poly(Adp-ribose) synthetase inhibition prevents lipopolysaccharide-induced peroxynitrite mediated damage in diaphragm. *Pharmacol Res*, roč. 46, č. 1, s. 67-73.
  83. Parrish W. R., Gallowitsch-Puerta M., Czura C. J., Tracey K. J., 2008. Experimental therapeutic strategies for severe sepsis: mediators and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*, roč. 1144, s. 210-236.
  84. Pierrakos C., Vincent J. L., 2010. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care*, roč. 14, č. 1, s. R15.

85. Pittet D., Rangel-Frausto S., Li N., Tarara D., Costigan M., Rempe L., Jebson P., Wenzel R. P., 1995. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med*, roč. 21, č. 4, s. 302-309.
86. Poli-de-Figueiredo L. F., Garrido A. G., Nakagawa N., Sannomiya P., 2008. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*, roč. 30 Suppl 1, s. 53-59.
87. Pova P., Almeida E., Moreira P., Fernandes A., Mealha R., Aragao A., Sabino H., 1998. C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Med*, roč. 24, č. 10, s. 1052-1056.
88. Prussin C., Metcalfe D. D., 1995. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods*, roč. 188, č. 1, s. 117-128.
89. Qu L., Kiss J. E., Dargo G., Carcillo J. A., 2011. Outcomes of previously healthy pediatric patients with fulminant sepsis-induced multisystem organ failure receiving therapeutic plasma exchange. *J Clin Apher.*, roč. 26, č. 4, s. 208-213.
90. Ramchandra R., Wan L., Hood S. G., Frithiof R., Bellomo R., May C. N., 2009. Septic shock induces distinct changes in sympathetic nerve activity to the heart and kidney in conscious sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, roč. 297, č. 5, s. R1247-R1253.
91. Rangel-Frausto M. S., Pittet D., Costigan M., Hwang T., Davis C. S., Wenzel R. P., 1995. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*, roč. 273, č. 2, s. 117-123.
92. Rittirsch D., Flierl M. A., Ward P. A., 2008. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*, roč. 8, č. 10, s. 776-787.
93. Salmon S. E., Mackey G., Fudenberg H. H., 1969. "Sandwich" solid phase radioimmunoassay for the quantitative determination of human immunoglobulins. *J Immunol*, roč. 103, č. 1, s. 129-137.
94. Salvo I., de C. W., Musicco M., Langer M., Piadena R., Wolfler A., Montani C., Magni E., 1995. The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*, roč. 21 Suppl 2, s. S244-S249.

95. Sasaki K., Fujita I., Hamasaki Y., Miyazaki S., 2002. Differentiating between bacterial and viral infection by measuring both C-reactive protein and 2'-5'-oligoadenylate synthetase as inflammatory markers. *J Infect Chemother*, roč. 8, č. 1, s. 76-80.
96. Schnare M., Barton G. M., Holt A. C., Takeda K., Akira S., Medzhitov R., 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol*, roč. 2, č. 10, s. 947-950.
97. Schouten M., Wiersinga W. J., Levi M., van der Poll T., 2008. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*, roč. 83, č. 3, s. 536-545.
98. Shozushima T., Takahashi G., Matsumoto N., Kojika M., Okamura Y., Endo S., 2011. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Chemother*, roč. 17, č. 6, s. 764-769.
99. Silvestre J., Pova P., Coelho L., Almeida E., Moreira P., Fernandes A., Mealha R., Sabino H., 2009. Is C-reactive protein a good prognostic marker in septic patients? *Intensive Care Med*, roč. 35, č. 5, s. 909-913.
100. Soysal D., Karakus V., Yavas H. H., Biceroglu S., Koseoglu M., Yesil M., 2010. C-reactive protein in unstable angina pectoris and its relation to coronary angiographic severity and diffusion scores of coronary lesions. *Anadolu Kardiyol Derg*, roč. 10, č. 5, s. 421-428.
101. Šplíchal I., 2012. ELISA systémy pro stanovení prasečích cytokinů. *Ústní sdělení*.
102. Takeda K., Akira S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, roč. 17, č. 1, s. 1-14.
103. Taner A. S., Cinel I., Ozer L., Onde U., Taner D., Koksoy C., 2001. Poly(adp-ribose) synthetase inhibition reduces bacterial translocation in rats after endotoxin challenge. *Shock*, roč. 16, č. 2, s. 159-162.
104. Tavernier B., Makhotine O., Lebuffe G., Dupont J., Scherpereel P., 1998. Systolic pressure variation as a guide to fluid therapy in patients with sepsis-induced hypotension. *Anesthesiology*, roč. 89, č. 6, s. 1313-1321.
105. Uematsu S., Akira S., 2006. Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med (Berl)*, roč. 84, č. 9, s. 712-725.

106. van der Poll T., Opal S. M., 2008. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis*, roč. 8, č. 1, s. 32-43.
107. Venet F., Lepape A., Monneret G., 2011. Clinical review: flow cytometry perspectives in the. *Crit Care*, roč. 15, č. 5, s. 231.
108. Vennemann M. M., Loddenkotter B., Fracasso T., Mitchell E. A., Debertin A. S., Larsch K. P., Sperhake J. P., Brinkmann B., Sauerland C., Lindemann M., Bajanowski T., 2012. Cytokines and sudden infant death. *Int J Legal Med*, roč. 126, č. 2, s. 279-284.
109. Vignali D. A., 2000. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods*, roč. 243, č. 1-2, s. 243-255.
110. Vincent J. L., Dufaye P., Berre J., Leeman M., Degaute J. P., Kahn R. J., 1983. Serial lactate determinations during circulatory shock. *Crit Care Med*, roč. 11, č. 6, s. 449-451.
111. Voller A., Bidwell D. E., Bartlett A., 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ*, roč. 53, č. 1, s. 55-65.
112. Von Niederhausern B., Bertoni G., Hertig C., Pfister H., Peterhans E., Pauli U., 1993. Cloning and expression in mammalian cells of porcine tumor necrosis factor alpha: examination of biological properties. *Vet Immunol Immunopathol*, roč. 38, č. 1-2, s. 57-74.
113. Xiang M., Yuan Y., Fan L., Li Y., Li A., Yin L., Scott M. J., Xiao G., Billiar T. R., Wilson M. A., Fan J., 2012. Role of Macrophages in Mobilization of Hematopoietic Progenitor Cells From Bone Marrow After Hemorrhagic Shock. *Shock*, roč. 37, č. 5, s. 518-523.
114. Zanotti-Cavazzoni S. L., Goldfarb R. D., 2009. Animal models of sepsis. *Crit Care Clin.*, roč. 25, č. 4, s. 703-viii.
115. Zeerleder S., Schroeder V., Hack C. E., Kohler H. P., Wuillemin W. A., 2006. TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. *Thromb Res*, roč. 118, č. 2, s. 205-212.