

**UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA KATEDRA BIOCHEMIE**

**PRODUKTY REAKTIVNÍCH FOREM  
DUSÍKU U PACIENTŮ V SEPSI**

Lucie Vávrová

**ŠKOLITEL:**

**Doc.RNDr. FRANTIŠEK NOVÁK, CSc.**

**MUDr. FRANTIŠEK NOVÁK**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Františka Nováka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

Místo a datum: Praha 5.5.2006

Podpis: *Barbora*

Tato diplomová práce vznikla v laboratořích IV. interní kliniky 1. Lékařské fakulty UK a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze ve spolupráci s MUDr. Františkem Novákem z oddělení akutní medicíny téže kliniky.

Ráda bych vyjádřila poděkování svému školiteli Doc. RNDr. Františku Novákovi CSc. a Doc. Olze Novákové CSc. za odborné vedení, jakož i za cenné připomínky a podněty, které mi poskytli při zpracovávání mé diplomové práce.

Dále bych ráda poděkovala MUDr. Františku Novákovi za konzultaci v otázkách medicíny a paní Jitce Bartíkové za pomoc při vyhledávání vhodných pacientů a kontrolování jejich zdravotního stavu.

Poděkování patří též Prof. MUDr. Aleši Žákovi DrSc. a RNDr. Evě Tvrzické CSc. za umožnění řešit tuto problematiku v laboratořích IV. interní kliniky 1. lékařské fakulty.

Poděkovala bych ráda také svým rodičům za porozumění, podporu a pomoc při mém studiu a v neposlední řadě bych chtěla poděkovat Mgr. Vlastě Čepelové, která mě přivedla ke studiu chemie a poskytla mi možnost do tohoto oboru proniknout a orientovat se v něm.

# 1 OBSAH

<b>2</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>1</b>
<b>3</b>	<b>SEZNAM POJMŮ</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>ÚVOD</b>	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>CÍL PRÁCE</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>6</b>
<b>6.1</b>	<b>Sepse</b>	<b>6</b>
6.1.1	Syndrom systémové zánětlivé odpovědi	6
6.1.2	Sepse	6
6.1.3	Těžká seps	7
6.1.4	Syndrom multiorgánové dysfunkce	7
6.1.5	Skórovací systémy používané v intenzivní péči	7
6.1.6	Diagnostika sepse	8
6.1.7	C-reaktivní protein	8
<b>6.2</b>	<b>Reaktivní formy kyslíku a dusíku a volné radikály</b>	<b>11</b>
6.2.1	Příčiny vzniku volných radikálů	12
6.2.2	Nemoci způsobené volnými radikály	13
6.2.3	Volné radikály a seps	14
6.2.4	Reaktivní formy kyslíku	15
6.2.5	Reaktivní formy dusíku	16
<b>6.3</b>	<b>Antioxidační systém</b>	<b>21</b>
6.3.1	Katalasa	24
<b>6.4</b>	<b>Oxidační stres</b>	<b>25</b>
6.4.1	Indikátory oxidačního stresu	25
<b>7</b>	<b>METODIKA</b>	<b>26</b>
<b>7.1</b>	<b>PARAMETRY KLINICKÉ STUDIE</b>	<b>26</b>
7.1.1	Kriteria výběru osob zařazených do studie	26
7.1.2	Charakteristika osob zařazených do studie	28
7.1.3	Časový plán odběru vzorků	30
7.1.4	Odběr a zpracování vzorků krve	30
<b>7.2</b>	<b>METODY</b>	<b>35</b>
7.2.1	Použité chemikálie a přístrojové vybavení	35
7.2.2	Metody stanovení hladiny produktů metabolismu oxidu dusnatého	36
7.2.3	Stanovení aktivity katalasy	42
7.2.4	Klinicko-biochemické parametry vzorků	44

<b>7.3</b>	<b>Statistické zpracování výsledků</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY</b>	<b>46</b>
<b>8.1</b>	<b>Optimalisace stanovení aktivity katalasy</b>	<b>46</b>
8.1.1	Závislost aktivity katalasy na koncentraci hemolysátu	46
8.1.2	Závislost aktivity katalasy na koncentraci substrátu	47
8.1.3	Závislost aktivity katalasy na teplotě	49
8.1.4	Reprodukovatelnost měření	50
8.1.5	Časový průběh hydrolysy peroxidu vodíku	51
<b>8.2</b>	<b>Klinicko-biochemické parametry osob zařazených do klinické studie</b>	<b>51</b>
<b>8.3</b>	<b>Aktivita katalasy</b>	<b>53</b>
8.3.1	Aktivita katalasy u pacientů v sepsi	53
8.3.2	Korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací C-reaktivního proteinu	56
8.3.3	Korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací železa	57
<b>8.4</b>	<b>Celková koncentrace nitritů a nitrátů u pacientů v sepsi</b>	<b>57</b>
<b>8.5</b>	<b>Koncentrace nitrotyrosinu</b>	<b>60</b>
8.5.1	Koncentrace nitrotyrosinu u pacientů v sepsi	60
8.5.2	Korelace koncentrací nitrotyrosinu a C-reaktivního proteinu	62
8.5.3	Korelace koncentrace nitrotyrosinu a celkové koncentrace nitritů a nitrátů	62
<b>8.6</b>	<b>Sledované parametry v závislosti na pohlaví</b>	<b>64</b>
<b>8.7</b>	<b>Sledované parametry v závislosti na věku</b>	<b>65</b>
<b>8.8</b>	<b>Sledované parametry a zdroj sepse</b>	<b>66</b>
<b>8.9</b>	<b>Korelace jednotlivých parametrů s APACHE II skóre</b>	<b>67</b>
<b>8.10</b>	<b>Korelace sledovaných parametrů mezi sebou</b>	<b>68</b>
8.10.1	Korelace mezi koncentracemi železa a C-reaktivního proteinu	68
8.10.2	Korelace mezi koncentracemi C-reaktivního proteinu a hemoglobinu	69
8.10.3	Korelace mezi koncentracemi hemoglobinu a železa	69
8.10.4	Korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací hemoglobinu	70
8.10.5	Korelace mezi aktivitou katalasy a celkovou koncentrací nitritů a nitrátů	70
<b>9</b>	<b>DISKUSE</b>	<b>71</b>
<b>9.1</b>	<b>Optimalisace stanovení aktivity katalasy</b>	<b>71</b>
<b>9.2</b>	<b>Výsledky klinické studie</b>	<b>72</b>
<b>10</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>75</b>
<b>11</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>76</b>

<b>12</b>	<b>SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY</b>	<b>77</b>
<b>13</b>	<b>PŘÍLOHA</b>	<b>82</b>
<b>13.1</b>	<b>Tabulky souhrnných výsledků</b>	<b>82</b>
<b>13.2</b>	<b>Seznam tabulek</b>	<b>85</b>
<b>13.3</b>	<b>Seznam grafů</b>	<b>86</b>
<b>13.4</b>	<b>Seznam obrázků</b>	<b>87</b>

## 2 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ZKRATKA	VYSVĚTLENÍ
APACHE II	Acute Physiologic And Chronic Health Evaluation, skóre hodnotící zdravotní stav
apoA-I	apoprotein A-I
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome, syndrom akutní dechové tísně
AK	skupina ambulantních kontrol
CAT	katalasa
CD	konjugované dieny
CDC	Centres for Disease Control
CNS	centrální nervová soustava
CoQ	koenzym Q
CRP	C-reaktivní protein
GPX	glutathionperoxidasa
GR	glutathionreduktasa
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
Hb	hemoglobin
HDL	High Density Lipoprotein, lipoprotein o vysoké hustotě
IL-1	interleukin 1
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein, lipopolysacharid vázající protein
LDL	Low Density Lipoprotein, lipoprotein o nízké hustotě
LF	Lékařská fakulta
LOOH	lipidové hydroperoxydy
LPS	lipopolysacharid
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome, syndrom multiorgánové dysfunkce, mnohočetné orgánové selhání
NBT	Nitro Blue Tetrazolium salt, nitrotetrazoliová modř, 3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-difenylen)bis[2-(4-nitrofenyl)-5-fenyl-2H-tetrazolium] chlorid
NED	N-(1-naftyl)ethylendiamin
NOS	nitroxidsynthasa
NK	skupina neseptických kriticky nemocných pacientů
PCT	prokalcitonin
PON	paraoxonasa



<b>POOH</b>	proteinové hydroperoxydy
<b>PUFA</b>	polyunsaturated fatty acids, polynenasycené mastné kyseliny
<b>RBC</b>	Red Blood Cell, erythrocyt
<b>RNS</b>	Reactive Nitrogen Species, reaktivní formy dusíku
<b>RONS</b>	Reactive Oxygen and Nitrogen Species, reaktivní formy kyslíku a dusíku
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species, reaktivní formy kyslíku
<b>SAA</b>	sérový amyloid A
<b>SAPS</b>	the Simplified Acute Physiology Score, skórovací systém pro klinickou praxi
<b>SIRS</b>	Systematic Inflammatory Response Syndrome, syndrom systémové zánětlivé odpovědi
<b>SOD</b>	superoxiddismutasa
<b>SOFA</b>	sepsis-related Organ Failure Assesment, skóre hodnotící septický stav
<b>TBARS</b>	Thiobarbituric Acid Reactive Substances, látky reagující s thiobarbiturovou kyselinou
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor alpha, tumor nekrotisující faktor alfa
<b>VFN</b>	Všeobecná Fakultní Nemocnice
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoprotein, lipoprotein o velmi nízké hustotě
<b>VR</b>	volné radikály
<b>XOD</b>	xanthinoxidasa

### 3 SEZNAM POJMŮ

<b>acidosa</b>	snížení pH krve, vzestup kyselých látek v krvi
<b>alopurinol</b>	účinná látka např. léčiva Milurit, má antioxidační účinky - je inhibitorem xantinoxidasy;
<b>anoxie</b>	nedostatek kyslíku ve tkáních
<b>aterosklerosa</b>	forma kornatění tepen, vyznačující se tvorbou atheromatosních plátů
<b>diabetes mellitus</b>	diabetes, cukrovka; onemocnění způsobené poruchou regulace hladiny glykemie hormonem insulinem
<b>farmakologická dávka</b>	dávka doplňku výživy (např. vitamin C, E), která je vyšší než jeho doporučená denní dávka
<b>hyperglykemie</b>	zvýšená hladina cukru v krvi
<b>hypoperfuse</b>	snížené zásobování tkání nebo orgánů krví
<b>hypotense</b>	snížený krevní tlak (systolický tlak nižší než 90 mmHg)
<b>hypoxie</b>	snížení obsahu kyslíku ve tkáních
<b>infarse</b>	prostoupení tkáně (červenými krvinkami)
<b>ischemie</b>	místní nedokrevnost tkáně nebo orgánu při omezení přívodu okysličené krve
<b>katetr</b>	tenká hadička z inertního materiálu (polyethyleny, silikonový kaučuk aj.), která se zavádí do horní duté žíly (vena cava superior) při úplné parenterální výživě apod.)
<b>leukocytosa</b>	zvýšený počet leukocytů (nad $12 \times 10^9$ leukocytů/l)
<b>leukopenie</b>	snížený počet leukocytů (pod $4 \times 10^9$ leukocytů/l)
<b>meningitida</b>	zánět měkkých plen mozkových
<b>mortalita</b>	úmrtnost
<b>nekrosa</b>	odumření tkáně a celých částí těla
<b>oligurie</b>	chorobné snížení vylučování moči
<b>penetrace</b>	pronikání, průchod
<b>resuscitace</b>	soubor opatření k udržení životně důležitých funkcí při jejich náhlém selhání
<b>tachykardie</b>	zrychlená srdeční frekvence (nad 90 tepů/min)
<b>tachypnoe</b>	zrychlená dechová frekvence (nad 20 dechů/min)

## 4 ÚVOD

Při metabolických procesech v organismu vzniká řada reaktivních forem kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species, RONS), které hrají významnou roli v patogenesi celé řady chorobných stavů. Organismus je schopen využívat RONS ve svůj prospěch; například kyslíkové radikály leukocytů slouží k likvidaci patogenních organismů. Oxid dusnatý plní zase funkci zvláštního neurotransmiteru, vyvolává relaxaci hladké svaloviny sfinkterů, je nezbytný pro vasodilataci corpus cavernosum, a v cévním endotelu působí jako inhibitor agregace a adheze trombocytů.

Za normálních okolností je tvorba volných radikálů a jejich odstraňování v rovnováze. Pokud ovšem dojde k porušení této rovnováhy, vzniká oxidační stres, který se podílí na vzniku celé řady nežádoucích stavů a nemocí. Volné radikály přispívají významně ke vzniku aterosklerosy, ischemické choroby srdeční, šedého zákalu, diabetu mellitu, vzniku zánětů a septických stavů a podporují stárnutí organismu.

Sledování vzniku volných radikálů a jejich působení v organismu se proto stalo velmi aktuální problematikou moderní medicíny.

## 5 CÍL PRÁCE

- 1) Zdokonalit metodiku stanovení aktivity antioxidantního enzymu – katalasy (CAT) zavedené Magdalenou Hynkovou v letech 2003-2004 [40]
  
- 2) Zavést metodiky stanovení celkové koncentrace nitrotyrosinu v plasmě a celkové koncentrace nitritů a nitrátů v séru do klinické laboratoře IV. interní kliniky 1. Lékařské fakulty UK, kde se tato měření dosud neprováděla.
  
- 3) Provést měření aktivity katalasy, stanovení celkové koncentrace nitritů a nitrátů v séru a koncentrace nitrotyrosinu v plasmě osob zařazených do klinické studie, zaměřené na sledování antioxidantní ochrany organismu během sepse.

## 6 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 6.1 *Sepse*

Sepse se v posledních letech stala jednou z nejčastějších a nejvážnějších komplikací v traumatologii a chirurgii a její progresse do septického šoku či multiorgánového selhání je jednou z nejčastějších příčin úmrtí na nekoronárních jednotkách intenzivní péče [21; 82]. Z tohoto hlediska sepse v posledních letech předstihla i infarkt myokardu a její incidence se stále dramaticky zvyšuje [5].

Během let bylo v literatuře uváděno a používáno mnoho termínů a pojmů ve spojení se septickým stavem, kdy mnohé z nich vyjadřovaly totéž (sepse, bakteriemie, septikemie, septický syndrom). Proto v roce 1991 navrhla konsensuální konference lékařů intenzivní péče a plicních specialistů v Chicagu [13] nové definice a novou koncepci pro různá stadia rozvoje sepse. Tyto definice jsou i přes mnohé kritické diskuse zatím všeobecně přijímány.

#### **6.1.1 *Syndrom systémové zánětlivé odpovědi***

Syndrom systémové zánětlivé odpovědi (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) je uniformní odpovědí organismu na různé podněty [13]. Tyto podněty mohou mít zevní či vnitřní původ. Mezi zevní podněty řadíme faktory fyzikální (tepelné, radiační, mechanické), chemické (toxiny organického i anorganického původu) a biologické (bakterie, viry, houby, plísňe). Vnitřními podněty mohou být např. thrombosis, ischemické a hemoragické infarkty, tkáňové nekrosy apod. [82].

Termín SIRS je v užším významu používán pro takové zánětlivé odpovědi organismu, jejichž příčinou není infekce [82]. Je-li infekce v organismu prokazatelná, nejedná se již o SIRS, ale o některé stadium sepse.

#### **6.1.2 *Sepse***

Sepse je definována jako specifický typ SIRS, při kterém je prokázána invaze patogenních mikroorganismů v normálně sterilní tkáni, tekutině či dutině hostitele [13; 82]. K diagnostice jak SIRS tak sepse slouží následující kritéria [13]:

- a) teplota nad 38°C nebo pod 36°C
- b) srdeční frekvence nad 90 tepů za minutu
- c) tachypnoe s frekvencí nad 20 za minutu, nebo s  $p_i(\text{CO}_2) < 4,3 \text{ kPa}$
- d) leukocytosa  $> 12 \cdot 10^9/\text{l}$  nebo  $< 4 \cdot 10^9/\text{l}$

K tomu, abychom mohli hovořit o SIRS či sepsi, musí být splněny nejméně dvě z výše uvedených kritérií.

### **6.1.3 Těžká sepse**

Jedná se o sepsi s orgánovou dysfunkcí a známkami hypoperfúze nebo sekundární hypotense (systolický krevní tlak pod 90mm Hg). Hypoperfúze je charakterisována plicní dysfunkcí, poklesem trombocytů pod  $100 \cdot 10^9/\text{l}$ , oligurií ( $\leq 0,5 \text{ ml/kg/h}$ , po dobu minimálně 2 hodin) a acidosou ( $\text{pH} \leq 7,3$ ) [13]. Progresí těžké sepse vzniká septický šok.

#### **6.1.3.1 Septický šok**

Septický šok je definován jako stav s těžkou hypotensí, hypoperfusí a orgánovou dysfunkcí i přes adekvátní resuscitaci infusní terapií.

### **6.1.4 Syndrom multiorgánové dysfunkce**

Ke vzniku syndromu multiorgánové dysfunkce (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) může dojít rozvojem těžké sepse, kdy dochází ke špatné funkčnosti až selhávání orgánů (ledvin, jater). Jeho extrémní formou je syndrom multiorgánového selhání (multiple organ failure, MOF) [13; 82].

### **6.1.5 Skórovací systémy používané v intenzivní péči**

Pro hodnocení septických pacientů a pacientů po chirurgickém výkonu byly vyvinuty desítky klasifikačních systémů. Tyto systémy si všímají dynamicky se měnících ukazatelů funkcí jednotlivých orgánových systémů a mohou sloužit jako prognostické modely.

Mezi nejužívanější klasifikační systémy můžeme zařadit APACHE II skóre (the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation System II) [36], SAPS II skóre (the Simplified Acute Physiology Score II) [50], MODS skóre (Multiple Organ Dysfunction Score) [54] a SOFA skóre (Sepsis-Related Organ Failure Assessment) [86].

### **6.1.5.1 Skóre APACHE II**

Skórovací systém hodnotící 12 fyzikálně, biochemicky a hematologicky vyšetřovaných parametrů (teplota, krevní tlak, tepová a dechová frekvence, parciální tlak kyslíku, pH, koncentrace Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, kreatininu, leukocytů; hematokrit a Glasgow coma score), dále pak zohledňuje věk a závažné choroby v anamnéze [36; 46]. Pro lékařskou veřejnost je volně dostupný na internetu na stránce:

<http://www.sfar.org/scores2/apache22.html>

### **6.1.6 Diagnostika sepse**

Ke stanovení diagnózy sepse se využívají různé klinické a laboratorní markery infekce, s větší či menší specifitou pro septický stav [82]. K běžně využívaným klasickým metodám patří:

- 1) tělesná teplota (u sepse je očekávána horečka,  $t > 38^{\circ}\text{C}$ )
- 2) tepová frekvence (velmi nespecifický faktor, jelikož tachykardie doprovází celou řadu různých onemocnění)
- 3) množství leukocytů
- 4) koncentrace C-reaktivního proteinu (CRP) v séru (nejčastěji využívaný marker k posouzení přítomnosti a závažnosti zánětlivé odpovědi organismu)
- 5) koncentrace prokalcitoninu (PCT) - velmi specifický parametr pro sepsi, jeho koncentrace během sepse roste až na tisícinásobnou hodnotu
- 6) koncentrace prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8 (malá specifita pro sepsi, spíše využití v predikci mortality)
- 7) hladina antithrombinu III

### **6.1.7 C-reaktivní protein**

C-reaktivní protein byl objeven v roce 1930 v laboratoři Oswalda Averyho, při studii sledující pacienty trpící streptokokovou infekcí. Séra těchto pacientů obsahovala protein, který byl schopen reagovat s C polysacharidem z buněčné stěny streptokoků (jednalo se o streptococcus pneumoniae), tato vlastnost přinesla proteinu jeho dnešní název C-reaktivní protein [12; 57]. O čtyřicet let později Volanakis a Kaplan identifikovali specifický ligand potřebný pro navázání CRP na C polysacharid streptokoka, tímto ligandem byl fosfocholin [88]. Fosfocholin byl

prvním objeveným ligandem pro CRP, ne však posledním, od té doby bylo již objeveno mnoho dalších látek, které mohou být ligandy pro CRP.

#### **6.1.7.1 Vlastnosti CRP**

C-reaktivní protein se řadí mezi proteiny akutní fáze zánětu, jeho koncentrace v plasmě rychle a významně vzrůstá při prvních příznacích akutního zánětu. Hodnoty v plasmě během akutního zánětu mohou dosáhnout až tisícinásobku normálních fyziologických hodnot [57].

Synthesa CRP probíhá převážně v jaterních hepatocytech, dále byla prokázána v neuronech, monocytech, lymfocytech a v atherosklerotickém plaku.

Svým navázáním na Fc receptor fagocytujících buněk (neutrofilů, monocytů a NK-buněk) ovlivňuje CRP jejich fagocytární aktivitu a chemotaxi. Je zapojen do indukce apoptosy vyvolané NK buňkami. Podílí se na eliminaci exogenních i endogenních patologických struktur a následně aktivuje kaskádu komplementu [55].

C-reaktivní protein má schopnost vázat se na fosfatidylcholin bakteriální stěny a buněčné membrány vyšších organismů; váže se i na nekrotické či poškozené buňky a může se vázat na chromatin, histony a malé částice jaderných nukleoproteinů.

C-reaktivní protein vykazuje přímou antioxidační aktivitu, ale u chronického zánětu má nepříznivé účinky. Dlouhodobě zvýšené hladiny CRP můžeme považovat za risikový faktor rozvoje atherosklerosy a ischemické choroby srdeční.

#### **6.1.7.2 Struktura CRP**

C-reaktivní protein se skládá z pěti strukturálně identických globulárních podjednotek o hmotnosti 25 kDa, které jsou navzájem vázány nekovalentními vazbami do podoby jednoduchého disku s pentagonálním cyklickým tvarem {(obrázek 6-1 (str. 10))} [17]. Každá podjednotka proteinu je složena ze dvou antiparalelních  $\beta$  skládaných listů a váže na sebe dva atomy  $\text{Ca}^{2+}$  [12; 57]. Díky své struktuře se řadí do skupiny proteinů, jenž jsou nazývány pentraxiny.

Každá podjednotka CRP obsahuje důležité tzv. rozpoznávající vazebné místo pro navázání fosfocholinu. Předpokládá se, že pro navázání fosfocholinu na CRP jsou nejdůležitější aminokyselinové zbytky: Phe-66 a Glu-81, kde Phe-66 hydrofobními interakcemi váže methylové skupiny fosfocholinu, zatímco Glu-81 interaguje s pozitivně nabitým dusíkem fosfocholinu [11].

Molekula CRP obsahuje dále tzv. efektorové místo, které slouží k navázání komplementu C1q. Je dokázáno, že v navázání CRP ke komplementu C1q hraje



klíčovou roli štěrbina táhnoucí se ze středu podjednotky do středu pentameru a mnohé aminokyselinové zbytky podél této štěrbiny zejména Asp-112 a Tyr 175 .



**Obrázek 6-1: Krystalová struktura CRP v komplexu s fosfocholinem**  
(Ca<sup>2+</sup> ... žluté; fosfocholin ... zelený)

#### **1.1.1.1 Genová exprese CRP a její regulace**

Gen pro CRP se u člověka nalézá na 1. chromosomu v regionu q2.1 a je tvořen dvěma exony a jedním intronem o délce 278 bp.

Regulace synthesy CRP hepatocyty probíhá především na úrovni transkripce a to prostřednictvím cytokinu IL-6, dále IL-1 a TNF- $\alpha$ , které aktivují transkripční faktory rodiny C/EBP (C/EBP $\beta$  a C/EBP $\delta$ ), v menší míře se pak na regulaci podílejí transkripční faktory STAT3 a Rel proteiny. Synthesu CRP mohou ovlivnit kromě cytokinů dále ještě hormony, konkrétně glukokortikoidy .

#### **1.1.1.2 Význam v diagnostice**

Stanovení hladin CRP slouží k detekci a monitorování závažných zánětových stavů . Koncentrace CRP po zánětovém stimulu vzroste až na tisícinásobek hodnoty fyziologické. Odpověď na zánětový stimul je rychlá a biologický poločas CRP

naopak krátký, výpovědní hodnota stanovení hladiny CRP je vyšší než měření sedimentace erythrocytů.

Vzestup koncentrace CRP je největší u bakteriálních infekcí způsobených Gram negativními bakteriemi, následují infekce způsobené Gram pozitivními bakteriemi. Vzestup koncentrace při infekcích virových, mykobakteriálních a parazitárních je až 10x menší.

Hladina CRP je dále zvýšena při infarktu myokardu, revmatických onemocnění a u pooperačních stavů [31].

S věkem, dochází k mírnému vzestupu hladiny CRP, kojenci syntetisují menší množství CRP a tak je u kojenců zvýšená hladina CRP využívána v diferenciální diagnostice meningitidy [57].

#### **6.1.7.5 Význam CRP v patogenezi**

CRP se účastní v patogenezi atherosklerosy, jeho koncentrace je zvýšena u subklinické a manifestní atherosklerosy. Přímou účastní v procesu cévních změn při atherosklerose [57; 93], v atheromových lesích byla nalezena deposita CRP.

Zvýšené hladiny CRP můžeme považovat za risikový faktor rozvoje atherosklerosy a ischemické choroby srdeční.

Při dlouhodobé koncentraci nad 50 mg/l (hladina CRP při chronickém či mírně akutním zánětu) je CRP neurotoxický. Nervové buňky aktivně vychytávají CRP a tak se aktivně podílí v patogenezi Alzheimerovy nemoci. Byl objeven v depositech amyloidu v mozkových lesích [20].

## **6.2 Reaktivní formy kyslíku a dusíku a volné radikály**

Reaktivní formy můžeme dělit podle zdroje, ze kterého vznikají, na reaktivní formy kyslíku ROS (Reactive Oxygen Species) a reaktivní formy dusíku RNS (Reactive Nitrogen Species) [80], nejdůležitější z nich představuje tabulka 6-1 (str. 12) [80].

Reaktivní formou může být volný radikál, tedy látka s nepárovým elektronem, nebo to může být látka, jenž má všechny elektrony v orbitalech spárované. Volné radikály mohou být neutrální částice či ionty [80]. Volné radikály vznikají trojím způsobem: homolytickým štěpením a oxidací či redukcí molekul; v organismu jsou využívány pouze energeticky méně náročné reakce, oxidace a redukce.

Tabulka 6-1: Reaktivní formy kyslíku a dusíku

<b>REAKTIVNÍ FORMY KYSLÍKU</b>	
<b>VOLNÉ RADIKÁLY</b>	<b>LÁTKY, KTERÉ NEJSOU VOLNÝMI RADIKÁLY</b>
Superoxid ( $O_2^\circ$ )	Peroxid vodíku ( $H_2O_2$ )
Hydroxylový radikál ( $HO^\circ$ )	Kyselina chlorná ( $HClO$ )
Peroxy (ROO $^\circ$ )	Ozon ( $O_3$ )
Alkoxy (RO $^\circ$ )	Singletový kyslík ( $^1O_2$ )
Hydroperoxy (HO $_2^\circ$ )	
<b>REAKTIVNÍ FORMY DUSÍKU</b>	
<b>VOLNÉ RADIKÁLY</b>	<b>LÁTKY, KTERÉ NEJSOU VOLNÝMI RADIKÁLY</b>
Oxid dusnatý (NO $^\circ$ )	Nitrosyl (NO $^+$ )
Oxid dusičitý (NO $_2^\circ$ )	Nitroxid (NO)
	Kyselina dusitá (HNO $_2$ )
	Dimer oxidu dusičitého (N $_2O_4$ )
	Oxid dusitý (N $_2O_3$ )
	Nitronium (NO $_2^+$ )
	Peroxyinitrit (ONOO)
	Alkylperoxyinitrit (ROONO)

### **6.2.1 Příčiny vzniku volných radikálů**

Příčiny vzniku volných radikálů můžeme rozdělit na exogenní a endogenní. Mezi exogenní příčiny řadíme např. ionizační záření, UV záření,  $\gamma$  paprsky, X-paprsky, mikrovlny, xenobiotika, polychlorované bifenoly, kouření, či stres. Mezi endogenní příčiny vzniku volných radikálů pak řadíme např. záněty,

popáleniny, infekce, rozpad fagocytů a makrofágů, hyperglykémii, reperfusi po předchozí ischemii, zvýšený metabolismus estrogenů, vznik methemoglobinu, či oxidaci chinonů [69].

### **6.2.2 Nemoci způsobené volnými radikály**

Volné radikály a jejich metabolity působí řadu poruch v organismu, dokonce se nyní hovoří o tzv. nemocech z volných radikálů. Volné radikály vznikají ve zvýšené míře jako reakce na zevní či vnitřní podnět a jedná se tedy o sekundární reakci. Volné radikály nemají vliv na tvorbu chemotaktických faktorů, ale jsou kritickou součástí funkce imunitního systému [68].

Mezi nejdůležitější stavy a choroby, jichž se účastní volné radikály, můžeme zařadit:

1) *Zánět* ( Z poškozené tkáně se uvolňují cytokiny a vytvářejí se volné radikály, které jednak zabíjejí organismy napadající tkáň, ale na druhé straně mohou poškození tkáně ještě zhoršit. Zánět je regulován histaminem, bradykininem a metabolity kyseliny arachidonové.) [42]

2) *Nádorová onemocnění* (T-lymfocyty ničí nádorové buňky pomocí volných radikálů a též řada léčebných postupů zahrnuje destrukci nádorové tkáně pomocí volných radikálů; na druhou stranu jsou volné radikály často hlavní příčinou vzniku karcinomů, slouží jako tzv. sekundární tumorové promotory. Tyto promotory zvyšují aktivitu xanthinoxidasy, NADPHoxidasy, uvolňují cytokiny a aktivují kinasy, tím nastává genová aktivace, dochází k indukci onkogenů a následné tvorbě nádorů.) [37]

3) *Diabetes mellitus* (U diabetiků bývá aktivita superoxiddismutasy zvýšená, ale aktivita glutathionperoxidasy snižena, což vede k nadměrné produkci peroxidu vodíku, ten poškozuje  $\beta$ -buňky pankreatu a tím přispívá ke vzniku či zhoršování nemoci; hyperglykemie působí oxidační stres a tím i další zatížení pacienta volnými radikály.) [68]

#### **4) Onemocnění srdce a cév**

a) *infarkt myokardu* (Při infarktu myokardu po počáteční hypoxii až anoxii nastává reperfuse a s ní spojená tvorba velkého množství volných radikálů, jež mohou způsobit i poruchy srdečního rytmu, škodlivě zde působí singletový kyslík.) [48]

*b) atherosklerosa (Oxidace vícenenasycených mastných kyselin a apolipoproteinu B usnadňuje fagocytosu LDL tkáňovými makrofágy a monocyty, fagocyty poté adherují k endothelu cév, penetrují do subendothelových prostor a vytvářejí pěnové buňky a tukové proužky na cévní stěně; to má za následek příliv dalších volných radikálů a proteolytických enzymů, což vede k poškození cévní stěny a vzniku atherosklerotického plátu.) [68]*

5) *Onemocnění centrální nervové soustavy (CNS má malou antioxidační kapacitu, ale velké množství lipidové tkáně a proto patří mezi nejohroženější tkáně z hlediska volných radikálů. Hlavním antioxidantem v mozku je kyselina askorbová a superoxidodismutasa.)*

a) *Parkinsonova choroba (Je charakterisována abnormálním metabolismem Fe a zvýšenou lipoperoxidací v mozku, dochází ke smrti buněk mozkového kmene.)*

b) *Alzheimerova choroba (Vzniká velké množství volných radikálů v neuronální tkáni, dochází k oxidačnímu poškození chromosomů v mozku a zvýšené lipoperoxidaci.)*

### **6.2.3 Volné radikály a sepse**

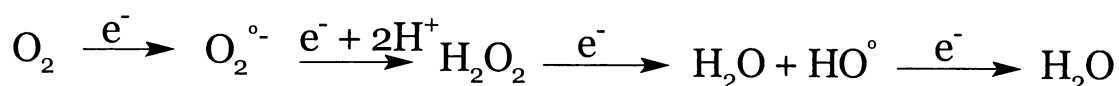
Podobně jako u ostatních patologických stavů hraje nerovnováha mezi tvorbou RONS a kapacitou antioxidačního systému roli také v patogenezi sepse a septického šoku [38].

Hlavním zdrojem RONS jsou při sepsi aktivované fagocyty (neutrofilní leukocyty, makrofágy) [8; 79]. Při infekci dochází ke zmnožení fagocytů, které produkují RONS. K produkci RONS ve fagocytech přispívají jednak enzymové systémy fagocytů, a dále pak volné železo, které je schopné katalyzovat Fentonovu reakci [25; 26]. Mezi enzymové systémy fagocytů patří především membránový enzymový komplex NADPHoxidasa [19], myeloperoxidasa [4] a inducibilní syntasa oxidu dusnatého (iNOS) [84].

Vznikající RONS působí oxidační poškození buněk, inaktivují katecholaminy [51] a stimulují transkripci genů prozánětlivých cytokinů (TNF $\alpha$ , IL-1 aj.). Účinek volných radikálů je zvyšován vysokou teplotou a nízkým pH [38].

## 6.2.4 Reaktivní formy kyslíku

Molekula atmosferického kyslíku (tripletového) je v organismu v aktivním centru cytochromoxidasy v dýchacím řetězci mitochondrií postupně redukována ve čtyřelektronové redukci, jak ukazuje obrázek 6-2 (str. 15) [80].



Obrázek 6-2: Postupná redukce kyslíku

Meziprodukty této redukce jsou reaktivní formy a volné radikály kyslíku, které ve vazbě s enzymem nejsou škodlivé. Jako volné částice jsou velmi jedovaté, neboť ve tkáni okamžitě reagují s jakoukoliv sousední molekulou a aktivují ji.

### 6.2.4.1 Superoxid

Superoxid má oxidačně-redukční vlastnosti a v organismech podléhá dismutaci za vzniku kyslíku a peroxidu vodíku, tato reakce je katalysována superoxidodismutasou.

### 6.2.4.2 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku není volným radikálem, ale řadíme ho mezi reaktivní formy kyslíku, neboť se účastní vzniku radikálů. Sám o sobě reaguje peroxid vodíku s biomolekulami velmi pomalu. Peroxid vodíku se redukuje za katalýzy  $\text{Fe}^{2+}$  či  $\text{Cu}^+$  na mnohem reaktivnější a nebezpečnější hydroxylový radikál. Železem katalysovaná redukce peroxidu vodíku je známa jako tzv. Fentonova reakce [25; 26].

Peroxid vodíku je odstraňován prostřednictvím katalasy, kterou je rozkládán na kyslík a vodu.

### 6.2.4.3 Kyselina chlorná

Kyselina chlorná je syntetisována v neutrofilních granulocytech prostřednictvím myeloperoxidasy, a to z peroxidu vodíku a chloridového aniontu, jak naznačuje následující reakce:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HClO} + \text{H}_2\text{O}$ . Kyselina chlorná

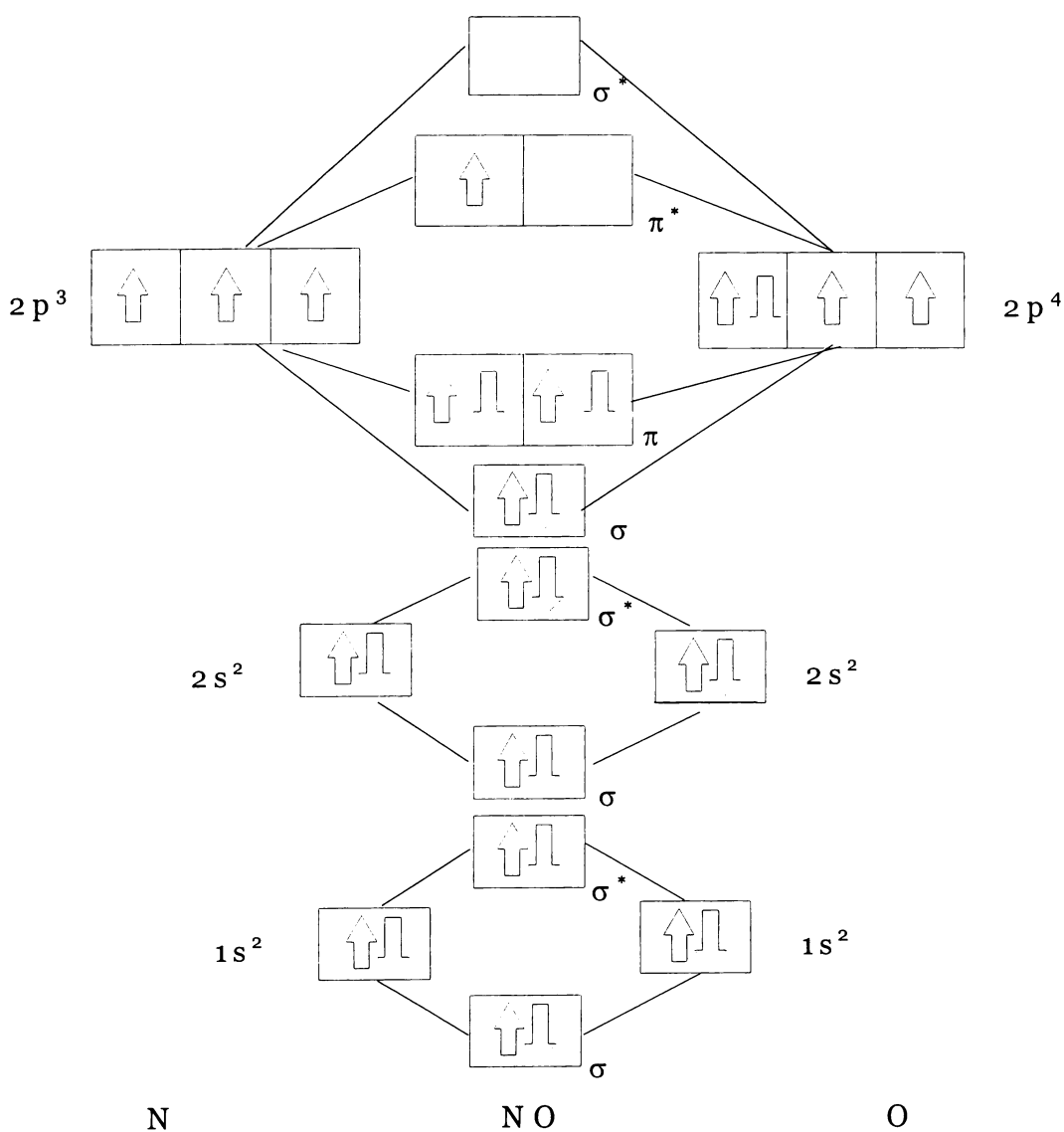
je silný oxidant a neutrofilními granulocyty je využívána jako baktericidní prostředek [80].

## 6.2.5 Reaktivní formy dusíku

### 6.2.5.1 Oxid dusnatý a produkty jeho metabolismu

#### 6.2.5.1.1 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý je nejmenší synthetický produkt savčí buňky [10], jehož produkce byla poprvé prokázána v roce 1985 [81]. Je to molekula s velmi krátkým poločasem života, což je dáno přítomností volného nespárovaného elektronu, jak ukazuje obrázek 6-3 (str. 16).



Obrázek 6-3: Rozložení elektronů v molekulových orbitalech pro oxid dusnatý

Poločas života oxidu dusnatého se pohybuje v řádu několika sekund [10]. Jediným prekursorem oxidu dusnatého je aminokyselina L-arginin, ze které je syntetisován prostřednictvím nitroxidsynthas [10; 67].

#### 6.2.5.1.2 Nitroxidsynthasy

Nitroxidsynthasa (L-arginin, NADPH: O<sub>2</sub> – oxidoreduktasa, EC 1.14.13.39) je dimerický enzym obsahující dvě identické podjednotky o molekulové hmotnosti 130 000 až 150 000, vážící čtyři prosthetické skupiny: flavinadenindinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN), tetrahydrobiopterin a hem. Každá podjednotka má dvě domény - reduktasovou a oxygenasovou obsahující hem [22; 70].

V dnešní době rozlišujeme tři isoformy nitroxidsynthas (NOS). Jedná se o dvě isoformy konstitutivní, Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin závislé nitroxidsynthasy (cNOS), a jednu isoformu indukibilní, Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin nezávislou nitroxidsynthasu (iNOS) [10; 67].

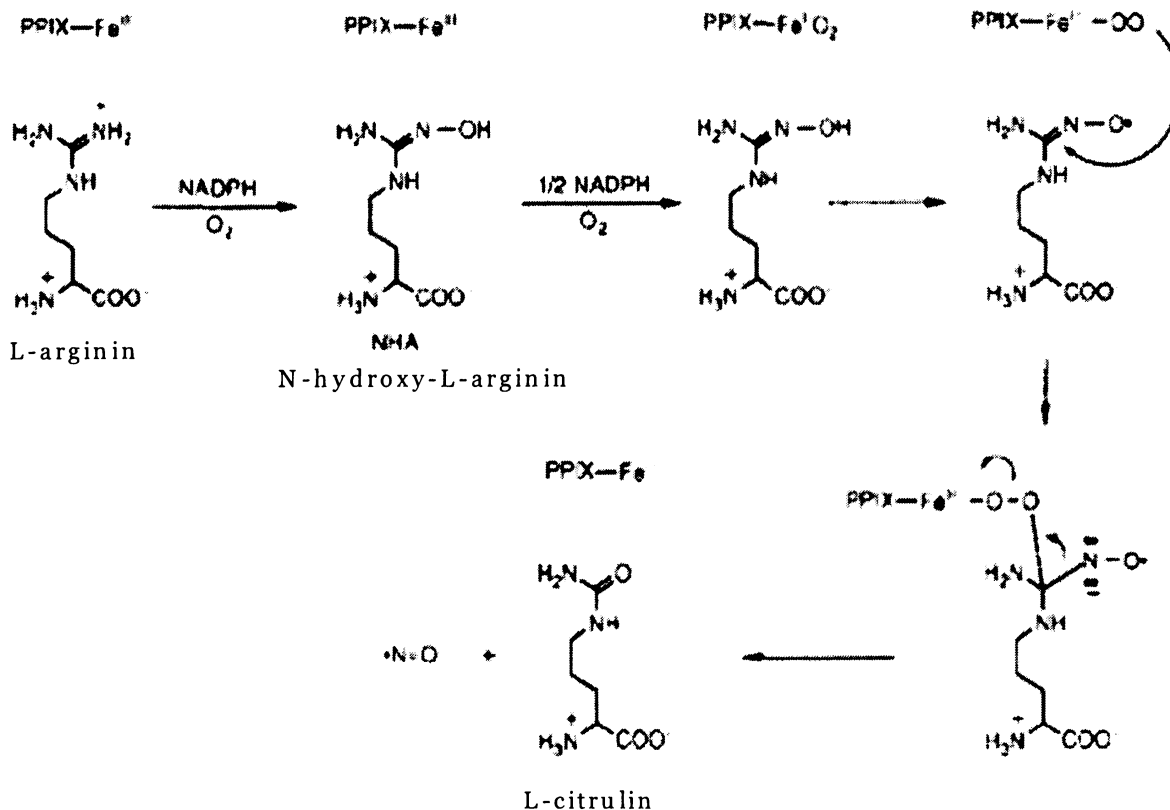
Konstitutivní nitroxidsynthasa se vyskytuje v endotelu, nadledvinkách, mozku, trombocytech, polymorfonukleárních leukocytech, fibroblastech, retině a v některých nervových zakončeních [22; 70]. Tvorba cNOS je řízena dvěma geny, které jsou umístěny na 7. a 12. chromosomu, podle toho rozlišujeme dva typy cNOS: endotelovou a neuronální. Tento enzym zajišťuje trvalou syntézu nezbytného minimálního množství NO.

Tvorba iNOS je řízena genem lokalizovaným na 17. chromosomu a její syntéza je stimulována některými cytokiny (TNF- $\alpha$ , interferon  $\gamma$  a IL-1) a lipopolysacharidem endotoxinem, syntézu inhibují IL-4 a IL-10. Syntéza iNOS probíhá především v monocytech, neutrofilních granulocytech a hepatocytech [78]. Po úplné indukci je její aktivita v buňkách až o několik řádů vyšší než aktivita cNOS [70].

Všechny tři isoformy NOS vyžadují při syntéze oxidu dusnatého jako kosubstráty NADPH+H<sup>+</sup> a O<sub>2</sub>. Prvním krokem syntézy oxidu dusnatého z L-argininu je hydroxylace L-argininu na jednom z jeho koncových guanidinových dusíků {obrázek 6-4 (str. 18)} [53]. Poté následuje tříelektronová oxidace tohoto intermediátu za uvolnění NO a citrulinu [70].

Nitroxidsynthasa je schopna redukovat kyslík i za nepřítomnosti svého hlavního substrátu, L-argininu; v takovémto případě je výsledkem jejího katalytického působení superoxid [64] nebo peroxid vodíku [34].





**Obrázek 6-4: Předpokládaný mechanismus syntesy NO z L-argininu**

### 6.2.5.1.3 Funkce a účinky oxidu dusnatého v organismu

Synthesa nezbytného množství oxidu dusnatého probíhá v organismu prostřednictvím cNOS, syntetisovaný NO má jednak úlohu signální molekuly a dále pak zajišťuje basální vasodilataci [67; 78].

NO slouží jako signální molekula jak centrální tak periferní nervové soustavy. V CNS působí v presynaptické štěrbině, kde stimuluje guanylátcyklasu, která vytváří z GTP cGMP a vzestup hladiny cGMP pak ovlivňuje syntesu dalších neurotransmiterů, jako například noradrenalinu či glutamátu. U periferní nervové soustavy slouží NO jako neurotransmiter v oblasti GIT, urogenitálního a vaskulárního systému. V GIT způsobuje relaxaci intestinální hladké svaloviny, čímž výrazně ovlivňuje funkci sfinkterů GIT. Dále působí jako signální molekula v nervových zakončeních, které inervují corpus cavernosum; a byl prokázán jeho stimulující účinek na erekci, nedostatek NO může vést až k impotenci [10].

Pomocí vasodilatačních stimulů (bradykinin, acetylcholin) je NO uvolňován z endoteliálních buněk, dále difunduje do buněk hladkého svalstva cév, kde aktivuje guanylátcyklasu, což má za následek relaxaci hladké svaloviny [67]. NO produkovaný v endotelu také zabraňuje shlukování a srážení krevních destiček, srážení neutrofilů a přilnutí těchto částic k endotelu [10].

Během zánětu dochází ke stimulaci iNOS, což vede k mnohonásobně zvýšené produkci NO, ten jako volný radikál se účastní zabíjení patogenů v makrofázích a neutrofilech. Je prokázána jeho schopnost zabíjet nádorové buňky a indukovat apoptosu [67].

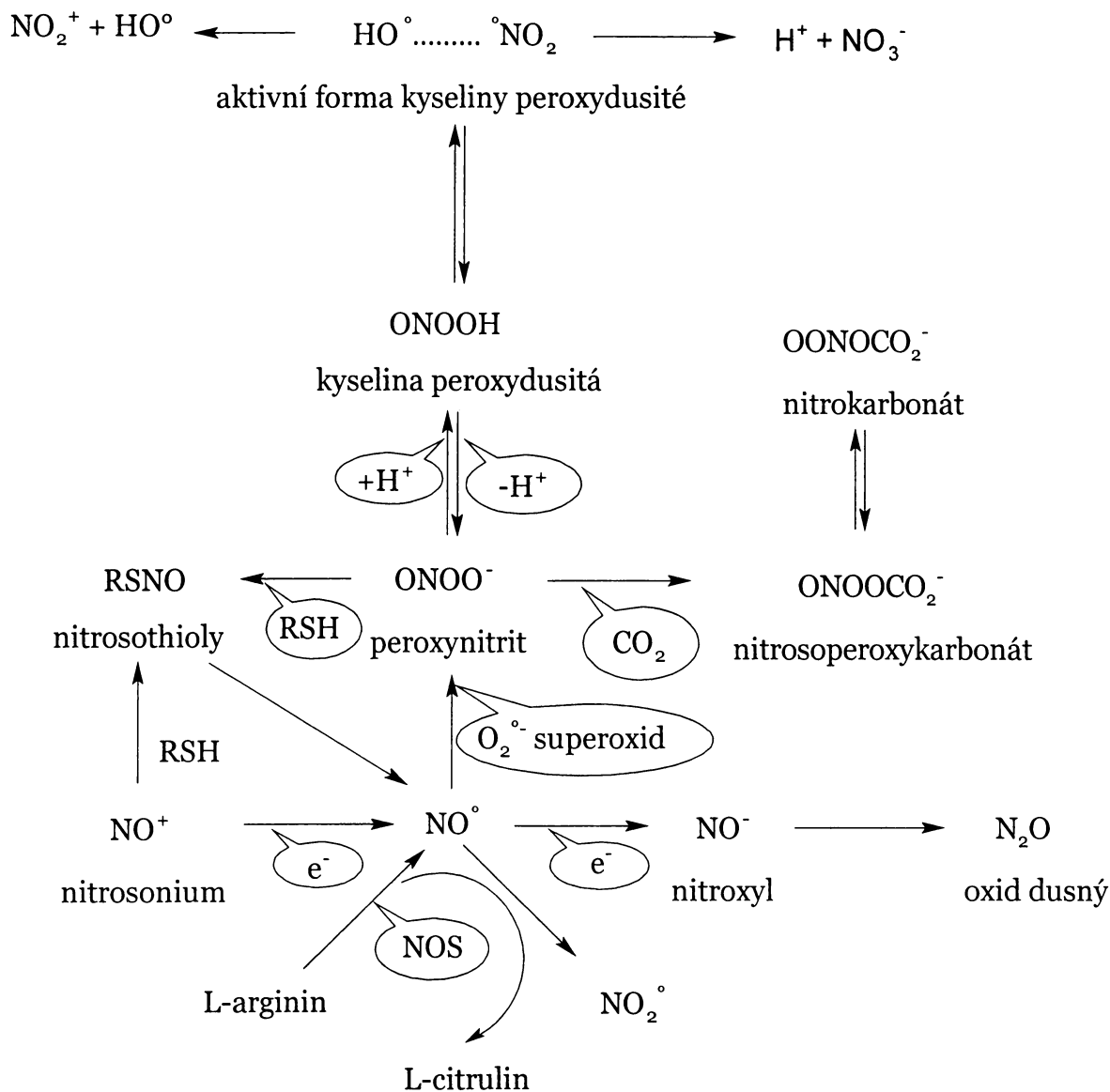
Oxid dusnatý může mít také negativní účinky na organismus. Poškozuje enzymy obsahující Fe, čímž přímo zasahuje do činnosti enzymů zodpovědných za energetický metabolismus buňky (transportní řetězec v mitochondriích a snížená tvorba ATP). Vytváří komplex s katalasou a tím ji inaktivuje; inaktivace katalasy má za následek hromadění peroxidu vodíku. Oxid dusnatý také snižuje sekreci insulínu a spolu s volnými kyslíkovými radikály destruuje  $\beta$ -buňky pankreatu. Reakcí se superoxidem vytváří velmi reaktivní peroxynitrit, který poškozuje tkáň a působí vaskulární dysfunkci [67].

#### 6.2.5.1.4 *Metabolismus oxidu dusnatého*

Jak již bylo uvedeno výše, jediným zdrojem pro syntézu oxidu dusnatého v organismu je L-arginin, z něž je NO syntetizován prostřednictvím NOS. Molekula NO je v přítomnosti kyslíku odbourávána na dusitany a dusičnany, které jsou pak vylučovány z těla močí [67]. Volná molekula NO je v organismu velmi rychle inaktivována. K této inaktivaci dochází reakcí NO s hemoglobinem za vzniku methemoglobinu, či reakcí s glutathionem či albuminem, kdy se vytvářejí nitrosothioly [10; 80]. Ve formě nitrosothiolů může volně cirkulovat a procházet membránou a následně být opět uvolněn ve formě NO [10].

Za patologických podmínek může ovšem metabolismus NO probíhat i jinak. Možné osudy NO v organismu ukazuje obrázek 6-5 (str. 20) [80]. Při zvýšeném oxidačním stresu reaguje NO s kyslíkovými radikály. Při reakci se superoxidem vytváří molekulu velmi reaktivního peroxynitritu, což je silný oxidant jež oxiduje například proteinové thioly či lipidy [10; 67].

Peroxynitrit je odpovědný za hydroxylaci a nitraci tyrosinu. V přítomnosti protonů reaguje peroxynitrit dále za vzniku velmi nebezpečných hydroxylových radikálů.



**Obrázek 6-5: Metabolismus oxidu dusnatého**

#### 6.2.5.1.5 Oxid dusnatý a možnosti jeho stanovení

Stanovit množství NO v biologickém materiálu přímo je velmi obtížné, vzhledem ke krátkému poločasu života této molekuly. Přímé stanovení NO se provádí pomocí EPR [6] či amperometrie [15]. Většina stanovení NO je nepřímá a založená

na stanovování konečných, stabilních produktů metabolismu NO. Mezi nejpoužívanější řadíme stanovení celkové koncentrace nitritů a nitrátů. K tomuto účelu se nejčastěji využívá tzv. Griessova reakce, založená na tvorbě barevného azoproduktu, který je stanovován spektrofotometricky při 540 nm. Vlastní Griessově reakci předchází redukce nitrátů na nitrity, která je prováděna buď prostřednictvím nitrátoreduktasy [18; 30; 60], či slitiny mědi a kadmia [76]. Jinou možností stanovení nitritů a nitrátů je chemiluminiscence [90].

Dalším konečným a stabilním produktem NO v organismu, který se využívá pro stanovení, je nitrotyrosin. Ke stanovení nitrotyrosinu je používána plynová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí [24; 77] či ELISA [16].

### **6.3 Antioxidační systém**

Antioxidanty jsou látky kontrolující redoxní rovnováhu v biologických systémech a představují různorodou skupinu látek z hlediska funkce a struktury. Zabraňují totiž, i ve velmi malých koncentracích, oxidaci nestabilních substrátů.

Antioxidační ochrana probíhá na třech úrovních [32]:

- a) primární ochrana, která spočívá v zabránění tvorby RONS (např. vazba železitých iontů do molekul transferinu a laktoferinu v extracelulárních tekutinách)
- b) sekundární ochrana spojená s neutralisací již vzniklých RONS {např. superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT), glutathionperoxidasa (GPX), vitaminy E a C, glutathion (GSH)}
- c) terciální ochrana, která se týká opravy oxidačního poškození biomolekul, je důležitá např. pro zachování integrity DNA a biomembrán.

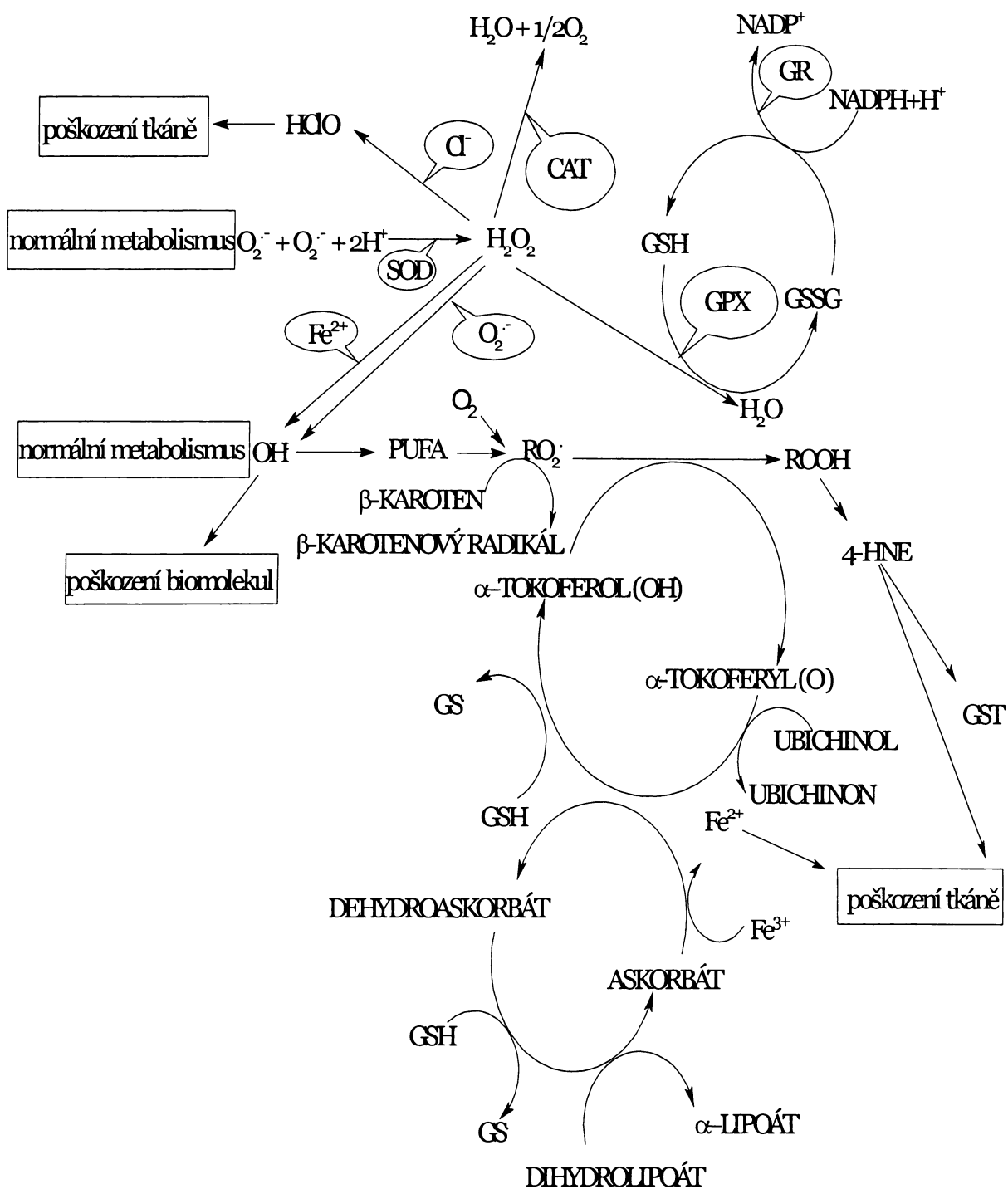
Antioxidanty můžeme rozdělit podle různých hledisek: a) podle místa působení na extracelulární, membránové a intracelulární b) podle charakteru antioxidantů na enzymové a neenzymové [80]. Celkový přehled antioxidantů ukazuje tabulka 6-2 (str. 22).

Ochrana organismu proti oxidačnímu poškození je umožněna kooperací jednotlivých skupin antioxidantů. Funkce jednoho antioxidantu často podmiňuje účinek jiného článku antioxidantní ochrany [80], což velmi dobře ilustruje obrázek 6-6 (str. 23).

Tabulka 6-2: Přehled antioxidantů na základě jejich charakteru a lokalisace

<b>LOKALISACE</b>		
<b>INTRACELULÁRNÍ ANTIOXIDANTY</b>	<b>BUNĚČNÁ MEMBRÁNA</b>	<b>EXTRACELULÁRNÍ ANTIOXIDANTY</b>
<b>ENZYMOVÉ SLOŽKY</b>		
superoxiddismutasa	fosfolipasy	paraoxonasa
katalasa		
glutathionperoxidasa		
peroxidasa		
DT-diaforasa		
proteolytické enzymy		
<b>NEENZYMOVÉ SLOŽKY</b>		
glutathion	vitamin E	transferrin
kyselina askorbová	β-karoten	laktoferrin
vazebné proteiny kovů		ceruloplasmin
opravné systémy DNA		albumin
		haptoglobiny
		hemopexin
		vitamin E
		kyselina askorbová
kyselina močová		
	bilirubin	

Převzato [40] a upraveno dle Gutteridge a Mitchell [33].



**Obrázek 6-6: Funkční vztahy mezi antioxidanty**

Obrázek převzat z literatury [80]

CAT...katalasa, GPX...glutathionperoxidasa, GR... glutathionreduktasa, GSH... redukovaný glutathion, GSSG... oxidovaný glutathion, SOD ... superoxididismutasa, GST... glutathiontransferasa, PUFA... polynenasycené mastné kyseliny, 4-HNE ... 4-hydroxy-2,3-trans-nonenal

### **6.3.1 Katalasa**

Katalasa (  $\text{H}_2\text{O}_2$  :  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidoreduktasa, EC 1.11.1.6) je enzym katalysující rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Tento enzym se nachází téměř ve všech aerobních buňkách a je zodpovědný za jejich ochranu před toxickým účinkem peroxidu vodíku [66].

#### **6.3.1.1 Charakterisace katalasy**

Katalasa je protein tvořený ze čtyř identických podjednotek o molekulové hmotnosti přibližně 65 kDa, kde každá podjednotka ve svém katalytickém centru obsahuje protoporfyrinovou skupinu s  $\text{Fe}^{3+}$ . Dále každá podjednotka pevně váže jednu molekulu NADPH, která se sice neúčastní v katalytickém procesu, ale chrání katalasu proti inaktivaci prostřednictvím peroxidu vodíku. Katalasa je hlavním reservoárem vázaného NADPH v erythrocytech [45].

Nejvyšší koncentrace katalasy u savců jsou v játrech, ledvinách a v cytosolu erythrocytů, ve tkáních se katalasa nalézá v peroxisomech. Gen pro katalasu je lokalizován na 11. chromosomu, skupina p13 [66].

#### **6.3.1.2 Katalasa a onemocnění spojená s oxidačním stresem**

Aktivita katalasy se v průběhu onemocnění spojených s oxidačním stresem významně mění. U onemocnění diabetes mellitus byla zjištěna snížená aktivita katalasy v erythrocytech, jak u 1. typu [7; 58; 85], tak i u 2. typu [9; 41; 47]; naopak někteří autoři [43; 44; 73] publikovali u tohoto onemocnění zvýšení aktivity katalasy.

Rovněž u schizofrenie a atherosklerosy byly výsledky stanovení aktivity katalasy nejednoznačné. Snížení aktivity katalasy v erythrocytech publikovali Goth & Vitai [29], naopak její zvýšení presentovali Herken a spolupracovníci [35].

U autistických osob byla pozorována snížená aktivita katalasy [92], která byla rovněž pozorována u chronických alkoholiků [83], revmatických onemocnění [75] a některých nádorových onemocnění [63; 72].

U septických stavů uvádí Warner [89] zvýšení aktivity katalasy.

## **6.4 Oxidační stres**

K oxidačnímu stresu dochází při porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním RONS [14; 80]. K porušení této rovnováhy může dojít v důsledku nadměrné produkce RONS nebo nedostatečné funkce antioxidačního systému, respektive kombinací obou faktorů.

K nadměrné tvorbě ROS dochází například při reoxygenaci tkáně po ischemii, po příjmu redoxně aktivních xenobiotik, či uvolněním železa, mědi a dalších transitivity prvků do redoxně aktivních forem. Nadměrná tvorba RNS je dána především tvorbou radikálu NO a jeho dalšími reakcemi. Produkce radikálu NO souvisí se zvýšenými hladinami celkového a LDL cholesterolu a se sníženou hladinou HDL cholesterolu, dále pak s porušenou glukosovou tolerancí, diabetem mellitem, hypertensí a kouřením [14].

Buňka vystavená oxidačnímu stresu podléhá charakteristickým změnám [27]. Dochází k lipoperoxidaci plasmatické membrány, úbytku thiolových skupin proteinů a k výraznému snížení množství redukováného glutathionu. Následuje porucha iontové homeostasy, změny funkčnosti mitochondrií, poškození DNA a cytoskeletu, což vede k metabolickému vyčerpání a funkčnímu poškození buňky. Celý proces může vést až k buněčné smrti [23; 74; 79].

### **6.4.1 Indikátory oxidačního stresu**

Mezi indikátory oxidačního stresu řadíme [71]:

- 1) produkty lipoperoxidace (konjugované dieny, lipidové hydroperoxydy, malondialdehyd, isoprostany, oxidovaný apo B, ethan, propan, lipoprotein a, poměr celkového a HDL cholesterolu, ... )
- 2) produkty peroxidace (bílkovinné hydroperoxydy, NO, transferin, ... )
- 3) produkty oxidačního poškození DNA (thyminglykol, 5-hydroxymethyluracil, 8-hydroxyguanidin, ... )
- 4) produkty pokročilé glykace (advanced glycation end-products, AGEs - karboxymethyllysin, pentosidin, ...)
- 5) látky s antioxidační schopností (PON, SOD, GPX, CAT, GSH, CoQ, Vitaminy C a E, Zn, Mn, Se, ...)



## 7 METODIKA

### 7.1 PARAMETRY KLINICKÉ STUDIE

V rámci naší klinické studie byly odbírány krevní vzorky třem skupinám osob. Sledovanou skupinou byli kriticky nemocní pacienti ve stavu sepse a dvě skupiny kontrolní: neseptičtí kriticky nemocní pacienti a ambulantní kontroly. Do skupiny kriticky nemocných pacientů v sepsi a do skupiny ambulantních kontrol bylo zařazeno celkem 13 osob. Do skupiny kriticky nemocných neseptických pacientů bylo zařazeno celkem 5 osob.

#### 7.1.1 Kriteria výběru osob zařazených do studie

##### 7.1.1.1 Septičtí pacienti

Do studie byli zařazeni pacienti, kteří splňovali následující vstupní kriteria:

- a) příznaky sepse dané definicí sepse [13]:
  - (1) teplota  $> 38^{\circ}\text{C}$  respektive  $< 36^{\circ}\text{C}$
  - (2) srdeční frekvence  $> 90$  tepů/min
  - (3) dechová frekvence  $> 20$  dechů/min nebo parciální tlak  $\text{CO}_2 < 32$  mm Hg
  - (4) počet bílých krvinek  $> 12\ 000$  buněk/ $\text{mm}^2$  nebo  $> 10\%$  nezralých buněk
- b) přítomnost infekce (lokalisovaná infekce, event. pozitivní hemokultura) definovaná CDC (Centres for Disease Control) kritérii [39]
- c) APACHE II skóre (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation)  $> 10$  [36].

Do studie nemohli být zařazeni pacienti, kteří splňovali některé z následujících vylučovacích kriterií:

- a) probíhající terapie antioxidanty (farmakologické dávky vitamínu C a E, alopurinol, N-acetylcystein)
- b) probíhající chronická dialýza
- c) probíhající imunosuprese a chemoterapie
- d) diabetes mellitus

e) generalisované tumory

### **7.1.1.2 Neseptičtí kriticky nemocní pacienti (1. kontrolní skupina)**

Do této skupiny byly pacienti vybíráni na základě párování s osobami ze skupiny septických pacientů, kdy museli splňovat následující kritéria:

- a) odpovídající hodnota APACHE II skóre ( $\pm 2$ )
- b) stejné pohlaví
- c) stejný věk ( $\pm 5$  let)

Zařazeni nemohli být pacienti, kteří splňovali některé z následujících vylučovacích kritérií:

- a) příznaky sepse dané její definicí
- b) přítomnost infekce (lokalizovaná infekce, event. pozitivní hemokultura) definovaná CDC kritérii
- c) přítomnost některého z vylučovacích kritérií skupiny septických pacientů.

### **7.1.1.3 Ambulantní kontroly (2. kontrolní skupina)**

Do studie byly zařazeny osoby na základě párování s osobami ze skupiny septických pacientů, kdy museli splňovat následující kritéria:

- a) stejné pohlaví
- b) stejný věk ( $\pm 5$  let)

Zařazeni nemohli být pacienti, kteří splňovali některé z následujících vylučovacích kritérií:

- a) probíhající terapie antioxidanty (farmakologické dávky vitamínu C a E, allopurinol, N-acetylcystein)
- b) probíhající chronická dialýza

- c) probíhající imunosuprese a chemoterapie
- d) generalisované tumory
- e) diabetes mellitus
- f) přítomnost infekce (lokalisovaná infekce, event. pozitivní hemokultura) definované CDC kritérii.

## **7.1.2 Charakteristika osob zařazených do studie**

### **7.1.2.1 Septičtí pacienti**

Celkem bylo do studie zařazeno 13 septicky nemocných pacientů {(tabulka 7-1 (str. 28))}, z toho bylo 8 mužů a 5 žen ve věku od 37 do 84 let.

*Tabulka 7-1: Charakteristika septických pacientů*

<b>OZNA- ČENÍ</b>	<b>POHLAVÍ</b>	<b>VĚK</b>	<b>APACHE II</b>	<b>CRP (mg/l)</b>	<b>ZDROJ INFEKCE</b>
<b>S001</b>	MUŽ	79	12	28	KANYLOVÁ SEPSE
<b>S002</b>	MUŽ	37	11	347	PANKREATITIDA
<b>S003</b>	ŽENA	83	16	62	PLÍCE
<b>S004</b>	MUŽ	61	20	86,3	PLÍCE
<b>S005</b>	MUŽ	79	14	134	PLÍCE
<b>S006</b>	ŽENA	84	28	133	PLÍCE, UROSEPSE
<b>S007</b>	MUŽ	61	15	105	KANYLOVÁ SEPSE
<b>S008</b>	ŽENA	74	28	461	UROSEPSE
<b>S009</b>	ŽENA	54	12	30,2	TENKÉ STŘEVO
<b>S010</b>	MUŽ	66	14	185,5	PLÍCE
<b>S011</b>	ŽENA	64	23	332	PLÍCE
<b>S012</b>	MUŽ	76	18	149	PLÍCE
<b>S013</b>	MUŽ	41	22	316	PANKREATITIDA

### **7.1.2.2 Ambulantní kontroly**

Charakteristiku osob zařazených do skupiny ambulantních kontrol podává tabulka 7-2 (str. 29). Celkem do této skupiny bylo zařazeno 13 osob; 8 mužů a 5 žen.

*Tabulka 7-2: Charakteristika ambulantních kontrol*

<b>OZNAČENÍ</b>	<b>POHLAVÍ</b>	<b>VĚK</b>	<b>CRP (mg/l)</b>	<b>PÁROVÁ SEPTICKÁ OSOBA</b>
<b>AK001</b>	MUŽ	80	10,1	<b>S001</b>
<b>AK002</b>	MUŽ	34	7,1	<b>S002</b>
<b>AK003</b>	ŽENA	78	3,2	<b>S003</b>
<b>AK004</b>	MUŽ	60	<2,0	<b>S004</b>
<b>AK005</b>	MUŽ	80	5,8	<b>S005</b>
<b>AK006</b>	ŽENA	80	3,8	<b>S006</b>
<b>AK007</b>	MUŽ	59	2,1	<b>S007</b>
<b>AK008</b>	ŽENA	77	<2,0	<b>S008</b>
<b>AK009</b>	ŽENA	56	<2,0	<b>S009</b>
<b>AK010</b>	MUŽ	68	<2,0	<b>S010</b>
<b>AK011</b>	ŽENA	69	2,2	<b>S011</b>
<b>AK012</b>	MUŽ	78	11,0	<b>S012</b>
<b>AK013</b>	MUŽ	36	<2,0	<b>S013</b>

### **7.1.2.3 Neseptičtí kriticky nemocní pacienti**

Charakteristiku osob zařazených do skupiny neseptických kriticky nemocných pacientů podává tabulka 7-3 (str. 30). Do této skupiny bylo zařazeno 5 osob; 3 muži a 2 ženy.

Tabulka 7-3: Charakteristika neseptických kriticky nemocných pacientů

OZNAČENÍ	POHLAVÍ	VĚK	APACHE II	CRP (mg/l)	PÁROVÁ SEPTICKÁ OSOBA
NK001	MUŽ	84	14	4,8	S001
NK002	MUŽ	37	13	8	S002
NK003	ŽENA	81	17	<2,0	S003
NK009	ŽENA	54	13	43	S009
NK010	MUŽ	66	17	174,2	S010

### 7.1.3 Časový plán odběru vzorků

U pacienta, který splňoval kritéria pro zařazení do studie do skupiny septicky nemocných osob, byl odebrán vzorek krve do 24 hodin od objevení příznaků sepse. Další odběr následoval po sedmi dnech od data prvního odběru. Třetí odběr byl prováděn sedm dní po odeznění příznaků sepse. Pacienti zařazení do jedné z kontrolních skupin byly hledány na základě výběrových kritérií (věk, pohlaví, APACHE II) k pacientům se sepsí a vzorek krve byl odebírán pouze jednou.

### 7.1.4 Odběr a zpracování vzorků krve

Všem pacientům (celkem 31) zařazeným do klinické studie bylo odebíráno 56 ml krve do vacutainerů (celkem 8), ty pak byly odeslány ke stanovení základních biochemických parametrů do centrálních laboratoří (4 vacutainery), nebo předány ke stanovení parametrů oxidačního stresu (4 vacutainery).

#### 7.1.4.1 Preanalytické zpracování vzorků

Ze čtyř vacutainerů, které byly určeny ke zpracování ve specialisované laboratoři, byly dva bez přídavku antikoagulačních látek (červené vacutainery) pro získání séra a dva vacutainery byly s přídavkem antikoagulantu EDTA (fialové vacutainery) pro získání plasmy a erythrocytů.

Vacutainery s plasmou a erythrocyty po odběru umístíme do ledové lázně a centrifugujeme po 15 - 20 minutách stání při 3500 rpm a 4°C po dobu 7 minut. Oddělíme plasmu, kterou rozpipetujeme dle tabulky 7-4 (str. 31). Po oddělení červených krvinek od plasmy krvinky 3x promyjeme vychlazeným fyziologickým roztokem (9 g NaCl/l) v poměru 1 : 10 tak, že suspensi promícháme a centrifugujeme při 3500 rpm po dobu 5 minut. Supernatant odsajeme společně s leukocyty a takto promyté červené krvinky teprve rozpipetujeme do zkumavek typu Eppendorf podle tabulky 7-4 (str. 31).

Vacutainery se srážlivou krví necháme 30 - 45 minut stát při laboratorní teplotě a následně centrifugujeme při 3500 rpm po dobu 9 minut, sérum zpracujeme dle tabulky 7-5 (str. 32).

*Tabulka 7-4: Zpracování plasmy (fialové vacutainery)*

MATERIÁL	BARVA/ POČET ALIKVOTŮ	ALIKVOT ( $\mu$ l)	SKLADOVÁNÍ	ANALYT
<b>PLASMA</b>	bezbarvá/2	100	- 80°C	nitrotyrosin
	modrá/1	1000	- 20°C	profil mastných kyselin
	žlutá/3	200	-20°C	homocystein
	zelená/2	500	kapalný dusík	fosfolipidy
<b>RBC</b> (promyté)	bezbarvá/2	100	-80°C	glutathionreduktasa
	bezbarvá/2	250		glutathionperoxidasa
	bezbarvá/2	250		katalasa
	bezbarvá/2	350		superoxiddismutasa
	bezbarvá/2	500 (+ 0,1 ml 6% CH <sub>3</sub> COOH)		poměr oxidovaného a redukovaného glutathionu
	zelená/2	500	kapalný dusík	fosfolipidy

Tabulka 7-5: Zpracování séra (červené vacutainery)

MATERIÁL	BARVA/ POČET ALIKVOTŮ	ALIKVOT ( $\mu$ l)	SKLADOVÁNÍ	ANALYT
sérum	bezbarvá/2	150	- 80°C	nitrity/nitráty
	modrá/2	250 + 25 $\mu$ l 10% EDTA	- 20°C	konjugované dieny
	bezbarvá/2	300	- 80°C	paraoxonasa
	žlutá/2	250	- 80°C	volné radikály
	zelená/2	650	- 80°C	proteinové hydroperoxydy
	zelená/2	650		lipidové hydroperoxydy

#### **7.1.4.2 Laboratorní parametry stanovované u pacientů zařazených do studie**

##### *a) Aktivita antioxidantních enzymů*

- superoxid-dismutasa (CuZn-SOD) v erythrocytech
- glutathionperoxidasa (GPX) v erythrocytech
- katalasa (CAT) v erythrocytech
- glutathionreduktasa (GR) v erythrocytech
- paraoxonasa (PON1) v séru

##### *b) hladina antioxidantů*

- poměr GSH/GSSG v erythrocytech
- ceruloplasmin v séru

- vitamin A v séru
- ferritin v séru
- vitamin E v séru
- transferin v séru
- kyselina močová v séru
- kyselina listová v séru
- celková bílkovina v séru
- celkový bilirubin v séru
- albumin v séru

c) *Hladina stopových prvků*

- měď v séru
- železo a vazebná kapacita železa v séru
- selen v séru
- zinek v séru

d) *Hladina produktů peroxidace lipidů a proteinů*

- konjugované dieny v séru
- lipidové a proteinové hydroperoxydy v séru

e) *Hladina produktů metabolismu NO*

- nitrity/nitráty v séru
- nitrotyrosin v plasmě

f) *Parametry lipidového metabolismu*

- celkový cholesterol v séru
- apoprotein A-1 v séru
- HDL cholesterol v séru
- apoprotein B v séru
- LDL cholesterol v séru



- profil mastných kyselin v plasmě
- triacylglyceroly v séru

*g) hladina markerů zánětu*

- CRP v séru
- sérový amyloid A (SAA) v séru

*h) zastoupení fosfolipidů v plasmě a membránách erythrocytů*

Ve své diplomové práci jsem stanovila hladinu konečných produktů NO v organismu tj. koncentrace nitritů a nitrátů v séru a nitrotyrosinu v plasmě a dále pak aktivitu antioxidačního enzymu CAT.

## **7.2 METODY**

### **7.2.1 Použité chemikálie a přístrojové vybavení**

#### **7.2.1.1 Chemikálie**

➤ PUFRY A ISOTONICKÝ ROZTOK:

Hydrogenfosforečnan sodný heptahydrát, p. a. ; dihydrogenfosforečnan draselný, p. a. (Lachema, ČR); disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové dihydrát, chlorid sodný, p. a. (Lachema, ČR); kyselina chlorovodíková, p. a. (Penta, ČR); tris(hydroxymethyl)aminomethan, p. a. (TRIS, Penta, ČR)

➤ KONCENTRACE NITRITŮ A NITRÁTŮ

N(1-naftyl)ethylendiamin, (NED) (Sigma, USA); nitrátreduktasa (Sigma, USA); NADPH (Sigma, USA); methanol; diethylether; kyselina chlorovodíková, p. a. (Penta, ČR); sulfanilová kyselina (Sigma, USA)

➤ KONCENTRACE NITROTYTOSINU:

Nitrotyrosine-Elisa test kit, (HyCult Biotechnology b.v., Nizozemí)

➤ AKTIVITA CAT:

Peroxid vodíku (3%, lékárna VFN, ČR )

#### **7.2.1.2 Přístroje**

➤ ÚPRAVA VODY: reversní osmosa MILLI-RO60 Water Purification System (Millipore, USA);

➤ CENTRIFUGY: typ MPW-341, typ MPW-310 (Mechanika Precyzyjna, Polsko);

➤ VÁHY: digitální analytické váhy MC1 Analytic AC 120 S (Sartorius, Německo);

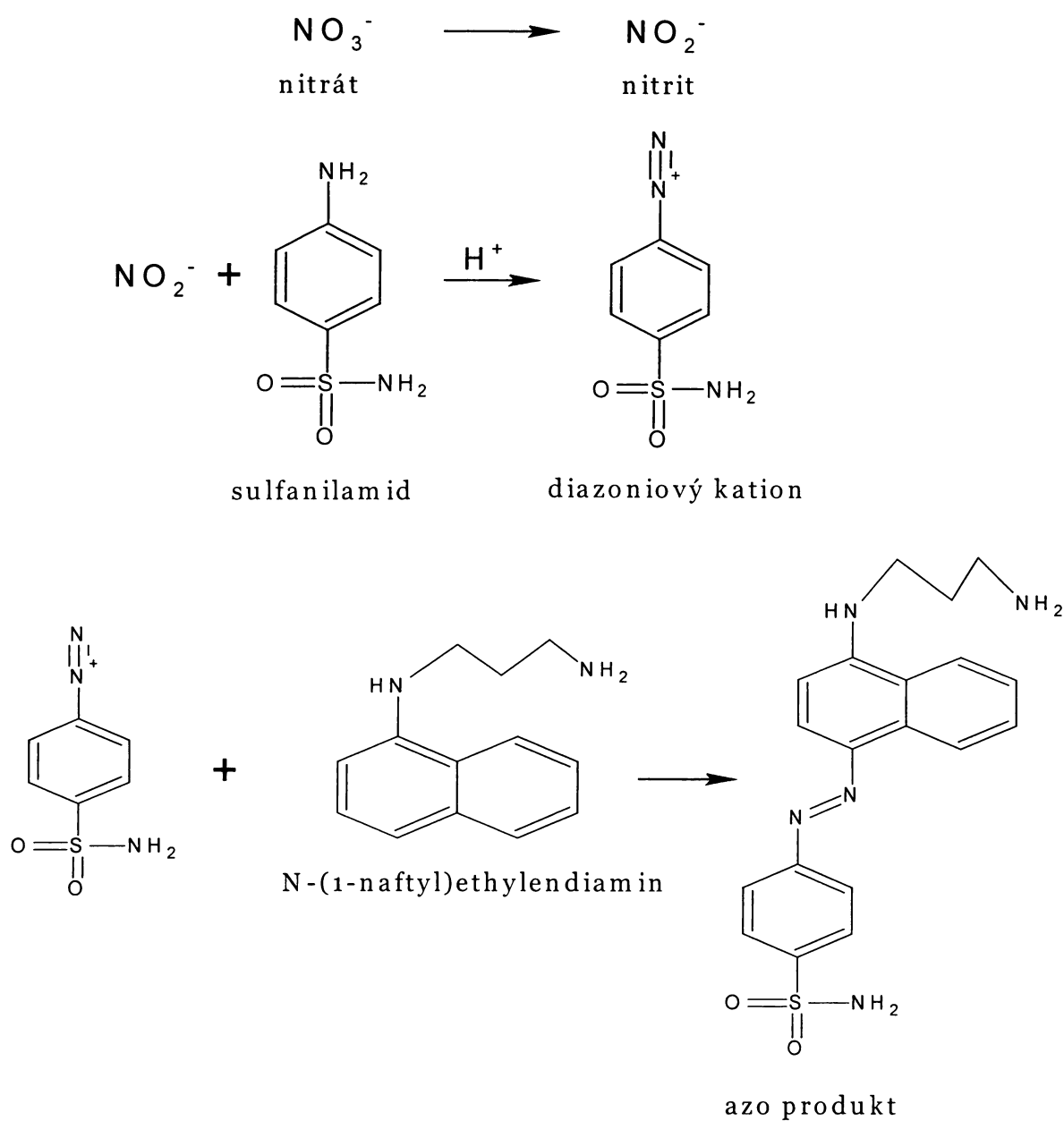
- pH METR: PHM 62 standard pH meter  
(Radiometer, Dánsko);
- TŘEPAČKA: Micro-Shaker type 326 m (Premed, Polsko);
- SPEKTROFOTOMETR: Helios  $\gamma$  (Thermo-Electron, USA)
- KYVETY: jednorázové UV semimikro kyvety 1,5 - 3,5 ml, Plastibrand (Brand, Německo)

## **7.2.2 Metody stanovení hladiny produktů metabolismu oxidu dusnatého**

### **7.2.2.1 Stanovení koncentrace nitritů a nitrátů v séru**

#### *7.2.2.1.1 Princip metody*

Ke stanovení celkové koncentrace nitritů a nitrátů využíváme tzv. Griessovy reakce upravené dle Guevara [30]. Pro toto stanovení odebíráme vzorky séra, které uchováváme při  $-80^{\circ}\text{C}$  až do stanovení. Redukci veškerých přítomných nitrátů na nitrity provádíme pomocí nitrátoreduktasy, poté vzorek deproteinujeme a stanovíme koncentraci nitritů pomocí tzv. Griessovy reakce, jejíž schéma znázorňuje obrázek 7-1 (str. 37). Griessova reakce je založena na reakci nitritů se sulfanilamidem za vzniku derivátu benzendiazoniové soli. Po 10 minutové inkubaci následuje přidání N-(1-naftyl)ethylendiaminu, který zreaguje za vzniku azoproduktu, jehož absorbanci měříme při 540 nm. Jedná se o end-point metodu, kdy absorbanci měříme jednorázově a výslednou koncentraci zjišťujeme z kalibrační křivky.



**Obrázek 7-1: Schéma Griessovy reakce**

#### 7.2.2.1.2 Roztoky

➤ TRIS PUFŘ (c = 20 mM, pH = 7,6)

0,606 g TRIS rozpustíme asi ve 150 ml destilované vody, pomocí HCl (asi 3 ml 6,5 M HCl) upravíme pH na 7,6 a v odměrné baňce doplníme vodou na 250 ml.

Skladujeme maximálně po dobu 1 měsíce v lednici.

➤ NADPH+H<sup>+</sup> (Mr = 745,4; c = 176 μM)

10 mg NADPH+H<sup>+</sup> rozpustíme v 75,3 ml TRIS pufru o pH = 7,6  
Roztok připravujeme vždy čerstvý.

➤ NITRÁTREDUKTASA (50 mU/100μl vzorku)

Nitrátreduktasa je dodávána v podobě pevné látky, po otevření lahvičky nitrátreduktasu rozpustíme ve vodě tak, aby zůstala zachována aktivita 10 U/ml, získaný roztok rozpipetujeme po 100μl do zkumavek typu Eppendorf a skladujeme při -80°C. Spotřebujeme do 1 měsíce. Ředěný roztok připravujeme vždy čerstvý a skladujeme max. 12 hodin na ledu.

➤ METHANOL : DIETHYLETHER (3 : 1)

Smícháme 250μl diethyletheru s 750 μl methanolu  
Směs je nutno připravit čerstvou, pracujeme v digestoři.

➤ N-(1-NAFTYL)ETHYLENDIAMIN (NED, Mr = 259,18; c = 12,5 mM)

3,24 mg NED rozpustíme v 1 ml destilované vody  
Připravujeme vždy čerstvé.

➤ SULFANILOVÁ KYSELINA (Mr = 173,19; c = 37,5 mM)

6,49 mg sulfanilové kyseliny rozpustíme ve 1 ml destilované vody  
Připravujeme vždy čerstvé.

➤ HCl (Mr = 36,4; c = 6,5 M)

1,1607 ml 37% HCl smícháme s 1 ml destilované vody  
Můžeme skladovat v podobě 6,5 M roztoku v uzavřené skleněné nádobě při teplotě místnosti.

#### 7.2.2.1.3 Redukce nitrátů na nitrity

Do zkumavky typu Eppendorf napipetujeme 100 μl 176 μM NADPH + H<sup>+</sup>, 100 μl séra a 20 μl nitrátreduktasy a necháme inkubovat po dobu 30 minut při laboratorní teplotě.

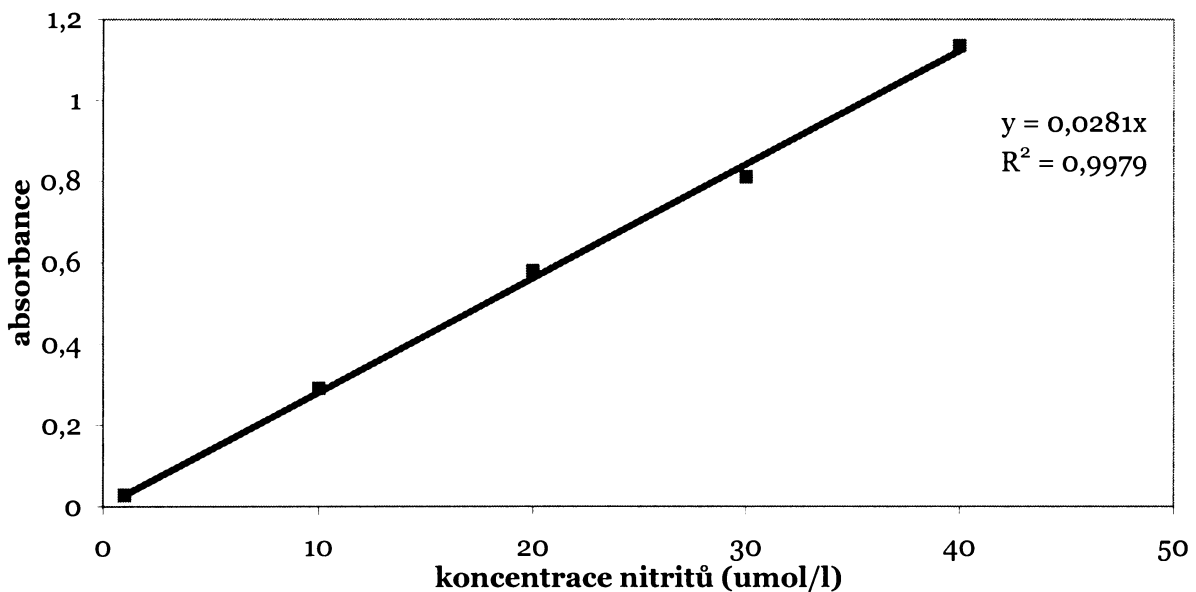
#### 7.2.2.1.4 Deproteinace

Po redukci nitrátů na nitrity popsané výše odebereme 100  $\mu$ l vzorku, dáme do zkumavky typu Eppendorf, přidáme 900  $\mu$ l směsi methanol : diethylether (3 : 1) a necháme vzorek inkubovat přes noc. Po inkubaci vzorky stočíme (10 000 rpm, 10 minut, 4°C) a supernatant používáme ke stanovení nitritů.

#### 7.2.2.1.5 Stanovení nitritů

Stanovení nitritů provádíme spektrofotometricky, tzv. end-point metodou, kdy absorbanci měříme při 540 nm na konci reakce a celkovou koncentraci stanovujeme z kalibrační křivky. Pro kalibrační křivku použijeme standardy dusitanu sodného v koncentracích od 1  $\mu$ mol/l do 40  $\mu$ mol/l; tato křivka je znázorněna v grafu 7-1 (str. 39).

Graf 7-1: Kalibrační křivka pro stanovení celkové koncentrace nitritů a nitrátů



V tabulce 7-6 (str. 40) je uveden postup stanovení nitritů, pokus provádíme ve zkumavkách typu Eppendorf a teprve po ukončení reakce a centrifugaci pipetujeme roztok do kyvet a měříme absorbanci.

Tabulka 7-6: Postup stanovení celkové koncentrace nitritů

Chemikálie	Vzorek (μl)	Blank (μl)
HCl	150	150
Sulfanilová kyselina	150	150
Vzorek	600	-
Destilovaná voda	-	600
INKUBACE 10 MINUT při 4°C		
NED	150	150
INKUBACE 30 MINUT při 4°C		
CENTRIFUGACE 10 000 rpm, 10 MINUT		

### 7.2.2.2 Stanovení koncentrace nitrotyrosinu v plasmě

#### 7.2.2.2.1 Princip metody

Ke stanovení koncentrace nitrotyrosinu v plasmě používáme sendvičovou ELISA metodu s enzymově značenou protilátkou. Během měření používáme dvě specifické protilátky. První protilátka je pevně vázána na stěnách jamek mikrotitrační destičky. Na tuto protilátku se váže ve vzorku přítomný nitrotyrosin. Druhá protilátka je značená biotinem a váže se na komplex první protilátky a nitrotyrosinu. Na druhou protilátku se váže konjugát enzymu streptavidinperoxidasy, jejímž substrátem je tetramethylbenzidin (TMB). Streptavidinperoxidasa katalysuje přeměnu TMB, při níž vzniká modře zbarvený produkt; reakci ukončíme přidáním kyseliny citronové a výsledný žlutě zbarvený produkt měříme při 450 nm. Výslednou koncentraci nitrotyrosinu odečteme z kalibrační křivky.

#### 7.2.2.2.2 Roztoky

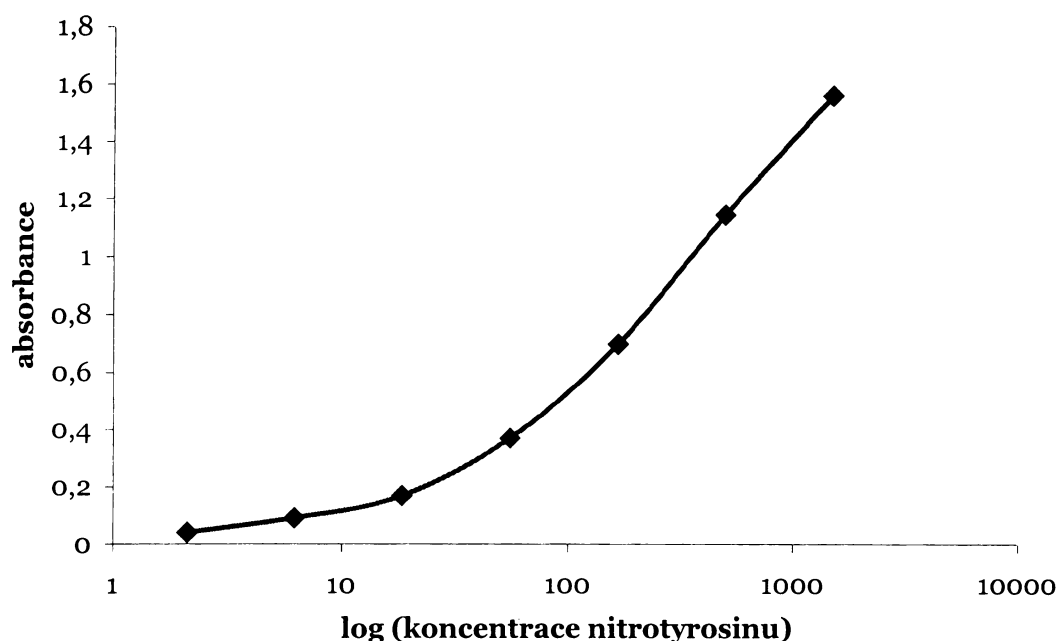
Používáme komerčně dodávaný ELISA kit, který skladujeme při teplotě 2-8°C do data expirace, po otevření nutno spotřebovat do 1 měsíce.

#### 7.2.2.2.3 Příprava vzorků

Pro stanovení nitrotyrosinu je možné používat jak sérum tak plasmu. Nejlepší výsledky jsou dosahovány při použití plasmy s přídatkem EDTA. Před stanovením je nutné vzorek zředit. Pro zdravé osoby zařazené do skupiny ambulantních kontrol jsme používali ředění 10x. Pro septicky nemocné pacienty potom ředění 20x. Plasmu před stanovením skladujeme při  $-80^{\circ}\text{C}$  a po rozmražení spotřebujeme do 24 hodin.

#### 7.2.2.2.4 Kalibrační křivka

Graf 7-2: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace nitrotyrosinu v plasmě



#### 7.2.2.2.5 Měření koncentrace

Kit obsahuje mikrotitrační destičku s 96 jamkami, z toho 16 jich využijeme pro proměření kalibrační křivky, zbylé jamky používáme pro měření neznámých vzorků. Měření provádíme vždy v dubletech.

Nejprve do jamek odpipetujeme 100  $\mu\text{l}$  vzorků, jemně promícháme a přikryjeme krytem, poté necháme inkubovat při laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny. Po uplynutí inkubace sejmem kryt, roztok odsajeme a promyjeme 3x promývacím puřrem, poté vysajeme do sucha.

Dále do jamek napipetujeme 100  $\mu\text{l}$  protilátky značené biotinem, jemně promícháme, přikryjeme krytem a necháme inkubovat při laboratorní teplotě



po dobu jedné hodiny. Poté promyjeme promývacím pufrům jako v předchozím kroku.

V dalším kroku přidáme 100  $\mu$ l konjugátu streptavidinperoxidasy, jemně promícháme, přikryjeme krytem a necháme inkubovat při laboratorní teplotě po dobu jedné hodiny. Po uplynutí inkubace opět promyjeme 3x promývacím pufrům a vysajeme do sucha.

Poté do jamek přidáme 100  $\mu$ l substrátu TMB, jemně promícháme a přikryjeme krytem a necháme inkubovat při laboratorní teplotě ve tmě po dobu 20-30 minut. Po inkubaci sejmeme kryt a přidáme 100  $\mu$ l kyseliny citronové k ukončení reakce, jemně promícháme, destičku vložíme do spektrofotometru a změříme absorbanci při 450 nm. Koncentrace nitrotyrosinu odečítáme z kalibrační křivky, kterou zobrazuje graf 7-2 (str. 41).

### **7.2.3 Stanovení aktivity katalasy**

#### *7.2.3.1.1 Princip metody*

Jedná se o spektrofotometrické stanovení při vlnové délce  $\lambda = 240$  nm, kdy je sledován úbytek peroxidu vodíku přidaného do reakční směsi jako substrát [1; 80]. Peroxid vodíku je katalasou rozkládán na vodu a kyslík.

#### *7.2.3.1.2 Roztoky*

➤ FOSFÁTOVÝ PUFR (50 mM, pH = 7,0)

0,681 g dihydrogenfosforečnanu draselného ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a 2,01 g heptahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) rozpustíme asi ve 150 ml destilované vody a v odměrné baňce doplníme na 250 ml destilovanou vodou. Skladujeme po dobu maximálně jednoho měsíce v lednici.

➤ ROZTOK PEROXIDU VODÍKU (c = 200 mmol/l)

2,140 ml 3% peroxidu vodíku rozpustíme v 7,86 ml fosfátového pufru (c = 50 mM, pH = 7,0)

Roztok připravujeme vždy čerstvý těsně před měřením a chráníme před světlem.

## ➤ HEMOLYSÁT

250µl promytých červených krvinek přidáme do 1 ml vychlazené destilované vody, promícháme a necháme asi 2-3 minuty stát v ledové lázni, vzniklý hemolysát ředíme:

500x ... 10 µl hemolysátu + 4990 µl pufru

1000x ... 10µl hemolysátu + 9990 µl pufru

### 7.2.3.1.3 Stanovení aktivity katalasy

Tabulka 7-7: Nastavení spektrofotometru Helios  $\gamma$

Parametr	Hodnota parametru	
Vlnová délka	240	nm
Počet kyvet	6	
Počet cyklů	6	
Perioda	30	s
Teplota	30	°C

Tabulka 7-8: Dávkování v kyvetách

Chemikálie	Blank (µl)	Vzorek (µl)
Fosfátový pufr	901	876
Ředěný hemolysát	-	25
<b>STARTOVÁNÍ REAKCE</b>		
Peroxid vodíku (200mM)	99	99

### 7.2.3.1.4 Výpočet aktivity katalasy

Aktivitu katalasy počítáme s využitím molárního extinkčního koeficientu peroxidu vodíku,  $\epsilon = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$$V \text{ (v kyvetě)} * 1000000 * 33 * ((A_0 - A)_{\text{vzorek}} - (A_0 - A)_{\text{blank}})$$

$$a(\text{kU/g Hb}) = \text{-----}$$

$$(\epsilon * t * 1000 * c(\text{Hb}) * V(\text{vzorku}))$$

kde  $A_0$  ... počáteční absorbance  
 $A$  ... absorbance na konci měření  
 $\epsilon$  ... molární extinkční koeficient peroxidu vodíku ( $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ )  
 $t$  ... doba měření (s)  
 $V$  ... objem (l)

#### **7.2.4 Klinicko-biochemické parametry vzorků**

Stanovení byla prováděna v Centrální laboratoři Ústavu klinické biochemie a laboratorní diagnostiky VFN a 1. LF UK.

##### **7.2.4.1 Stanovení koncentrace C-reaktivního proteinu**

Ke kvantitativnímu stanovení CRP je používána imunoturbidimetrie.

Koncentrace CRP se měří v séru pomocí komerčně dostupného kitu K-ASSAY CRP (Kamiya Biomedical Company, USA) na automatickém analyzátoru Hitachi Modular (Japonsko). C-reaktivní protein reaguje se specifickou kozí protilátkou za vzniku precipitátu imunokomplexu, na jehož částicích dochází k rozptylu světla. Množství CRP je přímo úměrné stupni turbidity v kyvetě, který se měří jako nárůst O.D. při 340 nm a 700 nm.

Odběr vzorku pro stanovení CRP je vhodné provést nalačno, získané sérum by mělo být skladováno max. 4 hodiny při laboratorní teplotě, jinak dochází ke změnám v koncentraci CRP. Je-li nutno sérum pro stanovení CRP skladovat po delší dobu, je stabilní 3 roky při  $-20^\circ\text{C}$  a 20 let při  $-70^\circ\text{C}$ . Hodnoty CRP mohou být ovlivněny polohou při odběru, dietou, věkem, kouřením, tělesnou zátěží, nadmořskou výškou a u žen těhotenstvím.

Fysiologická koncentrace CRP v séru je 0,0 až 7,1 mg/l [91].

#### **7.2.4.2 Stanovení hematokritu a koncentrace hemoglobinu**

Stanovení hematokritu a koncentrace hemoglobinu se provádí v hematologické laboratoři elektronickým počítačem Coulter JT , který udává celkem 16 parametrů krevního obrazu a 3 histogramy.

Fysiologická hodnota hematokritu je 0,39 až 0,51 a hemoglobinu 135 až 174 g/l.

#### **7.2.4.3 Stanovení koncentrace železa v séru**

Ke stanovení koncentrace železa v séru se používá fotometrického stanovení s ferrosinem, které je prováděno na automatickém analyzátoru.

Odběr vzorku pro stanovení Fe by měl být v ranních hodinách. Krevní elementy je nutno oddělit do 1 hodiny po odběru. Získané sérum může být skladováno max. 1 týden při laboratorní teplotě, jinak dochází ke změnám v koncentraci železa. Je-li nutno sérum pro stanovení Fe skladovat po delší dobu, je stabilní 3 týdny při 4-8°C a po dobu několika let při teplotě -20°C. Hodnoty koncentrace Fe mohou být ovlivněny věkem, pohlavím, u žen těhotenstvím a menstruačním cyklem a hemolysou krve.

Fysiologická koncentrace Fe v séru u mužů nad 15 let je 7,2 až 29,0  $\mu\text{mol/l}$ , u žen nad 15 let 6,6 až 28,0  $\mu\text{mol/l}$ .

### **7.3 Statistické zpracování výsledků**

Ke statistickému zpracování výsledků byly využity počítačové statistické programy :

- a) Minitab ® Release 14 (verse 14.20, rok 2005, trial verse)
- b) Graph Pad InStat (verse 3.06, rok 2003, demo verse)

## 8 VÝSLEDKY

### 8.1 Optimalisace stanovení aktivity katalasy

Při stanovení aktivity katalasy jsme vyšli z metody Aebiho [1]. Byla provedena kinetická měření vedoucí k optimalizaci podmínek stanovení katalasy v klinické praxi.

#### 8.1.1 Závislost aktivity katalasy na koncentraci hemolysátu

Tabulka 8-1 (str. 46) ukazuje hodnoty rychlosti rozkladu peroxidu vodíku v závislosti na koncentraci hemolysátu (objemu 500x ředěného hemolysátu v 1 ml reakční směsi). Z grafu 8-1 (str. 47) vyplývá, že závislost rychlosti reakce na objemu hemolysátu (tj. množství CAT) nebyla lineární v celém rozsahu koncentrace enzymu.

Proto byla během finálních měření prováděna kontrola linearitu závislosti aktivity CAT na její koncentraci, která spočívala v použití dvou různých ředění hemolysátu (500x a 1000x).

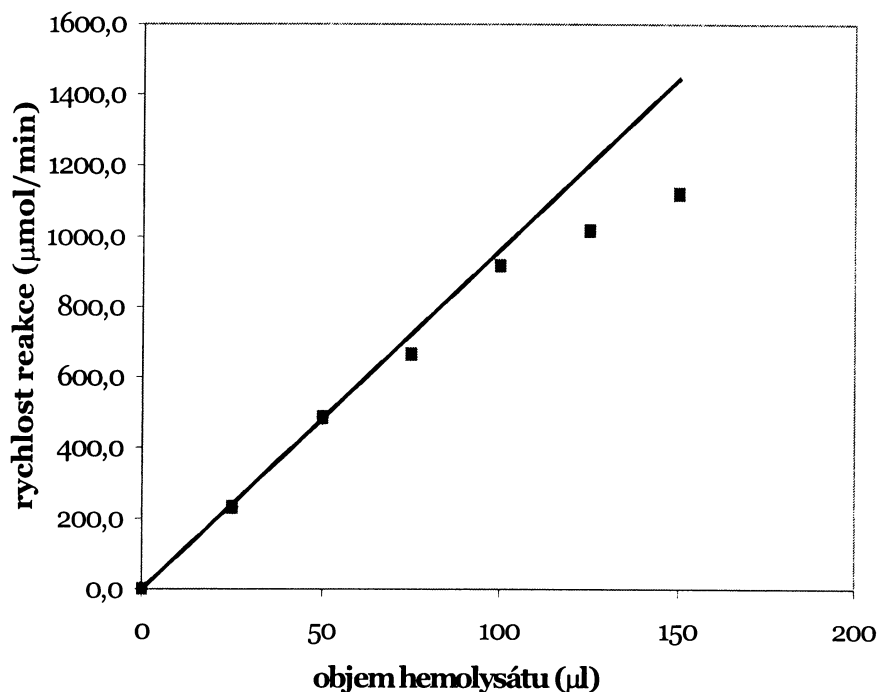
Tabulka 8-1: Rychlost reakce v závislosti na objemu hemolysátu

Objem hemolysátu ( $\mu\text{l}$ )	Rychlost reakce <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
0	0,0 $\pm$ 0,0
25	232,2 $\pm$ 14,9
50	485,5 $\pm$ 10,8
75	665,1 $\pm$ 24,3
100	917,4 $\pm$ 18,1
125	1016,8 $\pm$ 30,1
150	1120,0 $\pm$ 23,6

<sup>a</sup>) průměr  $\pm$  SD,  $n = 4$ ;

Podmínky:  $\text{pH} = 7$ ,  $c(\text{pufru}) = 50 \text{ mM}$ ,  $c(\text{H}_2\text{O}_2) = 200 \text{ mM}$ ,  $t = 30^\circ\text{C}$

Graf 8-1: Závislost rychlosti reakce na objemu hemolysátu



### 8.1.2 Závislost aktivity katalasy na koncentraci substrátu

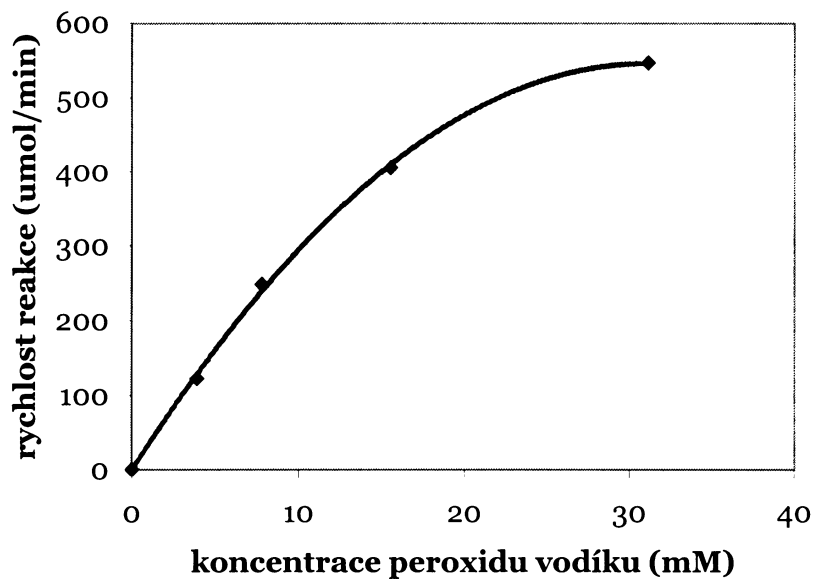
Tabulka 8-2: Závislost rychlosti reakce a aktivity katalasy na koncentraci substrátu(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Koncentrace H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mmol/l) zásobní roztok	Koncentrace H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mmol/l) v kyvetě	Rychlost reakce <sup>a</sup> (μmol/min)	Aktivita CAT <sup>a</sup> (kU/g Hb)
39,3	3,89	122,3 ± 5,4	47,9 ± 2,1
78,6	7,78	248,5 ± 5,4	97,2 ± 2,1
157,2	15,56	405,2 ± 5,4	158,6 ± 2,1
314,4	31,13	546,6 ± 5,4	213,9 ± 2,1

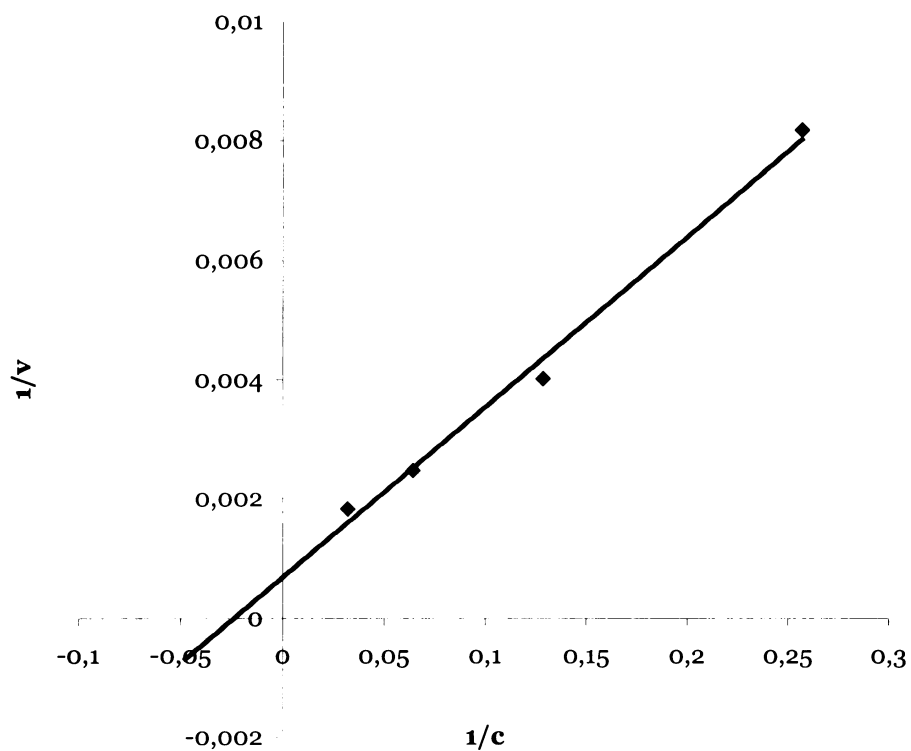
<sup>a</sup>) průměr ± SD, n = 4; CAT... katalasa

Podmínky: pH = 7, c(pufri) = 50 mM, t = 30°C,

Graf 8-2: Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu ( $H_2O_2$ )



Graf 8-3: Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu ( $H_2O_2$ )-vynesení  
Lineweaver- Burkovo



Tabulka 8-3: Kinetické parametry katalasy

PARAMETR	HODNOTA <sup>a</sup>
$K_M$ (mol/dm <sup>3</sup> )	0,0445 ± 0,0058
$V_{max}$ (μmol/min)	1428,6 ± 119,0

<sup>a</sup>) průměr ± SD, n = 4

### 8.1.3 Závislost aktivity katalasy na teplotě

Ve většině publikovaných prací se provádí měření aktivity CAT při teplotě 25°C. Z tabulky 8-4 (str. 49) vyplývá, že aktivita enzymu je závislá na teplotě a optimální teplotou pro měření enzymové aktivity CAT není 25°C, ale 30°C. Aktivita CAT při 30°C je vyšší než při ostatních námi sledovaných teplotách (p = 0,0002). Proto jsme pro finální stanovení zvolili teplotu 30°C.

Tabulka 8-4: Vliv teploty na aktivitu katalasy

Teplota (°C)	Aktivita CAT <sup>a</sup> (kU/g Hb)	
15	133,5 ± 2,2	*
20	134,1 ± 2,8	*
25	129,4 ± 4,4	***
<b>30</b>	<b>141,1 ± 2,8</b>	
37	131,9 ± 2,3	**
40	127,9 ± 2,0	***

<sup>a</sup>) průměr ± SD, n = 4; CAT... katalasa

Podmínky: pH = 7, c (pufry) = 50 mM, c (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) = 200 mM,

\* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001) ... aktivita CAT při dané teplotě vs. aktivita CAT při 30°C.



### 8.1.4 Reprodukovatelnost měření

Tabulka 8-5: Spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků

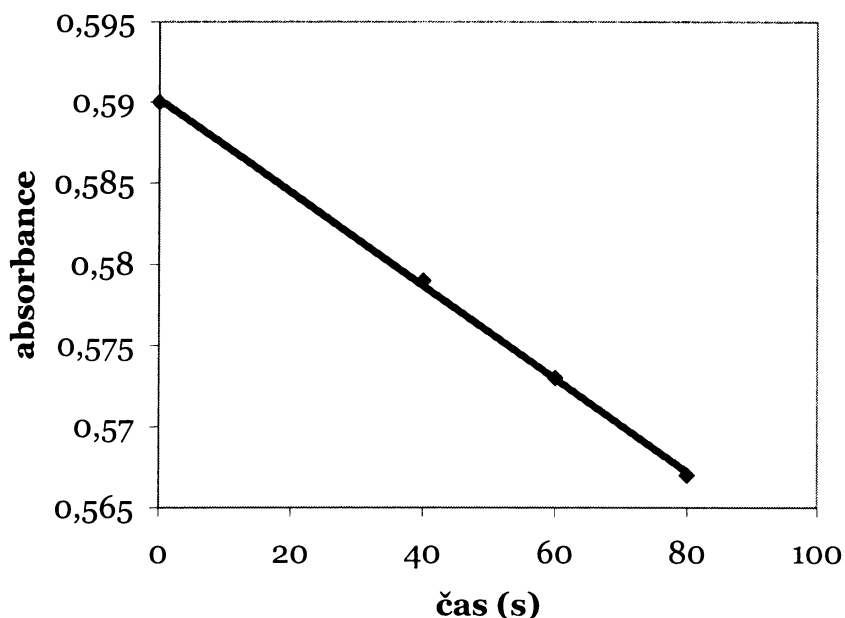
<b>Číslo měření</b>	<b>Aktivita CAT (kU/g Hb)</b>
<b>1</b>	139,1
<b>2</b>	143,6
<b>3</b>	139,1
<b>4</b>	143,6
<b>5</b>	143,6
<b>6</b>	139,1
<b>7</b>	139,1
<b>8</b>	143,6
<b>9</b>	139,1
<b>10</b>	143,6

<b>Průměr</b>	<b>141,4</b>
<b>Median</b>	<b>141,4</b>
<b>SEM</b>	<b>0,75</b>
<b>SD</b>	<b>2,4</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>1,7</b>

### 8.1.5 Časový průběh hydrolysy peroxidu vodíku

Graf 8-4 (str. 51) potvrzuje, že kinetika enzymové hydrolysy peroxidu vodíku byla lineární v časovém intervalu měření (0 – 80 s).

Graf 8-4: Časový průběh katalytického rozkladu peroxidu vodíku



## 8.2 Klinicko-biochemické parametry osob zařazených do klinické studie

Tabulka 8-6 (str. 52) shrnuje základní údaje o věku, pohlaví, intenzitě odpovědi na zánět (koncentrace CRP), závažnosti sepse (APACHE II skóre) a koncentraci železa v séru a hemoglobinu v celé krvi. Z tabulky vyplývá, že do studie byly zařazeny tři skupiny osob: septičtí pacienti odebíraní třikrát (S), ambulantní kontroly (AK) a neseptičtí kriticky nemocní pacienti (NK). Párování osob ve skupinách bylo provedeno na základě pohlaví, věku a hodnoty APACHE II skóre (skupiny S a NK).

Tabulka 8-6: Klinicko-biochemické parametry

PARAMETR	S - 1. odběr	S - 2. odběr	S - 3. odběr	AK	NK
<b>počet osob</b>	13	11	8	13	5
<b>pohlaví (muži/ženy)</b>	8/5	8/5	8/5	8/5	3/2
<b>věk<sup>a</sup></b>	66,1 ± 15,2	66,1 ± 15,2	66,1 ± 15,2	65,8 ± 16,1	64,4 ± 19,5
<b>APACHE II skóre<sup>a</sup></b>	17,9 ± 5,9	nehodnotí se	nehodnotí se	nehodnotí se	14,8 ± 2,1
<b>CRP (mg/l)<sup>a</sup></b>	182,23 <sup>***</sup> ± 137,71 <sup>+++</sup>	76,81 <sup>**</sup> ± 72,89	14,30 ± 5,93	4,25 ± 3,24	46,4 ± 73,35
<b>Fe (μmol/l)<sup>a</sup></b>	3,71 <sup>****</sup> ± 2,87 <sup>++++</sup>	6,64 ± 2,58	12,49 <sup>***</sup> ± 2,70	21,62 ± 7,82	17,50 ± 8,29
<b>Hemoglobin (g/l)<sup>a</sup></b>	99,84 <sup>***</sup> ± 15,74	99,36 <sup>***</sup> ± 15,72	103,88 <sup>**</sup> ± 16,55	137,15 ± 14,87	128,6 ± 27,97

<sup>a</sup>) průměr ± SD

S... skupina septických pacientů, AK... skupina ambulantních kontrol, NK... skupina neseptických kriticky nemocných pacientů

++ ( $p < 0,01$ ), +++ ( $p < 0,001$ ), ++++ ( $p < 0,0001$ ) uvedená skupina vs. S-3. odběr

\*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ) uvedená skupina vs. AK

Hodnota APACHE II skóre u septických pacientů byla  $17,9 \pm 5,9$ . Koncentrace CRP dosahovala nejvyšších hodnot u septických pacientů v rámci prvního odběru a v průběhu uzdravovacího procesu docházelo k postupnému snižování koncentrace CRP zpět k fyziologickým hodnotám.

Mikrobiologický záznam zdroje sepse (primární infekce) ukázal, že u sedmi pacientů (53,8%) představovaly plíce místo primární infekce, u dvou případů byl zdrojem primární infekce pankreas (akutní pankreatitida), u dvou případů se jednalo o kanylovou sepsi a u posledních dvou případů se jednalo o urosepsi respektive o sepsi GIT.

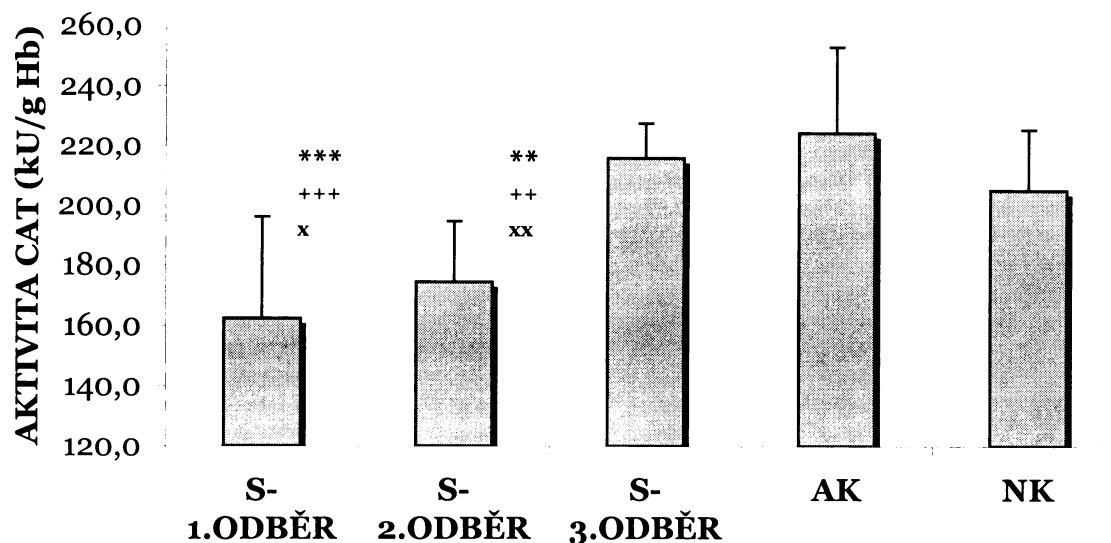
Koncentrace sérového železa byla u septických pacientů při prvním odběru 3,4x nižší než při třetím odběru, tj. po uzdravení ( $p < 0,0001$ ) a 5,8x nižší než u ambulantních kontrol ( $p < 0,0001$ ). I když koncentrace sérového železa v průběhu uzdravovacího procesu vzrůstala, hodnoty u septických pacientů v rámci třetího odběru, tj. po uzdravení, byly stále ještě nižší než u ambulantních kontrol ( $p = 0,0009$ ).

## **8.3 Aktivita katalasy**

### **8.3.1 Aktivita katalasy u pacientů v sepsi**

Tabulka 8-7 (str. 54) a graf 8-5 (str. 54) ukazuje srovnání aktivity CAT v erythrocytech u sledovaných skupin osob (tj. pacientů v sepsi, ambulantních kontrol a neseptických kriticky nemocných pacientů). U pacientů v septickém stavu byla aktivita CAT signifikantně snížena v porovnání s jejími hodnotami u uzdravených pacientů respektive ambulantních kontrol. Hodnoty aktivit tohoto enzymu byly srovnatelné u skupiny ambulantních kontrol a neseptických kriticky nemocných pacientů.

Graf 8-5: Vliv sepse na aktivitu CAT v erythrocytech



S... septičtí pacienti, AK ... ambulantní skupiny, NK ... neseptičtí kriticky nemocní pacienti

\*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) označené skupiny pacientů vs. AK

x ( $p < 0,05$ ), xx ( $p < 0,01$ ) označené skupiny pacientů vs. NK

++ ( $p < 0,01$ ), +++ ( $p < 0,001$ ) označené skupiny pacientů vs. S-3. odběr

Tabulka 8-7: Vliv sepse na aktivitu CAT v erythrocytech

	Pacienti v sepsi 1. odběr (n = 13)	Pacienti v sepsi 2. odběr (n = 11)	Pacienti v sepsi 3. odběr (n = 8)	Ambulantní kontroly (n = 13)	Neseptičtí kriticky nemocní (n = 5)
<b>Aktivita CAT<sup>a</sup> (kU/g Hb)</b>	162,42 *** ± 20,23+++ x	174,47 ** ± 33,79 ++ xx	216,00 ± 11,59	224,53 ± 28,75	205,48 ± 20,30

<sup>a</sup>) průměr ± SD, n... počet osob v dané skupině

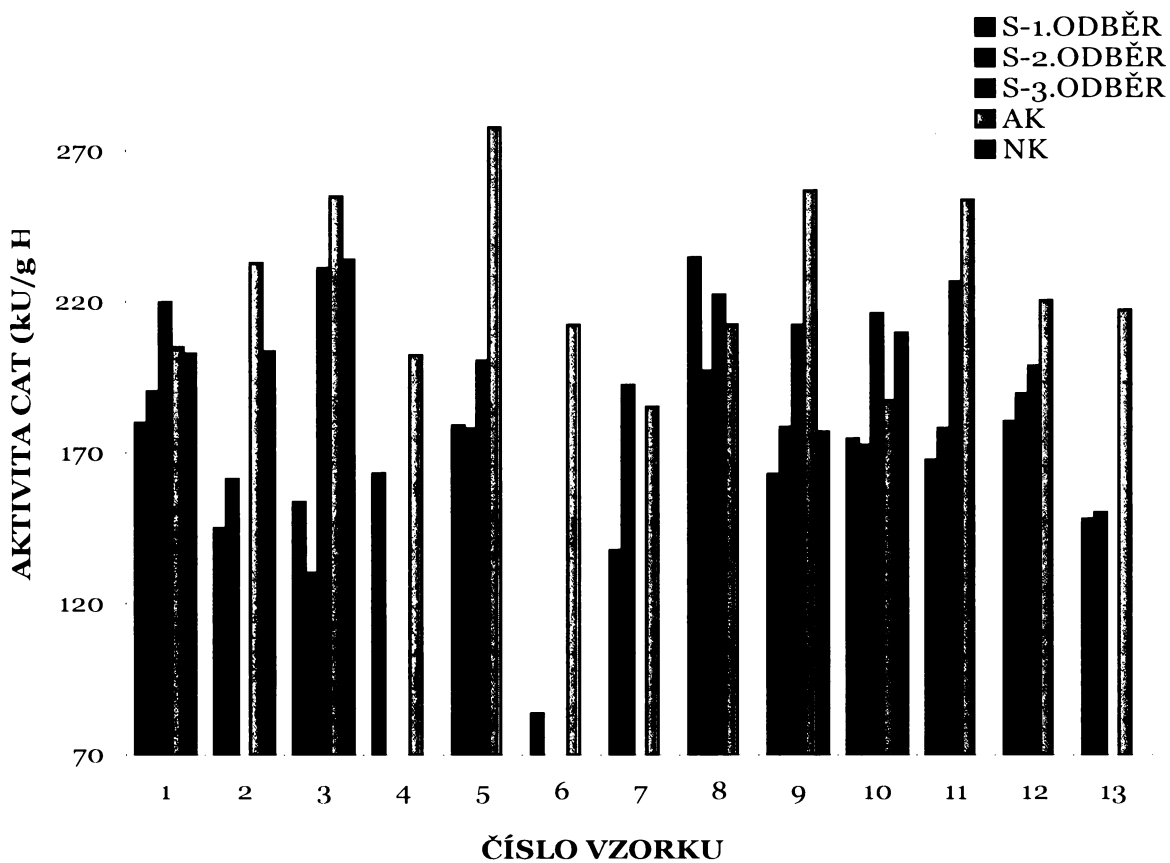
\*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) označené skupiny pacientů vs. AK

x ( $p < 0,05$ ), xx ( $p < 0,01$ ) označené skupiny pacientů vs. NK

++ ( $p < 0,01$ ), +++ ( $p < 0,001$ ) označené skupiny pacientů vs. sepse-3. odběr

Vývoj aktivity CAT v průběhu sepse a její srovnání s kontrolními skupinami v jednotlivých případech znázorňuje graf 8-6 (str. 55) Jak je z grafu patrné aktivita CAT u ambulantních kontrol je ve 12 případech (92,3%) vyšší než u septických pacientů v rámci prvního odběru, tj. v počátcích sepse. Srovnáváme-li aktivitu CAT v průběhu sepse, dochází ke zvyšování její aktivity s uzdravováním pacientů. Z osmi případů, kdy pacienti přežili a došlo k jejich uzdravení, tj. mohl být proveden 3. odběr, byla aktivita CAT v sedmi případech (87,5%) po uzdravení vyšší.

Graf 8-6: Aktivita katalasy v jednotlivých případech

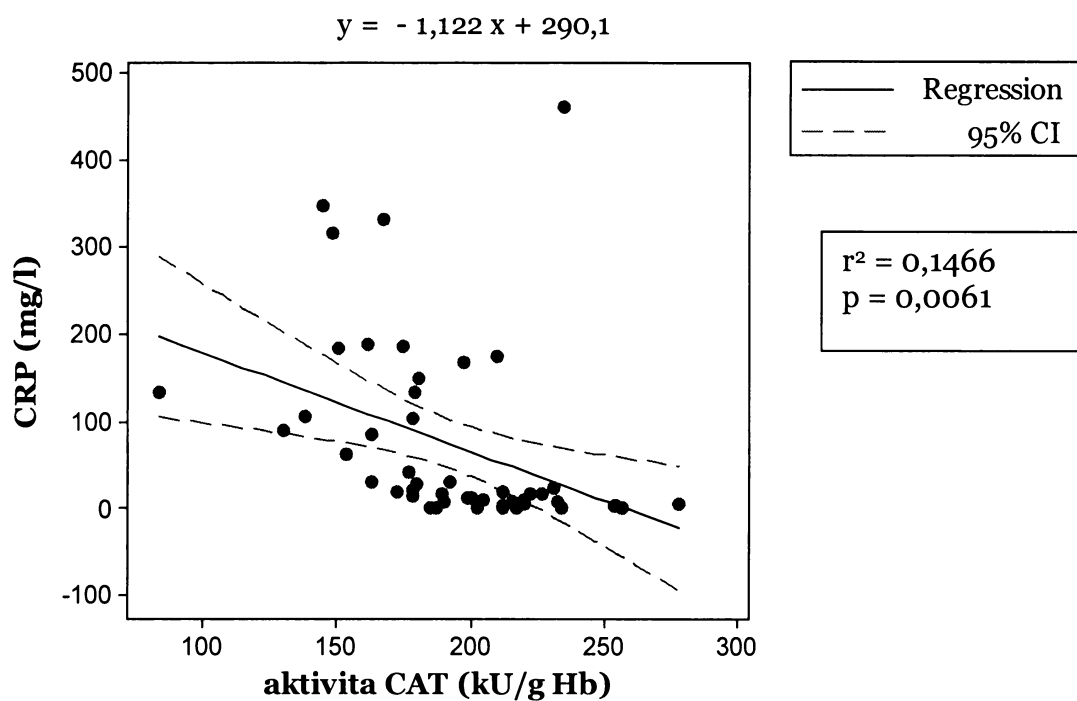


*S... septičtí pacienti, AK ... ambulantní skupiny, NK ... neseptičtí kriticky nemocní pacienti ; CAT...katalasa*

### 8.3.2 Korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací C-reaktivního proteinu

Byla sledována vzájemná korelace mezi aktivitou CAT a koncentrací CRP, parametru zánětlivé odpovědi organismu, graf 8-7 (str. 56). Tyto dva parametry vzájemně korelují ( $p < 0,01$ ).

Graf 8-7: Vzájemná korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací CRP

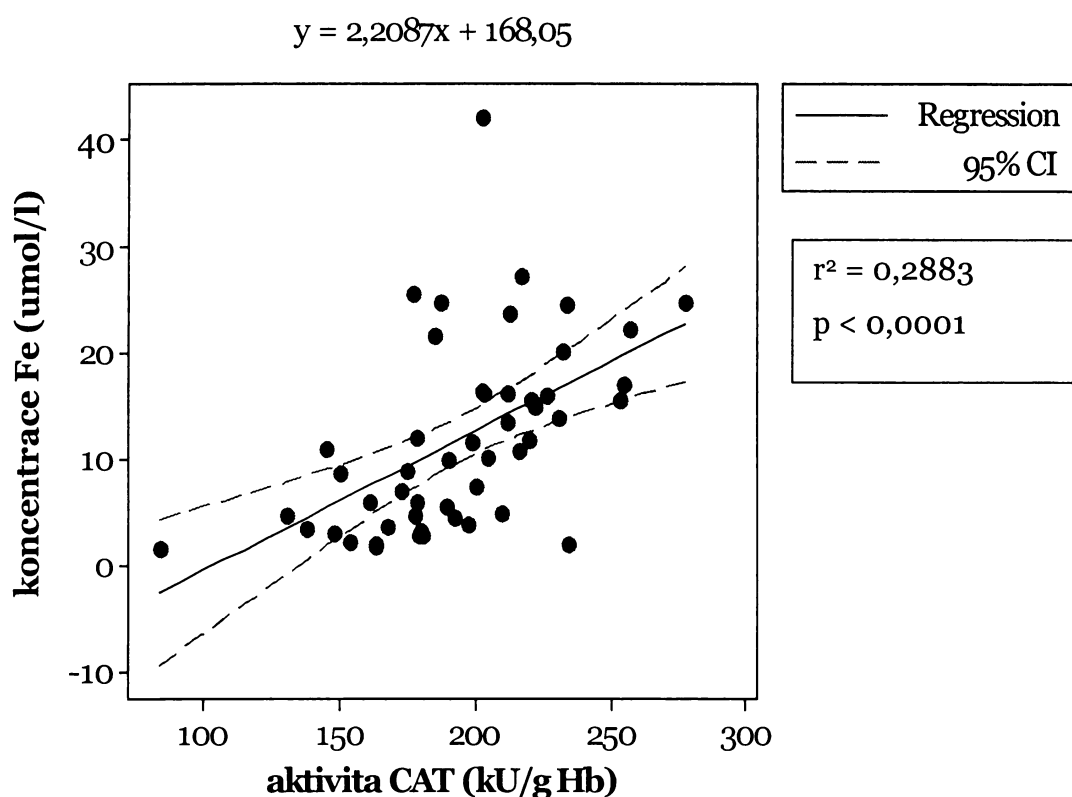


CRP... koncentrace C-reaktivního proteinu, CAT...katalasa, CI ... interval spolehlivosti

### 8.3.3 Korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací železa

Signifikantní korelace byla nalezena také mezi aktivitou katalasy a koncentrací železa ( $p < 0,0001$ ), graf 8-8 (str. 57).

Graf 8-8: Vzájemná korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací železa



CAT...katalasa, Fe...koncentrace sérového železa, CI ... interval spolehlivosti

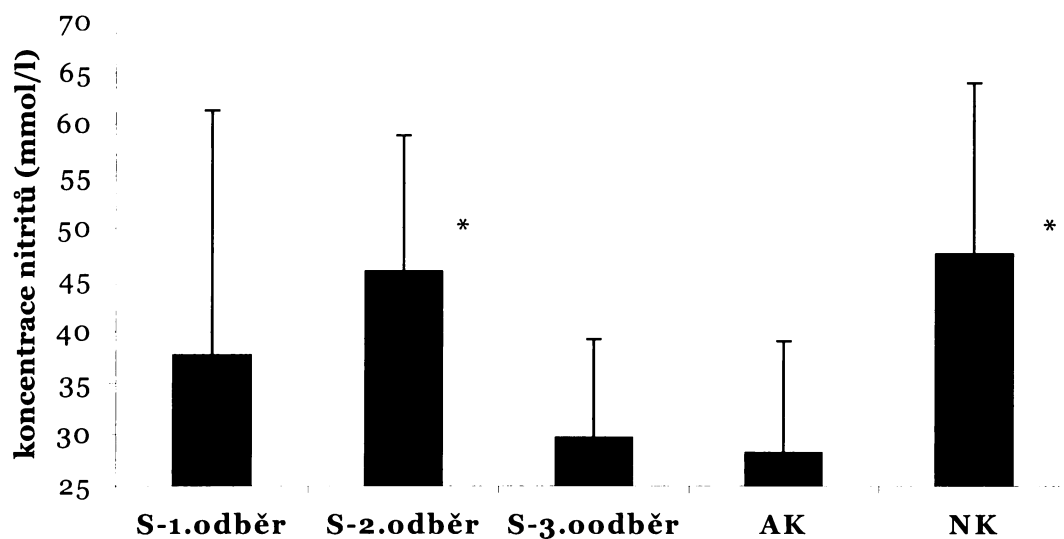
### 8.4 Celková koncentrace nitritů a nitrátů u pacientů v sepsi

Srovnání celkové koncentrace nitritů a nitrátů v séru u sledovaných skupin osob ukazuje tabulka 8-8 (str. 58) a graf 8-9 (str. 58). V průběhu nemoci dochází u septických pacientů k mírnému zvýšení celkové koncentrace nitritů a nitrátů mezi prvním a druhým odběrem, které však nedosahuje statistické významnosti. Septičtí pacienti mají při druhém odběru významně vyšší obsah nitritů a nitrátů v séru než



ambulantní kontroly ( $p < 0,05$ ). Statisticky významné rozdíly vůči skupině AK byly zjištěny i u skupiny NK ( $p < 0,05$ ).

Graf 8-9: Vliv sepse na celkovou koncentraci nitritů a nitrátů v séru



S... septičtí pacienti, AK ... ambulantní skupiny, NK ... neseptičtí kriticky nemocní pacienti

\* ( $p < 0,05$ ) označené skupiny vs. AK

Tabulka 8-8: Vliv sepse na celkovou koncentraci nitritů a nitrátů v séru

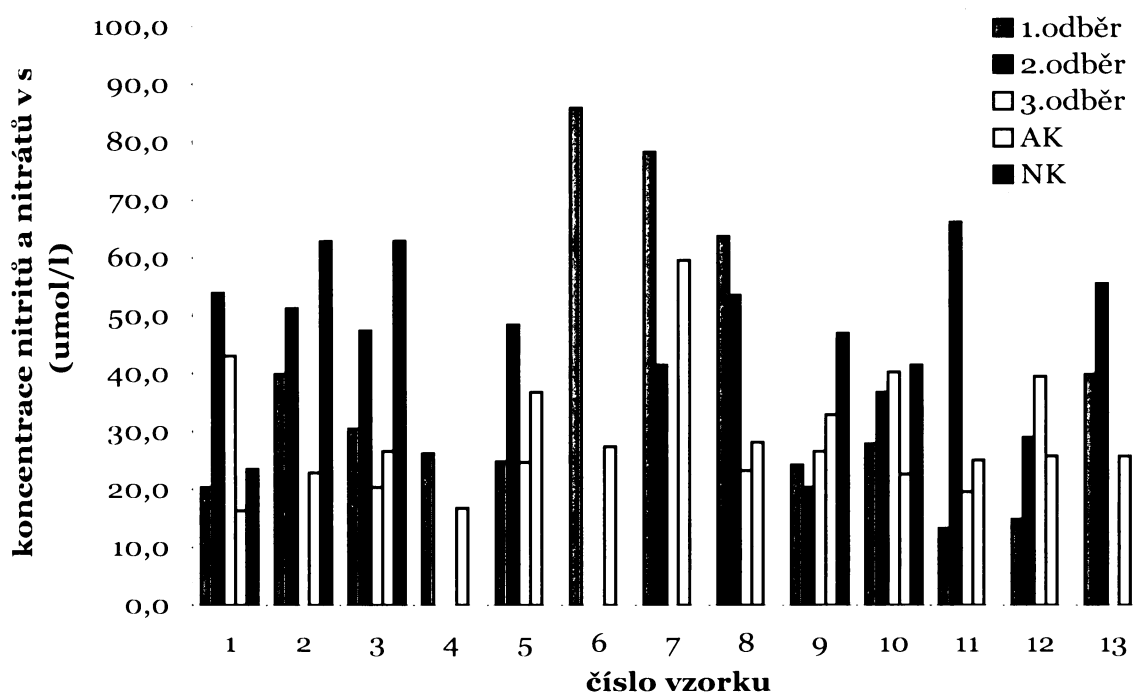
	Pacienti v sepsi 1. odběr (n = 13)	Pacienti v sepsi 2. odběr (n = 11)	Pacienti v sepsi 3. odběr (n = 8)	Ambulantní kontroly (n = 13)	Neseptičtí kriticky nemocní (n = 5)
<b>Koncentrace nitritů a nitrátů<sup>a</sup> (mmol/l séra)</b>	37,71 ± 23,65	45,85 * ± 13,07	29,69 ± 9,65	28,23 ± 10,93	47,58 * ± 16,51

<sup>a</sup>) průměr ± SD, n... označuje počet osob v dané skupině.

\* ( $p < 0,05$ ) označené skupiny vs. AK

Vývoj celkové koncentrace nitritů a nitrátů v průběhu sepse a její srovnání s kontrolními skupinami v jednotlivých případech znázorňuje graf 8-10 (str. 59). Celková koncentrace nitritů a nitrátů u septických pacientů v rámci druhého odběru je v 8 případech z 11 (72,7%) vyšší než v rámci prvního odběru týchž pacientů a v 9 případech z 11 (81,8%) vyšší než u ambulantních kontrol. Z 8 případů, kdy pacienti přežili a došlo k jejich uzdravení, tj. mohl být proveden 3. odběr, byla v 5 případech (62,5%) celková koncentrace nitritů a nitrátů po uzdravení nižší než v rámci druhého odběru. Srovnáváme-li septické pacienty v rámci prvního odběru s ambulantními kontrolami, pak v 9 případech ze 13 (69,2%) je celková koncentrace nitritů a nitrátů u septických pacientů vyšší.

Graf 8-10: Celková koncentrace nitritů a nitrátů v jednotlivých případech



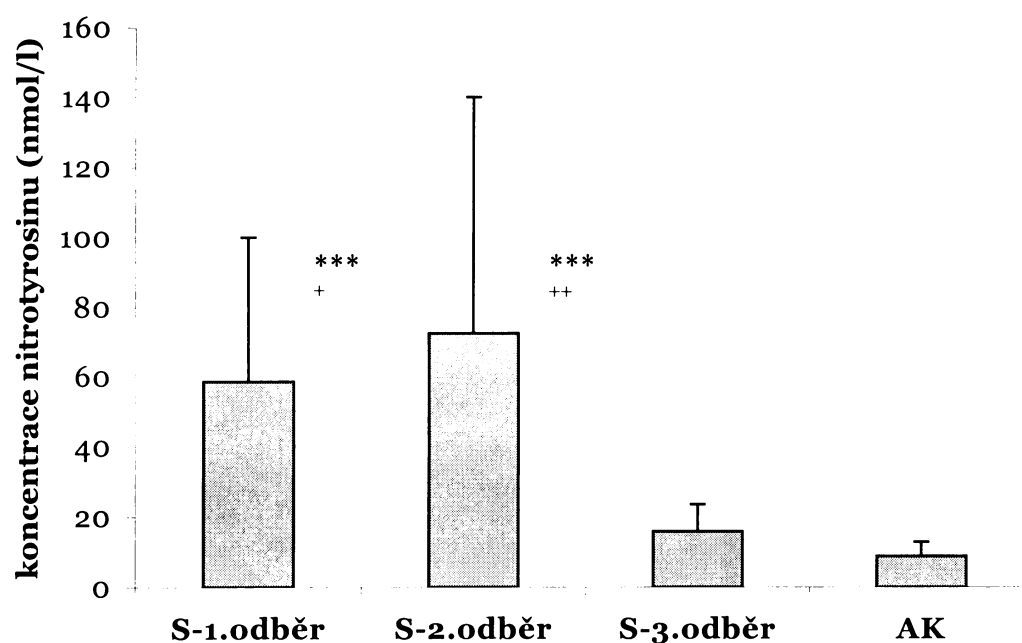
AK ... ambulantní skupiny, NK ... neseptičtí kriticky nemocní pacienti

## 8.5 Koncentrace nitrotyrosinu

### 8.5.1 Koncentrace nitrotyrosinu u pacientů v sepsi

Srovnání koncentrace nitrotyrosinu v plasmě u sledovaných skupin osob ukazuje tabulka 8-9 (str. 61) a graf 8-11 (str. 60). Koncentrace nitrotyrosinu v plasmě je zvýšena u pacientů v sepsi v porovnání s uzdravenými pacienty a s ambulantními kontrolami. Stejně jako celková koncentrace nitritů a nitrátů v séru, i koncentrace nitrotyrosinu v plasmě vykazuje vzrůstající tendenci v průběhu sepse.

Graf 8-11: Vliv sepse na koncentraci nitrotyrosinu v plasmě



S... septičtí pacienti, AK ... ambulantní skupiny

+ ( $p < 0,05$ ), ++ ( $p < 0,01$ ) označené skupiny vs. S-3. odběr

\*\*\* ( $p < 0,001$ ) označené skupiny vs. AK

Tabulka 8-9: Vliv sepsu na koncentraci nitrotyrosinu v plasmě

	<b>Pacienti v sepsi 1. odběr (n = 12)</b>	<b>Pacienti v sepsi 2. odběr (n = 9)</b>	<b>Pacienti v sepsi 3. odběr (n = 7)</b>	<b>Ambulantní kontroly (n = 12)</b>
<b>Koncentrace nitrotyrosinu<sup>a</sup> (nmol/l plasmy)</b>	58,58 *** ± 41,50 <sup>+</sup>	72,64 *** ± 67,48 <sup>++</sup>	15,96 ± 7,67	8,94 ± 4,02

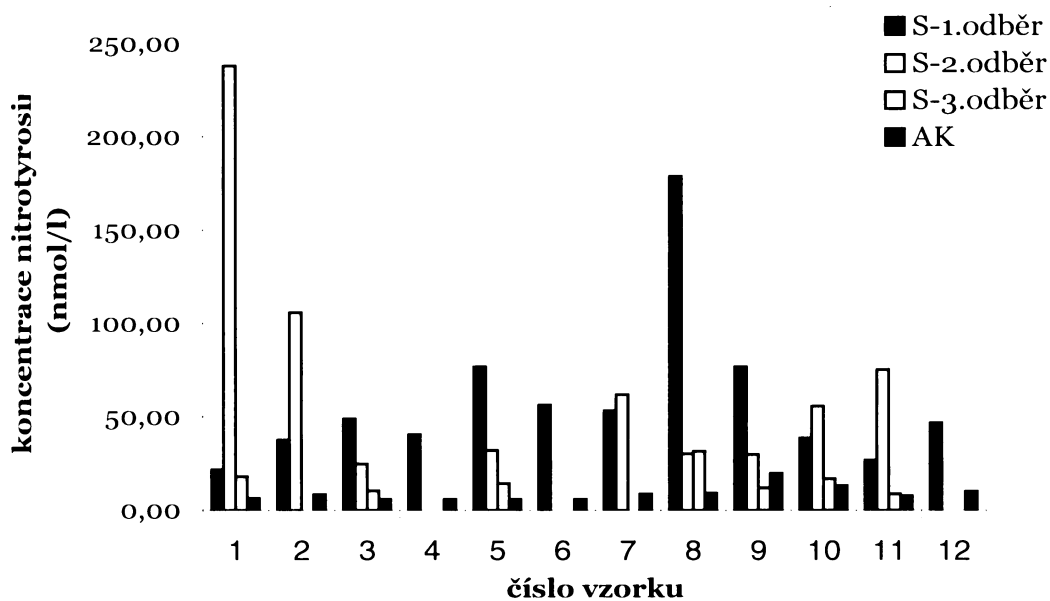
<sup>a</sup>) průměr ± SD, n... počet osob v dané skupině

<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ), <sup>++</sup> ( $p < 0,01$ ) označené skupiny vs. S-3. odběr

\*\*\* ( $p < 0,001$ ) označené skupiny vs. AK

Vývoj koncentrace nitrotyrosinu v průběhu sepsu a její srovnání s kontrolními skupinami v jednotlivých případech znázorňuje graf 8-12 (str. 61).

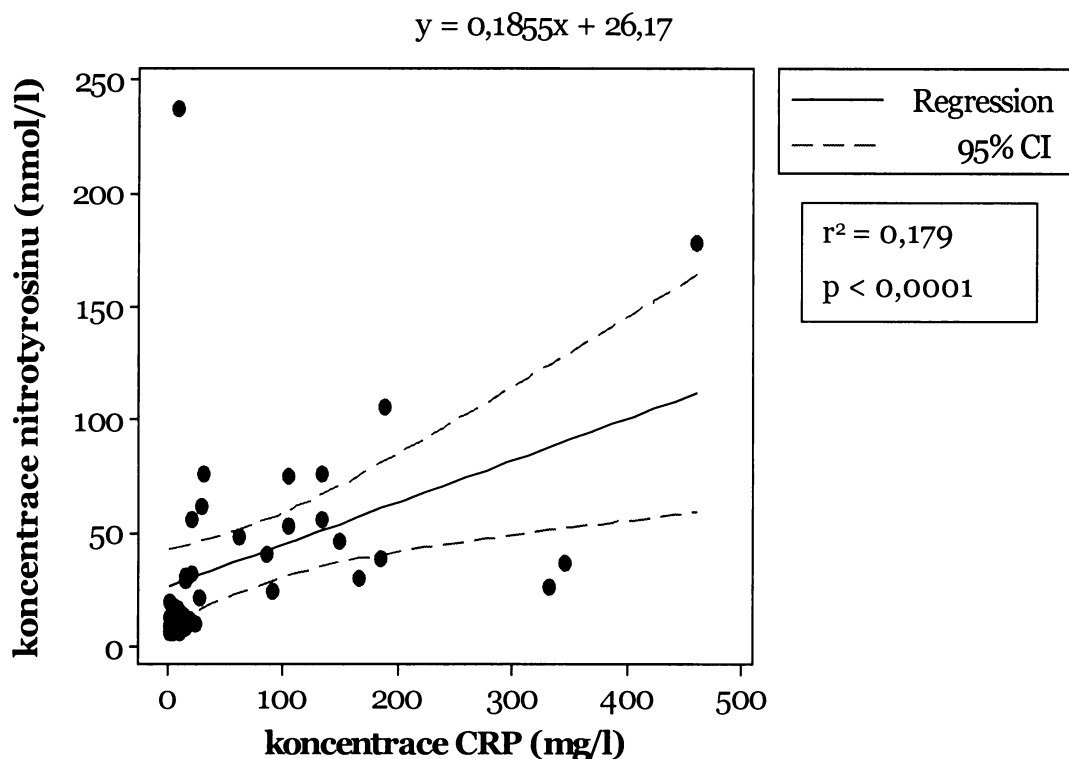
Graf 8-12: Koncentrace nitrotyrosinu v jednotlivých případech



S... septičtí pacienti, AK ... ambulantní skupiny

## 8.5.2 Korelace koncentrací nitrotyrosinu a C-reaktivního proteinu

Graf 8-13: Vzájemná korelace koncentrací nitrotyrosinu a CRP

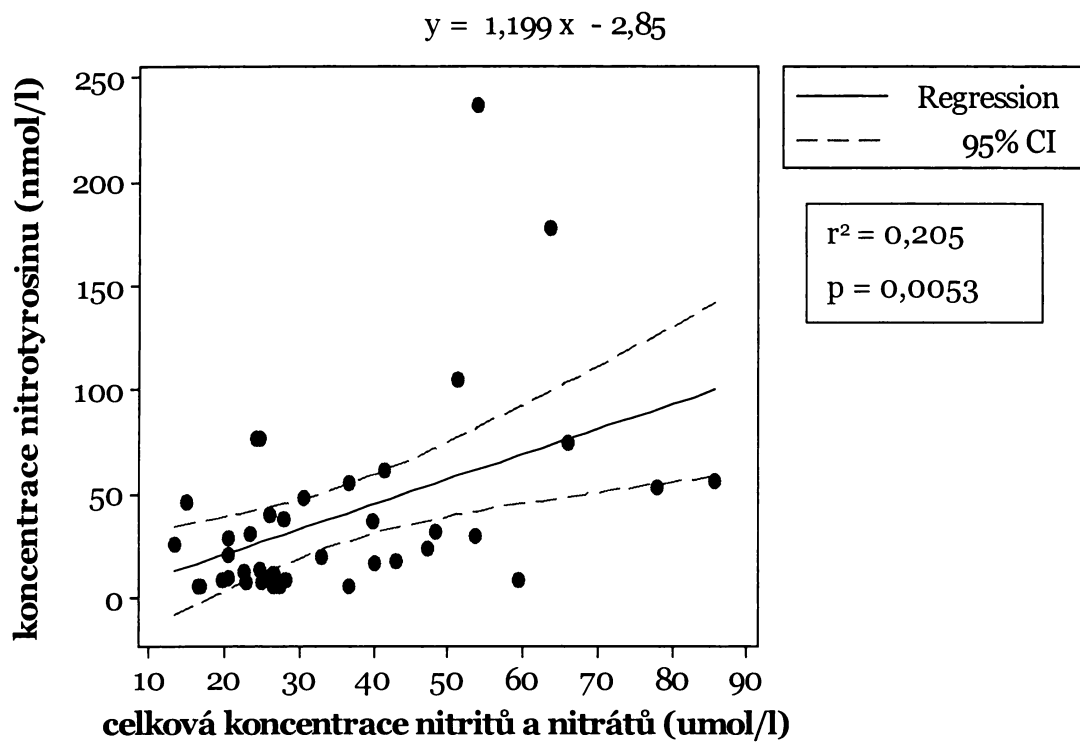


CRP... C-reaktivní protein, CI ... interval spolehlivosti

## 8.5.3 Korelace koncentrace nitrotyrosinu a celkové koncentrace nitritů a nitrátů

Byla sledována vzájemná korelace {graf 8-14 (str. 63)} mezi koncentrací nitrotyrosinu a celkovou koncentrací nitritů a nitrátů, konečných produktů metabolismu RNS. Mezi těmito dvěma parametry byla prokázána pozitivní korelace ( $p < 0,01$ ).

Graf 8-14: Korelace koncentrace nitrotyrosinu a celkové koncentrace nitritů a nitrátů



CI ... interval spolehlivosti

## 8.6 Sledované parametry v závislosti na pohlaví

U všech sledovaných parametrů byla zjišťována jejich rozdílnost mezi pohlavími, a to jak u septických pacientů, tak u ambulantních kontrol. Výsledky srovnání zobrazuje tabulka 8-10 (str. 64) a jak z této tabulky vyplývá, nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v hodnotách jednotlivých parametrů mezi muži a ženami.

Tabulka 8-10: Sledované parametry v závislosti na pohlaví

	S-1. ODBĚR		AK	
	MUŽI (n = 8)	ŽENY (n = 5)	MUŽI (n = 8)	ŽENY (n = 5)
<b>CRP<sup>a</sup></b> <b>(mg/l)</b>	168,85 ±110,85	203,64 ±185,64	5,26 ±3,82	2,64 ±0,82
<b>Fe<sup>a</sup></b> <b>(μmol/l)</b>	4,60 ±3,36	2,28 ±0,84	23,30 ±9,42	18,92 ±3,71
<b>Hb<sup>a</sup></b> <b>(g/l)</b>	104,49 ±16,93	92,40 ±11,39	140,75 ±18,07	131,40 ±4,93
<b>AKTIVITA CAT<sup>a</sup></b> <b>(kU/g Hb)</b>	163,56 ±17,60	160,58 ±53,63	216,05 ±29,78	238,10 ±23,53
<b>NOx<sup>a</sup></b> <b>(μmol/l)</b>	34,04 ±19,87	43,58 ±30,28	28,35 ±14,14	28,04 ±2,95
<b>NT<sup>a</sup></b> <b>(nmol/l)</b>	44,73 ±16,86	75,39 ±54,86	8,26 ±2,43	9,63 ±5,81

<sup>a)</sup> průměr ±SD

S-1. odběr ... skupina septických pacientů v rámci 1. odběru, AK ... skupina ambulantních kontrol, NOx... celková koncentrace nitritů a nitrátů v séru, NT... koncentrace nitrotyrosinu v plasmě, Hb... koncentrace hemoglobinu, CAT... katalasa, CRP ... koncentrace C- reaktivního proteinu, Fe... koncentrace sérového železa

## 8.7 Sledované parametry v závislosti na věku

Při sledování závislosti jednotlivých parametrů na věku byly osoby rozděleny do dvou věkových skupin: věk do 70 let ( $n = 7$ ) a věk nad 70 let ( $n = 6$ ) a dále bylo zachováno rozdělení na skupinu septických pacientů a na skupinu ambulantních kontrol. Tabulka 8-11 (str. 65) podává přehled o změnách jednotlivých parametrů v závislosti na věkové skupině sledovaných osob. U žádného ze sledovaných parametrů nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v hodnotách pro věkovou skupinu pod a nad 70 let a pro žádný sledovaný parametr nebyla zjištěna korelace mezi věkem a tímto parametrem.

Tabulka 8-11: Sledované parametry v závislosti na věku

	S-1. ODBĚR		AK	
	Do 70 let ( $n = 7$ )	Nad 70 let ( $n = 6$ )	Do 70 let ( $n = 7$ )	Nad 70 let ( $n = 6$ )
<b>CRP<sup>a</sup></b> <b>(mg/l)</b>	200,29 ±131,33	161,17 ±154,37	2,77 ±1,91	5,98 ±3,76
<b>Fe<sup>a</sup></b> <b>(μmol/l)</b>	4,80 ±3,62	2,43 ±0,62	24,81 ±8,46	17,88 ±5,48
<b>Hb<sup>a</sup></b> <b>(g/l)</b>	99,84 ±20,1	99,83 ±10,5	143,14 ±17,44	130,17 ±7,52
<b>AKTIVITA CAT<sup>a</sup></b> <b>(kU/g Hb)</b>	157,10 ±13,53	168,62 ±49,35	219,41 ±29,61	230,5 ±29,19
<b>NOx<sup>a</sup></b> <b>(μmol/l)</b>	35,69 ±20,95	40,07 ±28,35	29,40 ±14,15	26,87 ±6,5
<b>NT<sup>a</sup></b> <b>(nmol/l)</b>	45,22 ±17,3	69,79 ±51,34	10,42 ±5,08	7,24 ±1,82

<sup>a</sup>) průměr ±SD

S-1. odběr ... skupina septických pacientů v rámci 1. odběru, AK ... skupina ambulantních kontrol, NOx... celková koncentrace nitritů a nitrátů v séru, NT... koncentrace nitrotyrosinu v plasmě, Hb... koncentrace hemoglobinu, CAT... katalasa, CRP ... koncentrace C- reaktivního proteinu, Fe... koncentrace sérového železa



## 8.8 Sledované parametry a zdroj sepse

U skupiny septických pacientů byl zjišťován původ/zdroj infekce. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin: zdroj infekce – plíce (n = 7) a zdroj infekce – jiné orgány (n = 6). Mezi těmito dvěma skupinami nebyl nalezen rozdíl v hodnotách jednotlivých parametrů, což dokládá tabulka 8-12 (str. 66).

Tabulka 8-12: Sledované parametry a zdroj sepse

ZDROJ SEPSE	PLÍCE (n = 7)	JINÝ ORGÁN (n = 6)
CRP <sup>a</sup> (mg/l)	154,54 ±88,12	214,53 ±184,04
Fe <sup>a</sup> (μmol/l)	3,37 ±2,51	4,10 ±3,44
Hb <sup>a</sup> (g/l)	100,99 ±15,72	98,50 ±17,17
AKTIVITA CAT <sup>a</sup> (kU/g Hb)	157,56 ±33,89	168,08 ±35,92
NOx <sup>a</sup> (μmol/l)	31,94 ±24,71	44,43 ±22,57
NT <sup>a</sup> (nmol/l)	47,81 ±15,79	71,07 ±57,91

a) průměr ±SD

NOx... celková koncentrace nitritů a nitrátů v séru, NT... koncentrace nitrotyrosinu v plasmě, Hb... koncentrace hemoglobinu, CAT... katalasa, CRP ... koncentrace C-reaktivního proteinu, Fe... koncentrace sérového železa

## 8.9 Korelace jednotlivých parametrů s APACHE II skóre

U skupiny septických pacientů byly zjišťovány vzájemné korelace jednotlivých parametrů s hodnotou APACHE II skóre. Tabulka 8-13 (str. 67) ukazuje, že žádný z parametrů nekoreluje s hodnotou APACHE II skóre.

Tabulka 8-13: Korelace sledovaných parametrů a APACHE II

	<b>r</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>p</b>
<b>CRP</b>	0,488	0,238	0,090
<b>Fe</b>	-0,476	0,227	0,100
<b>Hb</b>	-0,250	0,063	0,410
<b>CAT</b>	-0,044	0,002	0,886
<b>NOx</b>	-0,458	0,210	0,116
<b>NT</b>	-0,464	0,215	0,128

*r ... Pearsonův korelační koeficient*

*korelace APACHE II vs. NOx... celková koncentrace nitritů a nitrátů v séru, NT...*

*koncentrace nitrotyrosinu v plasmě, Hb... koncentrace hemoglobinu, CAT...*

*katalasa, CRP ... koncentrace C- reaktivního proteinu, Fe... koncentrace sérového*

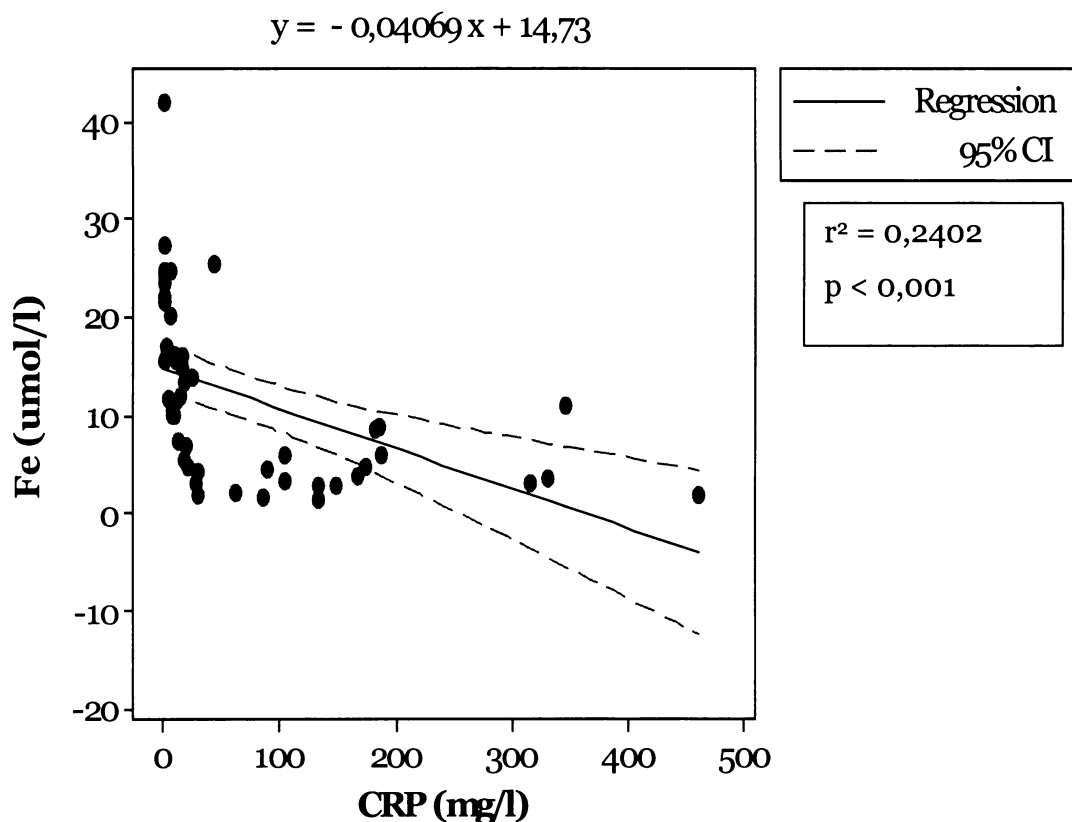
*železa*

## 8.10 Korelace sledovaných parametrů mezi sebou

Dále byla zjišťována korelace sledovaných parametrů mezi sebou. Korelace CRP s aktivitou CAT {graf 8-7 (str. 56)} a koncentrací nitrotyrosinu {graf 8-13 (str. 62)} byla již probrána při hodnocení aktivity CAT a koncentrace nitrotyrosinu. Vzájemná korelace koncentrací nitritů a nitrátů a nitrotyrosinu {graf 8-14 (str. 63)} byla diskutována u hodnocení koncentrace nitrotyrosinu. V této části budou zhodnoceny zbylé závislosti.

### 8.10.1 Korelace mezi koncentracemi železa a C-reaktivního proteinu

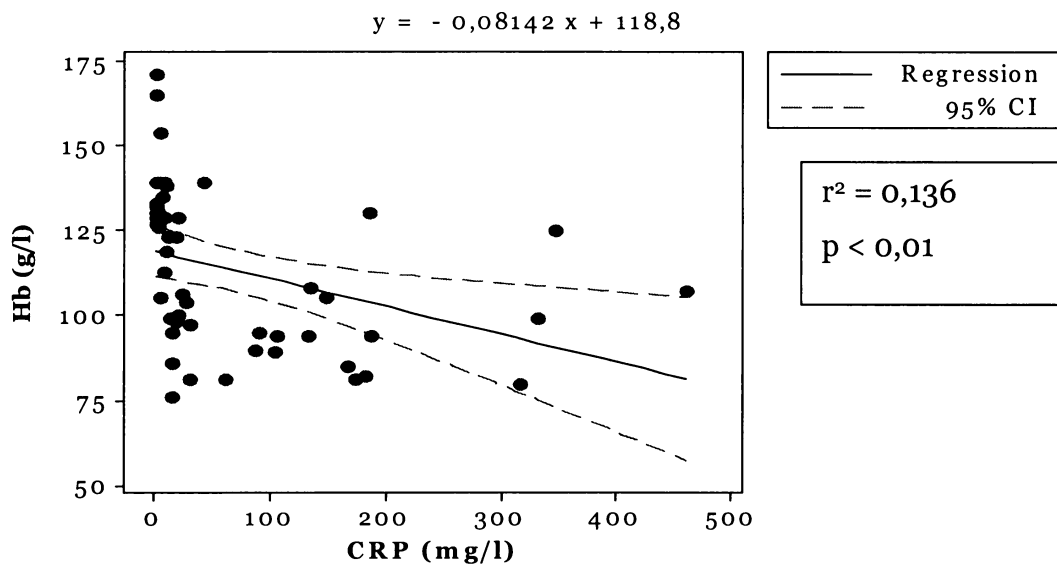
Graf 8-15: Korelace mezi koncentracemi železa a CRP



CRP... koncentrace C-reaktivního proteinu, Fe... koncentrace sérového železa, CI ... interval spolehlivosti

### 8.10.2 Korelace mezi koncentracemi C-reaktivního proteinu a hemoglobinu

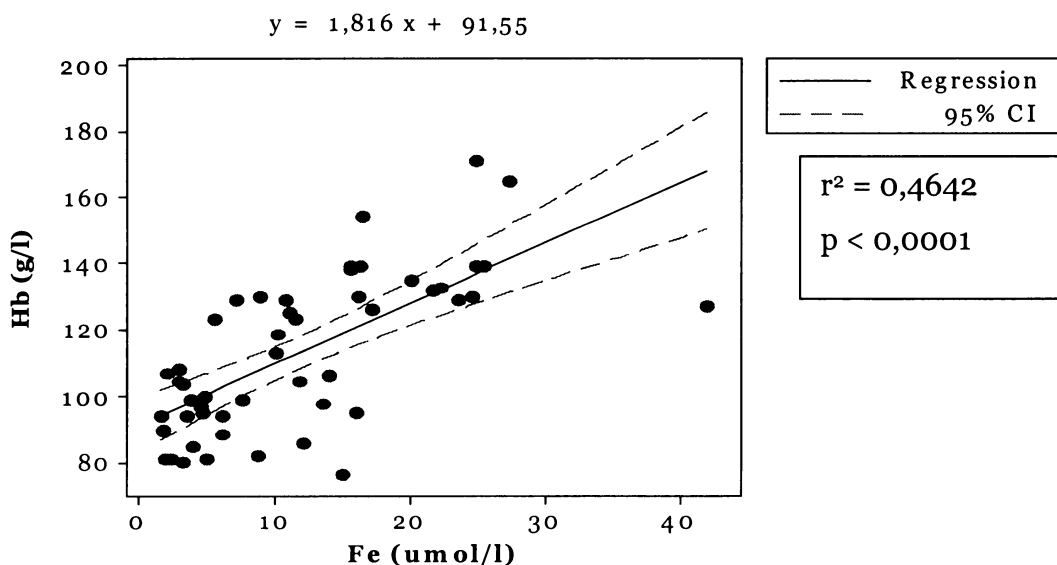
Graf 8-16: Korelace mezi koncentracemi CRP a hemoglobinu



Hb ... koncentrace hemoglobinu, CRP... koncentrace C-reaktivního proteinu , CI ... interval spolehlivosti

### 8.10.3 Korelace mezi koncentracemi hemoglobinu a železa

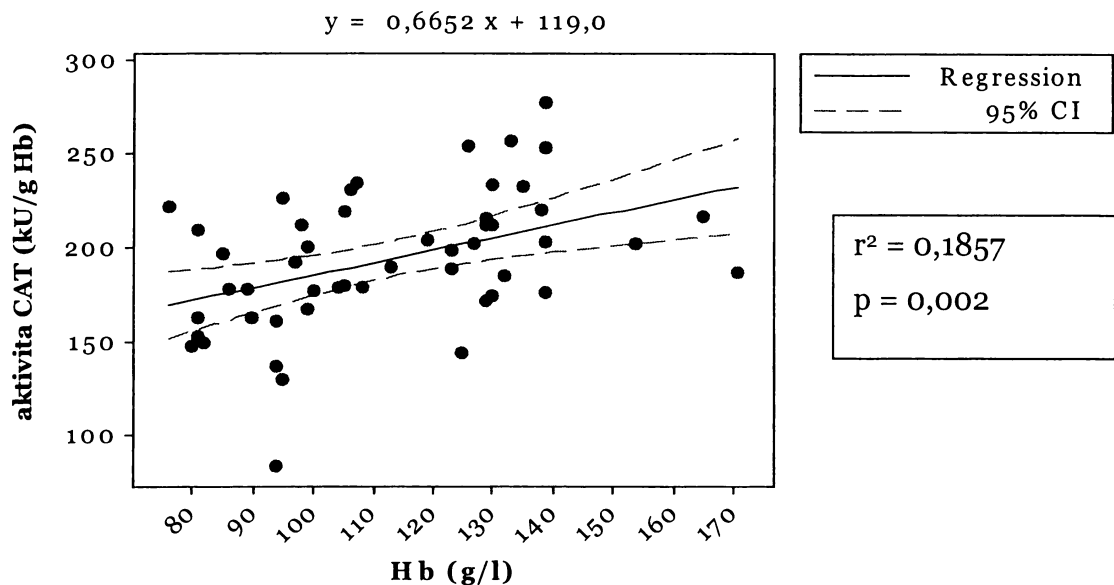
Graf 8-17: Korelace mezi koncentracemi hemoglobinu a železa



Hb ... koncentrace hemoglobinu, Fe... koncentrace sérového železa, CI ... interval spolehlivosti

### 8.10.4 Korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací hemoglobinu

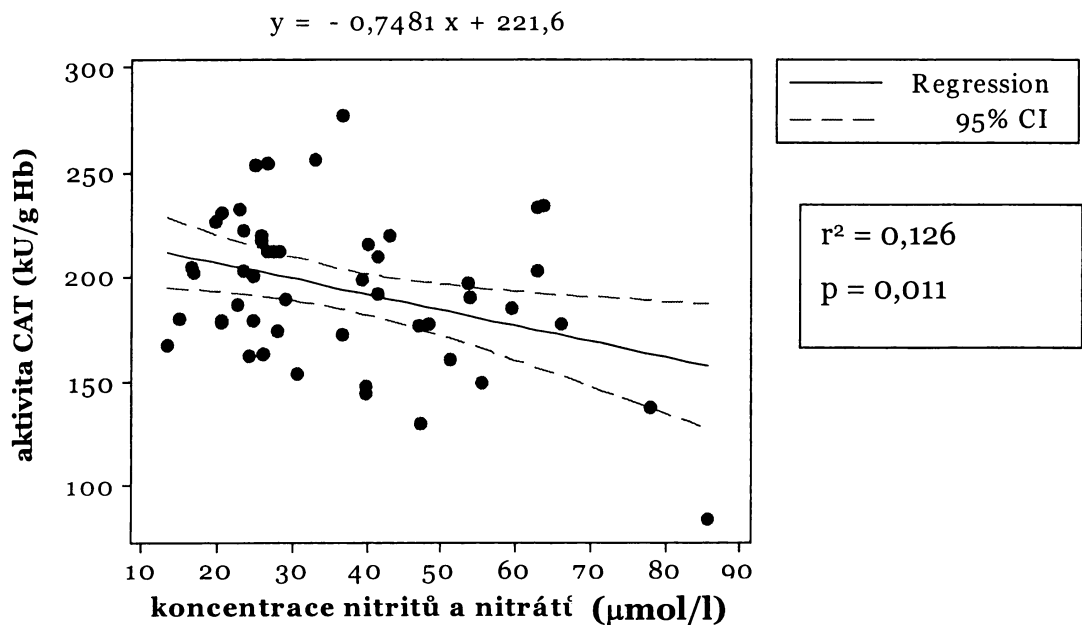
Graf 8-18: Korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací hemoglobinu



Hb ... koncentrace hemoglobinu, CAT... katalasa, CI ... interval spolehlivosti

### 8.10.5 Korelace mezi aktivitou katalasy a celkovou koncentrací nitritů a nitrátů

Graf 8-19: Korelace mezi aktivitou CAT a celkovou koncentrací nitritů a nitrátů



CAT... katalasa, CI ... interval spolehlivosti

## 9 DISKUSE

V rámci této diplomové práce byla stanovována aktivita katalasy v erythrocytech, celková koncentrace nitritů a nitrátů v séru a koncentrace nitrotyrosinu v plasmě za podmínek oxidačního stresu, který souvisel se septickým stavem. Podkladem pro stanovení aktivity CAT byla práce Aebiho a spolupracovníků [1]. Při zavádění metody však bylo zjištěno, že některé faktory, na kterých závisí kinetika enzymové reakce, nebyly v této práci dostatečně popsány. Proto bylo nutno upravit reakční podmínky. Byla určena optimální teplota stanovení, koncentrace enzymu a koncentrace substrátu (peroxidu vodíku).

Metoda pro stanovení celkové koncentrace nitritů a nitrátů v séru byla převzata z práce Guevary [30] a pro stanovení koncentrace nitrotyrosinu byl použit komerčně dodávaný ELISA – kit.

### 9.1 *Optimalisace stanovení aktivity katalasy*

Teplota publikovaná pro měření aktivity CAT je 25°C [1]. Z výsledků uvedených v tabulce 8-4 (str. 49) vyplývá, že aktivita CAT dosahuje svého maxima při teplotě 30°C a při této teplotě je signifikantně vyšší než při 25°C. V rámci této klinické studie byla pro měření aktivity katalasy zvolena teplota 30°C. V publikované práci, ze které bylo čerpáno, byla měření prováděna při teplotě 25°C, aniž by byl předem vliv teploty otestován.

U studovaných souborů byl předpokládán velký rozsah aktivity CAT, což se během finálního měření enzymové aktivity potvrdilo. K zajištění optimálních podmínek byly určeny meze linearit pro koncentraci hemolysátu, jak ukazuje graf 8-1 (str. 47), a z nich pak zvoleny dvě optimální koncentrace pro vlastní měření. Pokud v případě vzorku s vysokou aktivitou nebyl mezi oběma stanoveními lineární vztah, bylo stanovení okamžitě opakováno s nižší koncentrací hemolysátu. Závěrem lze říci, že používání jediné koncentrace hemolysátu je vhodné pro soubory s úzkým rozmezím aktivit, zatímco při měření, kde se předpokládají velké rozdíly mezi jednotlivými vzorky, je nezbytné vycházet alespoň ze dvou koncentrací hemolysátu.

Dále byly stanoveny kinetické parametry pro katalasu, a to hodnota Michaelisovy konstanty a hodnota maximální rychlosti reakce uvedené

v tabulce 8-3 (str. 49). V publikované literatuře [87] je na základě vysokého poměru katalytické a Michaelisovy konstanty katalasa zařazena mezi enzymy, které dosáhly tzv. katalytické dokonalosti, což znamená, že katalysují reakci téměř při každém střetnutí se substrátem.

## **9.2 Výsledky klinické studie**

V presentované studii byl hodnocen vliv oxidačního stresu vyvolaného sepsí na některé klinicko-biochemické parametry (aktivita CAT, koncentrace nitritů a nitrátů, koncentrace nitrotyrosinu, koncentrace železa a koncentrace hemoglobinu). Pacienti v sepsi byly srovnávány s dvěma kontrolními skupinami, a to se skupinou ambulantních kontrol a skupinou neseptických kriticky nemocných pacientů. Při zařazování osob do kontrolních skupin bylo dodržováno obecně požadované kritérium odpovídajícího věku a pohlaví.

Septičtí pacienti byly vybíráni na základě hodnot APACHE II skóre a hodnot koncentrací CRP v séru, který je v klinické diagnostice využíván jako vysoce citlivý indikátor zánětu [61; 65]. Pro přijetí do skupiny septických pacientů byla vyžadována koncentrace CRP nad 20 mg/l, dosaženo bylo průměrné koncentrace  $182,23 \pm 137,71$  mg/l, která byla signifikantně vyšší než u ambulantních kontrol. V průběhu uzdravování následoval pokles hodnot CRP na hodnoty blízké fyziologickému rozmezí.

Ve shodě s literárními údaji byly plíce ve sledovaném souboru nejčastějším místem primární infekce [52]. Plicní infekce byla rovněž jednou z příčin sepse u pacientů s více zdroji infekce, což potvrdilo, že plíce jsou nejrizikovějším orgánem pro rozvoj septického stavu.

Ve studii byly prokázány snížené hodnoty aktivity CAT v počátcích sepse oproti ambulantním kontrolám ( $p < 0.001$ ), v průběhu uzdravování byl zaznamenán trend růstu hodnot aktivity CAT a pacienti po uzdravení dosahovali hodnot srovnatelně vysokých s ambulantními kontrolami. Hodnoty aktivit katalasy neseptických kriticky nemocných pacientů se nelišili od aktivit ambulantních kontrol.

Existuje pouze jedna práce [89], která hodnotí aktivitu CAT v erythrocytech u dospělých pacientů v sepsi popř. septickém šoku. Warner a spolupracovníci [89] publikovali, že dochází ke zvýšení aktivity CAT v erythrocytech u takto kriticky nemocných pacientů. Další publikace, které by se zabývaly vlivem sepse na aktivitu

CAT v erythrocytech nebyly nalezeny. Jelikož v patogenesi sepse a septického šoku, podobně jako u ostatních patologických stavů, hraje důležitou roli nerovnováha mezi tvorbou RONS a kapacitou antioxidantního systému, tj. vznik oxidačního stresu [38], byly konfrontovány další publikované práce zabývající se vlivem oxidačního stresu na aktivitu CAT v erythrocytech. Z nalezených prací vyplývá značná nejednotnost v publikovaných změnách aktivity CAT při oxidačním stresu. Některé práce uvádějí její vzestup [35; 43; 44; 73], jiné ve shodě s dosaženými výsledky její pokles [7; 9; 28; 29; 41; 47; 58; 63; 72; 75; 83; 85; 92].

Tato studie naznačuje, že snížení aktivity CAT v erythrocytech by mohlo sloužit jako marker závažnosti stavu pacienta, protože byla pozorována negativní korelace mezi koncentrací CRP a aktivitou CAT ( $p < 0.01$ ) a dále u zemřelých pacientů byly pozorovány nejnižší aktivity CAT ze všech sledovaných osob. Definitivní závěr by vyžadoval studii se souborem většího počtu septicky nemocných.

Celková koncentrace nitritů a nitrátů v séru vykazovala vzrůstající trend v průběhu sepse, jak ukazuje graf 8-9 (str. 58) a v rámci druhého odběru septických pacientů byly zjištěny významně vyšší hodnoty než u ambulantních kontrol. S uzdravením pacientů došlo k poklesu koncentrací nitritů a nitrátů na hodnoty srovnatelné s ambulantními kontrolami. Naše výsledky jsou ve shodě s prací Mutakiho [59], který rovněž uvádí vzestup celkové koncentrace nitritů a nitrátů u septických stavů.

U sledovaných septických pacientů byl zjištěn trend vzrůstající koncentrace nitrotyrosinu v plasmě v průběhu sepse. Hodnoty dosahované během sepse byly vyšší než hodnoty ambulantních kontrol i septických pacientů po uzdravení. Změnami koncentrací nitrotyrosinu v sepsi se zabývala práce Ohyi a spolupracovníků [62], kteří sledovali vzestup hladin nitrotyrosinu u tohoto onemocnění.

Nitrity a nitráty stejně jako nitrotyrosin jsou konečnými produkty odbourávání dusíkového radikálu, oxidu dusnatého. Oxid dusnatý je v organismu syntetisován z argininu prostřednictvím nitroxidsynthasy. Během zánětu dochází k indukci inducibilní nitroxidsynthasy, což má za následek až tisícinásobné zvýšení produkce oxidu dusnatého v organismu. Jelikož sepse je systém zánětlivé odpovědi organismu, jejíž příčinou je infekce, byly zvýšené hladiny koncentrací nitrotyrosinu a nitritů a nitrátů v sepsi očekávány a tato studie očekávání potvrdila.

Mezi koncentracemi nitritů a nitrátů a nitrotyrosinu byla zjištěna pozitivní korelace a dále koncentrace nitritů a nitrátů negativně korelovala s aktivitou CAT.



Korelace aktivity katalasy a celkové koncentrace nitritů a nitrátů se očekávala, neboť zvýšená koncentrace volného radikálu NO má za následek vazbu NO s katalasou a tím i její inaktivaci [67].

V této studii jsme neprokázali závislost aktivity CAT v erythrocytech, koncentrace nitrotyrosinu v plasmě, celkové koncentrace nitritů a nitrátů v séru a klinicko-biochemických parametrů (koncentrace CRP, koncentrace hemoglobinu, koncentrace železa) ani na věku, ani na pohlaví a ani na APACHE II skóre sledovaných osob. Závislost jednotlivých parametrů na věku mohla být zkreslena malým souborem osob s úzkým rozpětím věku (6 osob ze 13 bylo nad 70 let). U ambulantních kontrol byl pozorován trend zvyšující se koncentrace sérového CRP s věkem, k potvrzení tohoto trendu by bylo zapotřebí většího a věkově rozmanitějšího souboru osob. V publikované literatuře [57] byla popsána zvyšující se koncentrace CRP s věkem.

Zdroj infekce rovněž neměl vliv na hodnoty stanovovaných parametrů. Byla však nalezena korelace mezi studovanými parametry a koncentrací CRP v séru (s výjimkou celkové koncentrace nitritů a nitrátů), a to pozitivní u koncentrace nitrotyrosinu a negativní u aktivity CAT, koncentrace železa v séru a koncentrace hemoglobinu.

Dále byly nalezeny pozitivní korelace mezi koncentrací železa a aktivitou CAT, což by se dalo vysvětlit tím, že katalasa je enzym obsahující ve svém katalytickém centru vázaný ion  $Fe^{3+}$  a při nedostatku železa v organismu může být snížena i její aktivita. Jiný způsob, jak by železo mohlo ovlivnit katalasu, je ovlivnění tvorby červených krvinek, kde je katalasa lokalizována v cytosolu. Železo je klíčovou složkou nutnou pro tvorbu krevního barviva hemoglobinu a tedy i klíčovou složkou při tvorbě červených krvinek. Tato studie potvrdila pozitivní korelaci mezi koncentrací železa a koncentrací hemoglobinu a dále prokázala pozitivní korelaci aktivity CAT a koncentrace hemoglobinu.

## 10 ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem optimalisovala podmínky stanovení aktivity CAT v erythrocytech. Stanovila jsem optimální teplotu pro měření enzymové aktivity CAT, zjistila jsem rozmezí lineární závislosti rychlosti reakce na koncentraci CAT a dále jsem určila kinetické parametry charakteristické pro tento enzym.

Klinická studie, která sledovala koncentraci nitrotyrosinu v plasmě, celkovou koncentraci nitritů a nitrátů v séru a aktivitu CAT v erythrocytech u pacientů v průběhu a po odeznění sepse, ukázala nárůst koncentrace jak nitrotyrosinu v plasmě, tak nitritů a nitrátů v séru, a dále pokles aktivity CAT v erythrocytech v septickém stavu. Po vymizení příznaků sepse se hladiny produktů reaktivních forem dusíku a aktivita antioxidačního enzymu CAT vrátily k hodnotám zdravých osob. Neseptičtí kriticky nemocní pacienti měli aktivitu CAT srovnatelnou se zdravými kontrolami, ale celková koncentrace nitritů a nitrátů byla u této kontrolní skupiny signifikantně vyšší.

Pokles aktivity CAT negativně koreloval s koncentracemi CRP v séru a pozitivně koreloval s koncentrací sérového železa. Positivní korelace byla také prokázána mezi koncentracemi nitrotyrosinu a nitritů a nitrátů. Koncentrace nitrotyrosinu v plasmě vykazovala pozitivní korelaci s koncentrací CRP v séru.

Dle mého názoru je nutné ve výzkumu vlivu sepse na hodnoty koncentrací nitritů a nitrátů a nitrotyrosinu a na hodnoty aktivity CAT dále pokračovat a mnou získané výsledky ověřit na větším souboru pacientů. Do budoucnosti by stanovení těchto parametrů mohlo významně pomoci v diagnostice sepse.

## 11 SUMMARY

In recent years, one of the most frequent and serious complications in traumatology and surgery is sepsis; sepsis often leads to septic shock or eventual multiple organ failure, which is a common cause of death in the intensive care patients. In pathogenesis, an imbalance between the production of reactive oxygen and nitrogen species and the capacity of an antioxidation system are the major factors in causing sepsis and septic shock.

The core of my work was to establish a quantitative end-product of metabolism of the reactive form of nitrogen, i.e. the overall concentration of nitrite and nitrate and concentration of nitrotyrosine in blood, and also set the level of activity for antioxidation enzyme catalasa within the erythrocytes of three groups of patients. This involved a group of septic diagnosed patients ( $n = 13$ ) who had blood samples taken three times in the first twenty-four hours, then after seven days of treatment and, finally, after recovery. Further, two control groups were included: a group of healthy people ( $n = 13$ ), and a group of nonseptic, critically ill patients ( $n = 5$ ).

The overall concentration of nitrite and nitrate was established using the Griess reaction with a following spectrophotometrical detection. The concentration of nitrotyrosine in the blood plasma was measured using the ELISA method, and the activity of catalase was measured spectrophotometrically. The seriousness of the septic state was evaluated on the basis of serum CRP concentration.

The results of the measurements revealed that the total concentration of nitrite and nitrate in blood serum increases during the course of sepsis; the highest level was reached during the second blood sampling from the septic patients, i.e. seven days after the emergence of sepsis. These measurements were significantly higher than the measurements of patients after the third blood tests, i.e. after recovery ( $p = 0.0133$ ) and the control group of healthy people ( $p = 0.005$ ). Likewise, the concentration of nitrotyrosine in plasma was increasingly higher in the first and second blood samples of the septic patients in comparison with the group of healthy people ( $p < 0.0001$ ). The activity of catalase negatively correlated with the serum CRP concentration and positively correlated with the concentration of iron in the serum.

The work confirmed the importance of observing oxidation stress markers in clinical practice.

## 12 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

1. Aebi H. (1974) *Methods of enzymatic analysis* 3, 673-684
2. Agrawal A., Samols D. & Kushner I. (2003) *Mol.Immunol.* 40, 373-380
3. Agrawal A., Shrive A.K., Greenhough T.J. & Volanakis J.E. (2001) *J.Immunol.* 166, 3998-4004
4. Alonso de Vega J.M., Díaz J., Serrano E. & Carbonell L.F (2002) *Crit.Care Med.* 30, 1782-1786
5. Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J. & Pinsky M.R. (2001) *Crit Care Med.* 29, 1303-1310
6. Arroyo C.M. & Kohno M. (1991) *Free Radic.Res.Comm.* 14, 145-155
7. Atalay M., Laaksonen D.E., Niskanen L., Uusitupa M., Hanninen O. & Sen C.K. (1997) *Acta Physiol Scand.* 161, 195-201
8. Babior B.M. (2000) *Am.J.Med.* 109, 33-44
9. Bhatia S., Shukla R., Venkata M.S., Kaur G.J. & Madhava P.K. (2003) *Clin.Biochem.* 36, 557-562
10. Billiar T.R. (1995) *Ann.Surg.* 221, 339-349
11. Black S., Agrawal A. & Samols D. (2003) *Mol.Immunol.* 39, 1045-1054
12. Black S., Kushner I. & Samols D. (2004) *J.Biol.Chem.* 279, 48487-48490
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) *Chest* 101, 1644-1655
14. Bulger E.M. & Maier R.V. (2001) *Arch.Surg.* 136, 1201-1207
15. Carvalho F.A., Martins-Silva J. & Saldanha C. (2004) *Biosens.Bioelectron.* 20, 505-508
16. Ceriello A., Mercuri F., Quagliaro L., Assaloni R., Motz E., Tonutti L. & Taboga C. (2001) *Diabetologia* 44, 834-838
17. Clyne B. & Olshaker J.S. (1999) *J.Emerg.Med.* 17, 1019-1025
18. Crkovska J. & Štípek S. (1998) *Klin.Biochem.Metab.* 82-87
19. DeLeo F.R., Renee J., McCormick S., Nakamura M., Apicella M., Weiss J.P. & Nauseef W.M. (1998) *J.Clin.Invest.* 101, 455-463
20. Duong T., Acton P.J. & Johnson R.A. (1998) *Brain Res.* 813, 303-312

21. Černý K., Novák I. & Cvachovec K. (2002) in: *seps v intenzivní péči*, Maxdorf, Praha,
22. Farrell A.J. & Blake D.R. (1996) *Ann.Rheum.Dis.* 55, 7-20
23. Freeman B.D., Reaume A.G., Swanson P.E., Epstein C.J., Carlson E.J., Buchman T.G., Karl I.E. & Hotchkiss R.S. (2000) *Crit.Care Med.* 28 , 1701-1708
24. Frost M.T., Halliwell B. & Moore K.P. (2000) *Biochem.J.* 345 Pt 3, 453-458
25. Galley H.F., Davies M.J. & Webster N.R. (1995) *Free Radic.Biol.Med.* 20, 139-143
26. Galley H.F. & Webster N.R. (1996) *Intensive Care Med.* 22, 226-229
27. Galli F., Canestrari F. & Buoncristiani U. (1999) *Blood Purif.* 17, 79-94
28. Goth L., Lenkey A. & Bigler W.N. (2001) *Diabetes Care* 24, 1839-1840
29. Goth L. & Vitai M. (1996) *Clin.Chem.* 42, 341-342
30. Guevara I., Iwanejko J., Dembinska-Kiec A., Pankiewicz J., Wanat A., Anna P., Golabek I., Bartus S., Malczewska-Malec M. & Szczudlik A. (1998) *Clin.Chim.Acta* 274, 177-188
31. Gurlich R., Maruna P., Cermak J., Vyborny J. & Masek Z. (1993) *Rozhl.Chir* 72, 235-238
32. Gutteridge J.M. & Mitchell J. (1999) *Br.Med.Bull.* 55, 49-75
33. Gutteridge J.M. & Mitchell J. (1998) *Br.Med.Bull.* 45, 75-78
34. Heinzl B., John M., Klatt P., Bohme E. & Mayer B. (1992) *Biochem.J.* 281 ( Pt 3), 627-630
35. Herken H., Uz E., Ozyurt H., Sogut S., Virit O. & Akyol O. (2001) *Mol.Psychiatry* 6, 66-73
36. Higgins T.L. Severity of illness and outcome prediction: Development and evaluation. Textbook of critical care Shoemaker W.C., Ayres S.M., Grenvik A., and Holbrook P.R. ed., 2069-2083. 2000.  
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
37. Holeček V., Racek J. & Jeřábek Z. (1994) *Klin.Biochem.Metab.* 2, 19-22
38. Holeček V., Racek J. & Liška J. (2003) *Klin.Biochem.Metab.* 12, 101-105
39. Horan T.C., Gaynes R.P., Martone W.J., Jarvis W.R. & Emori T.G. (1992) *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* 13, 606-608
40. Hynková Magdaléna. Diplomová práce 2003.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

41. Kedziora-Kornatowska K.Z., Luciak M., Blaszczyk J. & Pawlak W. (1998) *Nephrol.Dial.Transplant.* 13, 2829-2832
42. Kehrer J.P. (1993) *Crit Rev.Toxicol.* 23, 21-48
43. Kesavulu M.M., Giri R., Kameswara R.B. & Apparao C. (2000) *Diabetes Metab* 26, 387-392
44. Kesavulu M.M., Rao B.K., Giri R., Vijaya J., Subramanyam G. & Apparao C. (2001) *Diabetes Res.Clin.Pract.* 53, 33-39
45. Kirkman H.N. & Gaetani G.F. (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 81, 4343-4347
46. Knaus W.A., Draper E.A., Wagner D.P. & Zimmerman J.E. (1985) *Crit Care Med.* 13, 818-829
47. Komosinska-Vassev K., Olczyk K., Olczyk P. & Winsz-Szczotka K. (2005) *Diabetes Res.Clin.Pract.* 68, 207-216
48. Kukreja R.C. & Hess M.L. (1992) *Cardiovasc.Res.* 26, 641-655
49. Kushner I., Jiang S.L., Zhang D., Lozanski G. & Samols D. (1995) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 762, 102-107
50. Le Gall J.R., Lemeshow S. & Saulnier F. (1993) *JAMA* 270, 2957-2963
51. Macarthur H., Westfall T.C., Riley D.P., Misko T.P. & Salvemini D. (2000) *PNAS* 97, 9753-9758
52. Marik P.E. & Varon J. (1999) in: *Intensive care medicine* (Irwin R.S., Cerra F.B. & Rippe J.M., eds.), pp. 2031-2044
53. Marletta M.A. (1993) *J.Biol.Chem.* 268, 12231-12234
54. Marshall J.C., Cook D.J., Christou N.V., Bernard G.R., Sprung C.L. & Sibbald W.J. (1995) *Crit Care Med.* 23, 1638-1652
55. Maruna P. (2000) *Trendy v medicíně* 2, 73-77
56. Maruna P. (2001) *Klin.Biochem.Metab.* 9, 100-105
57. Maruna, P. Proteiny akutní fáze. 2004.  
Ref Type: Serial (Book, Monograph)
58. Merzouk S., Hichami A., Madani S., Merzouk H., Berrouiguet A.Y., Prost J., Moutairou K., Chabane-Sari N. & Khan N.A. (2003) *Gen.Physiol Biophys.* 22, 15-27
59. Mitaka C., Hirata Y., Yokoyama K., Wakimoto H., Hirokawa M., Nosaka T. & Imai T. (2003) *Shock* 19, 305-309
60. Moshage H., Kok B., Huizenga J.R. & Jansen P.L. (1995) *Clin.Chem.* 41, 892-896

61. Oberhoffer M., Karzai W., Meier-Hellmann A., Bogel D., Fassbinder J. & Reinhart K. (1999) *Crit.Care Med.* 27(9):1814-8, 1814-1818
62. Ohya M., Marukawa S., Inoue T., Ueno N., Hosohara K., Terada N. & Kosaka H. (2002) *Shock* 18, 116-118
63. Pavel M., Foia L., Popescu E., Iacobovici I. & Costuleanu N. (2002) *Rev.Med.Chir Soc.Med.Nat.Iasi* 107, 380-383
64. Pou S., Pou W.S., Bredt D.S., Snyder S.H. & Rosen G.M. (1992) *J.Biol.Chem.* 267, 24173-24176
65. Povia P., Almeida E., Moreira P., Fernandes A., Mealha R., Aragao A. & Sabino H. (1998) *Intensive Care Med.* 24, 1052-1056
66. Quan F., Korneluk R.G., Tropak M.B. & Gravel R.A. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 5321-5335
67. Racek J., Novák I. & Holeček V. (1999) *Anesteziologie a neodkladná péče* 169-174
68. Racek J. & Holeček V. (1994) *Klin.Biochem.Metab.* 2, 94-98
69. Racek J. & Holeček V. (1994) *Klin.Biochem.Metab.* 23, 89-93
70. Racek J. & Holeček V. (1999) *Klin.Biochem.Metab.* 7, 158-163
71. Racek J., Holeček V. & Trefil L. (1999) *Vnitřní lékařství* 46, 367-372
72. Rao G.M., Rao A.V., Raja A., Rao S. & Rao A. (2000) *Clin.Chim.Acta* 296, 203-212
73. Sailaja Y.R., Baskar R. & Saralakumari D. (2003) *Free Radic.Biol.Med.* 35, 133-139
74. Salvayre R., Auge N., Benoist H. & Negre-Salvayre A. (2002) *Biochim.Biophys.Acta* 1585, 213-221
75. Sarban S., Kocyigit A., Yazar M. & Isikan U.E. (2005) *Clin.Biochem.* 38, 981-986
76. Sastry K.V., Moudgal R.P., Mohan J., Tyagi J.S. & Rao G.S. (2002) *Anal.Biochem.* 306, 79-82
77. Schwedhelm E., Tsikas D., Gutzki F.M. & Frolich J.C. (1999) *Anal.Biochem.* 276, 195-203
78. Stichtenoth D.O. (1997) *Internist (Berl)* 38, 420-426
79. Štípek S. (2000) in: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci* (Štípek S., ed.), pp. 41-108

80. Štípek Stanislav. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. 1, 1-314. 2000. GRADA.

Ref Type: Serial (Book, Monograph)

81. Stuehr D.J. & Marletta M.A. (1985) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 82, 7738-7742
82. Svoboda P., Kantorová I., Řehořková D. & Scheer P. (2004) in: *Sepse v traumatologii a chirurgii*, Praha, pp. 1-199
83. Tarasova N.S. (1998) *Klin.Med.(Mosk)* 76, 43-44
84. Tsukahara Y., Morisaki T., Torisu M. & Tanaka M. (1998) *World J.Surg.* 22, 771-777
85. Twardowska-Sauchka K., Grzeszczak W., Lacka B., Froehlich J. & Krywult D. (1994) *Pol.Arch.Med.Wewn.* 92, 313-321
86. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonca A., Bruining H., Reinhart C.K., Suter P.M. & Thijs L.G. (1996) *Intensive Care Med.* 22, 707-710
87. Voet D. & Voetová J.G. (1996) in: *Biochemie*, Victoria publishing, pp. 1-1352
88. Volanakis J.E. & Kaplan M.H. (1971) *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 136, 612-614
89. Warner A., Bencosme A., Healy D. & Verme C. (1995) *Clin.Chem.* 41, 867-871
90. Yang F., Troncy E., Francoeur M., Vinet B., Vinay P., Czaika G. & Blaise G. (1997) *Clin.Chem.* 43, 657-662
91. Zima T., Štern P., and Mrázová K. *Přehled laboratorních vyšetření prováděných ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze . Všeobecná fakultní nemocnice*. 2003.

Ref Type: Catalog

92. Zoroglu S.S., Armutcu F., Ozen S., Gurel A., Sivasli E., Yetkin O. & Meram I. (2004) *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.* 254, 143-147
93. Zwaka T.P., Hombach V. & Torzewski J. (2001) *Circulation* 103, 1194-1197



## 13 PŘÍLOHA

### 13.1 Tabulky souhrnných výsledků

Tabulka 13-1: Souhrnné výsledky – hodnoty CRP

	S-1.odběr	S-2.odběr	S-3.odběr	AK	NK
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
001	28	8,4	5,7	10,1	4,8
002	347	187,9	-	7,1	8,0
003	62	90,3	24,6	3,2	2,0
004	86,3	-	-	<2,0	-
005	134	21	13,2	5,8	-
006	133	-	-	3,8	-
007	105	30	-	2,1	-
008	461	167,0	16	<2,0	-
009	30,2	15,2	18,4	<2,0	43
010	185,5	20,2	8,1	<2,0	174,2
011	332	104	16,0	2,2	-
012	149	17,9	12,4	11,0	-
013	316	183	-	<2,0	-

*S ... skupina septických pacientů, AK ... skupina ambulantních kontrol, NK ... skupina neseptických kriticky nemocných pacientů*

Tabulka 13-2: Souhrnné výsledky – koncentrace hemoglobinu

	S-1.odběr	S-2.odběr	S-3.odběr	AK	NK
	g/l	g/l	g/l	g/l	g/l
001	104	113	105	119	154
002	125	94	-	135	139
003	81	95	106	126	130
004	89,9	-	-	127	-
005	108	100	99	139	-
006	94	-	-	130	-
007	94	97	-	132	-
008	107	85	76	129	-
009	81	86	98	133	139
010	130	129	129	171	81
011	99	89	95	139	-
012	105	123	123	138	-
013	80	82	-	165	-

*S ... skupina septických pacientů, AK ... skupina ambulantních kontrol, NK ... skupina neseptických kriticky nemocných pacientů*

Tabulka 13-3: Souhrnné výsledky – hematokrit

	S-1.odběr	S-2.odběr	S-3.odběr	AK	NK
001	0,332	0,331	0,302	0,343	0,443
002	0,356	0,268	-	0,4	0,408
003	0,234	0,272	0,303	0,376	0,371
004	0,256	-	-	0,35	-
005	0,343	0,293	0,291	0,401	-
006	0,21	-	-	0,38	-
007	0,269	0,33	-	0,372	-
008	0,322	0,252	0,22	0,395	-
009	0,245	0,248	0,277	0,382	0,388
010	0,334	0,376	0,376	0,496	0,239
011	0,294	0,266	0,276	0,405	-
012	0,308	0,370	0,370	0,396	-
013	0,244	0,250	-	0,479	-

S ... skupina septických pacientů, AK ... skupina ambulantních kontrol, NK ... skupina neseptických kriticky nemocných pacientů

Tabulka 13-4: Souhrnné výsledky – koncentrace Fe

	S-1.odběr	S-2.odběr	S-3.odběr	AK	NK
	μmol/l	μmol/l	μmol/l	μmol/l	μmol/l
001	3,2	10,0	11,8	10,1	16,4
002	11,0	6,0	-	20,1	16,2
003	2,3	4,6	13,9	17,1	24,5
004	1,7	-	-	42,1	-
005	2,8	4,8	7,5	24,8	-
006	1,5	-	-	16,1	-
007	3,4	4,4	-	21,6	-
008	2,0	3,9	15,0	23,6	-
009	1,9	12,0	13,5	22,2	25,5
010	8,8	7,1	10,7	24,8	4,9
011	3,7	6,0	16,0	15,6	-
012	2,8	5,5	11,5	15,6	-
013	3,1	8,7	-	27,3	-

S ... skupina septických pacientů, AK ... skupina ambulantních kontrol, NK ... skupina neseptických kriticky nemocných pacientů

Tabulka 13-5: Souhrnné výsledky – aktivita CAT

	S-1.odběr	S-2.odběr	S-3.odběr	AK	NK
	kU/gHb	kU/gHb	kU/gHb	kU/gHb	kU/gHb
001	179,9	190,4	219,9	204,9	202,9
002	145,0	161,3	-	232,8	203,6
003	153,8	130,2	231,1	255,0	234,0
004	163,3	-	-	202,3	-
005	179,1	178,1	200,6	277,9	-
006	83,7	-	-	212,3	-
007	137,8	192,5	-	185,3	-
008	234,7	197,2	222,4	212,4	-
009	163,0	178,6	212,3	256,9	177,1
010	174,8	172,7	216,2	187,4	209,8
011	167,7	178,2	226,6	253,9	-
012	180,5	189,7	198,9	220,5	-
013	148,1	150,3	-	217,3	-

*S ... skupina septických pacientů, AK ... skupina ambulantních kontrol, NK ... skupina neseptických kriticky nemocných pacientů*

Tabulka 13-6: Souhrnné výsledky – koncentrace nitritů a nitrátů

	S-1.odběr	S-2.odběr	S-3.odběr	AK	NK
	μmol/l	μmol/l	μmol/l	μmol/l	μmol/l
001	20,4	54,0	43,1	16,4	23,5
002	39,9	51,3	-	22,9	62,9
003	30,5	47,4	20,4	26,6	63,0
004	26,2	-	-	16,8	-
005	24,8	48,5	24,7	36,8	-
006	86,0	-	-	27,4	-
007	78,3	41,5	-	59,6	-
008	63,8	53,6	23,3	28,2	-
009	24,3	20,4	26,6	32,9	47,0
010	27,9	36,8	40,3	22,7	41,5
011	13,3	66,2	19,6	25,1	-
012	14,9	29,0	39,5	25,8	-
013	39,9	55,6	-	25,8	-

*S ... skupina septických pacientů, AK ... skupina ambulantních kontrol, NK ... skupina neseptických kriticky nemocných pacientů*

Tabulka 13-7: Souhrnné výsledky – koncentrace nitrotyrosinu

	<b>S-1.odběr</b>	<b>S-2.odběr</b>	<b>S-3.odběr</b>	<b>AK</b>
	<b>nmol/l</b>	<b>nmol/l</b>	<b>nmol/l</b>	<b>nmol/l</b>
<b>001</b>	21,70	238,00	18,07	6,36
<b>002</b>	37,58	105,86	-	8,08
<b>003</b>	48,96	23,74	10,44	<6,00
<b>004</b>	40,54	-	-	<6,00
<b>005</b>	76,72	30,18	14,21	<6,00
<b>006</b>	56,42	-	-	<6,00
<b>007</b>	51,20	61,96	-	8,86
<b>008</b>	168,16	30,18	31,61	9,05
<b>009</b>	76,72	29,74	12,08	19,77
<b>010</b>	38,56	55,84	16,21	12,50
<b>011</b>	26,70	75,30	8,08	7,31
<b>012</b>	46,78	-	-	10,04

*S ... skupina septických pacientů, AK ... skupina ambulantních kontrol, NK ... skupina neseptických kriticky nemocných pacientů*

## 13.2 Seznam tabulek

Tabulka 6-1: Reaktivní formy kyslíku a dusíku	12
Tabulka 6-2: Přehled antioxidantů na základě jejich charakteru a lokalisace	22
Tabulka 7-1: Charakteristika septických pacientů	28
Tabulka 7-2: Charakteristika ambulantních kontrol	29
Tabulka 7-3: Charakteristika neseptických kriticky nemocných pacientů	30
Tabulka 7-4: Zpracování plasmy (fialové vacutainery)	31
Tabulka 7-5: Zpracování séra (červené vacutainery)	32
Tabulka 7-6: Postup stanovení celkové koncentrace nitritů	40
Tabulka 7-7: Nastavení spektrofotometru Helios $\gamma$	43
Tabulka 7-8: Dávkování v kyvetách	43
Tabulka 8-1: Rychlost reakce v závislosti na objemu hemolysátu	46
Tabulka 8-2: Závislost rychlosti reakce a aktivity katalasy na koncentraci substrátu(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	47
Tabulka 8-3: Kinetické parametry katalasy	49
Tabulka 8-4: Vliv teploty na aktivitu katalasy	49

Tabulka 8-5: Spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků	50
Tabulka 8-6: Klinicko-biochemické parametry	52
Tabulka 8-7: Vliv sepse na aktivitu CAT v erythrocytech	54
Tabulka 8-8: Vliv sepse na celkovou koncentraci nitritů a nitrátů v séru	58
Tabulka 8-9: Vliv sepse na koncentraci nitrotyrosinu v plasmě	61
Tabulka 8-10: Sledované parametry v závislosti na pohlaví	64
Tabulka 8-11: Sledované parametry v závislosti na věku	65
Tabulka 13-1: Souhrnné výsledky – hodnoty CRP	82
Tabulka 13-2: Souhrnné výsledky – koncentrace hemoglobinu	82
Tabulka 13-3: Souhrnné výsledky – hematokrit	83
Tabulka 13-4: Souhrnné výsledky – koncentrace Fe	83
Tabulka 13-5: Souhrnné výsledky – aktivita CAT	84
Tabulka 13-6: Souhrnné výsledky – koncentrace nitritů a nitrátů	84
Tabulka 13-7: Souhrnné výsledky – koncentrace nitrotyrosinu	85

### ***13.3 Seznam grafů***

Graf 7-1: Kalibrační křivka pro stanovení celkové koncentrace nitritů a nitrátů	39
Graf 7-2: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace nitrotyrosinu v plasmě	41
Graf 8-1: Závislost rychlosti reakce na objemu hemolysátu	47
Graf 8-2: Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu ( $H_2O_2$ )	48
Graf 8-3: Závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu ( $H_2O_2$ )-vynesení Lineweaver- Burkovo	48
Graf 8-4: Časový průběh katalytického rozkladu peroxidu vodíku	51
Graf 8-5: Vliv sepse na aktivitu CAT v erythrocytech	54
Graf 8-6: Aktivita katalasy v jednotlivých případech	55
Graf 8-7: Vzájemná korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací CRP	56
Graf 8-8: Vzájemná korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací železa	57
Graf 8-9: Vliv sepse na celkovou koncentraci nitritů a nitrátů v séru	58
Graf 8-10: Celková koncentrace nitritů a nitrátů v jednotlivých případech	59
Graf 8-11: Vliv sepse na koncentraci nitrotyrosinu v plasmě	60
Graf 8-12: Koncentrace nitrotyrosinu v jednotlivých případech	61
Graf 8-13: Vzájemná korelace koncentrací nitrotyrosinu a CRP	62

Graf 8-14: Korelace koncentrace nitrotyrosinu a celkové koncentrace nitritů a nitrátů	63
Graf 8-15: Korelace mezi koncentracemi železa a CRP	68
Graf 8-16: Korelace mezi koncentracemi CRP a hemoglobinu	69
Graf 8-17: Korelace mezi koncentracemi hemoglobinu a železa	69
Graf 8-18: Korelace mezi aktivitou katalasy a koncentrací hemoglobinu	70
Graf 8-19: Korelace mezi aktivitou CAT a celkovou koncentrací nitritů a nitrátů	70

### ***13.4 Seznam obrázků***

Obrázek 6-1: Krystalová struktura CRP v komplexu s fosfocholinem	10
Obrázek 6-2: Postupná redukce kyslíku	15
Obrázek 6-3: Rozložení elektronů v molekulových orbitalech pro oxid dusnatý	16
Obrázek 6-4: Předpokládaný mechanismus syntesy NO z L-argininu	18
Obrázek 6-5: Metabolismus oxidu dusnatého	20
Obrázek 6-6: Funkční vztahy mezi antioxidanty	23
Obrázek 7-1: Schéma Griessovy reakce	37

