

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicíně

Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Andreas Krüger

Mírná léčebná hypotermie a oxidativní stres po srdeční zástavě

Mild therapeutical hypothermia and oxidative stress after cardiac arrest

Disertační práce

Školitel: Doc. MUDr. Petr Ošťádal, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně, a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 16.7.2016

Andreas Krüger

Poděkování:

Rád poděkoval především svému školiteli, Doc. MUDr. Petru Ošťádalovi Ph.D., za podporu, odborné vedení a všestrannou pomoc při psaní této práce. Můj dík patří dále také všem spolupracovníkům z Nemocnice Na Homolce za podporu při sepisování této disertační práce. V neposlední řadě děkuji své ženě, která mně byla po celou dobu morální posilou.

Identifikační záznam:

KRÜGER Andreas. *Mírná léčebná hypotermie a oxidativní stres po srdeční zástavě. [Mild therapeutical hypothermia and oxidative stress after cardiac arrest]*. Praha, 2016. 73s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Vedoucí práce Ošťádal, Petr.

Souhrn

Úspěšná kardiopulmonální resuscitace a obnovení spontánní cirkulace po srdeční zástavě je zcela nezbytným krokem k záchraně života; povšechná ischemie během oběhové zástavy však vede k aktivaci celé řady procesů, které mohou způsobit další poškození. Jedním z klíčových patogenetických pochodů, odpovědných za ischemicko-reperfuzního poškození, je oxidativní stres. Současná evidence o možné účasti oxidativního stresu v patogeneze poresuscitačního syndromu je však zcela nedostatečná.

V naší práci jsme testovali následující hypotézy: (i) ischemicko-reperfuzní poškození při srdeční zástavě je provázeno oxidativním stresem a (ii) mírná léčebná hypotermie snižuje oxidativní stres.

V experimentální části na zvířecím modelu oběhové zástavy jsme posuzovali účinky hypotermie a normotermie na hemodynamické parametry, na známky orgánového poškození a na ovlivnění oxidativního stresu. Dále jsme srovnávali účinky hypotermie, ischemického postconditioningu a podání oxidu dusnatého při extrakorporální kardiopulmonální resuscitaci. Zjistili jsme, že mírná hypotermie působí protektivně na sledované parametry a snižuje oxidativní stres jak ve srovnání s normotermií, tak alespoň v některých hodnotách i ve srovnání s ischemickým postconditioningem a oxidem dusnatým.

V klinické části byl hodnocen oxidativní stres a produkce oxidu dusnatého u pacientů po oběhové zástavě na umělé plicní ventilaci, kteří byli léčeni endovaskulárně řízenou mírnou hypotermií. Hypotermie v této studii snižovala hladinu produktů oxidativního stresu a tvorbu oxidu dusnatého.

Naše práce potvrzuje hypotézy, že poresuscitační syndrom je provázen oxidativním stresem a že mírná léčebná hypotermie zmenšuje oxidativní stres po srdeční zástavě.

Klíčová slova: oběhová zástava, poresuscitační syndrom, mírná hypotermie, oxidativní stres

Summary

Successful cardiopulmonary resuscitation is an essential life-saving tool; nevertheless, general ischemia during cardiac arrest may trigger different pathways that could turn even into a fatal damage; this condition is called post-cardiac arrest syndrome. It has been repeatedly shown that oxidative stress (OS) plays one of the key roles in the development of ischemia-reperfusion injury. However, current evidence on the possible participation of OS in the pathogenesis of post-cardiac arrest syndrome is insufficient.

We tested following hypotheses: (i) ischaemia-reperfusion injury after cardiac arrest is accompanied by OS and (ii) mild therapeutical hypothermia decreases OS cardiac arrest.

In the experimental part of our work we studied the effects of hypothermia and normothermia on hemodynamic parameters, markers of organ damage and on the OS burden in porcine model of cardiac arrest. Furthermore, we compared the effects of hypothermia with ischaemic postconditioning and nitric oxide administration in the porcine model of extracorporeal cardiopulmonary resuscitation. We found protective effects of hypothermia on all major endpoints including OS in comparison with normothermia; moreover, hypothermia improved also selected variables compared to ischemic postconditioning and nitric oxide.

In the clinical part we evaluated OS burden and nitric oxide production in patients after cardiac arrest treated by endovascular mild hypothermia. During hypothermia we observed lower levels of OS metabolites and decreased nitric oxide production.

Our results revealed that post-cardiac arrest syndrome is accompanied by OS and that mild therapeutic hypothermia decreases OS burden.

Keywords: Cardiac arrest, Post-cardiac arrest syndrom, Mild therapeutical hypotermia, Oxidative stress.

OBSAH

1. ÚVOD	10
1.1. Ischemicko-reperfuzní poškození.....	10
1.2. Oxidativní stres.....	11
1.3. Patogenetické mechanizmy reperfuzního poškození mozku.....	14
1.4. Reperfuzní poškození srdce.....	15
1.5. Systémová odpověď na ischemicko-reperfuzní poškození.....	16
1.6. Persistující základní onemocnění.....	17
1.7. Hypotermie a ischemicko-reperfuzní poškození.....	18
1.7.1. <i>Hypotermie a metabolismus</i>	19
1.7.2. <i>Hypotermie a průtok krve mozem</i>	19
1.7.3. <i>Hypotermie a neurotransmitery</i>	19
1.7.4. <i>Hypotermie a zánět</i>	20
1.7.5. <i>Hypotermie a hematoencefalická bariéra, cévní permeabilita</i>	20
1.7.6. <i>Hypotermie a oxidativní stres</i>	20
2. HYPOTÉZY	22
3. CÍLE PRÁCE	23
3.1. Experimentální část.....	23
3.2. Klinická část.....	23
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST DISERTAČNÍ PRÁCE	24
4.1. Srovnání vlivu mírné hypotermie a řízené normotermie na udržení krevního tlaku, mozkové oxymetrie, prevenci orgánového poškození a oxidativní stres po srdeční zástavě na prasečím modelu.....	24
4.1.1. <i>Úvod</i>	24

4.1.2. <i>Metody</i>	25
4.1.2.1. <i>Experimentální model</i>	25
4.1.2.2. <i>Monitorování vitálních funkcí</i>	26
4.1.2.3. <i>Extrakorporální membránová oxygenace (ECMO)</i>	26
4.1.2.4. <i>Protokol experimentu</i>	29
4.1.2.5. <i>Laboratorní testy</i>	30
4.1.2.6. <i>Statistická analýza</i>	30
4.1.3. <i>Výsledky</i>	31
4.1.3.1. <i>Krevní tlak, mozková oxymetrie, resuscitabilita</i>	31
4.1.3.2. <i>Ukazatele orgánového poškození</i>	31
4.1.3.3. <i>Oxidativní stres</i>	33
4.1.4. <i>Diskuse</i>	34
4.1.5. <i>Závěr</i>	36
4.2. Účinky ischemického postconditioningu a podání oxidu dusnatého na zvířecím modelu extrakorporální kardiopulmonální resuscitace.....	37
4.2.1. <i>Úvod</i>	37
4.2.2. <i>Metody</i>	38
4.2.2.1. <i>Experimentální model</i>	38
4.2.2.2. <i>Monitorování vitálních funkcí</i>	39
4.2.2.3. <i>Extrakorporální membránová oxygenace (ECMO)</i>	39
4.2.2.4. <i>Protokol experimentu</i>	39
4.2.2.5. <i>Laboratorní testy</i>	41
4.2.2.6. <i>Statistická analýza</i>	42
4.2.3. <i>Výsledky</i>	42
4.2.3.1. <i>Krevní tlak, mozková oxymetrie, resuscitabilita</i>	42

4.2.3.2. <i>Ukazatele orgánového poškození a oxidativního stresu</i>	44
4.2.4. <i>Diskuse</i>	45
4.2.5. <i>Závěr</i>	47
5. KLINICKÁ ČÁST DISERTAČNÍ PRÁCE	48
5.1. Stanovení hodnot nitrotyrosinu a nitritů/nitrátů u nemocných po oběhové zástavě, léčených mírnou terapeutickou hypotermií.....	48
5.1.1. <i>Úvod</i>	48
5.1.2. <i>Soubor a metodika</i>	48
5.1.3. <i>Výsledky</i>	49
5.1.4. <i>Diskuse</i>	52
5.1.5. <i>Závěr</i>	54
6. SOUHRN VÝSLEDKŮ PRÁCE	55
7. ZÁVĚR	56
8. LITERATURA	57
8.1. Publikace autora, související s disertační prací, v časopisech s IF.....	57
8.2. Publikace autora, nesouvisející s disertační prací, v časopisech s IF.....	57
8.3. Publikace autora, nesouvisející s disertační prací, v časopisech bez IF.....	59
8.4. Použitá literatura.....	61
9. PŘILOŽENÉ ORIGINÁLNÍ PRÁCE	73

1. ÚVOD

K srdeční zástavě mimo nemocnici dochází u 35-90 jedinců na 100 000 obyvatel za rok, srdeční zástava v nemocnici nastane ročně v 1-5 z 1000 hospitalizací (1, 2). Zcela nezbytným krokem k záchraně života po srdeční zástavě je úspěšná kardiopulmonální resuscitace a obnovení spontánní cirkulace. Vysoká úmrtnost pacientů, ke které, bohužel, po obnovení cirkulace dochází, je způsobena zvláštním patofyziologickým procesem, který vede k poškození mnoha orgánů, tzv. ischemicko-reperfusionním poškozením (3). Tento stav bývá v klinické praxi označován jako „poresuscitační syndrom“ nebo též jako „post-cardiac arrest syndrome (PCAS)“. Patofyziologické pochody, podílející se na PCAS, zahrnují 4 klíčové komponenty: (i) poškození mozku, (ii) dysfunkci myokardu, (iii) systémovou ischemicko-reperfusionní reakci a (iv) persistující základní onemocnění (1). Závažnost těchto stavů po obnovení cirkulace se u jednotlivých nemocných liší a závisí na intenzitě ischemického poškození, na příčině srdeční zástavy a předchozím stavu pacienta (4). V posledních letech bylo vyvinuto značné úsilí na zlepšení výsledků léčby nemocných po srdeční zástavě, většina testovaných terapeutických intervencí však nebyla doprovázena zlepšením výsledků léčby. Jeden z mála postupů, u kterých bylo prokázáno, že zlepšují prognózu pacientů po srdeční zástavě, je mírná hypotermie (5).

1.1. Ischemicko-reperfusionní poškození

Jak již bylo uvedeno, obnovení cirkulace je nejúčinnější a v současné době základní přístup v léčbě ischemických stavů. Není pochyb o tom, že úspěšná reperfuze je v rukou kardiologů či kardiochirurgů často život zachraňujícím nástrojem. Experimentální i klinické studie však prokázaly, že obnovení cirkulace může prohloubit orgánové poškození, které vzniká v důsledku ischemie. Tuto skutečnost poprvé popsali Jennings a kol. již v roce 1960

(6). Koncepce reperfučního poškození pak byla vytvořena v roce 1983, kdy Rosenkranz a Buckberg definovali tento fenomén jako "...ty metabolické, funkční a strukturální důsledky obnovení krevního průtoku, kterým může být zabráněno modifikací podmínek reperfuze" (7). Park a Lucchesi (1999) označili tento proces jako „odumření buněk, přeživších období ischemie, jako důsledek více dějů iniciovaných reperfuzí“; to vedlo ke dnes všeobecně přijímanému označení tohoto fenoménu jako „ischemicko-reperfuční poškození“ (8). Obnovení průtoku totiž nepřináší jenom kyslík a živiny, nutné pro přežití buněk, nýbrž také faktory, které mohou ischemické buňky dále poškodit. Tento proces zahrnuje vznik arytmií, uvolnění enzymů, závažné hemorrhagie a konečně i buněčnou smrt. Rozsah reperfučního poškození koreluje s dobou trvání ischemie. Potencionálně nebezpečné faktory mohou být rozděleny do tří, úzce souvisejících skupin: (i) faktory, které jsou užitečné či dokonce esenciální pro zdravé buňky, ale mohou poškodit buňky alterované ischemií (re-energizace, prudká normalizace pH, prudká normalizace osmolality); (ii) faktory, škodlivé v přebytku nebo při defektu buněčných obranných systémů (volné radikály, proteázy); (iii) faktory, aktivované změnami vyvolanými ischemií, a tedy působící selektivně v poškozené tkáni (zánětlivé mechanismy). Příznivé ovlivnění ischemicko-reperfučního poškození je rozhodující pro další osud pacienta (9).

1.2. Oxidativní stres

Všeobecně se soudí, že uvolnění kyslíkových radikálů hraje jednu z hlavních rolí v buněčném poškození během reperfuze. Volné radikály jsou generovány z různých zdrojů: vznikají jako vedlejší produkt obnoveného mitochondriálního metabolismu, přicházejí s okysličenou krví a jsou rovněž uvolňovány buňkami imunitního systému (neutrofilní granulocyty a buňky monocyto-makrofágové řady). Je důležité zdůraznit, že v době reperfuze jsou obvykle buněčné antioxidační obranné systémy poškozeny předchozí ischemií a takové

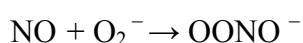
buňky jsou proto velmi citlivé k působení kyslíkových radikálů (10). Volné radikály jsou zodpovědné za útlum řady buněčných funkcí (11, 12).

Z volných kyslíkových radikálů jsou v organismu nejreaktivnější hydroxylový radikál (OH•) s poločasem rozpadu 10^{-9} sekund, alkoxylový radikál (RO•) s poločasem rozpadu 10^{-6} sec., singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) s poločasem rozpadu 10^{-5} sec., peroxylový (ROO•) radikál s poločasem rozpadu 7 sec., superoxidový radikál (O_2^-) a peroxid vodíku (H_2O_2). Z řady reaktivních dusíkatých radikálů potom peroxynitrit (ONOO-), mající přibližně 1000krát vyšší aktivitu než peroxid vodíku, s poločasem rozpadu 0,05-1,0 sec., a oxid dusnatý (NO•) s poločasem rozpadu 10 sec. (13).

Volné radikály pohotově reagují s různými biologickými strukturami, jako jsou mastné kyseliny a lipidy, aminokyseliny a proteiny, nukleové kyseliny (mono- a polynukleotidy) a s celou řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Volné radikály ve vyšších koncentracích způsobují přímé poškození DNA a zvyšují mutagenicitu. Např. oxid dusnatý (NO) se může dále sloučit se superoxidovým radikálem a vznikne peroxynitrit spolu s hydroxylovým radikálem; ty způsobují buněčné poškození indukci peroxidace lipidů v buněčné membráně a dále oxidativní poškození DNA a proteinů. Superoxid (O_2^-) reaguje rychle s NO. Superoxid O_2^- (superoxidový aniontový radikál) není sám příliš reaktivní, ale podléhá dismutaci - jedna molekula zároveň oxiduje i redukuje. Produkty této reakce jsou molekulární kyslík a peroxid vodíku:

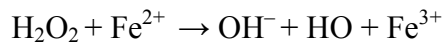


V biologickém prostředí je tato reakce urychlována superoxid dismutázou (SOD); reakcí s oxidem dusnatým dává vznik peroxinitritu:

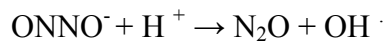
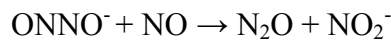
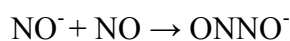


Peroxid vodíku vzniká dismutací superoxidu nebo působením některých enzymů (xantinoxidáza, monoaminoxidáza). Další reakce peroxidu vodíku jsou celkem pomalé, ale v

přítomnosti (tranzitních) kovů jako Fe^{2+} nebo Cu^{2+} se peroxid pohotově redukuje (přijímá elektron) – což je podstatou tzv. Fentonovy reakce:



Oxid dusnatý se pohotově váže na hemové železo enzymu guanylát cyklázy, který stimuluje syntézu cGMP. Ta je odpovědná za relaxaci hladkého svalstva, vazodilataci. *In vivo* se snadno slučuje s fenoly (tyrosin) nebo s thioley (cystein, albumin). Metabolity NO jsou velmi reaktivní. Peroxynitrit ONOO^- je odpovědný za nitraci a hydroxylaci tyrosinu.



Tyrosin se díky peroxynitritu mění na nitrotyrosin. Analýza 3-nitrotyrozinu, NO^\bullet oxidovaného derivátu tyrozinu, stejně jako halogenovaného tyrozinu 3-chlorotyrozinu (Cl-Tyr) a 3-bromotyrozinu (Br-Tyr) je možná na podkladě laboratorního stanovení prostřednictvím monoklonálních protilátek (14). 3-nitrotyrozin je plazmaticky nejrychleji se objevující marker oxidativního stresu, mimo jiné u Alzheimerovy choroby, při sclerosis multiplex a u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou (15). 3-nitrotyrozin je odbouráván několika cestami; nejvýznamnější z nich je biotransformační přeměna na 3-nitro-4-hydroxyfenyloctovou kyselinu, která je jako hlavní metabolit 3-nitrotyrozinu vylučována močí.

Antioxidační obrana organismu je zprostředkovávána endogenními antioxidačními systémy a exogenně dodávanými antioxidanty. Endogenní antioxidační systém tvoří enzymatické a neenzymatické mechanismy. Mezi enzymatické mechanismy řadíme cytochrom C, katalázu, glutathion peroxidázu, SOD a ceruloplazmin. Rozeznáváme několik typů SOD, které se liší kofaktorem, kterým je vždy atom kovu, hrající roli v katalytickém

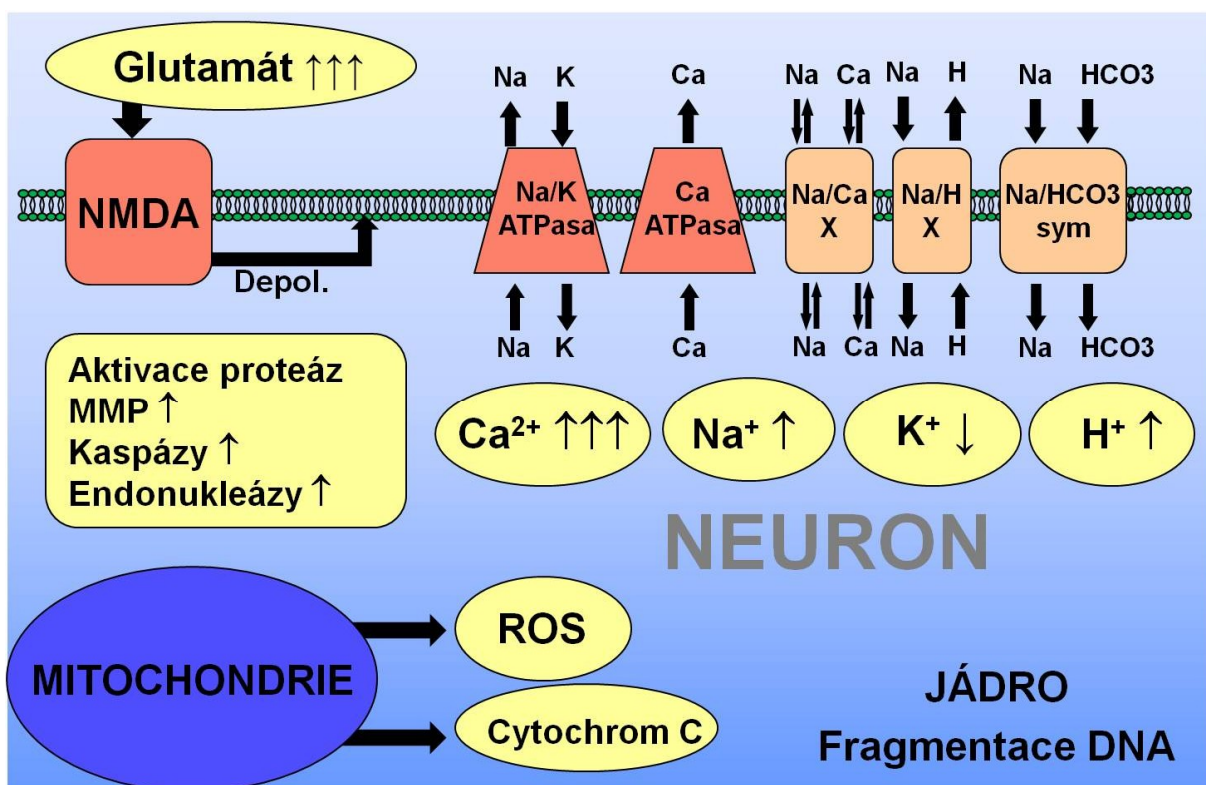
účinku tohoto enzymu. SOD je obsažena v cytoplasmě, stejně jako na povrchu endotelu ve vazbě s mědí nebo se zinkem (CuSOD, ZnSOD); v mitochondriích je ve vazbě s manganem (MnSOD) (16). Mezi neenzymatické antioxidanty potom řadíme např. glutathion, sulfhydrylové skupiny, thioredoxin, vitamín A, provitamín A, vitamín C, vitamín E a vitamín K, koenzym Q10, bilirubin či flavonoidy (17). Mezi antioxidanty patří i stopové prvky (selen, podporující absorpci antioxidantně působícího vitamínu E; zinek, stabilizující membrány buněk; měď - ve zvýšeném množství naopak oxidativní stres vyvolává (18).

Úloha volných kyslíkových a dusíkových radikálů však není jenom negativní. Řada studií prokázala, že jsou esenciální součástí signálních drah, které rozhodují o řadě pozitivních dějů např. v kardioprotekci (19). Jejich finální působení závisí na rovnováze mezi tvorbou a degradací.

1.3. Patogenetické mechanismy reperfučního poškození mozku

Poškození mozku patří k obvyklým projevům poresuscitačního poškození. Velká zranitelnost mozku je dána jeho nízkou hypoxickou tolerancí a zvláštní odpovědí na reperfuzi. Mechanismus poškození mozku, vyvolaný PCAS, je komplexní a zahrnuje zvýšenou dráždivost, porušený metabolismus vápníku, tvorbu kyslíkových radikálů, stimulaci proteáz a aktivaci signálních drah, způsobujících buněčnou smrt (obr. 1). Mnoho z těchto drah je aktivních ještě po dobu hodin až dnů po obnovení cirkulace. Histologicky se postupně objevují populace poškozených neuronů v hipokampu, kůře, mozečku, corpus striatum a thalamu. Patrné jsou oba typy buněčné smrti, nekróza i apoptóza; jejich vzájemný podíl však dosud objasněn nebyl (20). Relativně pozvolný vznik poškození dává dostatečný prostor pro terapeutický zásah. Uzávěr malých mozkových tepen vede k tzv. „no-reflow“ fenoménu, na němž se mimo jiné podílí intravaskulární trombóza, vzniklá v průběhu srdeční zástavy. Navzdory selhání mikrocirkulace je makroskopicky patrná hyperémie, způsobená vzestupem

perfuzního tlaku a porušenou autoregulací (21). Hyperemická reperfuze zvyšuje nebezpečí mozkového edému; příliš mnoho kyslíku v časných fázích reperfuze může navíc vést k exacerbaci poškození neuronů nově vznikajícími kyslíkovými radikály (22). V delším časovém odstupu (hodiny až dny) se na nedostatečné dodávce kyslíku do mozku a tím i na zhoršení poškození mohou podílet další faktory, jako hypotenze, hypoxemie, poruchy vaskulární autoregulace a mozkový edém (23).



Obrázek 1. Buněčné poškození. *NMDA* – *N-methyl-D-aspartát receptor pro glutamát*, *MMP* – *matrixová metaloproteináza*, *ROS* - *reaktivní formy kyslíku*.

1.4. Reperfuční poškození srdce

Bezprostředně po obnovení cirkulace jsou hodnoty srdeční frekvence a tlaku krevního velmi kolísavé. Zvýšení obou parametrů může být vyvoláno přechodným lokálním i celkovým vzestupem hladiny katecholaminů. V pokusech na zvířatech klesá ejekční frakce

z 55% na 20% a end-diastolický tlak v levé komoře stoupá z 8 na 20 mm Hg do 30 min po obnovení cirkulace. V počátečních stádiích reperfuze není porucha funkce doprovázena poklesem koronárního průtoku, což svědčí pro rozvoj stunningu a ne pro vznik ischemie či dokonce infarktu. Globální porucha srdeční funkce je přechodná a může být zcela reversibilní. Hodnoty srdečního indexu se významně upraví do 24 hodin, k normě se vrací do 72 hodin. Experimentální data naznačují, že reperfuzní poruchy srdeční funkce reagují citlivě na podávání inotropních látek (např. dobutaminu), které dramaticky snižují systolickou i diastolickou dysfunkci (24).

Stunning myokardu je definován jako přechodná kontraktilní dysfunkce viabilního myokardu, která vzniká v důsledku akutní transientní ischemie. Omráčený myokard obnoví svoji funkci ve 2/3 do 3 měsíců a jen u 10% až po 14 měsících od revaskularizace. Hibernace představuje odezvu myokardu na protražovanou ischemii při kritickém snížení koronárního průtoku v dané oblasti. Dochází tím k prolongované kontraktilní dysfunkci, která může být spojená se snížením srdečního výdeje a srdečním selháním. K obnovení kontraktilní funkce hibernovaného myokardu dochází v 1/3 do 3 měsíců od revaskularizace a v 1/3 až po více nežli 14 měsíci (25). Hibernace myokardu je nejen důsledek kyslíkového a nutričního deficitu, ale i adaptivní reakce myokardu na zachování viability v podmínkách redukováného koronárního průtoku. Viabilita je tedy z tohoto pohledu charakterizována jako stav umožňující podporu základních celulárních funkcí, ale již nedostačující k pokrytí energeticky náročné mechanické kontraktilní funkce.

1.5. Systémová odpověď na ischemicko-reperfuzní poškození

Srdeční zástava představuje těžký šokový stav, kdy je přerušena dodávka kyslíku i substrátů a metabolity nejsou odplavovány. Kardiopulmonální resuscitace tento proces upravuje jen částečně; v jejím průběhu dochází ke kompensatornímu zvýšení extrakce

kyslíku, což zase vede ke snížení saturace krve. Hypoxie může přetrvávat i vzhledem k porušené funkci srdečního svalu, tlakové nestabilitě a selhání mikrocirkulace. Prohlubující se hypoxie vede k aktivaci endotelu a zánětlivé reakci (26). Celotělová reperfuze vede ke generalizované aktivaci imunologických a koagulačních drah, což zvyšuje riziko multiorgánového selhání a infekce. Již 3 hodiny po srdeční zástavě stoupá koncentrace různých cytokinů, rozpustných receptorů a endotoxinu. Zvyšují se solubilní mezibuněčné adhesivní molekuly, solubilní cévní adhesivní molekuly a P- a E- selektiny, což svědčí pro aktivaci leukocytů a poškození endotelu (27). Aktivace koagulačních faktorů bez odpovídající stimulace endogenní fibrinolýzy je důležitým patogenetickým mechanismem, který podporuje selhání mikrocirkulace. Hladiny antikoagulačních faktorů jako jsou antitrombin, protein S a protein C klesají, což vede k přechodné endogenní aktivaci proteinu C (28). Ischemicko-reperfuze poškození dále postihuje funkci nadledvin, vede k poklesu intravaskulárního objemu, poškozuje regulaci cévního tonu, dodávku a utilizaci kyslíku a zvyšuje vnímavost k infekci. Výsledky experimentálního i klinického výzkumu naznačují, že rozvoj uvedených změn může být omezen včasnou intervencí.

1.6. Persistující základní onemocnění

Patofyziologie PCAS je obvykle komplikována persistujícím akutním stavem, který způsobil nebo alespoň přispěl k srdeční zástavě; do této skupiny patří především akutní koronární syndrom, plicní onemocnění, krvácení a sepse. Velmi často je možno diagnostikovat akutní koronární syndrom (akutní infarkt myokardu, nestabilní angina pectoris); akutní infarkt byl diagnostikován ve více než 50% případů srdeční zástavy (1). Jinou tromboembolickou komplikací, se kterou je nutno u srdeční zástavy počítat, je plicní embolie; vyskytuje se až u 10% případů srdeční zástavy (1). Srdeční zástava po masivním krvácení je popisována především u úrazů. Vzhledem k dalším komplikacím, jako je

mnohočetné trauma s poraněním hlavy, je nutno v tomto případě postupovat jako u samostatného klinického syndromu. Primární plicní onemocnění, jako např. chronická obstruktivní plicní choroba, astma či pneumonie mohou vést k respiračnímu selhání a srdeční zástavě. Je-li srdeční zástava způsobena respiračním selháním, bývá po obnovení cirkulace plicní funkce zhoršena. Redistribuce krve v plicním řečišti může vést k plicnímu edému nebo alespoň zvýšit alveolo-arteriální kyslíkový gradient. Sepsis je další možnou příčinou srdeční zástavy, akutního respiračního distress syndromu a multiorgánového selhání. Některé příčiny srdeční zástavy, jako např. předávkování léky a intoxikace, vyžadují specifický přístup; ten musí být koordinován se specifickou podporou kardiiovaskulárního a nervového systému (1).

1.7. Hypotermie a ischemicko-reperfuzní poškození

V posledních letech bylo vynaloženo značné úsilí na výzkum ischemicko-reperfuzního poškození a možnosti jeho ovlivnění. Je však třeba konstatovat, že většina postupů, které se v experimentálním uspořádání zdály slibné, v klinice zcela selhala. Sem patří např. antioxidanty a scavangery volných radikálů, inhibitory Na-Ca výměníku nebo protilátky proti neutrofilům a složkám komplementu (29). Jedním z možných vysvětlení neúspěchu těchto intervencí je, že ovlivňují vždy pouze jeden nebo úzké spektrum patogenetických mechanismů.

Z nezdařených pokusů o ovlivnění ischemicko-reperfuzního poškození se vymyká jeden postup, který byl úspěšný nejen v experimentu, ale i v klinických studiích - mírná systémová hypotermie (30). Dvě randomizované klinické studie a jejich metaanalýza ukázaly, že mírná hypotermie vede ke zlepšení výsledků u pacientů, kteří zůstávali v bezvědomí po resuscitaci pro srdeční zástavu (31). Zdá se, že úspěch hypotermie v ovlivnění ischemicko-reperfuzního poškození spočívá v jejím příznivém působení na řadu paralelně probíhajících procesů.

1.7.1. Hypotermie a metabolismus

Hypotermie snižuje buněčný metabolismus, zmenšuje spotřebu energie a zvyšuje postischemickou utilizaci glukózy (32). Pokles teploty o 1° C snižuje úroveň metabolismu v mozku o 5 – 7% (33). Hypotermie redukuje přestup iontů vápníku z extracelulárního prostoru do nitra buňky a zlepšuje homeostázu draslíku (34).

1.7.2. Hypotermie a průtok krve mozem

Za normálních okolností je průtok krve mozem přibližně 50mL/100g/min.; s poklesem tělesné teploty se tato hodnota snižuje. Podle experimentální studie Moriho a kol. klesá průtok mozem z 48mL/100g/min při normotermii na 21mL/100g/min při teplotě 33° C a 11mL/100g/min při ochlazení na 29° C (35). Během ischemie a reperfuze je však vztah mezi tělesnou teplotou a průtokem krve mozem komplikovaný: po obnovení krevního oběhu dochází zpravidla k přechodnému vzestupu průtoku, hyperemii; poté se průtok mozem postupně snižuje. Zdá se, že hypotermie zabraňuje přechodné hyperemii a naopak pomáhá udržet průtok v dalším období (34).

1.7.3. Hypotermie a neurotransmitery

Neurotransmitery se během ischemie začínají ve zvýšené míře vyplavovat zhruba za 10-20 min, jejich hladina dosahuje vrcholu za 60 min a k normálním hodnotám se vrací po cca 90–120 min. (36). Mírná hypotermie snižuje uvolňování mediátorů, při teplotě 30–33 °C je zcela inhibováno vyplavování glutamátu (37). Snížení hladiny glutamátu je spojeno s poklesem intracelulární koncentrace vápníku, se zmenšením spotřeby ATP a představuje pravděpodobně jeden z klíčových neuroprotektivních účinků hypotermie (34).

1.7.4. Hypotermie a záněť

Hypotermie působí protizánětlivě, zmenšuje počet neutrofilů v ischemií postižené tkáni a inhibuje aktivaci mikroglíí. Hypotermie také snižuje expresi ICAM-1 a ovlivňuje tím interakce mezi leukocyty a endotelem, snižuje produkci různých protizánětlivých mediátorů, jako je oxid dusnatý nebo interleukin 6, na čemž se zřejmě podílí inhibice transkripce nukleárního faktoru kappa B (NFkB). Protizánětlivé účinky hypotermie se projevují i u buněk, které jsou sice ischemií poškozeny, ale přežívají (38).

1.7.5. Hypotermie a hematoencefalická bariéra, cévní permeabilita

Hypotermie omezuje vznik disrupcí hematoencefalické bariéry a snižuje cévní permeabilitu po ischemicko-reperfuzním poškození, čímž zmenšuje riziko vzniku edému (39). Bylo dále zjištěno, že hypotermie snižuje tvorbu matrixových metaloproteináz, které se pravděpodobně významně podílejí na poškození hematoencefalické bariéry během ischemie a reperfuze (40).

1.7.6. Hypotermie a oxidativní stres

Hypotermie inhibuje tvorbu volných radikálů, snižuje peroxidaci lipidů a ochraňuje jadernou DNA před přímým poškozením reaktivními formami kyslíku a fragmentací (41). Antioxidační účinek hypotermie byl prokázán u laboratorních potkanů při studiu vlivu mozkové ischemie na tvorbu volných hydroxylových radikálů, tvořících 2,3- a 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHBA). Model mozkové ischemie byl vytvořen okluzí obou krkavic v kombinaci se systémovou hypotenzí 50mmHg. Při normotermní ischemii došlo k 50% redukci hodnoty DHBA ve srovnání s bazálním stavem a při reperfuzi došlo k jejich významnému zvýšení, po hypotermické ischemii se hladina DHBA nezvýšila (40). Dalším důkazem antioxidačního působení hypotermie byla práce, která prokázala zmenšení velikosti

infarktového ložiska při cévní mozkové příhodě u potkanů (42). U pokusných psů byl popsán vliv hypotermie i na snížení peroxidace lipidů v mozkové tkáni po oběhové zástavě (43).

Bylo navíc prokázáno, že hypotermie stimuluje produkci anti-apoptotického proteinu Bcl-2, inhibuje uvolnění cytochromu c a aktivaci kaspáz (34).

Z analýzy dostupné literatury vyplývá, že na vzniku ischemicko-reperfuzního poškození se podílejí kyslíkové radikály, vznikající na začátku reperfuze. Experimentální i klinické studie naznačují, že hypotermie brání rozvoji ischemicko-reperfuzního poškození. Dosud nezodpovězena zůstává otázka úlohy oxidačního stresu při ischemicko-reperfuzním poškození, vznikajícím po srdeční zástavě a možnost protektivního ovlivnění působením mírné hypotermie.

2. HYPOTÉZY

Testovali jsme následující hypotézy:

1. Ischemicko-reperfuční poškození při srdeční zástavě je provázeno oxidativním stresem.
2. Mírná léčebná hypotermie po srdeční zástavě snižuje oxidativní stres.

3. CÍLE PRÁCE

3.1. Experimentální část

Na experimentálním modelu (prase, *Sus scrofa domestica*) byly posuzovány protektivní účinky hypotermie (33° C). Hodnoceny byly hemodynamické parametry (krevní tlak, mozková oxymetrie), hodnoty kreatinfosfokinázy, troponinu I, myoglobinu, neuronspecifické enolázy, reaktivních metabolitů kyslíku a biologického antioxidačního potenciálu.

3.2. Klinická část

U nemocných po oběhové zástavě mimo nemocnici byl hodnocen oxidativní stres a produkce NO. Nemocným na umělé plicní ventilaci v hluboké analgosedaci byla v souladu s doporučenými postupy nastolena řízená hypotermie (33° C) pomocí endovaskulárního chladicího katetru Thermogard XP (Alsius, USA). Hypotermie byla udržována po dobu 24 hod., poté proběhl řízený ohřev o 0,15 °C/hod na cílovou teplotu 36,8 °C. Hodnoceny byly hladiny nitrotyrosinu a nitrátů/nitritů v pravidelných časových intervalech.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST DISERTAČNÍ PRÁCE

4.1. Srovnání vlivu mírné hypotermie a řízené normotermie na udržení krevního tlaku, mozkovou oxymetrii, prevenci orgánového poškození a oxidativní stres po srdeční zástavě na prasečím modelu

4.1.1. Úvod

Mírná terapeutická hypotermie byla zavedena do péče o nemocné po oběhové zástavě po zveřejnění výsledků dvou klinických studií, které ukazují její výhody ve srovnání se standardní terapií (5, 63). Hypotermie byla zavedena do doporučených postupů pro nemocné po oběhové zástavě jak AHA (American Heart Association) (44) tak ERC (European Resuscitation Council) (45). Zavedená hypotermie do klinické praxe byla také podpořena metaanalýzami těchto klinických studií (46, 47). Recentně někteří autoři prezentovali kritický pohled na dosavadní evidenci protektivní role hypotermie v poresuscitačním syndromu (49, 50). Analýzou dostupných randomizovaných dat poukazovali na to, že důkazy protektivního vlivu hypotermie jsou nekonzistentní. Jejich kritika byla založena na malém počtu publikovaných studií, nízké kvalitě dat a nezanedbatelnému riziku systémových a náhodných chyb. Navíc v publikovaných studiích byla hypotermie srovnávána se standardní péčí bez specifického ovlivnění tělesné teploty, mnohdy se spontánně vzniklou febrilií. Nepříznivé účinky febrilie a hypertemie byly navíc opakovaně popsány u široké populace kriticky nemocných (48) nebo u nemocných, kteří přežili oběhovou zástavu (51, 52). Relativní nedostatek evidence prospěšnosti mírné terapeutické hypotermie vedl k iniciaci velké multicentrické randomizované studie, která srovnávala hypotermii s kontrolovanou normotermií u nemocných po oběhové zástavě - studie TTM (Target Temperature Management) (54). V současné době je jen velmi málo vědeckých prací, které srovnávají

mírnou terapeutickou hypotermií s normotermií jak v klinických studiích (11) či na zvířecím modelu (12). Proto cílem této práce bylo porovnat účinky mírné terapeutické hypotermie a kontrolované normotermie na zvířecím modelu. Na prasečím modelu oběhové zástavy jsme testovali hypotézu, že hypotermie je účinnější než kontrolovaná normotermie v udržení krevního tlaku, mozkového okysličení, resuscitability, prevenci poškození orgánů a v potlačení oxidativního stresu.

4.1.2. Metody

4.1.2.1. Experimentální model

Do naší studie jsme zařadili 8 prasečích samic (*Sus scrofa domestica*), tělesné hmotnosti 45kg, stáří 4-5 měsíců. Zvířata byla náhodně rozdělena do skupiny hypotermie (HT) a normotermie (NT), v každé skupině byla 4 zvířata.

Celková anestezie byla vyvolána podáním azaperonu (2 mg/kg) a ketaminu (15-20 mg/kg) intramuskulárně. Následně jsme provedli orotracheální intubaci a byla zahájena umělá plicní ventilace. K udržení anestezie byla použita kontinuální infuze propofolu (8-10 mg/kg/hod.) a morfinu (0.1-0.2 mg/kg/hod.). Dávky byly upravovány na podkladě fyziologických parametrů, korneálního a papilárního reflexu, lakrimace a spontánních pohybů.

Jako cévní vstupy byly s pomocí Seldingerovské perkutánní punkční techniky použity femorální cévy (tepna a žíla) a dále jugulární žíla. Po úvodu do anestezie byla rychle podána infuze fyziologického roztoku (1000ml), který byl dále aplikován v kontinuální infuzi (200-500ml/hod.) s cílem udržení tlaku v pravé síni v rozmezí 3-7 mmHg. Podání bolusu nefrakcionovaného heparinu (100 j/kg i.v.) a poté kontinuální infuze 50 j/kg/hod. vedlo k docílení ACT (activated clotting time) mezi 180-250s. Hodnoty byly monitorovány každou hodinu systémem Hemochron (Hemochron Junior+ Microcoagulation System, ITC, USA).

K ventilaci jsme použili přístroj Hamilton G5 (Hamilton Medical AG, Švýcarsko) v modu Intellivent – ASV (Adaptive Support Ventilation). Ventilátor byl nastaven k udržování hodnoty periferní saturace O₂ (mezi 95-99%) a udržení hodnoty CO₂ ve vydechovaném vzduchu (38-42 mmHg). Během fáze srdeční zástavy zvířata nebyla ventilována. Během reperfuze, po ukončení srdeční zástavy byla zvířata ventilována s frakcí kyslíku 21%.

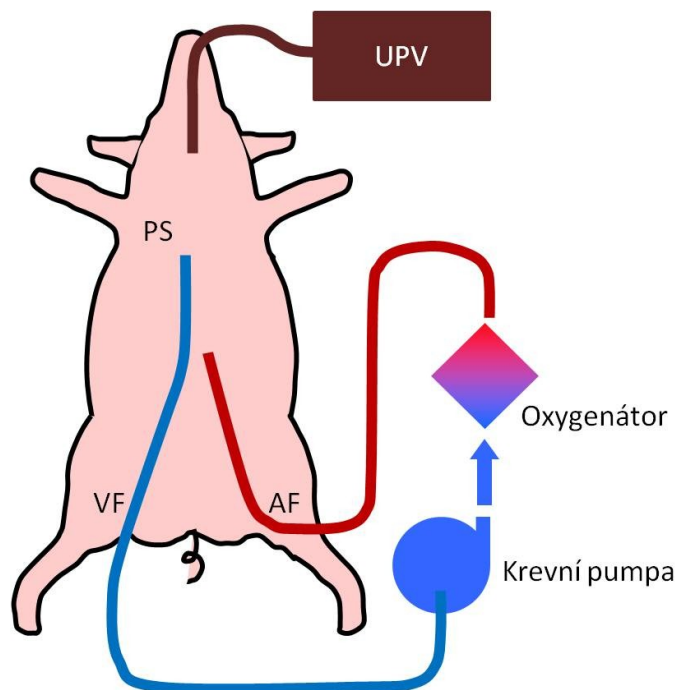
4.1.2.2. Monitorování vitálních funkcí

Arteriální tlak byl měřen invazivně (Truwave Edwards Lifesciences LLC, USA) pomocí pigtail katetru, umístěného v oblouku aorty. Swan-Ganzův katetr byl zaveden přes femorální žílu do plicnicové tepny. Kontinuálně bylo u všech zvířat monitorováno EKG, invazivně tlaky v oblouku aorty a v jugulární žíle, pulzní oxymetrie, kapnometrie, teplota tělesného jádra (plicní tepna) a invazivně saturace kyslíku v plicnicové tepně (Monitor Life Scope TR, Nihon Kohden, Japonsko; Vigilance II, Edwards Lifesciences, USA). Saturace hemoglobinu v kapilární krvi mozkové kůry byla měřena na principu NIRS (near-infrared spectroscopy), přístrojem INVOS (Somanetics, USA).

4.1.2.3. Extrakorporální membránová oxygenace (ECMO)

Systém ECMO byl složen z centrifugální pumpy Levitronix Centrimag (Thoratec, USA) a oxygenátoru (Maquet Cardiopulmonary AG, Germany) (obr. 2, 3); použili jsme směšovač plynů Sechrist (Sechrist, USA) (obr. 4). Vlastní kanyly (Maquet, Německo) systému pro mimotělní oběh jsme zavedli perkutánně Seldingerovskou technikou po dilatacích ve veno-arteriální konfiguraci cestou femorálních cév. Žilní nasávací kanyla (21 Fr) byla zavedena přes femorální žílu a dolní dutou žílu až do pravé síně (správná pozice byla dokumentována fluoroskopicky). Arteriální kanyla (15 Fr) byla zavedena cestou femorální tepny. Teplotu tělesného jádra jsme regulovali pomocí tepelného výměníku, připojeného na

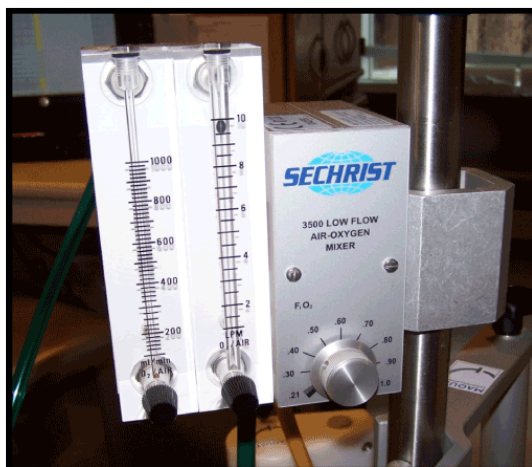
oxygenátor (obr. 5). Krevní plyny z oxygenátoru byly kontinuálně monitorovány (CDI™ Blood Parameter Monitoring systém 500, Terumo, USA). Během fáze neléčené srdeční zástavy jsme rychlost krevní pumpy nastavili na 0.5 l/min a průtok plynů v oxygenátoru byl zastaven. Během reperfuze po ukončení srdeční zástavy byla krevní pumpa nastavena na 4.5 l/min a průtok plynů byl nastaven a upravován s cílem udržet cílovou hodnotu pO_2 10-15 kPa a pCO_2 4.0-6.5 kPa.



Obrázek 2. Periferní veno-arteriální ECMO - schéma zapojení. Nasávání neokysličené krve z oblasti pravé síně (PS) cestou femorální žíly (VF). Přeš krevní pumpu a oxygenátor návrat okysličené krve cestou femorální tepny (AF). *UPV – umělá plicní ventilace, PS – pravá síň, VF – femorální žíla, AF – femorální tepna.*



Obrázek 3. Krevní pumpa Levitronix Centrimag.



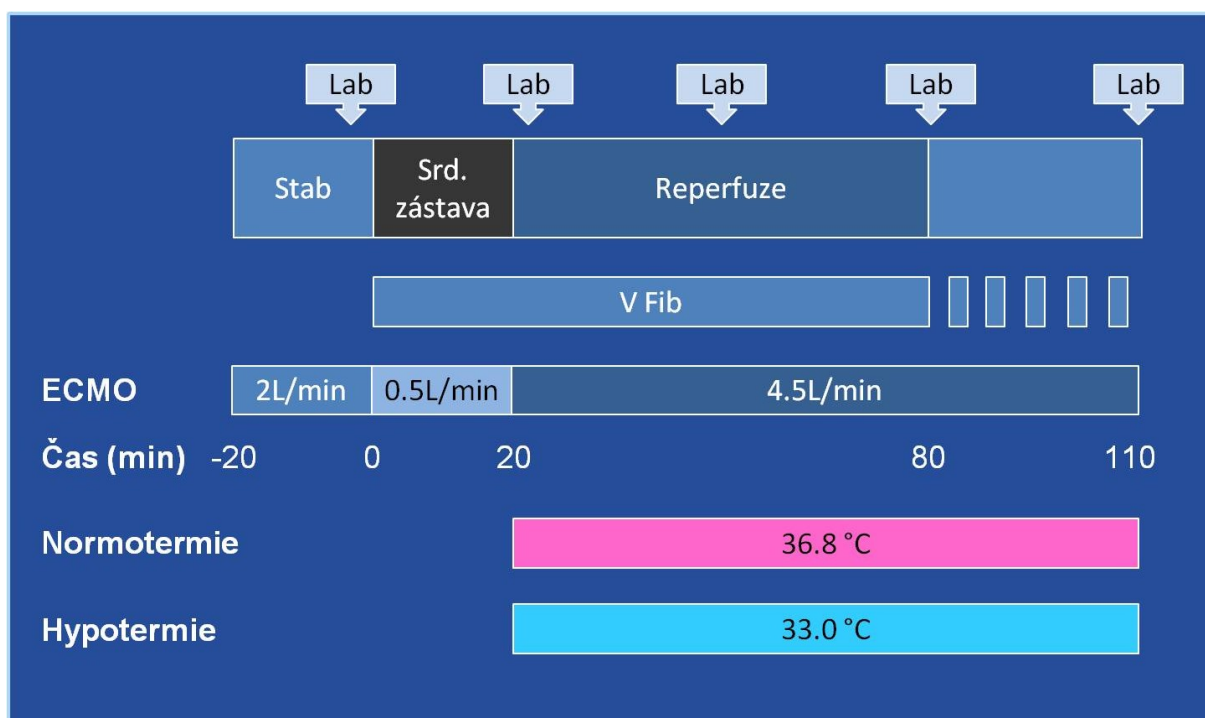
Obrázek 4. Směšovač plynů pro oxygenátor.



Obrázek 5. Teplotní výměník.

4.1.2.4. Protokol experimentu

Po zavedení všech katetrů a spuštění ECMO byla zvířata stabilizována po dobu 10 min. Následně jsme navodili oběhovou zástavu - fibrilaci komor - pomocí vysokofrekvenční stimulace z diagnostického katetru (Response, St. Jude medical, USA), který byl zaveden do hrotu pravé komory jugulárním přístupem. Oběhovou zástavu jsme udržovali po dobu 20 min, než došlo k obnovení oběhu zvýšením průtoku ECMO na 4.5 l/min. Po 60 min reperfuze následovaly až tři pokusy o defibrilaci (300–360–360 J) a zvířata byla sledována po dobu dalších 30 min. Zvířata byla randomizována do dvou skupin hypotermie (HT) nebo normotermie (NT); teplota jádra byla ve skupině HT udržována na úrovni 33°C a ve skupině NT na 36.8°C (obr. 6).



Obrázek 6. Schéma experimentálního protokolu.

Noradrenalin mohl být podán, pokud došlo ke snížení středního arteriálního tlaku pod hodnotu 60 mmHg, trvající alespoň po dobu 10 min od obnovení oběhu. Počáteční dávka byla

0.2 µg/kg/min a mohla být zvýšena na dvojnásobek nebo snížena na polovinu v čase 15 min, 20 min a následně každých 10 min od obnovení oběhu; zvýšení dávky bylo povoleno při hodnotách středního arteriálního tlaku pod 60 mmHg (maximální dávka 1.6 µg/kg/min) a snížení dávky při vzestupu tlaku nad tuto hodnotu.

4.1.2.5. Laboratorní testy

Vzorky krve byly odebírány po 90 min reperfuze a okamžitě centrifugovány. Sérum se uchovávalo zchladené při teplotě -70°C až do doby měření troponinu I (TnI), myoglobinu (MGB), kreatinkinázy (CK), alanin-aminotransferázy (ALT), neuron-specifické enolázy (NSE) a cystatinu C (CysC). Před oběhovou zástavou byly stanovovány hladiny reaktivních metabolitů kyslíku (ROM) a biologický antioxygenační potenciál (BAP). Tato měření byla opakována 1 min po obnově cirkulace a dále po 30, 60 a 90 min od reperfuze. ROM a BAP test byl bezprostředně zpracován a vyhodnocen.

Hladiny TnI a MGB se měřily chemiluminiscenční imunoanalýzou (Access Immunoassay System, Beckman Coulter Inc, USA); hladiny CK a ALT se měřily metodou podle Interacional Fedaration of Clinical Chemistry za použití Synchron System (Beckman Coulter, USA); hladiny NSE se hodnotily imunoradiometrickou analýzou (Backman Coulter Inc, USA); CysC se měřil imunoturbidimetrickou metodou (Gentian AS, Norsko). ROM a BAP test byl hodnocen pomocí Fras 4 Evolve free radical analytical system (H&D srl, Itálie).

4.1.2.6. Statistická analýza

Výsledky jsou vyjádřeny jako medián (minimum; maximum). K porovnání rozdílů krevního tlaku, dávky noradrenalinu, hodnot mozkové oxymetrie, ROM, BAP a hladin všech ostatních laboratorních parametrů mezi jednotlivými skupinami byl použit Mann-Whitneyův test. K porovnání rozdílů resucitability byl použit Fisherův test. Za statisticky významné

rozdíly jsou považovány hodnoty $P < 0.05$. Ke zpracování statistických analýz byl použit program GraphPad Prism verze 5.0 (GraphPad, USA).

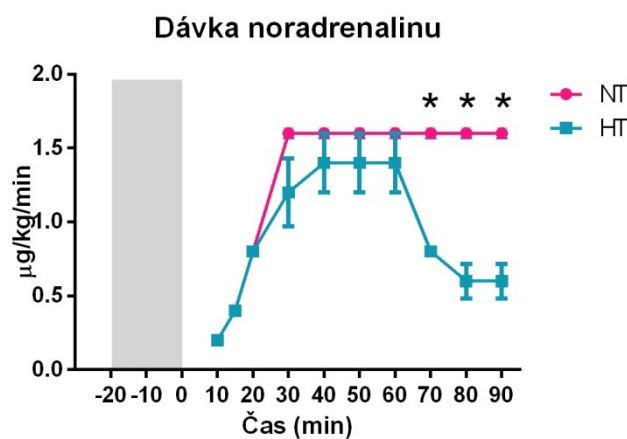
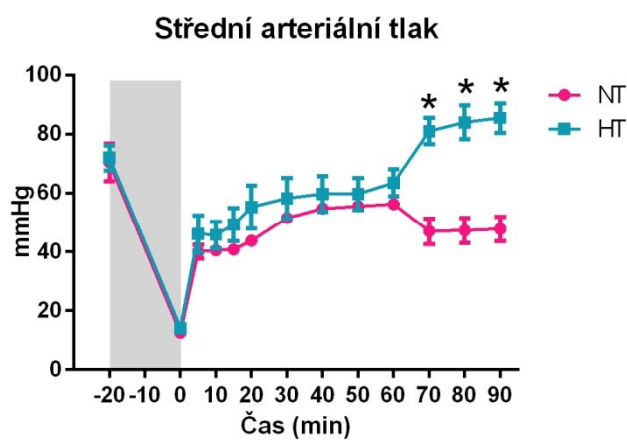
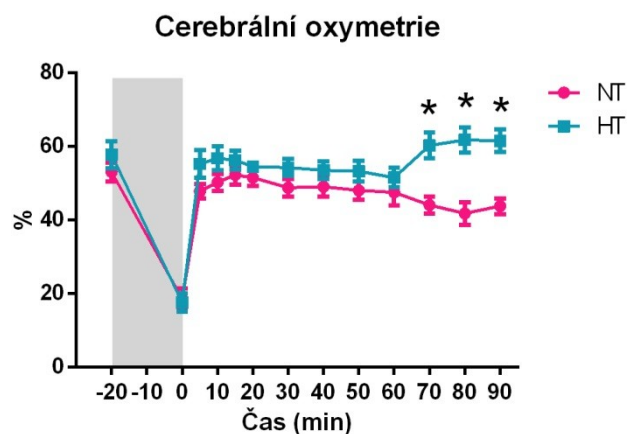
4.1.3. Výsledky

4.1.3.1. Krevní tlak, mozková oxymetrie, resuscitabilita

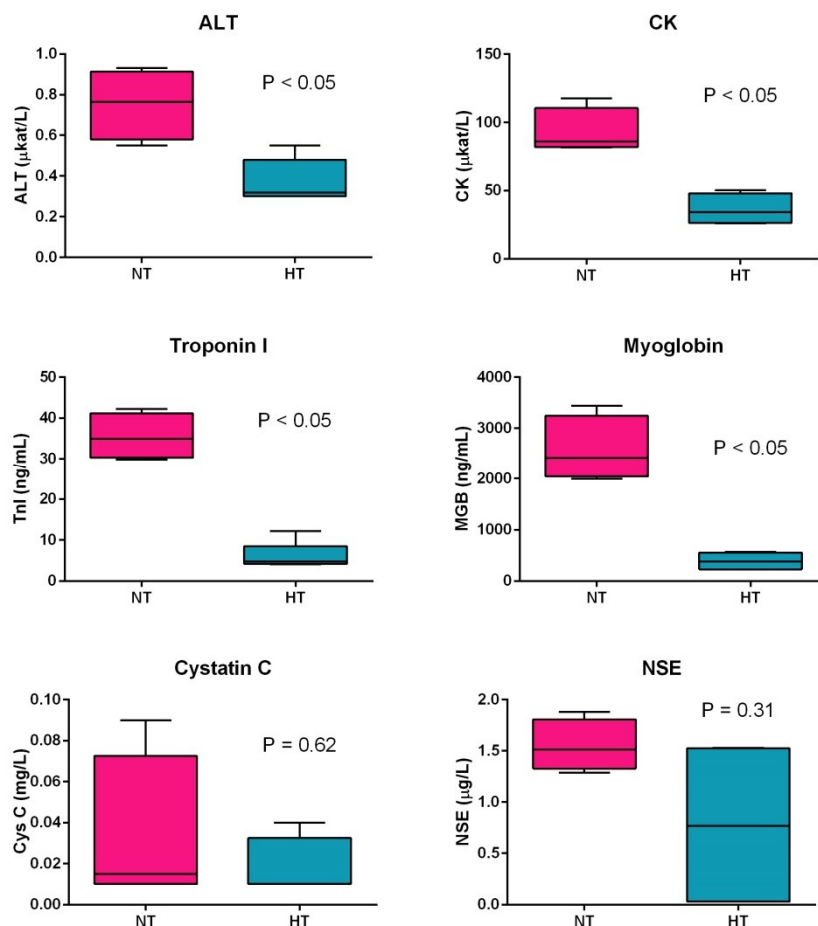
Vstupní hodnoty krevního tlaku a mozkové oxymetrie se nelišily a sledované parametry byly srovnatelné také po dobu prvních 60 min reperfuze (obr. 7). V 70., 80. a 90. min byly střední arteriální tlak a hodnota mozkové saturace významně vyšší a zároveň dávky noradrenalinu nižší ve skupině HT ($P < 0.05$; obr. 7). Defibrilace byla úspěšná u všech zvířat ve skupině HT, ale pouze u jednoho ve skupině NT ($P > 0.05$).

4.1.3.2. Ukazatelé orgánového poškození

Laboratorní parametry byly analyzovány ze vzorků krve, získaných v 90. min reperfuze. Hodnoty ALT, CK, MGB a TnI byly významně nižší ve skupině HT ve srovnání s NT skupinou (ALT: 0.36 (0.30; 0.55) vs. 0.79 (0.65; 1.27) $\mu\text{kat/L}$, $P < 0.05$; CK: 34.2 (26.0; 50.29) vs. 86.0 (81.6; 117.8) $\mu\text{kat/L}$, $P < 0.05$; MGB: 379.8 (225.3; 566.0) vs. 2423.0 (1995.0; 3442.0) ng/L , $P < 0.05$; TnI: 4.8 (4.0; 12.2) vs. 35.0 (29.8; 42.2) ng/L , $P < 0.05$) (obr. 8). Hladiny CysC a NSE se významně nelišily (Cys C: 0.01 (0.01; 0.04) vs. 0.02 (0.01; 0.09) ng/L , $P = 0.62$; NSE: 0.77 (0.03; 1.53) vs. 1.52 (1.29; 1.88) ng/L , $P = 0.31$) (obr. 8).



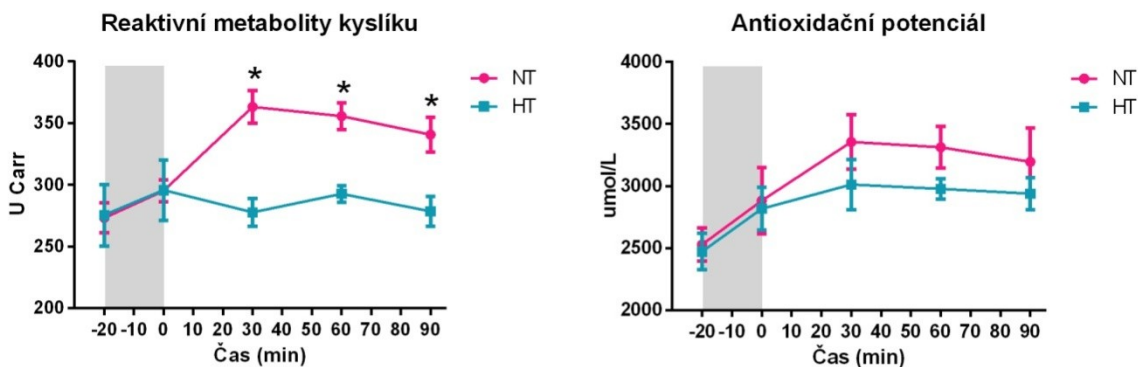
Obrázek 7. Hodnoty cerebrální oxymetrie, středního arteriálního tlaku a dávky noradrenalinu, vyjádřené jako medián (min; max). *NT* - normotermie; *HT* - hypotermie.



Obrázek 8. Hladiny biochemických parametrů orgánového poškození. Hodnoty vyjádřené jako medián (min; max). *NT* - normotermie; *HT* - hypotermie; *ALT* - alaninaminotransferáza, *CK* - kreatinkináza, *NSE* - neuron-specifická enoláza.

4.1.3.3. Oxidativní stres

Hodnoty ROM testu odebrané před a bezprostředně po oběhové zástavě byly srovnatelné ve skupině HT a NT, ale ve 30., 60. a 90. min reperfuze byly ve skupině HT významně nižší (obr. 9). Hladiny BAP byly srovnatelné ve skupině HT a NT ve všech měřeních.



Obrázek 9. Hladiny parametrů oxidativního stresu. Hodnoty vyjádřené jako medián (min; max). *NT* - normotermie; *HT* - hypotermie.

4.1.4. Diskuse

Hlavním originálním výsledkem této studie je zjištění, že mírná terapeutická HT (33°C) je ve srovnání s kontrolovanou NT (36.8°C) významně účinnější v udržení hodnoty krevního tlaku, mozkové oxygenace, v protekci orgánového poškození a v potlačení oxidativního stresu po oběhové zástavě.

Údaje o příznivém účinku mírné terapeutické hypotermie v léčbě nemocných po oběhové zástavě jsou zatím stále nedostatečné (49, 50). V kontrolních skupinách klinických studií, které testovaly účinnost hypotermie, často docházelo ke spontánní hypertermii, která se považuje za prokázaný významný rizikový faktor (51, 52). K dnešnímu dni bylo publikováno jen několik málo prací, které srovnávaly mírnou terapeutickou hypotermii s kontrolovanou normotermií po srdeční zástavě. Jia a kol. (12) na modelu resuscitované zástavy u laboratorního potkana zjistili častější výboje, následované dřívějším obnovením kontinuální aktivity na EEG a menší neurologický deficit u potkanů, léčených mírnou terapeutickou hypotermií ve srovnání s normotermií či hypertermií. Hörburger a kol. (11) v retrospektivním

pozorování popsali, že terapeutická hypotermie je spojena s významným zlepšením neurologického výsledku a s lepším 180 denním přežitím ve srovnání se spontánní normotermií u pacientů po oběhové zástavě mimo nemocnici.

Tyto práce jsou v souladu s výsledky naší studie. Zjistili jsme, že zvířata v HT měla vyšší hodnoty krevního tlaku, lepší oxygenaci mozku a nižší spotřebou noradrenalinu. Tyto rozdíly však dosáhly statistické významnosti pouze během posledních 30 min reperfuze po úspěšné defibrilaci u všech zvířat ve skupině HT. Hemodynamicky účinný srdeční rytmus byl však obnoven pouze u jednoho ze čtyř normotermických prasat. Přestože výsledky úspěšné defibrilace se významně nelišily, je možné, že vyšší hodnoty krevního tlaku a mozkové saturace v hypotermické skupině byly ovlivněny častější úspěšnou resuscitací. Navíc rozdíly krevního tlaku mezi HT a NT zvířaty mohly být ovlivněny také pokračováním kontinuální ECMO podpory, bez ohledu na výsledek defibrilace. Na druhé straně krevní tlak, tkáňová saturace, spotřeba vazopresorů a srdeční rytmus jsou závislé parametry. Proto je z klinického hlediska obtížné spekulovat, který z těchto faktorů hraje větší roli. Za zmínku stojí, že číselná hodnota krevního tlaku na jediném NT zvířeti po úspěšné defibrilaci byla o 10 mmHg nižší i přes vyšší dávku noradrenalinu než odpovídající hodnoty u všech hypotermických prasat.

Pozorovali jsme také nižší hladiny TnI, CK, MBG a ALT ve skupině HT, což ukazuje na protektivní účinek hypotermie na myokard, kosterní sval a jaterní buňky. Hladiny CysC a NSE, ukazatelé poškození ledvin a mozku, byly srovnatelné v hypotermické a normotermické skupině zvířat. Nicméně tyto parametry se blížily spodní hranici detekce v obou skupinách. Můžeme předpokládat, že 90 min reperfuze je příliš krátká doba k uvolnění těchto molekul do krevního oběhu.

Nižší hladiny ROM v průběhu reperfuze ve skupině HT, společně se srovnatelnými hladinami BAP mezi skupinami, ukazují, že tvorba reaktivních forem kyslíku je hypotermií potlačena a oxidativní stres je proto při hypotermii menší ve srovnání s normotermií. Tyto

výsledky jsou v souladu s naším předchozím pozorováním v klinické studii, kde aplikace mírné hypotermie u nemocných po oběhové zástavě byla spojena se sníženou tvorbou nitrotyrosinu a oxidu dusnatého (53).

Až po publikaci naší studie byly prezentovány výsledky klinické studie Target Temperature Management (TTM, Nielsen a kol.), ve který nebyl pozorován rozdíl v přežívání s dobrým neurologickým výsledkem mezi mírnou hypotermií a kontrolovanou normotermií u jedinců po srdeční zástavě (54). Tyto výsledky jsou tedy v přímém rozporu s naším pozorováním. Je však třeba zmínit, že výsledky TTM nejsou všeobecně přijímány, především vzhledem k ne zcela běžné a pravděpodobně výrazně selektované populaci či suboptimálně prováděné hypotermii, zahajované s velkým odstupem od obnovení oběhu (55).

Naše studie má několik omezení. Do každé skupiny jsme zařadili pouze čtyři zvířata, která byla sledována jen devadesát minut po srdeční zástavě. Také obnovení průtoku krve za použití V-A ECMO v klinických podmínkách není zcela běžným postupem, i když se stále častěji používá u refrakterní srdeční zástavy v rámci tzv. extrakorporální kardiopulmonální resuscitace. Nicméně s použitím ECMO jsme minimalizovali variabilitu krevního průtoku po resuscitaci, a zajistili "úspěšnou" obnovu oběhu u všech zvířat. Hladiny CysC a NSE, jako ukazatelů poškození ledvin a mozku, se neukázaly jako dostatečně citlivé parametry pro časnou detekci poškození.

4.1.5. Závěr

Výsledky této studie ukazují, že mírná hypotermie (33°C) je účinnější než kontrolovaná normotermie (36.8°C) v udržení hladiny krevního tlaku a mozkové saturace, v prevenci orgánového poškození a potlačení oxidativního stresu po oběhové zástavě.

4.2. Účinky ischemického postconditioningu a podání oxidu dusnatého na zvířecím modelu extrakorporální kardiopulmonální resuscitace

4.2.1. Úvod

Oběhová zástava je jednou z hlavních příčin smrti na světě. I přes pokroky v resuscitačních technikách v posledních letech umírá přibližně ½ nemocných bez obnovy spontánní cirkulace. Extrakorporální kardiopulmonální resuscitace (ECPR) představuje terapeutickou možnost řešení tak závažného stavu jakým je refrakterní oběhová zástava (56-62). Přeživší nemocní mají i po obnově cirkulace špatnou prognózu. Globální ischemie během zástavy oběhu spouští závažné patologické cesty, které mohou dále zhoršovat ischemické poškození především po reperfuzi. Ischemicko-reperfuzní poškození vede k rozvoji poresuscitačního syndromu, který je zodpovědný za další poškození tkání, často s fatálním koncem. A právě velké úsilí je věnováno snahám o prevenci rozvoje a progresi poresuscitačního syndromu. K dnešnímu dni je prokázáno, že pouze protektivní intervence v podobě cílené terapeutické hypotermie či kontrolované normotermie může redukovat poresuscitační poškození (5, 54, 63). Bylo prokázáno, že hypotermie příznivě ovlivňuje homeostasu vápníku a draslíku, chrání před hyperemií, ovlivňuje průtok krve mozkem (34), inhibuje uvolňování glutamátu (37), redukuje oxidativní stres (53), potlačuje zánět (64) a snižuje produkci tkáňových metaloproteináz (40). Během posledních let bylo navrženo několik dalších intervencí k ovlivnění ischemicko-reperfuzního poškození, které zahrnují ischemický postconditioning (IPC) a podání oxidu dusnatého (NO).

IPC zahrnuje několik krátkých epizod ischemie během reperfuze, následující prodloužený ischemický inzult (65). Pilotní studie Staata a kol. (66) prokázala, že IPC efektivně snižuje poškození myokardu a zlepšuje prognózu pacientů s akutním infarktem

myokardu. Rověž bylo prokázáno, že IPC může na zvířecím modelu zvrátit fibrilaci komor na sinusový rytmus (67, 68).

NO je molekula, která se účastní mnoha fyziologických signálních cest, které zodpovídají mimo jiné za vazodilataci. NO je in vivo produkován NO syntázami (NOS1, NOS2 a NOS3). Jeden z primárních cílů NO je rozpustná guanylát cykláza - NO se váže na její podjednotky a stimuluje produkci intracelulárního druhého posla cGMP. Bylo prokázáno, že NO snižuje ischemicko-reperfuzní poškození orgánů. Nadprodukce NOS3 v endoteliálních buňkách (69) nebo kardiomyocytech (70) snižuje ischemicko-reperfuzní poškození srdce, zatímco deficit NOS3 zhoršuje stunning myokardu, který byl ischemicko-reperfuzním poškozením vyvolán (71).

Na základě příznivého vlivu IPC i NO na ischemicko-reperfuzní poškození, který byl potvrzen experimentálními studii, byly tyto intervence navrženy jako možné protektivní metody léčby poresuscitačního syndromu (72-74). Doposud však schází data, která by se týkala účinku IPC a NO na výsledky ECPR.

Cílem naší studie bylo srovnání efektu IPC a podání NO s mírnou hypotermií na modelu prasete.

4.2.2. Metody

4.2.2.1. Experimentální model

Do této studie jsme zařadili 15 prasat samic (*Sus scrofa domestica*), tělesné hmotnosti 45kg, stáří 4-5 měsíců. Zvířata byla náhodně rozdělena do třech skupin, v každé skupině bylo 5 zvířat. U všech zvířat jsme použili experimentální model srdeční zástavy (75).

Celková anestezie byla vyvolána podáním azaperonu (2mg/kg) a ketaminu (15-20mg/kg) intramuskulárně. Následně jsme provedli orotracheální intubaci a byla zahájena umělá plicní ventilace. K udržení anestezie byla použita kontinuální infuze propofolu (8-10

mg/kg/hod.) a morfinu (0.1-0.2 mg/kg/hod.). Dávky byly upravovány na podkladě fyziologických parametrů, korneálního a papilárního reflexu, lakrimace a spontánních pohybů.

Jako cévní vstupy byly s pomocí Seldingerovské perkutánní punkční techniky použity femorální cévy (tepna a žíla) a dále jugulární žíla. Po úvodu do anestezie byla rychle podána infuze fyziologického roztoku (1000ml), který byl dále aplikován v kontinuální infuzi (200-500 ml/hod.) s cílem udržení tlaku v pravé síni v rozmezí 3-7 mmHg. Podání bolusu nefrakcionovaného heparinu (100 j/kg i.v.) a poté kontinuální infuze 50j/kg/hod. vedlo k docílení ACT (activated clotting time) mezi 180-250s. Hodnoty byly monitorovány každou hodinu systémem Hemochron (Hemochron Junior+ Microcoagulation System, ITC, USA).

K ventilaci jsme použili přístroj Hamilton G5 (Hamilton Medical AG, Švýcarsko) v modu Intellivent – ASV (Adaptive Support Ventilation). Ventilátor byl nastaven k udržování hodnoty periferní saturace O₂ (mezi 95-99%) a udržení hodnoty CO₂ ve vydechovaném vzduchu (38-42 mmHg). Během fáze srdeční zástavy zvířata nebyla ventilována. Během reperfuze, po ukončení srdeční zástavy byla zvířata ventilována s frakcí kyslíku 21%.

4.2.2.2. Monitorování vitálních funkcí

viz 4.1.2.2.

4.2.2.3. Extrakorporální membránová oxygenace (ECMO)

viz 4.1.2.3.

4.2.2.4. Protokol experimentu

Po zavedení všech katetrů a spuštění ECMO byla zvířata stabilizována po dobu 10 min. Následně jsme navodili oběhovou zástavu - fibrilaci komor - pomocí vysokofrekvenční

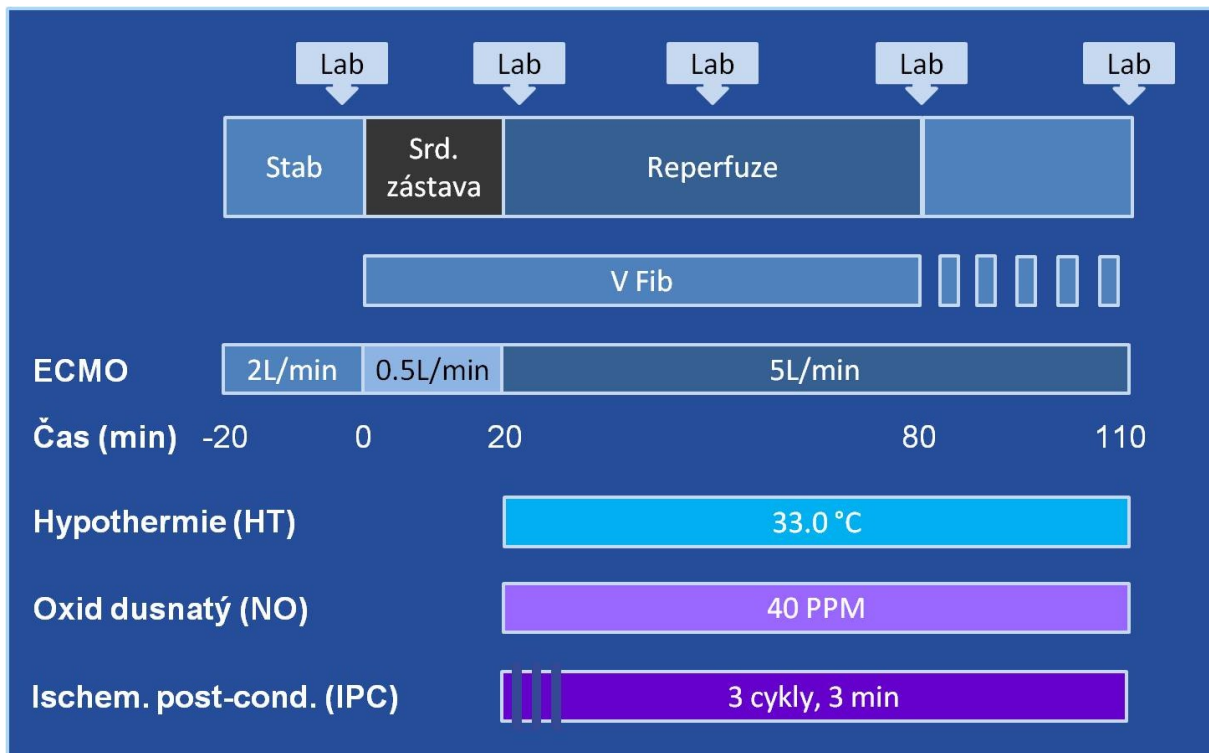
stimulace z diagnostického katetru (Response, St. Jude medical, USA), který byl zaveden do hrotu pravé komory jugulárním přístupem. Oběhovou zástavu jsme udržovali po dobu 20 min, než došlo k obnovení oběhu zvýšením průtoku ECMO na 4.5 l/min. (obr. 10). Po 60 min reperfuze následovaly až tři pokusy o defibrilaci (300–360–360 J) a zvířata byla sledována po dobu dalších 30 min (obr. 11). Zvířata byla randomizována do třech skupin: hypotermie (HT), oxid dusnatý (NO) a ischemický postconditioning (IPC). Ve skupině HT byla zvířata ihned po obnovení krevního oběhu ochlazována na cílovou teplotu tělesného jádra 33°C; cílové teploty bylo dosaženo do 5 min. u všech zvířat a tato teplota byla dále udržována až do ukončení pokusu pomocí teplotního výměníku, napojeného na oxygenátor. V NO skupině byl přidáván oxid dusnatý v koncentraci 80 ppm do směsi plynů, přiváděné do oxygenátoru po celou dobu reperfuze. Ve skupině IPC zvířata podstoupila tři cykly třiminutové globální ischemie, následované třiminutovou reperfuzí okamžitě po obnovení oběhu (obr. 11).



Obrázek 10. Napojení na periferní V-A ECMO cestou femorální tepny a žíly, kompletní hemodynamické monitorování zvířete v analgosedaci na umělé plicní ventilaci.

Noradrenalin mohl být podán, pokud došlo ke snížení středního arteriálního tlaku pod hodnotu 60 mmHg, trvající alespoň po dobu 10 min od obnovení oběhu. Počáteční dávka byla

0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ a mohla být zvýšena na dvojnásobek nebo snížena na polovinu v čase 15 min, 20 min a následně každých 10 min od obnovení oběhu; zvýšení dávky bylo povoleno při hodnotách středního arteriálního tlaku pod 60 mmHg (maximální dávka 1.6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) a snížení dávky při vzestupu tlaku nad tuto hodnotu.



Obrázek 11. Schéma experimentálního protokolu

4.2.2.5. Laboratorní testy

Vzorky krve byly odebírány po 90 min reperfuze a okamžitě centrifugovány. Sérum se uchovávalo zchlazené při teplotě -70°C až do doby měření troponinu I (TnI), myoglobinu (MGB), kreatinkinázy (CK), alanin-aminotransferázy (ALT), neuron-specifické enolázy (NSE) a cystatinu C (CysC). Před oběhovou zástavou byly stanovovány hladiny reaktivních

metabolitů kyslíku (ROM). Tato měření byla opakována 1 min po obnově cirkulace a dále po 30, 60 a 90 min od reperfuze. ROM test byl bezprostředně zpracován a vyhodnocen.

Hladiny TnI a MGB se měřily chemiluminiscenční imunoanalýzou (Access Immunoassay System, Beckman Coulter Inc, USA); hladiny CK a ALT se měřily metodou podle Interacional Federation of Clinical Chemistry za použití Synchron System (Beckman Coulter, USA); hladiny NSE se hodnotily imunoradiometrickou analýzou (Beckman Coulter Inc, USA); CysC se měřil imunoturbidimetrickou metodou (Gentian AS, Norsko). ROM test byl hodnocen pomocí Fras 4 Evolve free radical analytical system (H&D srl, Itálie).

4.2.2.6. Statistická analýza

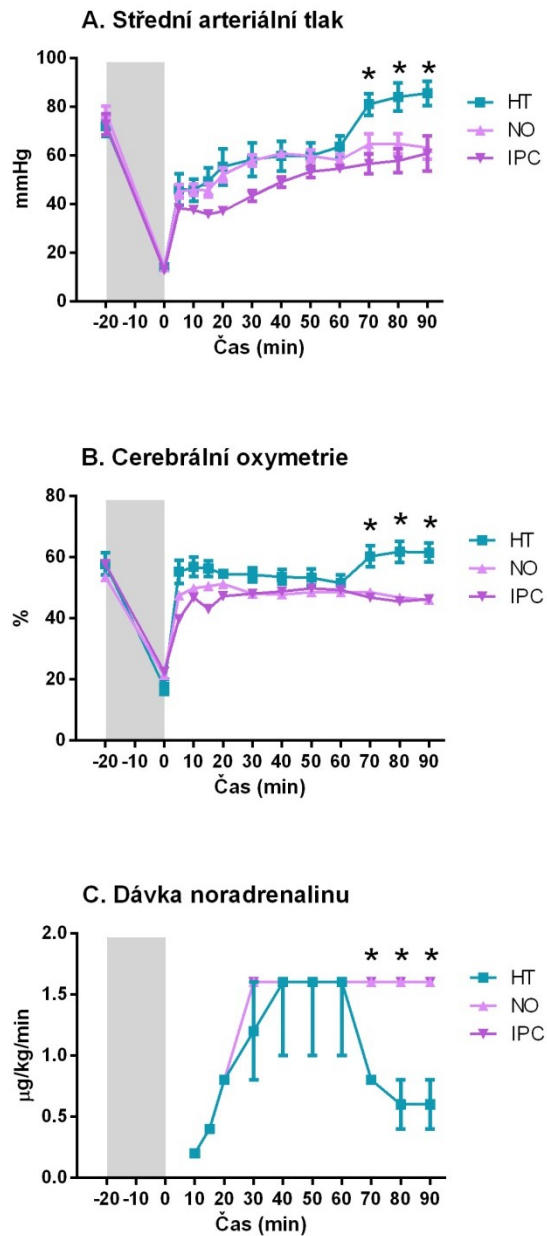
Výsledky jsou vyjádřeny jako medián (minimum; maximum). ANOVA test s dvojitým tříděním a Bonferoni vícenásobné porovnání byly použity k posouzení statistické významnosti rozdílů ve středním arteriálním tlaku, v hodnotách mozkové oxymetrie, v dávce noradrenalinu a v hladinách ROM. Kruskal-Wallisův test a Dunnova vícenásobná analýza byly použity k porovnání ostatních laboratorních parametrů. χ^2 test byl použit k posouzení rozdílů v resuscitabilitě. Za statisticky významné rozdíly byly považovány hodnoty $P < 0.05$. Ke zpracování statistických analýz byl použit program GraphPad Prism verze 5.0 (GraphPad, USA).

4.2.3. Výsledky

4.2.3.1. Krevní tlak, mozková oxymetrie, resuscitabilita

Vstupní hodnoty všech monitorovaných parametrů se u jednotlivých skupin nelišily. Střední hodnota arteriálního tlaku, mozková oxymetrie a dávky noradrenalinu byly srovnatelné mezi skupinami HT, NO a IPC i v průběhu prvních 60 min reperfuze. V 70., 80. a 90. min byly střední arteriální tlak a mozková saturace významně vyšší ve skupině HT,

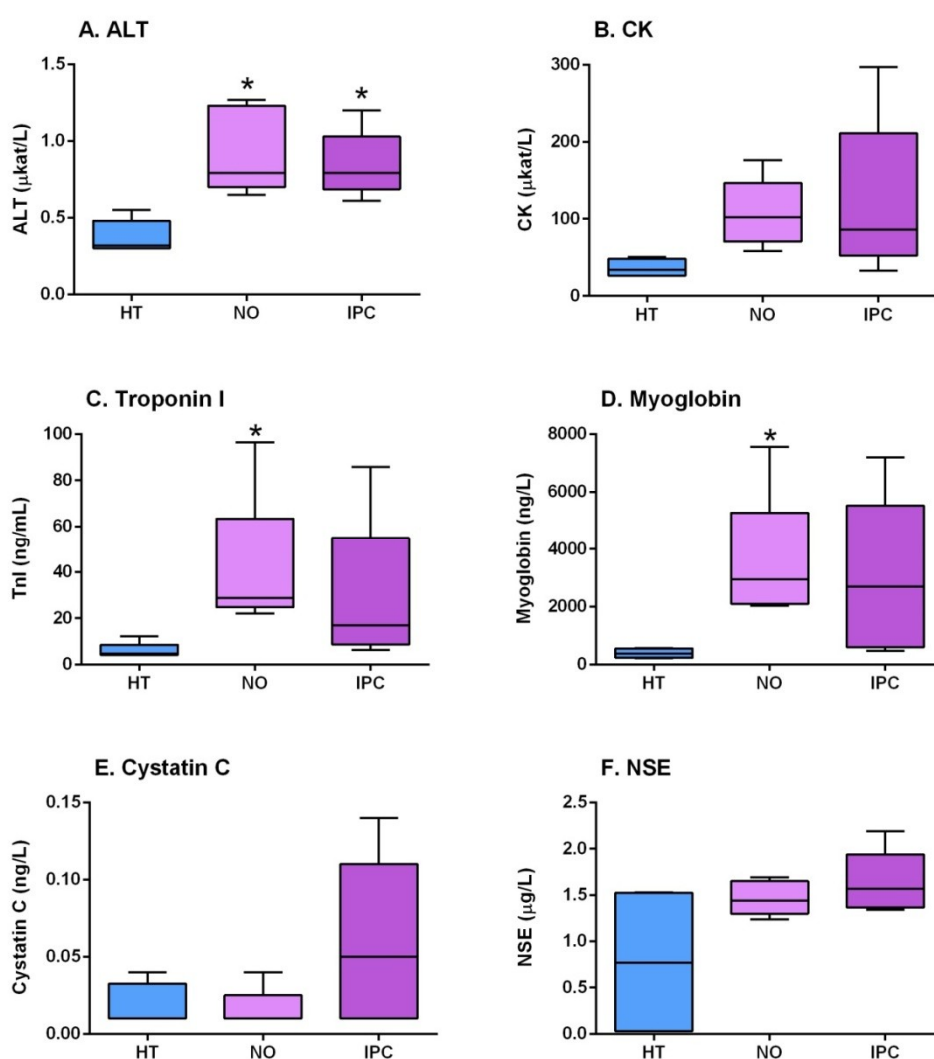
zatímco dávky noradrenalinu byly ve skupině HT nižší ve srovnání se skupinami NO a IPC (obr. 12). Defibrilace byla úspěšná u všech zvířat ve skupině HT, ale pouze u jednoho z pěti zvířat ve skupinách NO a IPC ($P=0.01$).



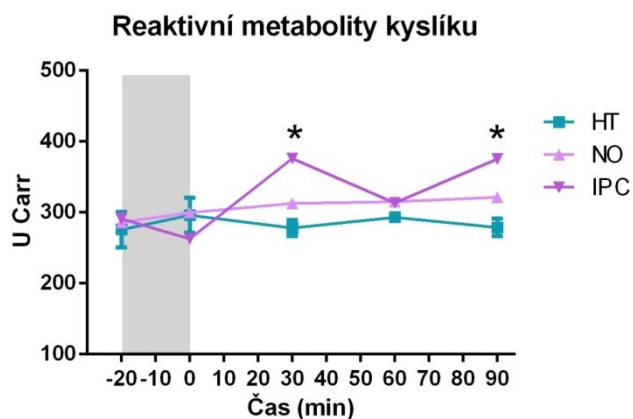
Obrázek 12. Hodnoty cerebrální oxymetrie, středního arteriálního tlaku a dávky noradrenalinu, vyjádřené jako medián (min; max). *HT* - hypotermie, *NO* - oxid dusnatý, *IPC* - ischemický postconditioning.

4.2.3.2. Ukazatelé orgánového poškození a oxidativního stresu

Nalezli jsme významné rozdíly v hodnotách ALT, CK, MGB a TnI (obr. 13). Hladiny ALT byly signifikantně nižší ve skupině HT ve srovnání s ostatními skupinami; hodnoty CK, MGB a TnI byly významně nižší ve skupině HT ve srovnání se skupinou NO, zatímco rozdíly mezi skupinou HT a IPC nedosáhly statistické významnosti; skupiny NO a IPC skupiny byly srovnatelné ve všech měřených parametrech (obr. 13). Hodnoty CysC, NSE a ROM se ve všech skupinách významně nelišily (obr. 13 a 14).



Obrázek 13. Hladiny ukazatelů orgánového poškození 90 minut po obnovení krevního oběhu po srdeční zástavě. *HT* - hypotermie; *NO* - oxid dusnatý; *IPC* - ischemický postconditioning, *ALT* - alanin-aminotransferáza, *CK* - kreatinkináza, *NSE* - neuron-specifická enoláza.



Obrázek 14. Hladiny metabolitů reaktivního kyslíku. *HT* – hypotermie; *NO* – oxid dusnatý; *IPC* – ischemický postconditioning.

4.2.4. Diskuse

Hlavním výsledkem této studie je originální pozorování, že ischemický postconditioning ani podání oxidu dusnatého neměly větší protektivní účinek na poresuscitační syndrom než hypotermie na zvířecím modelu oběhové zástavy a ECPR.

Prokázali jsme, že ve skupině HT byly vyšší hodnoty krevního tlaku a vyšší mozková oxymetrie s nižšími dávkami noradrenalinu ve srovnání se skupinami IPC a NO. Tyto rozdíly však dosáhly statistické významnosti až v 70., 80. a 90. min reperfuze, po úspěšné defibrilaci u všech zvířat ve skupině HT, zatímco účinný rytmus byl nastolen pouze u jednoho z pěti zvířat ve skupině NO a IPC. Vyšší arteriální tlak a vyšší hodnoty mozkové oxygenace ve skupině HT mohou zvyšovat šanci na úspěšnou defibrilaci. Krevní tlak, tkáňová saturace, spotřeba vazopresorů a srdeční rytmus jsou však závislé parametry; je obtížné spekulovat, který z těchto faktorů hraje důležitější roli. Nicméně úspěch defibrilace u zvířat ve skupině HT (100% vs. 20% v ostatních skupinách) ukazuje, že mírná terapeutická hypotermie může být spojená s větším kardioprotektivním potenciálem. Všechny měřené parametry orgánového

postižení byly srovnatelné či vyšší ve skupinách IPC a NO než ve skupině HT, nebyl zjištěn žádný rozdíl mezi skupinami IPC a NO a neprokázali jsme tedy protektivní účinek ischemického postconditioningu a podání oxidu dusnatého ve srovnání s hypotermií v prevenci orgánového postižení.

Tyto výsledky jsou v rozporu se studií Yannopoulose a kol. (76), kteří demonstrovali vyšší přežití a neuroprotektivní účinek ischemického postconditioningu na prasečím modelu srdeční zástavy. Tyto rozdíly mohou být vysvětleny použitím jiného experimentálního protokolu s kratším trváním srdeční zástavy a ischemickým postconditioningem s kratšími periodami ischemie a reperfuze v citované práci. Naše výsledky jsou naopak ve shodě s publikací Meybohma a kol. (77), kteří neprokázali protektivní účinek ischemického postconditioningu s verofluranem v kombinaci s hypotermií ve srovnání se samotnou hypotermií po srdeční zástavě.

Nepodařilo se nám prokázat ani protektivní účinek podávání NO po srdeční zástavě. Naše pozorování je v rozporu s pozorováním Nishidy a kol. (78), kteří zjistili, že srdeční NOS3 zmenšuje srdeční a neurologickou dysfunkci a inhibuje zánětlivou reakci u potkanů po srdeční zástavě. Minamishima a kol. (79) pozorovali vyšší přežívání myší, kterým byl podán hydrogen sulfid, stimuluje NOS, 24hodin po resuscitaci. Tyto rozdíly mohou být částečně vysvětleny rozdílným experimentálním uspořádáním, zvláště pak použitím exogenního NO v naší studii. Naše výsledky se však také liší od publikovaných prací, kde byl NO po srdeční zástavě podáván inhalačně. Minamishima a kol. (80) popsali zlepšené přežívání po srdeční zástavě u myší, které inhalovaly NO 23 hodin po obnovení oběhu. Kida a spol. (81) pozorovali nižší mortalitu u myší, které byly po oběhové zástavě léčené kombinací hypotermie a inhalace NO. Také tento rozpor s našimi výsledky může být vysvětlen nejen rozdílnými experimentálními modely, ale i aplikací NO prostřednictvím oxygenátoru v naší studii.

V naší práci jsme navíc testovali ischemický postconditioning a podání NO odděleně, přestože tyto mechanismy spolu mohou úzce souviset. Yang a spol. (82) popsali významně zvýšenou expresi inducibilní NOS u kosterních svalů potkanů jako výsledek ischemického postconditioningu. Nemůžeme tedy vyloučit, že protektivního účinku bychom mohli dosáhnout současnou aplikací NO a ischemického postconditioningu, nebo dokonce jejich kombinací s hypotermií. Samotná hypotermie totiž může ovlivnit produkci NO, jak ukázali Zorner a kol. (83) na prasečím modelu resuscitace při srdeční zástavě.

V této studii jsme demonstrovali, že hladiny ROM byly srovnatelné mezi skupinami NO, IPC a HT. Naše předchozí práce ukázaly, že mírná hypotermie po srdeční zástavě oxidativní stres tlumí (53, 75, 84). Výsledky této práce tedy nepřímou naznačují, že jak ischemický postconditioning tak podání NO mohou zmenšit oxidativní stres podobně jako hypotermie.

Naše studie má několik omezení. V první řadě jsme použili jenom pět zvířat do každé skupiny a sledování bylo pouze 90 min po srdeční zástavě. Nemůžeme vyloučit, že protektivní efekt ve skupinách IPC a NO by se mohl projevit později. V naší práci jsme sledovali účinky uvedených intervencí na modelu ECPR; nelze vyloučit, že při konvenční resuscitaci by byly výsledky jiné. Nicméně tento model ECPR zajišťuje úspěšné obnovení cirkulace u všech zvířat a eliminuje potenciální individuální variabilitu v obnově cirkulace při použití standardních resuscitačních technik.

4.2.5. Závěr

Výsledky této studie ukázaly, že po srdeční zástavě mají ischemický postconditioning a podání oxidu dusnatého menší protektivní účinek na udržení krevního tlaku, mozkovou oxygenaci a orgánové poškození než mírná léčebná hypotermie.

5. KLINICKÁ ČÁST DISERTAČNÍ PRÁCE

5.1. Stanovení hodnot nitrotyrosinu a nitritů/nitrátů u nemocných po oběhové zástavě, léčených mírnou terapeutickou hypotermií

5.1.1. Úvod

Jak již bylo uvedeno výše, protektivní účinek hypotermie u nemocných po oběhové zástavě byl popsán v několika klinických studiích, např. Bernard a kol. (5), HACA-Study (63). Globální ischemie během oběhové zástavy aktivuje celou řadu patogenetických mechanismů, které mohou následně způsobovat závažné poškození organismu - jedná se o tzv. ischemicko-reperfuzní poškození. Řada autorů prokázala, že jedním z klíčových patogenetických pochodů, odpovědných za ischemicko-reperfuzní poškození, je oxidativní stres. V současnosti je však zcela nedostatečná evidence o výskytu oxidativního stresu po oběhové zástavě a klinické údaje o vlivu hypotermie na oxidativní stres po srdeční zástavě zcela chybějí. Cílem této studie bylo proto stanovit ukazatele oxidativního stresu u nemocných po srdeční zástavě, léčených endovaskulární hypotermií.

5.1.2. Soubor a metodika

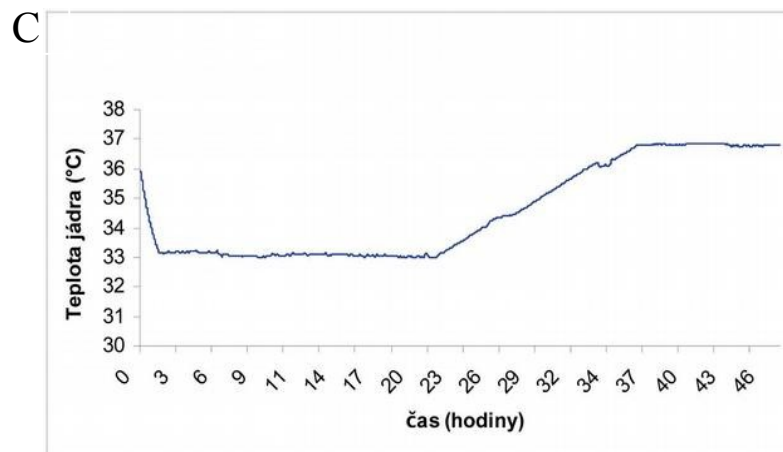
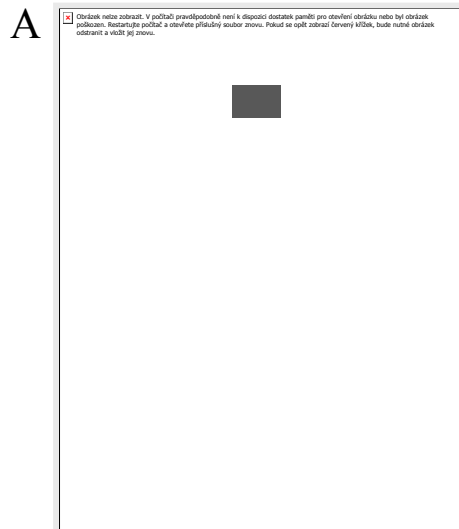
Do studie byli zařazováni nemocní po oběhové zástavě mimo nemocnici, kteří byli indikováni k mírné terapeutické hypotermii. Nemocným po oběhové zástavě byla aplikována již během transportu do nemocnice infuze chladného fyziologického roztoku rychlostí 30 ml/kg/hod. V této infuzi jsme pokračovali i po přijetí do nemocnice a byla ukončena po dosažení teploty 34 °C. U všech nemocných byla dále použita endovaskulárně řízená hypotermie s použitím systému Thermogard XP (Alsius, USA) (obr. 15). Cestou femorální žíly byl do 30 min od přijetí k hospitalizaci zaveden trojcestný chladicí katetr (Icy catheter,

Alsius, USA). Cílová teplota 33.0 °C byla udržována po dobu 24 hodin a následně probíhal řízený ohřev o 0.15 °C/hod. až do dosažení normotermie 36.8 °C. Normotermie byla dále udržována až do návratu vědomí (obr. 15). Primární teplotní čidlo bylo umístěno v močovém měchýři jako součást močového katetru, sekundární, tedy bezpečnostní tepelné čidlo bylo umístěno v axile nebo v plicnici (u nemocných, kteří měli zavedený plicnicový katetr). Vzorky krve ke stanovení ukazatelů oxidativního stresu byly měřeny každých 6 hodin po dobu 54 hodin od oběhové zástavy. Sérum bylo získáno centrifugací plné krve při otáčkách 1500/min. po dobu 5 minut a následně zamrazeno na -70 °C až do vlastního měření. Stanovovali jsme hladiny 3-nitrotyrosinu (nitrotyrosin), jako ukazatele produkce peroxynitritu, vznikajícího reakcí NO a superoxidu (85). Hladiny nitrotyrosinu byly stanoveny s použitím monoklonálních protilátek metodou ELISA (14). Nitráty spolu s nitrity jako nepřímé ukazatele produkce NO byly měřeny v séru za použití Siversova chemoluminiscenčního analyzátoru (GE Analytical Instruments, USA). Data byla analyzována ANOVA testem za použití Newman-Keulsovy vícenásobné post-test analýzy. Hodnota $P < 0.05$ byla považována za statisticky významnou. Ke zpracování statistických analýz byl použit program GraphPad Prism verze 4.0 (GraphPad, USA).

5.1.3. Výsledky

Kritéria studie splňovalo celkem 14 nemocných, z nichž byl 1 vyřazen pro technický problém zpracování vzorků, další 2 byli vyřazeni pro nemožnost podepsání informovaného souhlasu. Do studie bylo tedy celkem zahrnuto 11 pacientů (průměrný věk 58 let), většinou se jednalo o muže (10 z 11), tělesná teplota při přijetí byla 34.9 ± 0.2 °C. Všichni nemocní dosáhli cílové teploty 33 °C do 1 hodiny od přijetí. Střední arteriální tlak byl udržován v rozmezí 65-90 mmHg na vazopresorické či inotropní podpoře (noradrenalin, dobutamin), nikdo ze souboru nepotřeboval mechanickou podporu oběhu. Všichni nemocní s akutním

koronárním syndromem podstoupili selektivní angiografii věnčitých tepen, popřípadě spolu s perkutánní koronární intervencí.



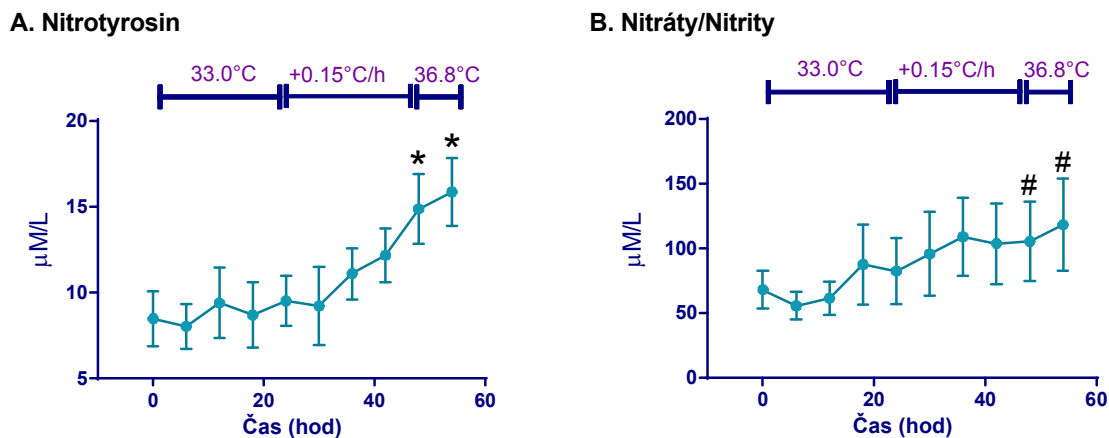
Obrázek 15. Endovaskulární hypotermie systémem Thermogard XP (A), řídicí konzole (B). Grafické schéma teplotního průběhu - rychlé zchlazení na 33 °C na dobu 24 hod. a následný řízený ohřev (C).

Pacient	Vstupní rytmus	Strukturální onemocnění srdce	ROSC (min)	EF LK (%)	30-denní přežití	CPC
1	Asystolie	AIM	8	20	Ano	1
2	Fibrilace komor	AIM	15	40	Ano	3
3	Fibrilace komor	AIM	17	50	Ano	4
4	Fibrilace komor	Chronické srdeční selhání	12	40	Ano	1
5	Fibrilace komor	AIM	16	15	Ano	1
6	Fibrilace komor	DKMP	25	15	Ne	5
7	Fibrilace komor	AIM	18	35	Ano	1
8	Asystolie	Žádné	15	55	Ano	1
9	Asystolie	AoS	16	30	Ano	2
10	Fibrilace komor	Chronické srdeční selhání	45	15	Ne	5
11	Fibrilace komor	Žádné	8	50	Ano	1

Tabulka 1. Základní charakteristika souboru nemocných po srdeční zástavě. *ROSC* - *return of spontaneous circulation*; *EF LK* - *ejekční frakce levé komory*; *CPC* – *cerebral performance category*, *CPC 1* – *návrat normálních mozkových funkcí a běžného života*, *CPC 2* – *mozkové poškození bez zásadnějšího vlivu na běžné fyzické aktivity*, *CPC 3* - *těžké poškození mozku a neschopnost samostatné existence*, *CPC 4* – *kóma*, *CPC 5* – *mozková smrt*; *AIM* - *akutní infarkt myokardu*; *DKMP* – *dilatační kardiomyopatie*; *AoS* - *aortální stenóza*.

Vysoce významné rozdíly jsme našli v hodnotách hladiny nitrotyrosinu ($P < 0.001$). Během normotermické periody (48. a 54. hodina), byly hladiny nitrotyrosinu výrazně vyšší ($P < 0.05$) ve srovnání s jejich hodnotou v průběhu hypotermického období (0., 6., 12., 18. a 24. hodina) (obr. 16A). Signifikantní rozdíly byly také pozorovány v hladinách nitritů/nitrátů

($P < 0.05$); během normotermie (48. a 54. hodina) byly hladiny nitritů/nitrátů významně vyšší nežli hodnoty získané v hypotermické periodě (6. a 12. hodina) ($P < 0.05$) (obr. 16B).



Obrázek 16. Hodnoty hladiny nitrotyrosinu (A) a hladiny nitrátů/nitritů (B) u přeživších nemocných po oběhové zástavě, kteří byli ošetřeni endovaskulární hypotermií. Cílová teplota jádra byla udržována na 33.0°C po dobu 24 hodin. Následný řízený ohřev o 0.15°C/hod. na teplotu 36.8°C. Normotermie byla kontrolována až do probuzení nemocného. Hodnoty jsou ukázány jako průměr ± SEM. * $P < 0.05$ v porovnání s hodnotou v 0, 6, 12, 18 a 24 hodině; # $P < 0.05$ v porovnání s hodnotou v 6 a 12 hodině.

5.1.4. Diskuse

Originálním výsledkem této studie bylo pozorování snížených hladin nitrotyrosinu a nitrátů/nitritů během mírné terapeutické hypotermie ve srovnání s hladinami, měřenými při normotermii u nemocných, kteří přežili oběhovou zástavu.

Je známo, že oxidativní stres hraje jednu z hlavních rolí v patogeneze ischemicko-reperfučního poškození (10, 86). Rychlý nárůst markerů oxidativního stresu a produkce NO

může být detekován u různých akutních klinických situací jako je trauma, cévní mozková příhoda, selhání jater nebo infekce (87, 88). Po publikaci dvou klinických studií, které dokumentují pozitivní vliv hypotermie na neurologickou prognózu (5, 63), se mírná terapeutická hypotermie stala nedílnou součástí péče o pacienty po oběhové zástavě. Snížení oxidativního stresu a produkce NO za použití hypotermie bylo popsáno u zvířecích modelů. V naší práci jsme však poprvé i v klinické studii prokázali, že hypotermie po srdeční zástavě může příznivě ovlivňovat také oxidativní stres.

Naše výsledky jsou v souladu s doposud publikovanými experimentálními studiemi. Jiang a kol. (88) popsali normalizaci hladin nitrátů/nitritů a signifikantní ovlivnění exprese NO systasy v mozku za použití hypotermie na modelu akutního ischemického jaterního selhání u potkanů. Stefanutti a kol. (89) pozorovali, že hypotermie u potkanů snižuje oxidativní stres u ischemicko-reperfučního poškození střeva. Scumpia a kol. (90) pozorovali při hypotermii inhibici produkce NO a myeloperoksidase zprostředkované poškození srdce po podání endotoxinu u potkanů. Han a kol. (42) zjistili, že hypotermie inhibuje tvorbu NO na experimentálním modelu cévní mozkové příhody a zánětu. Hypotermií zprostředkované ovlivnění exprese isoformy NO-systasy po lokální mozkové ischemii u potkanů popsali Karabiyikoglu a kol. (91). Lei a kol. (43) pozorovali snížení peroxidace lipidů se zachovalou antioxidační obranou účinkem hypotermie na modelu oběhové zástavy u psa.

Výsledky naší práce jsou v souladu i s dosud publikovanými klinickými studiemi, zaměřenými na vliv hypotermie na oxidativní stres u různých patologických stavů. Hayashi a kol. (87) pozorovali snížené hladiny nitrátů/nitritů jako výsledek ochlazení na cílové teploty 32-33 °C u nemocných s poraněním mozku nebo mozkovým krvácením. Podobně Wenisch a kol. (92) zjistili redukci tvorby reaktivních forem kyslíku při aplikaci mírné hypotermie během chirurgických výkonů. Bayir a spol. (93) pozorovali ochranný účinek hypotermie na antioxidační kapacitu po těžkém poranění mozku u dětí.

Naše studie má celou řadu omezení, vyplývající především z malé velikosti sledovaného souboru a z absence kontrolní skupiny. Z etického hlediska by však bylo neobhájitelné neposkytnout u nemocných po srdeční zástavě léčbu mírnou terapeutickou hypotermií. Z dnešního pohledu by se jistě nabízela možnost srovnání účinků kontroly tělesné teploty na úrovni 33°C a 36°C. V době provádění a publikace naší studie však byla tělesná teplota 33°C jedinou doporučenou cílovou teplotou v léčbě poresuscitačního syndromu. Oxidativní stres a produkce NO může být také ovlivněna iontovou nerovnováhou (např. dysbalancí hladin draslíku nebo vápníku) či laktátovou acidózou. V souladu se současnou klinickou prací byly však u všech nemocných, zařazených do studie, tyto poruchy korigovány v prvních hodinách od přijetí.

5.1.5. Závěr

Tato studie ukázala redukcí oxidativního stresu a nižší produkci NO během mírné terapeutické hypotermie u nemocných, kteří přežili oběhovou zástavu. Tyto výsledky tedy přinášejí nepřímou evidenci, že hypotermie může ovlivnit oxidativní stres a produkci NO u těchto nemocných. Lze se proto domnívat, že právě ovlivnění oxidativního stresu a produkce NO se může podílet na příznivém vlivu hypotermie na klinické výsledky u nemocných po oběhové zástavě.

6. SOUHRN VÝSLEDKŮ PRÁCE

- Na experimentálním modelu oběhové zástavy jsme ukázali, že mírná hypotermie po obnovení krevního oběhu je účinnější než kontrolovaná normotermie v udržení hladiny krevního tlaku a mozkové saturace, zmenšuje známky orgánového poškození a potlačuje oxidativní stres.
- Na experimentálním modelu srdeční zástavy jsme demonstrovali, že po srdeční zástavě má mírná léčebná hypotermie větší protektivní účinek na udržení krevního tlaku, mozkovou oxygenaci a orgánové poškození než ischemický postconditioning a podání oxidu dusnatého, přičemž oxidativní stres tyto metody ovlivňují srovnatelně.
- V klinické studii jsme pozorovali potlačení oxidativního stresu a produkce oxidu dusnatého během mírné terapeutické hypotermie u nemocných po srdeční zástavě.

7. ZÁVĚR

Výsledky práce, prováděné jak na experimentálním modelu u prasat, tak na souboru nemocných po srdeční zástavě v prospektivní klinické studii, potvrzují stanovené hypotézy, že ischemicko-reperfuzní poškození při srdeční zástavě je provázeno oxidativním stresem a mírná léčebná hypotermie oxidativní stres snižuje.

8. LITERATURA

8.1. Publikace autora, související s disertační prací, v časopisech s IF

1. Krüger A, Ošťádal P, Vondráková D, Janotka M, Herget J. Nitrotyrosine and nitrate/nitrite levels in cardiac arrest survivors treated with endovascular hypothermia. *Physiol Res* 2012,4(61): 425-430. IF: 1.531
2. Ošťádal P, Mlček M, Krüger A, Horáková S, Škabradová M, Holý F, Svoboda T, Bělohávek J, Hrachovina V, Táborský L, Dudková V, Psotová H, Kittnar O, Neuzil P. Mild therapeutic hypothermia is superior to controlled normothermia for the maintenance of blood pressure and cerebral oxygenation, prevention of organ damage and suppression of oxidative stress after cardiac arrest in a porcine model. *J Transl Med* 2013 May 20;11:124. IF: 3.991
3. Psotova H, Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, Janotka M, Vondrakova D, Svoboda T, Hrachovina M, Taborsky L, Dudkova V, Strunina S, Kittnar O, Neuzil P. Ischemic Postconditioning and Nitric Oxide Administration Failed to Confer Protective Effects in a Porcine Model of Extracorporeal Cardiopulmonary Resuscitation. *Artif Organs*. 2016 Apr;40(4):353-9. IF: 2.050

8.2. Publikace autora, nesouvisející s disertační prací, v časopisech s IF

1. Ošťádal P, Krüger A, Vondráková D, Janotka M, Psotová H, Neuzil P. Noninvasive assessment of hemodynamic variables using near-infrared spectroscopy in patients

- experiencing cardiogenic shock and individuals undergoing venoarterial extracorporeal membrane oxygenation. *J Crit Care* 2014 Aug;29(4):690. IF: 4.950
2. Ošťádal P, Mlček M, Krüger A, Hála P, Lacko S, Mates M, Vondráková D, Svoboda T, Hrachovina M, Janotka M, Mudrochová H, Strunina S, Kittnar O, Neužil P. Increasing venoarterial extracorporeal membrane oxygenation flow negatively affects left ventricular performance in a porcine model of cardiogenic shock. *Journal of Translational Medicine*, 2015, vol. 13, no. 1, s. 266-274. IF: 3.694
 3. Vondráková D, Ošťádal P, Krüger A. Immediate effect of intensive atorvastatin therapy on lipid parameters in patients with acute coronary syndrome. *Lipids Health Dis* 2010 Jul 14;9:71. IF:2.239
 4. Ošťádal P, Krüger A, Zdráhalová V, Janotka M, Vondráková D, Neužil P, Průcha M. Blood levels of copeptin on admission predict outcomes in out-of-hospital cardiac arrest survivors treated with therapeutic hypothermia. *Crit Care* 2012 Oct 4;16(5):R187. IF: 5.035
 5. Hubáček JA, Staněk V, Gebauerová M, Pilipčincová A, Dlouhá D, Poledne R, Aschermann M, Skalická H, Matoušková J, Krüger A, Pěnička M, Hrabáková H, Veselka J, Hájek P, Lánská V, Adamková V, Piňha J. A FTO variant and risk of acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2010 Aug 5;411(15-16):1069-72. IF:2.748
 6. Kutil B, Ošťádal P, Vejvoda J, Kukačka J, Cepová J, Alan D, Krüger A, Vondráková D. Alterations in serum selenium levels and their relation to troponin I in acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 2010 Dec;345(1-2):23-7. IF: 2.168
 7. Ošťádal P, Vondráková D, Krüger A, Janotka M, Psotová H, Průcha M. Alteration in lipoprotein-associated phospholipase A2 levels during acute coronary syndrome and its relationship to standard biomarkers. *Lipids Health Dis* 2012 Nov 10;11:153. IF: 2.015

8. Ošťádal P, Mlček M, Holý F, Horáková S, Královec Š, Škoda J, Petru J, Krüger A, Hrachovina V, Svoboda T, Kittnar O, Reddy VY, Neužil P. Direct comparison of percutaneous circulatory support systems in specific hemodynamic conditions in a porcine model. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012 Dec;5(6):1202-6. IF:5.947
9. Málek F, Ošťádal P, Pařenica J, Jarkovský J, Vítovec J, Widimský P, Linhart A, Fedorco M, Coufali Z, Miklík R, Krüger A, Vondráková D, Špinar J. Uric acid, allopurinol therapy, and mortality in patients with acute heart failure--results of the Acute HEart FAilure Database registry. *J Crit Care* 2012 Dec;27(6):737.e11-24. IF:2.510

8.3. Publikace autora, nesouvisející s disertační prací, v časopisech bez IF

1. Krüger A. Epileptické paroxysmy jako ekvivalent synkopy u těžké aortální stenóze. *Praktický lékař* 2007;87(4):241-242.
2. Krüger A. Defekt komorového septa jako komplikace infarktu myokardu *Kardiologie v primární péči*, 2007;2(2):72-73.
3. Ošťádal P, Alan D, Vejvoda J, Segethová J, Krüger A. Anti-Xa activity of enoxaparin and nadroparin in patients with acute coronary syndrome. *Exp Clin Cardiol* 2008 Winter;13(4):175-8.
4. Krüger A, Ošťádal P, Černý Š, Štursa P, Táborský M. Parciální poinfarktová ruptura stěny levé komory. *Cor et Vasa* 2009;3(51):212-213.
5. Krüger A, Ošťádal P, Táborský M. Perkutánně zaváděné mechanické srdeční podpory. *Postgraduální medicína* 2009;11(9):1028-1030.

6. Krüger A, Ošťádal P, Kmoníček P, Doubek D, Marounek J, Horáková E, Škabradová M, Neužil P, Táborský M. Profylaktické použití mimotělní podpory oběhu s membránovým oxygenátorem u rizikové perkutanní koronární intervence. *Cor et Vasa* 2010;52:141-145.
7. Krüger A, Ošťádal P, Vondráková D. Akutní koronární syndrom způsobený embolizací myxomu. *Praktický lékař* 2011;91(4):222-224.
8. Krüger A, Ošťádal P, Neužil P. Mini-invasive mechanical cardiac support. *Cas Lek Cesk.* 2011;150(12):647-50.
9. Hubáček JA, Staněk V, Gebauerová M, Pilipčincová A, Poledne R, Aschermann M, Skalická H, Matoušková J, Krüger A, Pěnička M, Hrabáková H, Veselka J, Hájek P, Lánská V, Adamková V, Piřha J. Lack of an association between connexin-37, stromelysin-1, plasminogen activator-inhibitor type 1 and lymphotoxin-alpha genes and acute coronary syndrome in Czech Caucasians. *Exp Clin Cardiol* 2010 Fall;15(3):e52-6. (IF až od r. 2011)
10. Krüger A, Ošťádal P, Černohorský S, Neužil P. Iatrogenní hemotorax jako komplikace punkce perikardiálního výpotku. *Intervenční a akutní kardiologie*, 2013;12(2):94-97.
11. Málek F, Ošťádal P, Krüger A, Vondráková D, Matoušková J, Neužil P. Levosimendan a renální funkce. *Kardiologická revue*, 2013;15(3):178-180.
12. Doškář P, Málek F, Dvořák J, Henyš P, Ošťádal P, Krüger A, Vondráková D, Janotks M, Říhová D, Neužil P. Vývoj renálních parametrů u pacientů s pokročilým srdečním selháním léčených levosimendanem – retrospektivní analýza. *Kardiologická revue - interní medicína*, 2014, roč. 16, č. 1, s. 31-33.
13. Ošťádal P, Krüger A, Vondráková D., Janotka M, Psotová H, Neužil P. Noninvasive assessment of hemodynamic variables using near-infrared spectroscopy in patients experiencing cardiogenic shock and individuals undergoing venoarterial

extracorporeal membrane oxygenation. *Journal of Critical Care*, 2014, vol. 29, no. 4, s. 690.e11-690.e15.

14. Littnerová S, Pařenica J, Špinar J, Vítovec J, Linhart A, Widimský P, Jarkovský J, Miklík R, Špinarová L, Zeman K, Bělohávek J, Málek F, Felsoci M, Kettner J, Ošťádal P, Čihalík Č, Špác J, Al-Hiti H, Fedorco M, Fojt R, Krüger A, Málek J, Mikusová T, Monhart Z, Boháčová S, Pohludková L, Roháč F, Václavík J, Vondráková D, Vyskočilová K, Bambouch M, Dušek L. Positive Influence of Being Overweight/Obese on Long Term Survival in Patients Hospitalised Due to Acute Heart Failure. *PLoS ONE*, 2015, vol. 2, no. 10, s. 1-15.
15. Krüger A. Srdeční zástava a poresuscitační péče. *Kardiologická revue - interní medicína*, 2015, roč. 17, č. 3, s. 230-233.

8.4. Použitá literatura

1. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation*. 2008;79(3):350-79.
2. Hollenberg J, Svensson L, Rosenqvist M. Out-of-hospital cardiac arrest: 10 years of progress in research and treatment. *Journal of internal medicine*. 2013;273(6):572-83.

3. Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation*. 1989;80(4):1049-62
4. Riess ML, Matsuura TR, Bartos JA, Bienengraeber M, Aldakkak M, McKnite SH, Rees JN, Aufderheide TP, Sarraf M, Neumar RW, Yannopoulos D. Anaesthetic Postconditioning at the Initiation of CPR Improves Myocardial and Mitochondrial Function in a Pig Model of Prolonged Untreated Ventricular Fibrillation. *Resuscitation*. 2014;85(12):1745-51.
5. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med*. 2002;11:557–563.
6. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68-78.
7. Rosenkranz ER, Buckberg GD, Laks H, Mulder DG. Warm induction of cardioplegia with glutamate-enriched blood in coronary patients with cardiogenic shock who are dependent on inotropic drugs and intra-aortic balloon support. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1983;86(4):507-18.
8. Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 1999;68(5):1905-12.
9. Ostadal P. What is 'reperfusion injury'? *Eur Heart J*. 2005;26(1):99
10. Dhalla NS, Temsah RM., Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*, 2000;18:655-673.
11. Horburger D, Testori C, Sterz F, Herkner H, Krizanac D, Uray T, Schober A, Stockl M, Stratil P, Weiser C. Mild therapeutic hypothermia improves outcomes compared

- with normothermia in cardiac-arrest patients-a retrospective chart review. *Crit Care Med.* 2012;40(8):2315-2319.
12. Jia X, Koenig MA, Venkatraman A, Thakor NV, Geocadin RG. Post-cardiac arrest temperature manipulation alters early EEG bursting in rats. *Resuscitation.* 2008;11:367–373.
 13. Aikens J, Dix TA. Peroxy radical (HOO*) initiated lipid-peroxidation - the role of fatty-acid hydroperoxides. *J Biol Chem*, 1991;266, p. 15
 14. Fisarkova B, Vytasek R, Mikova D, Vizek M. Hyperoxia attenuated nitrotyrosine concentration in the lung tissue of rats with experimental pneumonia. *Physiol. Res.* 2004;53:487-492
 15. Gaut JP, Yeh GC, Tran HD, et al. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001;98, p. 11 961-11 966.
 16. Lavelle F, McAdam ME, Fielden EM, Roberts PB. A pulse radiolysis study of the catalytic mechanism of the iron containing superoxide dismutase from *Photobacterium leiognathi*. *Biochem J.* 1977; 161(1):3-11.
 17. Ohta H, Adachi T, Hirano K. Internalization of human extracellular-superoxide dismutase by bovine aortic endothelial cells. *Radic Biol Med* 1994;16:501-507.
 18. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 2005;16, p. 577-586.
 19. Kolar F, Neckar J, Ostadal B, Maslov LN, Stakheev DL, Tayurskaya AS, Lishmanov YB. Role of ATP-sensitive K(+)-channels in antiarrhythmic and cardioprotective action of adaptation to intermittent hypobaric hypoxia. *Bull Exp Biol Med.* 2008;145(4):418-21.

20. Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med.* 2000;36(5):483-506.
21. Wolfson SK Jr, Safar P, Reich H, Clark JM, Gur D, Stezoski W, Cook EE, Krupper MA. Dynamic heterogeneity of cerebral hypoperfusion after prolonged cardiac arrest in dogs measured by the stable xenon/CT technique: a preliminary study. *Resuscitation.* 1992 Feb;23(1):1-20.
22. Vereczki V, Martin E, Rosenthal RE, Hof PR, Hoffman GE, Fiskum G. Normoxic resuscitation after cardiac arrest protects against hippocampal oxidative stress, metabolic dysfunction, and neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Jun;26(6):821-35.
23. Pusswald G, Fertl E, Faltl M, Auff E. Neurological rehabilitation of severely disabled cardiac arrest survivors. Part II. Life situation of patients and families after treatment. *Resuscitation.* 2000 Nov;47(3):241-8.
24. Kern KB, Hilwig RW, Berg RA, Rhee KH, Sanders AB, Otto CW, Ewy GA. Postresuscitation left ventricular systolic and diastolic dysfunction. Treatment with dobutamine. *Circulation.* 1997 Jun 17;95(12):2610-3.
25. Chareonthaitawee P, Gersh BJ, Araoz PA, Gibbons RJ. Revascularization in severe left ventricular dysfunction: the role of viability testing. *J Am Coll Cardiol.* 2005 Aug 16;46(4):567-74.
26. Shoemaker WC, Patil R, Appel PL, Kram HB. Hemodynamic and oxygen transport patterns for outcome prediction, therapeutic goals, and clinical algorithms to improve outcome. Feasibility of artificial intelligence to customize algorithms. *Chest.* 1992 Nov;102(5 Suppl 2):617S-625S.

27. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, Monchi M, Vinsonneau C, Fitting C, Fraise F, Dinh-Xuan AT, Carli P, Spaulding C, Dhainaut JF, Cavaillon JM. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome. *Circulation*. 2002 Jul 30;106(5):562-8.
28. Adrie C, Monchi M, Laurent I, Um S, Yan SB, Thuong M, Cariou A, Charpentier J, Dhainaut JF. Coagulopathy after successful cardiopulmonary resuscitation following cardiac arrest: implication of the protein C anticoagulant pathway. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Jul 5;46(1):21-8.
29. Ostadal P, Elmoselhi AB, Zdobnicka I, Lukas A, Chapman D, Dhalla NS. Ischemia-reperfusion alters gene expression of Na⁺-K⁺ ATPase isoforms in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Jun 27;306(2):457-62.
30. Skulec R, Kovarnik T, Dostalova G, Kolar J, Linhart A. Induction of mild hypothermia in cardiac arrest survivors presenting with cardiogenic shock syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2008 Feb;52(2):188-94. Epub 2007 Nov 13.
31. Holzer M, Behringer W. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2005 Apr;18(2):163-8.
32. Lanier WL. Cerebral metabolic rate and hypothermia: their relationship with ischemic neurologic injury. *J Neurosurg anesthesiol* 1995;7(3):216-221.
33. Erecinska M, Thoresen M, Silver IA. Effects of hypothermia on energy metabolism in Mammalian central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(5):513-530.
34. Liu L, Yenari MA. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front Biosci* 2007;12:816-825.
35. Mori K, Maeda M, Miyazaki M, Iwase H. Effects of mild (33 degrees C) and moderate (29 degrees C) hypothermia on cerebral blood flow and metabolism, lactate,

- and extracellular glutamate in experimental head injury. *Neurol Res.* 1998 Dec;20(8):719-26.
36. Graham SH, Shiraishi K, Panter SS, et al. Changes of extracellular amino acid neurotransmitters produced by focal cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 1990;110(1-2):124-130
37. Busto R, Globus MY, Dietrich WD, et al. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acid in rat brain. *Stroke* 1989;20(7):904-910.
38. Deng WG, Wu KK. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by p300 and p50 acetylation. *J Immunol.* 2003 Dec 15;171(12):6581-8
39. Chi JS, Kloner RA. Stress and myocardial infarction. *Heart.* 2003 May;89(5):475-6.
40. Lee JE, Yoon YJ, Moseley ME, Yenari MA. Reduction in levels of matrix metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke. *J Neurosurg.* 2005 Aug;103(2):289-97.
41. Globus MY, Busto R, Lin B, et al. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intras ischemic brain temperature modulation. *J Neurochem* 1995;65(3):1250-1256.
42. Han et al. Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *The Journal of Neuroscience*, 2002;22(10):3921-3928.
43. Lei B et al. Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. *Stroke*, 1994;25:147-152.
44. Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, Geocadin RG, Zimmerman JL, Donnino M, Gabrielli A, Silvers SM, Zaritsky AL, Merchant R, et al. Part 9: post-cardiac arrest

care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010, 122:S768–S786.

45. Deakin CD, Nolan JP, Soar J, Sunde K, Koster RW, Smith GB, Perkins GD. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation* 2010, 81:1305–1352.
46. Holzer M, Bernard SA, Hachimi-Idrissi S, Roine RO, Sterz F, Mullner M. Hypothermia for neuroprotection after cardiac arrest: systematic review and individual patient data meta-analysis. *Crit Care Med* 2005, 33:414–418.
47. Arrich J, Holzer M, Herkner H, Mullner M. Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD004128.
48. Badjatia N. Hyperthermia and fever control in brain injury. *Crit Care Med* 2009, 37:S250–S257.
49. Nielsen N, Friberg H. Insights from the evidence evaluation process—do we have the answers for therapeutic hypothermia? *Resuscitation*. 2011;82:501–502.
50. Nielsen N, Friberg H, Gluud C, Herlitz J, Wetterslev J. Hypothermia after cardiac arrest should be further evaluated—a systematic review of randomised trials with meta-analysis and trial sequential analysis. *Int J Cardiol*. 2011;151:333–341.
51. Zeiner A, Holzer M, Sterz F, Schorkhuber W, Eisenburger P, Havel C, Kliegel A, Laggner AN. Hyperthermia after cardiac arrest is associated with an unfavorable neurologic outcome. *Arch Intern Med*. 2001;161:2007–2012.
52. Takasu A, Saitoh D, Kaneko N, Sakamoto T, Okada Y. Hyperthermia: is it an ominous sign after cardiac arrest? *Resuscitation*. 2001;49:273–277.

53. Kruger A, Ostadal P, Vondrakova D, Janotka M, Herget J. Nitrotyrosine and nitrate/nitrite levels in cardiac arrest survivors treated with endovascular hypothermia. *Physiol Res*. 2012;61:425–430.
54. N. Nielsen, J. Wetterslev, T. Cronberg, et al. Target temperature management at 33 °C versus 36 °C after cardiac arrest. *N Engl J Med*, 369 (2013), pp. 2197–2206
55. Polderman KH, Varon J. Interpreting the results of the targeted temperature management trial in cardiac arrest. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2015 Jun;5(2):73-6.
56. Younger JG, Schreiner RJ, Swaniker F, Hirschl RB, Chapman RA, Bartlett RH. Extracorporeal resuscitation of cardiac arrest. *Acad Emerg Med* 1999;6:700–7.
57. Chen YS, Chao A, Yu HY, et al. Analysis and results of prolonged resuscitation in cardiac arrest patients rescued by extracorporeal membrane oxygenation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:197–203.
58. Megarbane B, Leprince P, Deye N, et al. Emergency feasibility in medical intensive care unit of extracorporeal life support for refractory cardiac arrest. *Intensive Care Med* 2007;33:758–64.
59. Le Guen M, Nicolas-Robin A, Carreira S, et al. Extracorporeal life support following out-of-hospital refractory cardiac arrest. *Crit Care* 2011;15:R29.
60. Haneya A, Philipp A, Diez C, et al. A 5-year experience with cardiopulmonary resuscitation using extracorporeal life support in non-postcardiotomy patients with cardiac arrest. *Resuscitation* 2012;83:1331–7.
61. Lin JW, Wang MJ, Yu HY, et al. Comparing the survival between extracorporeal rescue and conventional resuscitation in adult in-hospital cardiac arrests: propensity analysis of three-year data. *Resuscitation* 2010;81:796–803.

62. Fagnoul D, Combes A, De Backer D. Extracorporeal cardiopulmonary resuscitation. *Curr Opin Crit Care* 2014;20:259–65.
63. HACA-Study-Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med* 2002;346:549–56.
64. Deng H, Han HS, Cheng D, Sun GH, Yenari MA. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke* 2003;34:2495–501.
65. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579–88.
66. Staat P, Rioufol G, Piot C, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005;112:2143–8.
67. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, Valen G, Vaage J. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;25:1006–10.
68. Segal N, Matsuura T, Caldwell E, et al. Ischemic postconditioning at the initiation of cardiopulmonary resuscitation facilitates functional cardiac and cerebral recovery after prolonged untreated ventricular fibrillation. *Resuscitation* 2012;83:1397–403.
69. Jones SP, Greer JJ, Kakkar AK, et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H276–82.
70. Elrod JW, Greer JJ, Bryan NS, et al. Cardiomyocyte-specific overexpression of NO synthase-3 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1517–23.

71. Hannan RL, John MC, Kouretas PC, Hack BD, Matherne GP, Laubach VE. Deletion of endothelial nitric oxide synthase exacerbates myocardial stunning in an isolated mouse heart model. *J Surg Res* 2000;93:127–32.
72. Mangus DB, Huang L, Applegate PM, Gatling JW, Zhang J, Applegate RL 2nd. A systematic review of neuroprotective strategies after cardiac arrest: from bench to bedside (Part I-Protection via specific pathways). *Med Gas Res* 2014;4:9.
73. Kruzliak P, Pechanova O, Kara T. New perspectives of nitric oxide donors in cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation treatment. *Heart Fail Rev* 2014;19:383–90.
74. Ichinose F. Improving outcomes after cardiac arrest using NO inhalation. *Trends Cardiovasc Med* 2013;23:52–8.
75. Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, Horakova S, Skabradova M, Holy F, Svoboda T, Belohlavek J, Hrachovina V, Taborsky L, Dudkova V, Psotova H, Kittnar O, Neuzil P. Mild therapeutic hypothermia is superior to controlled normothermia for the maintenance of blood pressure and cerebral oxygenation, prevention of organ damage and suppression of oxidative stress after cardiac arrest in a porcine model. *J Transl Med* 2013;11:124.
76. Yannopoulos D, Segal N, Matsuura T, et al. Ischemic postconditioning and vasodilator therapy during standard cardiopulmonary resuscitation to reduce cardiac and brain injury after prolonged untreated ventricular fibrillation. *Resuscitation* 2013;84:1143–9.
77. Meybohm P, Gruenewald M, Zacharowski KD, et al. Mild hypothermia alone or in combination with anesthetic postconditioning reduces expression of inflammatory cytokines in the cerebral cortex of pigs after cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care* 2010;14:R21.

78. Nishida T, Yu JD, Minamishima S, et al. Protective effects of nitric oxide synthase 3 and soluble guanylate cyclase on the outcome of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *Crit Care Med* 2009;37:256–62.
79. Minamishima S, Bougaki M, Sips PY, et al. Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation* 2009;120:888–96.
80. Minamishima S, Kida K, Tokuda K, et al. Inhaled nitric oxide improves outcomes after successful cardiopulmonary resuscitation in mice. *Circulation* 2011;124:1645–53.
81. Kida K, Shirozu K, Yu B, Mandeville JB, Bloch KD, Ichinose F. Beneficial effects of nitric oxide on outcomes after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in hypothermia-treated mice. *Anesthesiology* 2014;120:880–9.
82. Yang M, Angel MF, Pang Y, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in muscle flaps treated with ischemic preconditioning. *Hand (N Y)* 2012;7:297–302.
83. Zoerner F, Wiklund L, Miclescu A, Martijn C. Therapeutic hypothermia activates the endothelin and nitric oxide systems after cardiac arrest in a pig model of cardiopulmonary resuscitation. *PLoS ONE* 2013;8:e64792.
84. Sunde K, Pytte M, Jacobsen D, et al. Implementation of a standardised treatment protocol for post resuscitation care after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation* 2007;73:29–39.
85. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 9: 836-844, 1996. 2012 Oxidative Stress in Cardiac Arrest Survivors
86. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 47: 446-456, 2000.

87. Hayashi N, Utagawa A, Kinoshita K, Izumi T. Application of a novel technique for clinical evaluation of nitric oxide-induced free radical reactions in ICU patients. *Cell Mol Neurobiol* 19: 3-17, 1999.
88. Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Hypothermia attenuates oxidative/nitrosative stress, encephalopathy and brain edema in acute (ischemic) liver failure. *Neurochem Int* 55: 124-128, 2009.
89. Stefanutti G, Perro A, Vinardi S, Sspitz L, Eaton S. Moderate hypothermia protects against systemic oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock* 24: 159-164, 2005.
90. Scumpia PO, Sarcia PJ, Kelly KM, Demarco VG, Skimming JW. Hypothermia induces anti-inflammatory cytokines and inhibits nitric oxide and myeloperoxidase-mediated damage in the hearts of endotoxemic rats. *Chest* 125: 1483-1491, 2004.
91. Karabiyikoglu M, Han HS, Yenari MA, Steinberg GK. Attenuation of nitric oxide synthase isoform expression by mild hypothermia after focal cerebral ischemia: variations depending on timing of cooling. *J Neurosurg* 98: 1271-1276, 2003.
92. Wenisch C, Narzt E, Sessler DI, Parschalk B, Lenhardt R, Kurz A, Graninger W. Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. *Anesth Analg* 82: 810-816, 1996.
93. Bayir H, Adelson PD, Wisniewski SR, Shore P, Lai Y, Brown D, Janesko-Feldman KL, Kahan VE, Kochanek PM. Therapeutic hypothermia preserves antioxidant defenses after severe traumatic brain injury in infants and children. *Crit Care Med* 37: 689-695, 2009.

9. PŘILOŽENÉ ORIGINÁLNÍ PRÁCE

Příloha 1

Ostadal P, Mlcek M, Krüger A, Horakova S, Skabradova M, Holy F, Svoboda T, Belohlavek J, Hrachovina V, Taborsky L, Dudkova V, Psotova H, Kittnar O, Neuzil P. Mild therapeutic hypothermia is superior to controlled normothermia for the maintenance of blood pressure and cerebral oxygenation, prevention of organ damage and suppression of oxidative stress after cardiac arrest in a porcine model. *J Transl Med* 2013 May 20;11:124. IF: 3.991

Příloha 2

Psotova H, Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, Janotka M, Vondrakova D, Svoboda T, Hrachovina M, Taborsky L, Dudkova V, Strunina S, Kittnar O, Neuzil P. Ischemic Postconditioning and Nitric Oxide Administration Failed to Confer Protective Effects in a Porcine Model of Extracorporeal Cardiopulmonary Resuscitation. *Artif Organs*. 2016 Apr;40(4):353-9. IF: 2.050

Příloha 3

Krüger A, Ostadal P, Vondrakova D, Janotka M, Herget J. Nitrotyrosine and nitrate/nitrite levels in cardiac arrest survivors treated with endovascular hypothermia. *Physiol Res* 2012,4(61): 425-430. IF: 1.531