

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Specializace ve zdravotnictví

Zdravotnická technika



Autor: Kristýna Havelková

Vliv užití mimotělního oběhu s membránovou oxygenací (ECMO) na hladiny antibiotik v plicích živého modelu.

Effect of the use of extracorporeal circulation with membrane oxygenation (ECMO) in the levels of antibiotics in the lungs of the living model.

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Drahomíra Springer, Ph.D.

Pracoviště:

ÚLBLD 1. LF UK a VFN, U Nemocnice 2, Praha 2

Praha 2012

HAVELKOVÁ, Kristýna. *Vliv užití mimotělního oběhu s membránovou oxygenací (ECMO) na hladiny antibiotik v plicích živého modelu*. Praha, 2012. 47 s., Bakalářská práce (Bc.). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Vedoucí práce Ing. Springer, Drahomíra, Ph.D.

Poděkování

Tato bakalářská práce byla vypracována pod odborným vedením paní Ing. Drahomíry Springer, Ph.D. a za pomoci pana MUDr. Jana Bělohlávka, kterým tímto velmi děkuji za mnoho cenných rad a připomínek, ale i za čas, který mi věnovali a za jejich velkou ochotu a trpělivost.

Prohlášení:

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

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

V Praze, 17. 05. 2012

Kristýna Havelková

Podpis

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
SEZNAM ZKRATEK	8
1. CÍL PRÁCE	10
2. ÚVOD	11
2.1 ANATOMIE A FYZIOLOGIE KREVNIHO OBĚHU A DÝCHACÍHO SYSTÉMU	11
2.1.1 <i>Anatomie a fyziologie krevního oběhu</i>	11
2.1.2 <i>Anatomie a fyziologie dýchacího systému</i>	12
2.2 PATOFYZIOLOGIE KARDIOVASKULÁRNÍHO A DÝCHACÍHO SYSTÉMU	13
2.2.1 <i>Patofyziologie kardiovaskulárního systému</i>	13
2.2.2 <i>Patofyziologie dýchacího systému</i>	13
2.3 ECMO	14
2.3.1 <i>Extra Corporal Membrane Oxygenation</i>	14
2.3.2 <i>Části systému ECMO</i>	16
2.4 FARMAKOKINETIKA	19
2.5 ANTIBIOTIKA	20
2.6 ANATYLIKA ANTIBIOTIK	22
3. MATERIÁL A METODY	28
3.1 PROJEKT	28
3.2 POUŽÍVANÝ MATERIÁL, METODY A PŘÍSTROJE	30
3.2.1 <i>Používaný materiál, metody</i>	30
3.2.2 <i>Přístroje</i>	31
4. VÝSLEDKY	33
4.1 POUŽITÉ MEZE DETEKCE	33
4.2 PILOTNÍ SÉRIE MĚŘENÍ	33
4.3 SÉRIE MĚŘENÍ PROSINEC	38
6. ZÁVĚR	45
7. LITERATURA	46

Abstrakt

V červenci, srpnu a v prosinci proběhl pilotní projekt vyšetřování dostupnosti antibiotik do plic na modelu selat léčených VA ECMO. V rámci studie byly odebrány a dále zpracovány vzorky z plicnice, arterie, ECMO a BAL.

Ke stanovení analytů byly použity různé analyzátory, kterými laboratoř disponuje, a jsou schopné provádět potřebná vyšetření. Většina analyzátorů používá meze detekce od výrobce. Naměřené hodnoty byly i nižší než tyto meze, bylo důležité zjistit, zda jsou relevantní a tudíž použitelné pro další statistické zpracování.

Data z tohoto projektu byla znovu vyhodnocena pomocí nově vypočtených mezí detekce. Z celkového souboru 12 selat všechna projekt úspěšně dokončila, 2 z nich utrpěla plicní edém. Při použití VA ECMO nedochází navzdory zdánlivému snížení plicního průtoku ke snížení koncentrace vancomycinu, gentamicinu ani amikacinu v plicní tepně a do jedné hodiny po podání antibiotika mohou být detekována v tracheálním punktátu.

Klíčová slova: ECMO, farmakokinetika, antibiotika, mez detekce

Abstract

In July, August and December was conducted a pilot project investigating the availability of antibiotics to the lungs on the model of piglets treated with VA ECMO. In the study were collected and processed samples from the pulmonary artery, artery, ECMO and BAL.

To determine the analytes there were used different analyzers that are capable of conducting the investigation. Most analyzers use the detection limit from the manufacturer. The measured values were lower than those limits, it was important to determine whether they are relevant and therefore usable for further statistical processing.

Data from this project was evaluated using the newly calculated limits of detection. Of the total group of 12 piglets all successfully completed the project, 2 of them suffered a pulmonary edema. It was concluded that the use of VA ECMO, despite the apparent reduction in pulmonary flow, does not reduce the concentration of vancomycin, gentamicin or amikacin in pulmonary artery and within one hour after administration of antibiotics can be detected in the tracheal aspirate.

Keywords: ECMO, pharmacokinetics, antibiotics, limit of detection

Seznam zkratek

a. – arterie, tepna

ALF – alveolar lining fluid, tekutina pokrývající vnitřní povrch plicních sklípků

ASV – adaptive support ventilation, adaptivní ventilační podpora

ATB – antibiotika

BAL – broncho-alveolární laváž

dx. – dexter

ECMO – extrakorporální membránová oxygenace

FF – femoro-femorální

FiO₂ – fraction of inspired oxygen O₂, inspirační koncentrace kyslíku

FS – femoro-subclaviální

G+ – grampozitivní bakterie

G- – gramnegativní bakterie

IABP – intraaortální balonková podpora

im. – intramuskulární, do svalu

iv. – intravenozní, do žíly

MBC – minimální baktericidní koncentrace

MD – mez detekce

MIC – minimální inhibiční koncentrace

paCO₂ – parciální tlak oxidu uhličitého

paO₂ – parciální tlak kyslíku

sin. – sinister

v. – vena, žíla

VA – veno-ateriální

VF – fibrilace komor

1. Cíl práce

Cílem práce je zjistit zda má užití mimotělního oběhu významnější vliv na dostupnost antibiotik do plic. Hladina antibiotik bude sledována jak v plicnici, tak v artérii, stejně jako v broncho-alveolárním výplachu. Výsledky budou statisticky zpracovány, jejich hladina bude korelována s vyšetřením urey ve shodných vzorcích.

2. Úvod

2.1 Anatomie a fyziologie krevního oběhu a dýchacího systému

2.1.1 Anatomie a fyziologie krevního oběhu

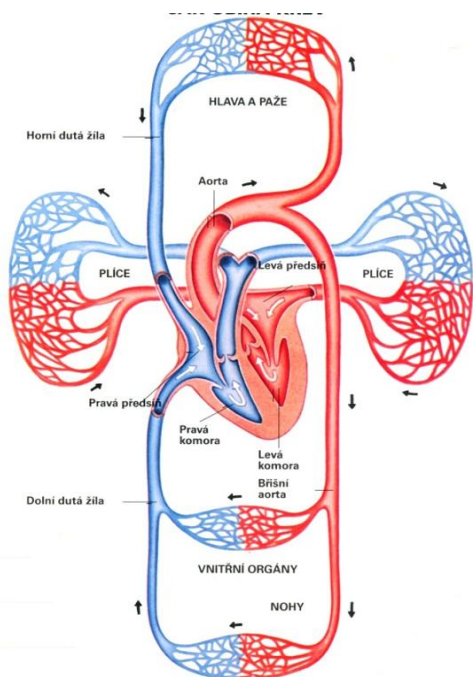
Propojení srdce a cév je uskutečněno malýma velkým krevním oběhem.

Malý krevní oběh (plicní)

Do malého krevního oběhu je přiváděna odkysličená krev z celého těla přes v. cava superior a inferior do pravé předsíně, dále přes trikuspidální chlopeň do pravé komory. Přes truncus pulmonalis, který se rozděluje na arteria pulmonalis dx. a sin. je krev přivedena do levé a pravé plicí. V plicích se krev okysličuje a plicními žilami, dvě venae pulmonales dx. a dvě venae pulmonales sin., proudí do levé předsíně srdeční.

Velký krevní oběh (tělní)

Ve velkém oběhu je cirkulována krev okysličená z levé předsíně přes bikuspidální chlopeň do levé komory, dále do aorty a odtud do celého těla. Kapiláry přivádí krev do jednotlivých regionálních žil a z nich se vrací horní a dolní dutou žilou do srdce.



Obr.1 Schéma malého a velkého krevního oběhu (1)

2.1.2 Anatomie a fyziologie dýchacího systému

Funkcí dýchacího systému je především výměna dýchacích plynů. Slouží k vnějšímu dýchání, což je výměna plynů mezi vnějším prostředím a plicemi a dýchání vnitřnímu, výměna plynů mezi vnitřním prostředím a tkáněmi. Výměnou kyslíku a oxidu uhličitého se dýchací systém podílí na udržování acidobazické rovnováhy.

Dýchací systém se skládá z horních cest dýchacích zevního nosu, dutiny nosní, vedlejších dutin nosních, nosohltanu a dolních cest dýchacích hrtanu, průdušnice, průdušek a plic.

Dolní dýchací cesty

Hrtan – larynx

Larynx je dutý, nepárový orgán, který navazuje na pars laryngea pharyngis. Slouží k dýchání a tvorbě zvuků. Skelet hrtanu tvoří chrupavky, které jsou pohyblivě spojeny klouby, vazy a svaly. Uvnitř je pokryt slizniční výstelkou. Dorsálně je hrtan spojen s hltanem a zavěšen vazivovou membránou na jazylce.

Průdušnice – trachea

Trachea je 12-13 cm dlouhá dutá trubice navazující na larynx ve výši obratle C6. Je zavěšená na chrupavce prstencové. Na konci se větví na pravý a levý hlavní bronchus. Trachea je tvořena 15-20 hyalinními chrupavkami, které mají tvar podkovy a jsou orientovány otvorem dorzálně. Jednotlivé chrupavky spojují ligamenta trachealia. Vnitřní výstelkou trachey je sliznice, která je krytá epitelem typickým pro dýchací cesty, víceřadý řasinkový s pohárkovými buňkami.

Plíce – pulmones – pulmo dexter et sinister

Plíce jsou párový orgán, kuželovitého tvaru, šedorůžové barvy s houbovitou strukturou. Obě plíce se dělí na plicní laloky (lobi pulmonalis), pravá plíce se dělí na tři laloky, horní, střední a dolní. Levá plíce má laloky dva, horní a dolní. Plíce jsou uloženy v pravé a levé pleurální dutině. Při dýchání probíhá výměna plynů mezi vzduchem a krví. Bronchi, průdušky, které vstupují do plic se dále větví až na bronchioli, průdušinky, na jejichž konce navazují alveoli pulmonis, plicní sklípky. [1]

2.2 Patofyziologie kardiovaskulárního a dýchacího systému

2.2.1 Patofyziologie kardiovaskulárního systému

Srdeční a oběhové selhání

Srdeční selhání je stav, kdy srdce nedokáže dodávat krev v přiměřeném množství, které je potřebné pro zásobování jednotlivých orgánů.

Mezi příčiny vedoucí k srdečnímu selhání patří nejčastěji tyto poruchy. Poškození srdečního svalu a jeho snížená výkonnost, například z důvodu náhrady svalů jizvou po rozsáhlých infarktech myokardu. Tlakové přetížení, kdy je nutno pumpovat krev proti vysokému tlaku, ke kterému dochází zejména při arteriální či plicní hypertenzi nebo při některých chlopenních vadách. Objemové přetížení, při kterém se srdce musí přečerpávat nadměrné objemy krve, například při chlopenních vadách s regurgitací krve.

Selhání srdce se dělí podle místa postižení na levostranné, pravostranné nebo oboustranné srdeční selhání. Dále také na akutní či chronické selhání.

Kardiogenní šok (postkardiotomický u infarktu s rupturou komorového septa)

Ke kardiogennímu šoku dochází při kriticky nízkém srdečním výdeji, který je zapříčiněn závažnou poruchou srdeční funkce. Dochází k němu při těžkém nebo opakovaném infarktu myokardu s vyřazením 40% a více svaloviny, dále z důvodu akutní chlopenní vady, těžké arytmie. Nízký srdeční výdej je spojen s narušenou funkcí srdce, žilní návrat je normální a v důsledku toho stoupá v komorách tlak na konci diastoly.

2.2.2 Patofyziologie dýchacího systému

Respirační selhání

Respirační selhání je možné diferencovat na respirační selhání hypoxické, hyperkapnické a smíšené tj. hypoxicko - hyperkapnické. Z hlediska trvání poruchy je možné rozlišovat akutní respirační nedostatečnost a respirační nedostatečnost chronickou. Obecně je však vždy možné rozlišit dva fenomény: selhání oxygenace a selhání ventilace.

Respirační selhání je stav navozený závažnou plicní poruchou transportu kyslíku, která nedovoluje dostatečnou dodávku kyslíku do tkání (selhání oxygenace – respirační selhání hypoxické, parciální) a stejně tak i adekvátní eliminaci oxidu uhličitého (selhání

ventilace – respirační selhání hyperkapnické). Respirační selhání je provázeno narůstající energetickou potřebou vyvolanou postupným nárůstem dechové práce.

V klinické praxi je hyperkapnické selhání provázené i selháním oxygenace. Proto hovoříme o respiračním selhání globálním, globální respirační nedostatečnosti či o selhání hypoxycko – hyperkapnickém.

ARDS (adult respiratory distress syndrome)

Nekardiální otok plic, kterým plíce reagují na četná poškození. Navíc je poškozena tvorba surfaktantu, je snížena plicní poddajnost a porušena ventilačně-perfuzní rovnováha. Dochází k hypoxémii a výrazné dušnosti s hyperventilací, hypokapnie. Příčinou bývá řada stavů poškozujících alveolární část alveolokapilární membrány, zejména vdechnutí toxických látek, ale i žaludečního obsahu. Stavů poškozujících její kapilární stranu, tj. endotel plicních kapilár jsou například sepse a další celkové stavy včetně šoku (šoková plíce). [2, 15, 18, 19]

2.3 ECMO

2.3.1 Extra Corporal Membrane Oxygenation

Extrakorporální membránová oxygenace je léčebná metoda využívající možnosti kontrolované výměny plynů v oxygenátoru. Používá se v případech, kdy plíce nejsou schopny plnit svoji funkci, jako při těžkém respiračním selhání kdy nelze ani pomocí řízené ventilace udržet hodnoty paO_2 a $paCO_2$ v mezích slučitelných se životem. Primární plicní postižení (zánět, inhalace toxických látek), těžké poúrazové stavy, septické a pooperační stavy.

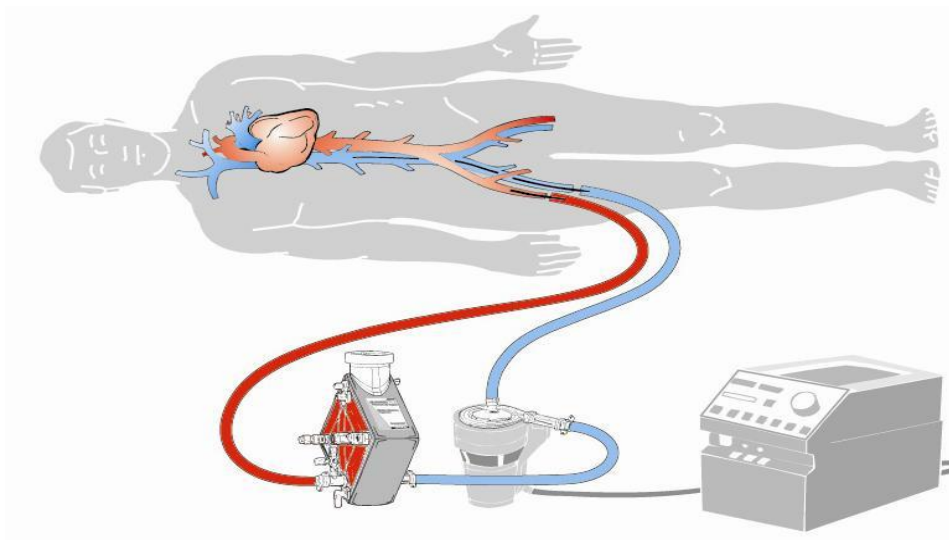
Veno-venózní ECMO

Metodou volby je v těchto případech u dospělých okysličování žilní krve vracené zpět do žilního systému. Jedná se o jakousi smyčku, v níž je odvodná kanyla zavedena do pravé v. jugularis interna a okysličená krev je přiváděná do dolní duté žíly kanylou zavedenou do v. femoralis. Okruh dále tvoří centrifugální pumpa a oxygenátor. Systém funguje jako plně uzavřený. Směr toku krve je zvolen s předpokladem, že část okysličené krve přečerpá pravá komora srdeční do plic a velkého oběhu a část krve je opět nasáta do systému a ještě jednou více okysličená. Protože se jedná o žilní smyčku v systému nemocného, systém je schopen zabezpečit pouze výměnu plynů a případné ohřívání krve, ale nemůže zajistit podporu oběhu.

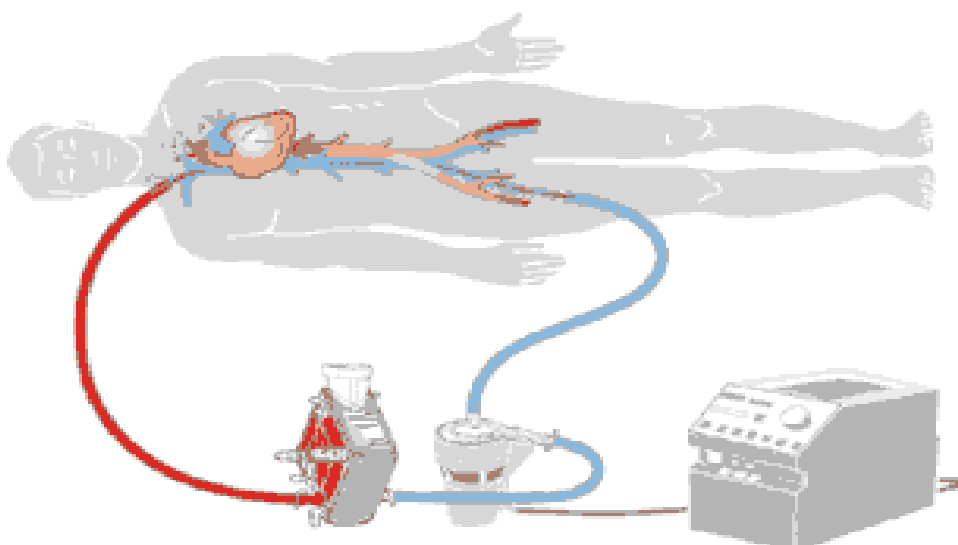
Veno-arteriální ECMO

Pomocí VA ECMO zajišťujeme výměnu plynů i podporu oběhu. Používá se u nemocných s kombinací plicního selhání a se selháváním oběhu. Odvodná kanyla je zavedená v pravé v. jugularis interna, krev je nasávána do centrifugální pumpy, do oxygenátoru. Návrat do oběhu pacienta je zajištěn prostřednictvím pravé arteria carotis communis.

Nevýhodami mohou být, ischemie částí těla periferně od zavedené tepenné kanyly, možnost embolizací, snížený průtok krve plicemi, riziko orgánové hypoperfúze.



Obr. 2 Zapojení veno-arteriální smyčky ECMO FF (2)



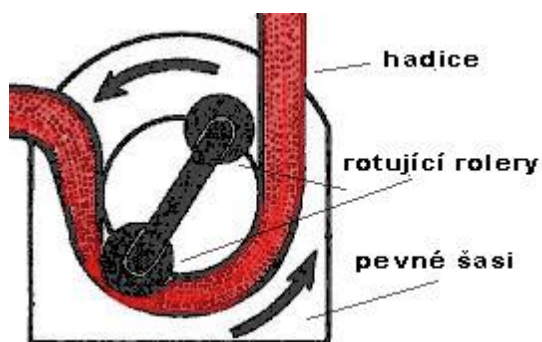
Obr. 3 Zapojení veno-arteriální smyčky ECMO FS (2)

2.3.2 Části systému ECMO

Krevní pumpa

Nejčastějším a nejvíce rozšířeným typem krevní pumpy v klinické praxi je **rotační válečková pumpa** viz obr. 4. Dva protilehlé rotery rotují v pevném šasi a komprimují přesně definovanou silou (tzv. okluzí) elastickou hadici, kterou protéká krev. Nevýhodou tohoto typu pump je vznik hemolýzy, způsobené komprimací pružného materiálu, omezená hodnota průtoku, které jsou tyto pumpy schopny generovat a při vysokých průtocích nepřesné odečítání skutečného průtoku. Tento jev je způsoben absencí návratu hadice do původního tvaru a tedy menším skutečným objemem segmentu, ve kterém je krev posouvána. Také generují vysoký negativní (sací) tlak, který má značné destruktivní účinky na krevní elementy. Velikost průtoku, které jsou tyto pumpy schopny generovat, závisí teoreticky na velikosti rotoru čerpadla, typu materiálu, z něhož je komprimující se hadice zhotovena a počtu otáček rotujících roteru. V klinické praxi ale velikost průtoku závisí pouze na počtu otáček, jelikož velikost rotoru je standardně definována výrobcem pumpy a materiálem komprimující hadice je silikon. Ten je volen pro svou dobrou materiálovou pružnost a rychlý návrat do původního stavu. Výhodou pumpy je potom možnost opakovaného využívání a s tím souvisejí nízké provozní náklady. Ačkoliv má rotační válečková pumpa největší zastoupení v klinické praxi, pro aplikaci v systému ECMO není zcela vhodná a to zejména z důvodu své okluzivní činnosti a s tím přidružených problému. V aplikaci ECMO se z těchto důvodů používají pumpy centrifugálního typu.

Centrifugální pumpy, viz. obr. 5 pracují, na principu odstředivé síly. Na rozdíl od rotačních pump jsou centrifugální pumpy neokluzivní. Jejich výkon závisí na periferní rezistenci za pumpou a velikosti přítoku krve do pumpy. Výkon pumpy se tedy v podstatě reguluje sám a není závislý pouze na počtu otáček rotujícího kuželu. To je spojeno s následujícími náležitostmi. Značnou výhodou je absence okluze. Při omezení přítoku krve do pumpy nedochází ke vzniku podtlaku, který má značné hemolytické účinky spojené se vznikem mikrobublin vzduchu. Centrifugální pumpy eliminují oproti rotačním téměř 90% všech mikrobublin vzduchu. Na druhou stranu velikou nevýhodou je nutná přesná monitorace velikosti průtoku celým systémem a jednorázové použití pumpy a s ní spojené vyšší provozní náklady. Stupeň hemolýzy způsobený provozem centrifugální pumpy je v odborných literaturách uváděn nižší v porovnání s rotační válečkovou pumpou.



Obr. 4 Typ rotační válečkové pumpy



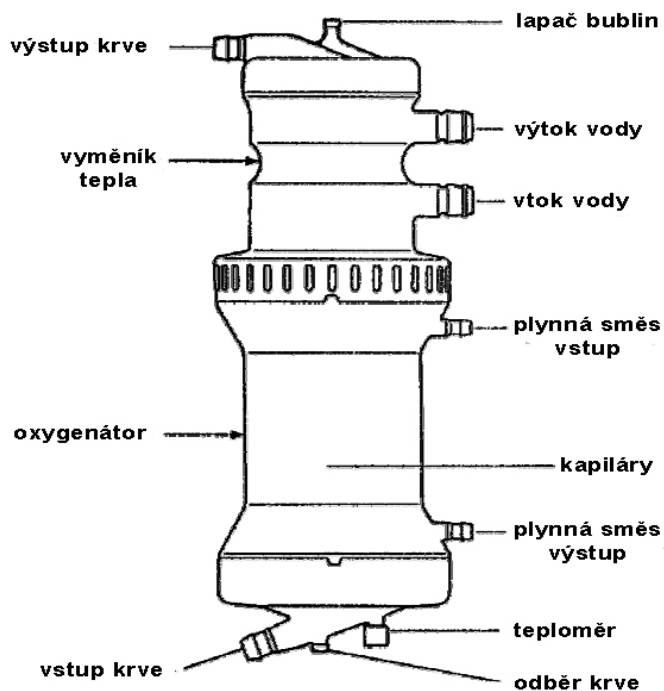
Obr. 5 Typ centrifugální pumpy (2)

Oxygenátor

Tvoří nejdůležitější prvek celého systému, ve kterém dochází ke klíčovému ději – okysličení krve. Oxygenátory prodělaly v minulosti značný vývoj a v současné době se používají tzv. membránové oxygenátory. Pro označení tohoto typu oxygenátoru existují dva druhy zařízení, v závislosti na typu použité membrány.

Prvním a nejvíce využívaným typem v běžném klinickém provozu je **membránového oxygenátoru z dutých vláken**, kde je membrána tvořena mikroporézním polypropylenem. Z něj jsou vyrobeny kapiláry, kterými proudí plynná směs a v prostoru mezi kapilárami je vedena krev (extraluminal blood flow oxygenation - ELF). Na membráně kapiláry dochází vlivem odlišných gradientů plynné směsi a krve k difúzi kyslíku a CO_2 . Nevýhodou tohoto typu oxygenátoru je jeho vysoká rezistence a snižování účinnosti oxygenace již po několika hodinách používání, vlivem kondenzace vodních par a současného pronikání plazmy mikropóry. Tyto oxygenátory zaručují efektivní oxygenaci v časovém rozmezí 8-10h.

Druhým typem, v dnešní době již nepoužívaným, byl tzv. **"pravý" membránový oxygenátor**. Ten byl vytvořen dvojité složenou semipermeabilní silikonovou membránou, která byla spirálovitě stočena v plastovém pouzdře. Mezi vrstvami membrány procházela plynná směs a mezi spirálou byla vedena krev. Kyslík a CO_2 do krve difundoval přes membránu na základě rozdílných tlakových gradientu plynné směsi a krve v oxygenátoru. Výhodou tohoto typu byla možnost použití i pro časově delší oxygenace bez poklesu účinnosti. Nevýhodou byla pak vyšší pořizovací cena a větší povrch, se kterým je krev v přímém kontaktu. V dnešní době se užívají pro dlouhodobou oxygenaci oxygenátory z dutých vláken, kde je "pravá" membrána tvořena polymethylpenténem. Efektivita oxygenace tohoto typu oxygenátoru je výrobcem garantována v řádu týdnů.



Obr.6 Typ membránového oxygenátoru z dutých vláken s integrovaným tepelným výměníkem

Výměňik tepla

Je součástí každého oxygenátoru a je umístěn na jeho začátku, ještě před okysličovací částí viz obr. 6. Důvodem je snížení tvorby vzduchových mikrobublin v krvi, při změně teploty již kyslíkem saturované krve. Teplo je do primárního systému, ve kterém je protékající krev, předáváno ze sekundárního okruhu naplněného cirkulující vodou. Ta protéká jednotkou, která cirkulující vodu ohřívá či naopak chladí. Oba systémy jsou od sebe neprodyšně odděleny teplovodivou přepážkou, aby nedošlo k průsaku vody ze sekundárního okruhu do krve, což by mělo pro pacienta fatální následky.

Hadice

Na spojovací hadice je kladena celá rada mechanických a fyzikálních požadavků. Musí být maximálně biokompatibilní, maximálně hladké (eliminace vzniku turbulentního proudění) a nesmáčivé. Zároveň musí být co nejvíce mechanicky a chemicky odolné, elastické a zároveň se nesmí vlivem velkého negativního tlaku bortit, zalamovat či jinak klást odpor protékající krvi. Musí ve spojích dokonale těsnit a odolávat vysokým tlakům aniž by došlo k rozpojení systému. Vnitřní rozměr modře značené žilní linky je obvykle 1/2“ a červeně značené tepenné linky 3/8“. Materiálem splňující tato přísná kritéria je medicínský polyvinylchlorid a medicínský silikon.

Kanyly a možnosti kanylace

Kanyly jsou nejužší součástí celého systému. Velký průtok nevhodně zvolenou kanylou má za následek destrukci krevních elementů a v horším případě tzv. tryskový efekt, kdy jsou vlivem velké energie „tryskající“ krve z kanyly uvolněny embolizující ateromatozní pláty, či dokonce dochází k disekci (poškození) příslušné cévy. Jejich velikost silně ovlivňuje také celkovou rezistenci mezi tělem pacienta a okruhem ECMO a zároveň znesnadňuje zavedení kanyly do těla pacienta, v případě méně odporových větších kanyl. Velikost žilní kanyly, která slouží k odvodu krve z těla pacienta a je limitujícím faktorem průtoku celou smyčkou, se pohybuje mezi 21F až 28F a doporučuje se využívání kanyl s tuhou případně armovanou stěnou. Velikost zavedené arteriální kanyly je uváděna v rozmezí 15F až 21F. Možnosti kanylace jsou periferní kanylace: a. femoralis, v. femoralis, a. subclavia, v. femoralis, centrální kanylace: aorta ascendens, pravé atrium. [3, 10, 17]

2.4 Farmakokinetika

Farmakokinetika studuje osud léčiv a jejich metabolitů v organismu, ten je charakterizován absorpcí, distribucí, metabolismem a eliminací. V praxi se jejich poznatků využívá zejména k výpočtu dávkování léčiv a při odhadu hladin léků v „nepřístupných“ oblastech (např. cerebrospinalní likvor, synoviální tekutina, ...).

Absorpce

Absorpce je děj, který popisuje vstřebávání léčiva do organismu z místa jeho aplikace. Jednou z nejdůležitějších veličin, které ji charakterizují, je biologická dostupnost. Biologická dostupnost udává množství léčiva vyjádřené v procentech, v němž dosáhne systémové cirkulace, a tudíž i často místa svého účinku. K nejdůležitějším parametrům charakterizujícím absorpci se řadí maximální plazmatická koncentrace, a doba, za kterou je jí dosaženo. Množství vstřebané látky v čase udává tzv. plocha pod křivkou, AUC (area under the curve). Její vyšší hodnota značí dosažení vyšších koncentrací, delší setrvání v plazmě anebo obojí.

Distribuce

Jakmile se léčivo dostane do organismu, počíná jeho distribuce, kterou popisuje veličina distribuční objem. Jedná se o poměr podané látky a v plazmě naměřené koncentrace

léčiva. Jednotkou je l, případně l/kg. Jedná se o fiktivní objem celkové tělesné tekutiny nutný k tomu, jaká byla naměřena v krevní plazmě. Velké hodnoty distribučního objemu (mnohonásobně převyšující objem těla) tak svědčí pro distribuci látky do intracelulárního prostoru a malé (jednotky litrů) naopak pro setrvání v krevním řečišti a extracelulárním prostoru. V distribuci léčiva sehrává důležitou roli hematoencefalická bariéra – schází pouze v oblasti area postrema a eminentia mediana, u gravidních žen placenta.

Biotransformace

Třebaže některá léčiva v našem organismu nejsou metabolizována vůbec a vylučující se tak v nezměněné podobě, většina z nich je metabolizována. Biotransformací se obvykle zvyšuje polarita, čímž se sníží míra distribuce a omezí se proces reabsorpce v ledvinách.

Exkrece

Léčiva jsou z těla vylučována ve formě mateřské molekuly (např. furosemid, dioxin) nebo v podobě svých metabolitů. Nejdůležitějším eliminačním orgánem jsou ledviny následované zažívacím traktem a plicemi. Látka však může být dále vylučována ostatními tělními tekutinami (pot, mateřské mléko, slzy). [4, 13, 14]

2.5 Antibiotika

Antibiotika (ATB) jsou látky produkované nejčastěji plísněmi (ale také některými bakteriemi – např. streptomycetami), které inhibují růst či destruuji další mikroorganismy. Látky s analogickým účinkem, ovšem vyrobené chemickou syntézou, označujeme jako chemoterapeutika. V obou případech je kladen zásadní požadavek na selektivní toxicitu vůči patogenu a současně minimální toxicitu na organismus hostitele. Tento vztah vyjadřuje takzvaný chemoterapeutický index, což je poměr mezi dávkou toxickou pro hostitele a účinnou dávkou pro patogen, to znamená, že vyšší hodnota svědčí pro větší bezpečnost/účinnost daného ATB.

Účinnost ATB je in vitro charakterizována minimální inhibiční koncentrací (MIC), případně minimální baktericidní koncentrací (MBC), přičemž obojí je stanovováno řaděním daného ATB v geometrické posloupnosti. MIC je definována jako nejnižší koncentrace ATB,

při které se daný mikroorganismus přestává množit. MBC je nejnižší koncentrace ATB, která vede k usmrcení mikroorganismu.

Podle spektra účinku lze antibiotika dělit na ATB působící převážně na gramnegativní bakterie (G-) – cefalosporiny III. generace, aminoglykosidy, fluorochinolony, polypeptidy aj. A antibiotika působící převážně na grampozitivní bakterie (G+) – penicilin, oxacilin, glykopeptidy, makrolidy aj.

Aminoglykosidy

Aminoglykosidy, původně izolované z aktinomycet, inhibují proteosyntézu vazbou na 30S podjednotku s minimálním účinkem na anaeroby, neboť jejich vstup do buňky částečně závisí na přítomnosti přenašeče závislého na dodávce kyslíku. Působí na G+ (minimálně na streptokoky) i G- mikroorganismy. Obecně lze říci, že se uplatňují u těžkých uroinfekcí, nozokomiálních infekcí či chirurgických infekcí. Vzhledem ke své vysoké polaritě nejsou vstřebávány ze zažívacího traktu, a jsou proto obvykle podávány intramuskulárně nebo intravenózně. Vzhledem k významnému postantibiotickému účinku obvykle postačí aplikace 1 x denně.

Nejvýznamnějšími nežádoucími účinky jsou ototoxicita (ireverzibilní stav, který se může objevit i po ukončení léčby – projevuje se jako kochleární nebo vestibulární porucha; nejvyšší riziko je u streptomycinu) a nefrotoxicita, zpočátku se projevující postupným vzestupem sérového kreatininu a močoviny a sníženou koncentrační schopností ledvin; poměrně vzácné jsou případy neuromuskulární blokády objevující se u nemocných myasthenia gravis, hypokalcémií nebo při současné aplikaci periferně působícího myorelaxancia. Nejvýznamnějšími zástupci jsou streptomycin, gentamicin, neomycin (podávání lokálně v kombinaci s bacitracinem), amikacin, netilmicin a tobramycin.

Gentamicin

Patří mezi aminoglykosidová antibiotika se širokospektrým účinkem. Má bakteriostatický až baktericidní účinek na většinu G- bakterií, jako jsou enterokoky, mykobakterie a anaerobní bakterie.

Amikacin

Amikacin je aminoglykosidové baktericidní antibiotikum se širokým antibakteriálním spektrem. Aminoglykosidová antibiotika jsou určena k léčbě infekcí způsobených aerobními

G- bakterie. Amikacin má úzké terapeutické okno. Při život ohrožujících infekcích musí být efektivní sérová koncentrace dosažena bez předávkování, při kterém se objevují toxické účinky.

Glykopeptidová antibiotika

Vancomycin a dlouhodoběji působící teikoplanin jsou rezervní antibiotika vyhrazená pro závažné infekce vyvolané například MRSA; citlivé jsou však i enterokoky, streptokoky, klostridia, listerie a jiné. Působí většinou baktericidně ovlivněním syntézy bakteriální stěny tím, že se vážou na terminální D-alanyl-D-alanin na konci peptidových řetězců, čímž se zamezí prostorovému zesíťování tvořeného peptidoglykanu.

Jsou podávány parenterálně, neboť se nevstřebávají z GIT. Při infuzi vancomycinu byl pozorován výskyt anafylaktoidní reakce známé jako red neck (red man) syndrom charakterizovaný zarudnutím v obličeji, na krku a horní části trupu, eventuálně s hypotenzí (doporučeno je podávat jej v pomalé infuzi, čímž se zabrání nárazovému vyplavování histaminu). Dávku vancomycinu je třeba snížit u seniorů a osob se selhávajícími ledvinami (vedle neurotoxických účinků působí i ototoxicky či neurotoxicky).

Vancomycin

Řadí se mezi glykopeptidová antibiotika. Používá se při profylaxi a léčbě infekcí způsobovaných G+ bakterie. Je tradičně vyhrazen jako lék, používaný jen v případech, kdy léčba jinými antibiotiky selhala; nárůst rezistence mikroorganismů proti vancomycinu však znamená, že je v této roli postupně nahrazován linezolidem a daptomycinem. [4, 13, 14]

2.6 Analytika antibiotik

Pro stanovení hladin léků se běžně používají imunochemické metody. K některým analýzám, jako je kvalitativní vyhodnocení neznámých vzorků, se používá chromatografie. Můžeme ji rozdělit dle používané mobilní fáze na kapalinovou nebo plynovou, při spojení s vhodným detektorem ji lze použít i ke kvantitativnímu hodnocení. Kapalinová chromatografie může mít plošné uspořádání, tzv. tenkovrstevné nebo sloupcové uspořádání – kolonová, je vhodná při použití vysokého tlaku i pro stanovení některých vitaminů, nebo i dalších látek, např. porfyrinů.

Imunoanalytická stanovení

Imunoanalytické metody se mohou dělit z více pohledů:

Kompetitivní stanovení, kdy o omezené množství protilátky soutěží antigen ve vzorku se stejným, ale značeným antigenem ze soupravy. Tato metoda se vyznačuje kalibrační křivkou podobnou hyperbole. Stanovovaný analyt má původní koncentraci nepřímo závislou na velikosti signálu.

Nekompetitivní stanovení (většinou *sendvičové*), kdy se antigen ze vzorku obvykle vychytává mezi dvě protilátky, ty jsou přítomné v reakční směsi v nadbytku. Stanovovaný antigen má původní koncentraci přímo úměrnou výšce měřeného signálu. Typickým průběhem je kalibrační křivka, která se podobá parabolě.

Následující dělení se většinou provádí především podle použité značky a měřeného signálu. Nejčastější jsou **radioimunoanalýza**, **enzymoimunoanalýza**, **fluoroimunoanalýza** a **luminiscenční imunoanalýza**. Existují další metodiky, které se váží na výrobce a celý systém analyzátoru a reagensů, které jsou neustále ve vývoji.

Senzitivita a **specifita** vyšetření v imunochemii jsou dány především použitou protilátkou, její čistotou a typem. Používají se protilátky monoklonální nebo polyklonální.

Monoklonální protilátky jsou produkovány hybridomy, ty jsou připravovány fúzí imunizovaných slezinných buněk s nádorovými a ty jsou po očištění a selekci schopné produkovat jeden daný typ protilátky. S monoklonální protilátkou lze dosáhnout vyšší specifity a produkovat ji kontinuálně. Ovšem příprava je drahá.

Polyklonální protilátky se získávají imunizací zvířat, jsou to vždy směsi protilátek, které jsou schopné rozpoznat i izoformy antigenu a tudíž mají vyšší senzitivitu. Zásadní nevýhodou představuje závislost na imunizovaném zvířeti a někdy nelze získání protilátky opakovat.

Detekce a stanovení se může provádět u imunochemických metod přímo v reakční směsi, **homogenní imunoanalýza**, nebo po specifické separaci vytvořeného imunokomplexu, **heterogenní imunoanalýza**. Homogenní imunoanalýza se používá u metod, kdy při navázání protilátky dojde k ovlivnění značky, např. u fluoroimunoanalýzy. Separace imunokomplexů u heterogenních metod je možná několika způsoby: precipitačně, odsáváním zbytku reakční

směsi u pevně zakotvené protilátky, magneticky, případně adhezí použitých částic vázaných na protilátku.

Radioimunoanalýza

Je nejstarší citlivá imunometoda (1959), svou citlivostí občas předčí mnohé z automatizovaných moderních neizotopových imunoanalýz. Jako značka se používá téměř vždy ^{125}I , γ -zářič, který má poločas rozpadu 60 dní. Radioimunoanalýza je dostupná v kompetitivním uspořádání RIA, i v sendvičovém IRMA.

Enzymová imunoanalýza

Značkou, která se používá, je enzym. V *heterogenní enzymoimunoanalýze* jsou to nejběžněji peroxidáza, ALP a β -galaktosidáza. Měření signálu je závislé na produktu konečné enzymatické reakce. Nejčastěji jsou to barevné produkty, ale používá se i měření fluorescence nebo chemiluminiscence. Mezi často používané a velmi snadno proveditelné stanovení, nenáročná na techniku, patří **ELISA** (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). I zde lze používat oba typy uspořádání, kompetitivní i sendvičové.

Mezi enzymoimunoanalýzu z hlediska značky patří i metoda **MEIA**, která používá ke značení ALP a jako substrát 4-methyl-umbelliferylfosfát. Po separaci imunochemického komplexu pomocí specifických mikročástic se při enzymatické reakci uvolní 4-methyl-umbelliferol, jehož fluorescence se měří. Způsob detekce se v poslední době upřednostňuje jako rozhodující kritérium zařazení metody – takže obvykle bývá řazena mezi fluorescenční imunoanalýzy. Tato metodika je využívána imunochemickým analyzátozem a umožňuje vyšetřovat i poměrně velké soubory pacientů v krátkém časovém intervalu. Poměrně často využívanou možností je také použití ALP jako značky v chemiluminiscenčních detekcích. V tomto případě odštěpuje ALP fosfát z cyklického peroxidu, stabilizovaného adamantanovou strukturou.

Metodika **EMIT** (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique – chráněný název*) se používá převážně ke stanovení léků a drog. Je to kompetitivní homogenní enzymová imunoanalýza, při které soutěží o protilátku lék ze vzorku s lékem značeným glukóza-6-fosfátdehydrogenázou. Vazbou na protilátku klesne aktivita enzymu. Aktivní enzym konvertuje NAD^+ na NADH, což umožňuje spektrofotometrickou detekci. Původní koncentrace léku ve vzorku odpovídá aktivitě enzymu.

Fluorescenční imunoanalýza

V této metodě se pro značení používají fluorofory a měří se fluorescence. Je známo několik uspořádání, které používají firmy v různých uzavřených systémech.

DELFA (Dissociation-enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay).

Slabá fluorescence se zesiluje uvolňováním iontů do prostředí. Životnost fluorescence je mnohatisíckrát delší než u běžné fluorescence, což je využito při měření.

FPIA (fluorescenční polarizační imunoanalýza)

Je to kvantitativní analytická metoda využívající kombinaci dvou principů kompetitivní imunochemická reakce mezi stanovovaným analytem a analytem značeným indikátorem (fluoresceinem) o vazebná místa na specifické protilátce, - měření vertikálně polarizovaného fluorescenčního záření emitovaného na základě excitace rovněž polarizovaným světlem. Reakce probíhá v homogenním uspořádání bez nutnosti separačního kroku. Postup je využíván v systémech TDx, IMx nebo AxSYM firmy Abbott.

Technologie je použitelná pro určení koncentrace malých molekul. Ty se v roztoku otáčejí relativně velkou rychlostí. Pokud je tato molekula označena vhodnou fluorescenční značkou (fluorescein) a je excitována polarizovaným světlem vhodné vlnové délky, emituje fluorescenční záření do mnoha směrů. V případě jeho detekce rovněž v polarizované vertikální rovině je naměřena pouze jeho malá část. Pokud však tato malá molekula obsadí vazebné místo specifické protilátky, dojde díky vytvoření komplexu s velkou molekulou k výraznému snížení rychlosti jeho rotace v roztoku, což má za následek zvýšení detekované polarizované fluorescence. Díky vhodnému uspořádání je možné vynechání obvykle potřebného separačního kroku k oddělení tzv. volné a vázané frakce indikátoru analytické reakce. V případě velkého obsahu analytu ve sledovaném vzorku dojde během kompetitivní reakce k jeho přednostní vazbě na vazebná místa specifické protilátky, v roztoku zůstane především nnavázaný indikátor a v důsledku toho je naměřena malá polarizovaná fluorescence. Naopak při nulové koncentraci analytu ve vzorku je změřena maximální hodnota polarizované fluorescence. Jinými slovy to znamená, že hodnota naměřené odezvy je nepřímě úměrná koncentraci analytu ve vzorku.

TRACE – Time Resolved Amplified Cryptate Emission

Je to homogenní fluorescenční imunoanalýza, která využívá kryptandy, to jsou sloučeniny, které fluorofor (Eu^{3+}) váží v trisdipyridylové „kleci“. Kryptandem se značí protilátka nebo antigen, dle typu stanovení. Na druhou protilátku se váže fluorofor, který se excituje při odlišné vlnové délce než Eu (pigment z červených řas). Po inkubaci je imunokomplex excitován laserem při 337 nm. Amplifikovaná energie přenesená z kryptandu (donor) na fluorofor (akceptor) je detekována jako časově prodloužený signál při 665 nm. Díky časově posunutému čtení neruší fluorescence příměsí ze vzorku. Akceptor nevázaný v imunokomplexu není excitován, a tudíž měření neruší. Metoda je v užívaném uzavřeném systému mimořádně přesná a výsledky mají vysokou reprodukovatelnost v sérii i v čase.

Luminiscenční imunoanalýza

Luminiscence se využívá jako neradioaktivní metoda v mnohých analytických systémech a to především pro svou vysokou senzitivitu. Luminofory, které se používají ke značení, nemají interference v biologickém materiálu a jsou poměrně stabilní.

Elektrochemiluminiscence (ECL)

Metoda využívající značení rutheniovým chelátem, který je zodpovědný za světelnou emisi. Stěžejním činidlem-iniciátorem celé ECL reakce je tripropylamin (TPA), který funguje jako přenašeč elektronu na rutheniový chelát (po vložení napětí na pracovní elektrodu a oxidaci TPA a rutheniového chelátu). Přenosem elektronu na rutheniový chelát dojde k jeho redukci na nestabilní excitovanou formu a při návratu do stabilního stavu dojde k vyzáření fotonu, který se měří fotonásobičem. Pomocí analog-digitálního konvertoru dostaneme tzv. „counts“, které jsou kvantifikací vyzářených fotonů. Počet „counts“ je pak úměrný koncentraci analytu ve vzorku. Hlavním přínosem celé technologie je neustálé opakování oxido-redukčních dějů na pracovní elektrodě až do spotřebování TPA - ProCell, což snižuje mez detekce a zvětšuje měřicí rozsah.

Interpretace nálezů

Výsledky vyšetření hladin léků slouží lékařovi přímo k orientaci a k hodnocení stavu pacienta. U mnoha látek je však ještě důležitější dynamika vývoje výsledků jednotlivých vyšetření. Sledování hladiny *léku* v séru je u některých onemocnění běžně využívanou a nedílnou součástí praxe. Stanovování hladiny antibiotik ukazuje, zda má pacient optimální

léčbu a zda jsou dávky léku dostatečné, případně nejsou-li vysoké. U většiny léků je nezbytné dávkou udržet terapeutické rozmezí, v některých případech je toto okno poměrně úzké. [5, 9, 13, 16, 20]

3. Materiál a metody

3.1 Projekt

Studie byla schválena 1. LF UK Ústavní péčí o zvířata, Ústav fyziologie, 1. lékařská fakulta, Univerzity Karlovy v Praze, v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu proti týrání zvířat. Vše bylo prováděno se souhlasem etické komise. Projekt objednala Odborná komise pro práci s pokusnými zvířaty UK 1. lékařské fakulty pod číslem jednacím 316/10.

ECMO slouží k naléhavé hemodynamické stabilizaci u pacientů všech věkových kategorií s těžkým plicním a srdečním selháním. Plicní a krevní infekce u pacientů na ECMO jsou časté, proto má šíření a dostupnost antibiotik do orgánů prvořadý význam. Venoarteriální ECMO snižuje průtok krve plicemi, pokles je přímo úměrný množství průtoku mimotělním oběhem.

Studie se prováděla v červenci a srpnu, další odběry pokračovaly v prosinci.

Do protokolu o prodloužené zástavě srdce léčené FF nebo FS ECMO+IABP, bylo zařazeno 12 prasnic, 4,5 měsíců starých, o tělesné hmotnosti $51,5 \pm 3,5$ kg. Po 24 hodinovém půstu, byla zvířata uvedena do celkové anestezie, jako bolusy byly aplikovány azaperon (2 mg / kg, im.), následně atropin sulfát (0,02 mg / kg, im.) a ketamin hydrochloridum (15-20 mg / kg, im.), propofol (2 mg / kg, iv.) a morfin (0,1-0,2 mg / kg, iv.).

Pod laryngoskopickou kontrolou byla zvířata orotracheálně zaintubována (vnější průměr 7,5 mm). K udržení celkové anestezie byly podávány kontinuální infuze propofolu (8-10 mg / kg / hod) v kombinaci s morfinem (0,1-0,2 mg / kg / hod), hloubka anestezie byla pravidelně hodnocena fotoreakcí, rohovkovým reflexem.

Po stabilizaci anestezie, byla provedena žilní kanylace zavedením žilního katetru do v. femoralis a tepenná kanylace, zavedením arteriálního katetru do a. femoralis nebo a. subclavia (15 F). Kanylace byly provedeny náhodným výběrem (FF:FS, 1:1) napojil se ECMO okruh, s bazálním průtokem (<10 ml / kg / min) a max. 5000 ot / min.

Pro udržení středního tlaku pravé síně 3-7 mmHg, byla podána počáteční iv. infuze fyziologického roztoku 1000 ml, následovala kontinuální infuze 200-500 ml / hod. V případě potřeby kvůli hypovolemii, byly podávány tekutiny v rychlých iv. infuzích.

Antikoagulace byla zajištěna nefrakcionovaným heparinem, bolus (100 U / kg, iv.), v kontinuální iv. infuzi (40-50 U / kg / hod). Každou hodinu byl kontrolován ACT (aktivovaný srážecí čas).

Ventilace byla poskytována ventilátorem Hamilton G5, s nastaveným režimem ASV (Adaptive Support Ventilation), pro udržení saturace O₂ 95-99% a CO₂ 4,5-5,6 kPa. Po připojení zvířat na ECMO byl inspirovaný podíl kyslíku na ECMO oxygenátoru směšovači plynů zpočátku nastaven na 40% a proudění vzduchu do 2 l / min a opakovaně byl upraven podle průběžně sledovaných arteriálních krevních plynů, pro udržení pO₂ a pCO₂ v rozsahu 10-15 kPa a 4-6,5 kPa v krvi. Během fází srdeční zástavy, nebyla zvířata ventilována, ve fázích léčení ECMO, byla nastavena a udržována minutová ventilace na 100% předpokládaného MV na základě ideální tělesné hmotnosti a FiO₂ byla stanovena na 21%. Tracheální aspirát byl získán pomocí sacího katetru s uzavřeným systémem, po podání 20 ml fyziologického roztoku a dvou povinných vdeších.

V celkové anestezii podstoupila zvířata naprogramovanou fibrilaci komor (VF) 15 minutovou srdeční zástavu s bazálním ECMO tokem 5-10 ml / kg / min, aby se zabránilo tromtizaci v ECMO obvodu, minimálně 10 minut po zástavě byl nastaven průtok ECMO 100-120 ml / kg / min. Po období srdeční zástavy, po nástupu ECMO léčby, byla zahájena infuzní aplikace bolusy amikacinu 7,5 mg / kg, gentamicinu 3 mg / kg a vancomycinu 10 mg / kg v 50 ml fyziologického roztoku ve 30 min. trvajících iv. infuzi. Krevní vzorky pro stanovení sérové hladiny (5-10 ml) byly odebrány 30 a 60 minut po počátečním bolusu amikacinu, gentamicinu a během 30 a 60 minut po ukončení infuze vancomycinu.

Ověření meze detekce (MD)

Mez detekce je naměřená hodnota veličiny získaná daným postupem měření, pro kterou je pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o nepřítomnosti složky v materiálu β , přičemž pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o jeho přítomnosti je α .

Při analýze vzorků, byly naměřeny hodnoty, které byly nižší než MD udávaná výrobcem. Bylo důležité zjistit, zda lze tyto nižší hodnoty použít pro další zpracování. Pro stanovení limitu detekce se vzorek nařadil do koncentrační řady pod MD uváděnou výrobcem. Pro analýzu ověření spolehlivosti byly použity nejnižší nezáporné vzorky kalibrátoru ředěného rozpouštědlem, a tak byla zkontrolována koncentrace analytu. Toto ověření potvrdilo možnost použití nižších výsledků.

3.2 Používaný materiál, metody a přístroje

3.2.1 Používaný materiál, metody

Zpracovávaly se vzorky z BAL, krve z plicnice a krve z ECMO. Vzorky krve byly odstředovány co nejdříve, po dobu 10 minut při 3500 otáčkách za minutu při 4 ° C a sérum, které bylo získáno z každého vzorku, se umístilo do plastových mikrozkušavek, které byly ihned zmrazeny na - 70 ° C pro další analýzy. BAL vzorky byly odstředovány po dobu 10 minut při 3500 otáčkách za minutu při teplotě 4 ° C, supernatanty byly odebrány do plastových obalů, jakmile se odebraly vzorky krve, byly ihned zmrazeny při - 70 ° C až do doby analýzy.

Koncentrace gentamicinu a vancomycinu v séru a v BAL tekutině supernatantu byly stanovovány za použití automatizovaného fluorescenčního polarizačního imunologického testu (AxSYM, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Stanovení gentamicinu má detekční limit 0,3 mg / l. Vankomycinový test má detekční limit 2,0 mg / l.

Koncentrace amikacinu v séru a v BAL tekutině supernatantu byla stanovena pomocí automatizované fluorescenční polarizační metody,(TDX / FLX analyzátor, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL). Pro stanovení amikacinu je detekční rozsah 0.8 - 50.0 mg / l s detekčním limitem 0,8 mg / l.

Koncentrace močoviny v séru a BAL vzorků byla stanovena enzymatickou metodu, (UREA / BUN, Roche Diagnostics GmbH) v HITACHI MODULAR analyzátozem (Roche Diagnostics). Nejnižší měřitelná hladina byla stanovena na 0,83 mmol/l. Stanovení je lineární od 0,83 - 66,8 mmol / l.

ALF (alveolar lining fluid)

ALF je tekutina pokrývající vnitřní povrch plicních sklípků. Bronchoalveolární laváž je technika umožňující odběr vzorků z ALF a stanovení koncentrace ATB. BAL je metoda umožňující získat buněčné i buněčné složky z dolních dýchacích cest a alveolů. Po zavedení fibrobronchoskopu se aplikuje 20 ml fyziologického roztoku a následují dva povinné vdechy. Tracheální aspirát se získává sacím katétrem.

Urea (močovina)

Urea je látka s nízkou molekulární hmotností, která se snadno šíří přes alveolo-kapilární bariéru, můžeme předpokládat, že koncentrace urey v ALF a v plazmě jsou stejné.

Penetrační poměr

Antibiotika jsou v plazmě vázána na bílkoviny, zejména na albumin, s volnou částí cca 55%. Kdyby nebylo proteinů v ALF, dalo by se očekávat, že koncentrace volného léku musí být na této úrovni, tj. koncentrace dosahující až 55% koncentrace v plazmě, protože volná frakce má schopnost proniknout do ALF. Několik mechanismů však může omezit průchod ATB přes alveolo-kapilární bariéru. Za prvé, alveolární epitelové buňky, které se vyznačují četnými zonula occludens, nemusí být zcela prostupné pro lyofobní ATB (např. vancomycin), a proto neumožní průchod molekul ATB. Za druhé, určité typy buněk, které tvoří krevní-bronchoalveolární bariéru mají specifickou metabolickou funkci a mohou být zodpovědné za metabolizaci a lokální degradaci léku. A za třetí, míra ionizace ATB může omezit jejich průchod do ALF, protože ATB např. vancomycin je pozitivně nabitý. Proběhly studie, kde byla prokázána koncentrace vancomycinu v ALF 18%, gentamycinu v ALF 32%.

Penetrace ATB do plicní tkáně se zvyšuje při zánětu spojeným s bakteriální infekcí, který je charakterizován zvýšeným prokrvením, dilatací cév, zvýšenou propustností cév a produkcí výpotku bohatého na bílkoviny. [6, 7, 8, 11, 12]

3.2.2 Přístroje

AxSYM Abbott

Systém AxSYM je plně automatický přístroj umožňující imunochemickou analýzu léků. Pracuje po vzorcích (random access) s možností vložení statimových vyšetření. Má karusel na 20 sad činidel po 100 stanoveních daného analytu. Pro měření používá dva základní principy, homogenní FPIA pro analyty s malou molekulovou hmotností a heterogenní MEIA pro analyty s velkou molekulovou hmotností.

K funkcím tohoto přístroje patří široké menu (více než 75 metod), kapacita až 120 vyšetření za 1 hodinu, počet vyšetřovaných vzorků 60 primárních/alikvótních zkumavek nebo 90 vzorkových nádobek, automatické provedení: ředění, opakované testování, reflexní testování. Pozitivní identifikace vzorků, reagenčních souprav a vzorkových segmentů pomocí čárových kódů. Jednoduchá obsluha. Přístroj AxSYM je v souladu s Evropskou direktivou

IVD 98/79/EC označen značkou shody CE. Používá technologie MEIA (Microparticle Enzyme Immunoassay) technologie enzymové imunoanalýzy na mikročásticích a FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay) technologie imunoanalýzy využívající fluorescenční polarizaci. Rozměry přístroje AxSYM jsou, šířka 160 cm, hloubka 85 cm, výška (včetně monitoru) 130 cm, hmotnost 300 kg.



Obr. 7 AxSYM Abbott (5)



Obr. 8 TDx Abbott (6)

TDx Abbott

Systém TDx je určený především pro terapeutické monitorování léků, toxikologii a transplantační diagnostiku. Analyzátor TDx je automatizovaný přístroj umožňující zpracování vyšetřovaných vzorků v dávce. U tohoto přístroje se setkáme s jednoduchou obsluhou. Reagencie jsou připraveny k použití, vyšetřování v karuselu - dávkování vzorků do reakčních nádobek, není nutné přesné pipetování vzorku. Počet pozic v karuselu je 20 reakčních nádobek. Kalibrace metod je uložena v paměti přístroje. Používá čárových kódů. Reagencie určené pro použití s přístrojem TDx jsou v souladu s Evropskou direktivou IVD 98/79/EC označeny značkou shody CE. Nové přístroje TDx již nejsou uváděny do provozu v EU.

Technologii, kterou tento přístroj používá je FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay) technologie imunoanalýzy využívající fluorescenční polarizaci. Rozměry TDx jsou šířka 70 cm, hloubka 60 cm, výška 37,5 cm, hmotnost 49 kg. [9, 16]

4. Výsledky

4.1 Použité meze detekce

Pro hodnocení dat byly použity nové meze detekce, které jsou uvedeny v tabulce č. 1 a výsledky byly porovnány se stanovenými MD od výrobce.

Tab. 1 meze detekce

	meze detekce	
	výrobce	ověřeno
Vancomycin	2 ug/ml	0,71 ug/ml
Gentamicin	0,3 ug/ml	0,20 ug/ml
Amikacin	0,8ug/ml	0,38 ug/ml

4.2 Pilotní série měření

První měření probíhala v červenci a srpnu. Všech 8 zvířat úspěšně dokončilo celý protokol, byly získány vzorky pro stanovení vancomycinu od všech zvířat, vzorky pro amikacin a gentamicin od 5 zvířat. Sérové hodnoty z ECMO obvodu se statisticky neliší od aortálních, data nejsou uvedena. Výsledky sérové koncentrace získané 30 až 60 minut po podání ze vzestupné aorty a plicní tepny jsou uvedeny v tabulkách. Koncentrace v plicní tepně jsou stejné nebo dokonce vyšší než u jiných hodnot. Hodnoty vzorků bronchiálního aspirátu po 30 minutách byly zjistitelné jen u 4 ze 7 zvířat v případě vancomycinu, u 4 z 5 zvířat pro gentamycin, i pro amikacin. Hodnoty v tracheálním aspirátu za 60 minut byly zjistitelné u 5 ze 7 zvířat v případě vancomycinu, a u 4 z 5 zvířat v případě amikacinu a gentamicinu. Dvě zvířata utrpěla plicní edém a jejich hodnoty tracheálního aspirátu se odchýlily, byly 10x vyšší v porovnání s hodnotami ostatních zvířat a byly vyloučeny z analýzy.

ALF (alveolar lining fluid) tekutina pokrývající vnitřní povrch plicních sklípků.

$$\text{ALF} = \text{BAL} * \text{urea plicnice} / \text{urea BAL}$$

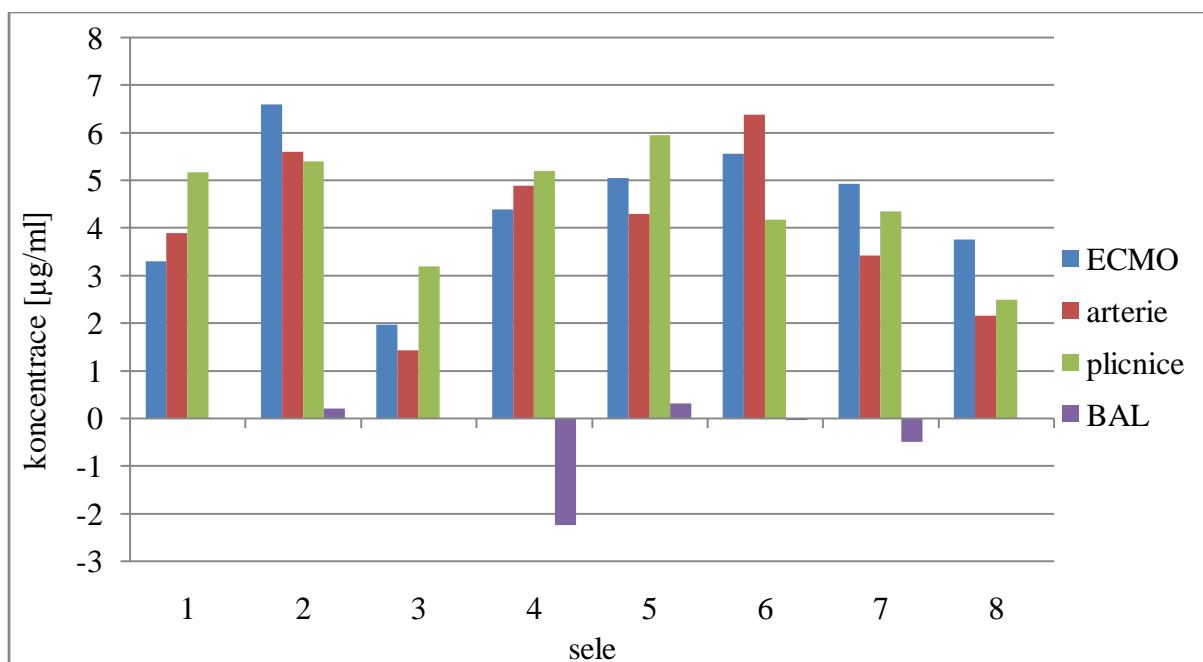
Penetrační poměr ATB penetrační poměr = ALF / plicnice

Vancomycin

Tab. 2 Vancomycin [$\mu\text{g/ml}$]

sele	Vancomycin po 30 minútách				Vancomycin po 60 minútách			
	ECMO	arterie	plicnice	BAL	ECMO	arterie	plicnice	BAL
1.	21,2	21,63	24,82		17,89	17,73	19,64	
2.	24,7	23,6	27,1	2,71	18,1	18	21,7	2,49
3.	10,6	10,7	16,4		8,63	9,26	13,2	
4.	23,2	23,6	27,3		18,8	18,7	22,1	2,23
5.	18,56	18,46	19,63	3,3	13,51	14,16	13,68	2,98
6.	21,7	22,27	21,41		16,14	15,89	17,23	0,03
7.	18,24	17,31	18,06		13,3	13,88	13,7	0,49
8.	23,24	21,82	22,51		19,47	19,65	20,01	

Graf 1 Vancomycin – rozdíl

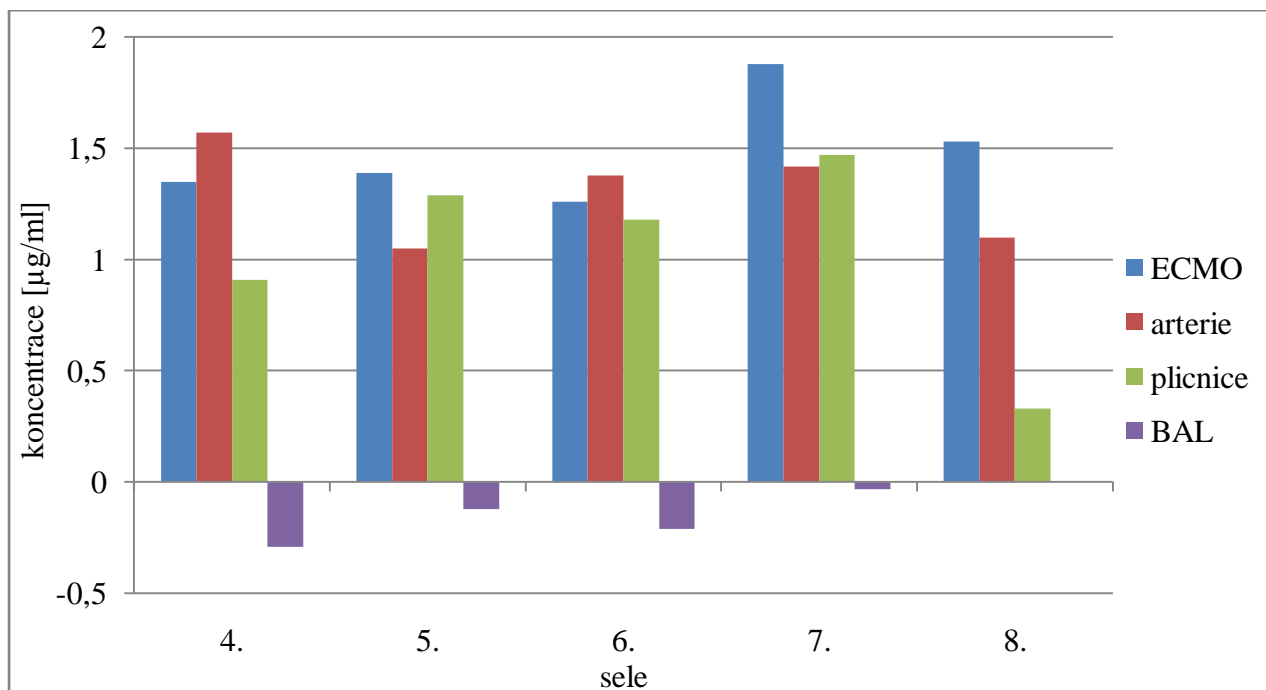


Gentamicin

Tab. 3 Gentamicin [$\mu\text{g/ml}$]

sele	Gentamicin po 30 minútách				Gentamicin po 60 minútách			
	ECMO	arterie	plicnice	BAL	ECMO	arterie	plicnice	BAL
4.	5,67	6,05	5,63	1,04	4,32	4,48	4,72	1,33
5.	4,74	4,51	4,73		3,35	3,46	3,44	0,12
6.	5,42	5,68	5,89	0,18	4,16	4,3	4,71	0,39
7.	7,33	6,57	7,22	0,34	5,45	5,15	5,75	0,37
8.	8,78	8,63	8,2		7,25	7,53	7,87	

Graf 2 Genatamicin – rozdíl

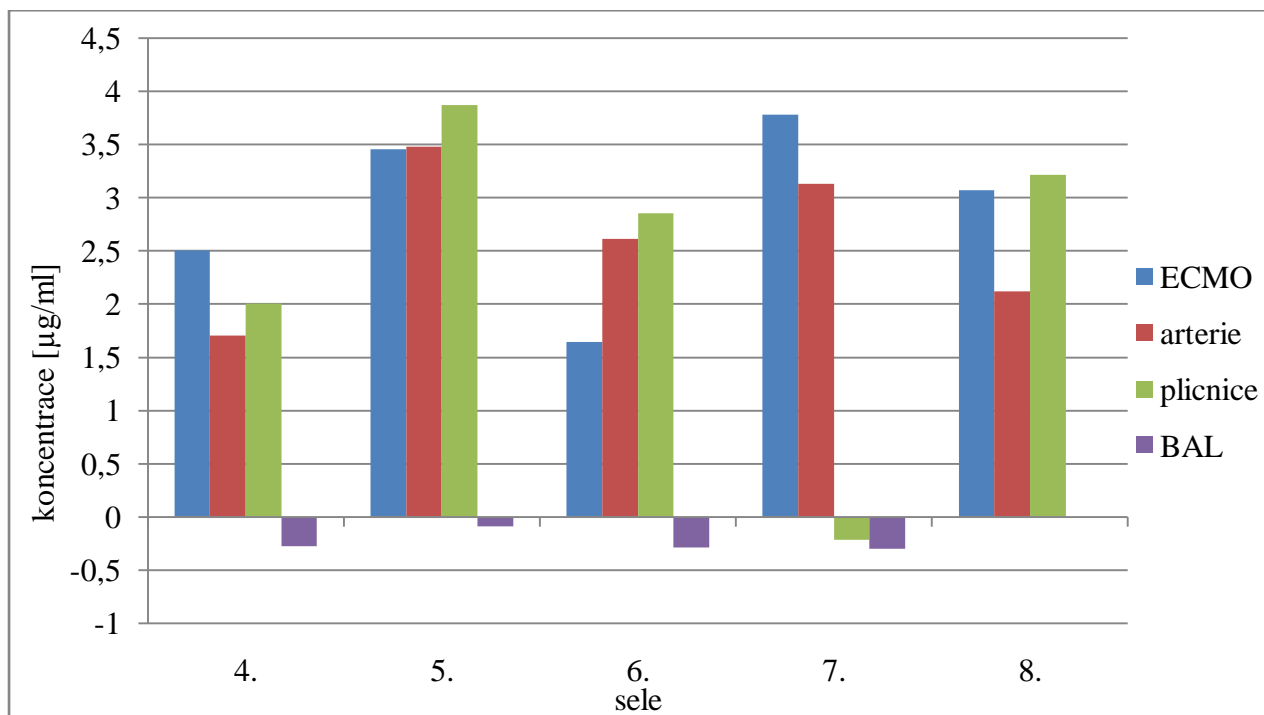


Amikacin

Tab. 4 Amikacin [$\mu\text{g/ml}$]

sele	Amikacin po 30 minútách				Amikacin po 60 minútách			
	ECMO	arterie	plicnice	BAL	ECMO	arterie	plicnice	BAL
4.	12,8	12,2	13,2	1,09	10,3	10,5	11,2	1,37
5.	13,76	13,59	14,17	1,93	10,31	10,11	10,3	2,02
6.	11,62	11,58	12,4	0,77	9,98	8,97	9,55	1,06
7.	15,36	14,37	15,35	0,5	11,58	11,24	15,57	0,8
8.	23,77	23,43	24,09		20,7	21,31	20,88	

Graf 3 Amikacin – rozdiel



Urea

Tab. 5 Urea arterie, plicnice aspirát [mmol/l]

	arterie			plicnice		aspirát	
	baseline	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
sele							
2.	3,4	3,1	3,4	3,1	3,2	0,6	1,1
3.							
4.	4,9	5	5	4,9	5,1	0,6	3,4
5.				3,5	3,6	0,2	0,4
6.	3	3	2,9	3,1	3,1	0,5	1,1
7.	3,4	4,4	4,1	4,3	4,5	0,7	0,5
8.	2,9	3,5	3,7	3,6	3,5	1,2	1,8

Penetrační poměr

Tab. 6 Vancomycin [µg/ml]

	Vancomycin po 30 min						Vancomycin po 60 min					
	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Vanco. ALF	pen. poměr	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Vanco. ALF	pen. poměr
sele												
2.	3,1	0,6	2,71	27,1	14,00	0,52	3,2	1,1	2,49	21,7	7,24	0,33
3.			22,2	16,4					25,8	13,2		
4.	4,9	0,6		27,3			5,1	3,4	2,23	22,1	3,35	0,15
5.	3,5	0,2	3,3	19,63	57,75	2,94	3,6	0,4	2,98	13,68	26,82	1,96
6.	3,1	0,5		21,41			3,1	1,1	0,03	17,23	0,085	0,005
7.	4,3	0,7		18,06			4,5	0,5	0,49	13,7	4,41	0,32
8.	3,6	1,2		22,51			3,5	1,8	26,62	20,01		

Tab. 7 Gentamicin [$\mu\text{g/ml}$]

	Gentamicin po 30 min						Gentamicin po 60 min					
	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Genta. ALF	pen. poměr	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Vanco. ALF	pen. poměr
sele												
4.	4,9	0,6	1,04	5,63	8,49	1,51	5,1	3,4	1,33	4,72	2,00	0,42
5.	3,5	0,2		4,73			3,6	0,4	0,12	3,44	1,08	0,31
6.	3,1	0,5	0,18	5,89	1,12	0,19	3,1	1,1	0,39	4,71	1,10	0,23
7.	4,3	0,7	0,34	7,22	2,09	0,29	4,5	0,5	0,37	5,75	3,33	0,58
8.	3,6	1,2	2,35	8,2	7,05	0,86	3,5	1,8	3,12	7,87		

Tab. 8 Amikacin [$\mu\text{g/ml}$]

	Amikacin po 30 min.						Amikacin po 60 min.					
	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Genta. ALF	pen. poměr	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Vanco. ALF	pen. poměr
sele												
4.	4,9	0,6	1,09	13,2	8,90	0,67	5,1	3,4	1,37	11,2	2,055	0,18
5.	3,5	0,2	1,93	14,17	33,78	2,38	3,6	0,4	2,02	10,3	18,18	1,77
6.	3,1	0,5	0,77	12,4	4,77	0,39	3,1	1,1	1,06	9,55	2,99	0,31
7.	4,3	0,7	0,5	15,35	3,07	0,20	4,5	0,5	0,8	15,57	7,2	0,46
8.	3,6	1,2	7,68	24,09	23,04	0,96	3,5	1,8	9,35	20,88		

4.3 Série měření prosinec

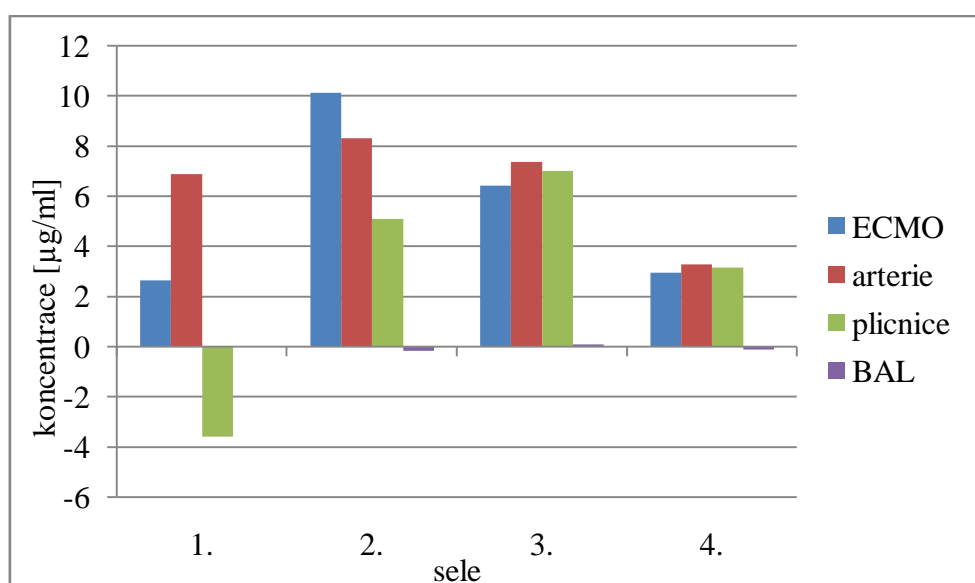
V prosinci se měření prováděla u 4 zvířat, která všechna úspěšně dokončila celý protokol. Byly získány vzorky pro stanovení vancomycinu a gentamicinu od všech zvířat, pro amikacin od 3 ze 4 zvířat. Sérové hodnoty z ECMO obvodu se statisticky neliší od aortálních, data nejsou uvedena. Výsledky sérové koncentrace získané 30 až 60 minut po podání ze vzestupné aorty a plicní tepny s příslušným statistickým vyhodnocením jsou uvedeny v tabulkách. Koncentrace v plicní tepně jsou stejné nebo dokonce vyšší než u jiných hodnot. Hodnoty vzorků bronchiálního aspirátu po 30 minutách byly zjistitelné jen u 3 ze 4 zvířat v případě vancomycinu, u všech zvířat pro gentamicin a u 3 ze 4 zvířat pro amikacin. Hodnoty aspirátu za 60 minut byly zjistitelné u všech zvířat v případě vancomycinu, amikacinu a gentamicinu.

Vancomycin

Tab. 9 Vancomycin [$\mu\text{g/ml}$]

sele	Vancomycin po 30 minútách				Vancomycin po 60 minútách			
	ECMO	arterie	plicnice	BAL	ECMO	arterie	plicnice	BAL
1.	22,59	24,33	18,47	0,3	19,97	17,47	22,08	0,3
2.	29,15	28,16	26,28	0,86	19,05	19,87	21,21	1,05
3.	29,17	26,66	28,45	0,48	22,76	19,31	21,46	0,41
4.	15,94	17,48	18,04		13,01	14,21	14,9	0,13

Graf 4 Vancomycin – rozdíl

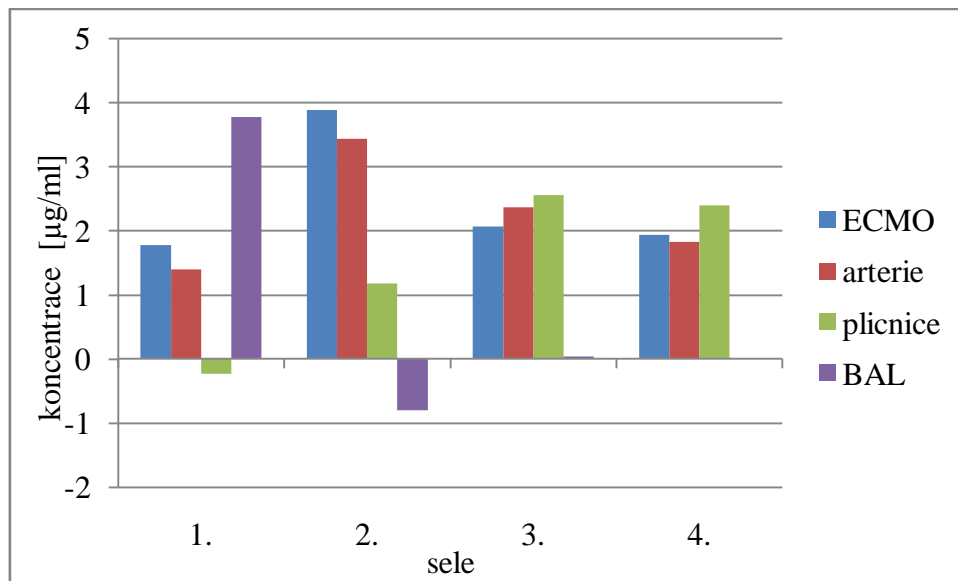


Gentamicin

Tab. 10 Gentamicin [$\mu\text{g/ml}$]

sele	Gentamicin po 30 minútách				Gentamicin po 60 minútách			
	ECMO	arterie	plicnice	BAL	ECMO	arterie	plicnice	BAL
1.	9,88	9,41	7,87	5,13	8,11	8,01	8,1	1,36
2.	10,94	10,48	9,64	0,53	7,06	7,05	8,46	1,33
3.	8,96	10,15	9,7	0,18	6,9	7,79	7,15	0,14
4.	8,16	8,07	8,81	0,305	6,23	6,25	6,42	0,3

Graf 5 Gentamicin – rozdíl

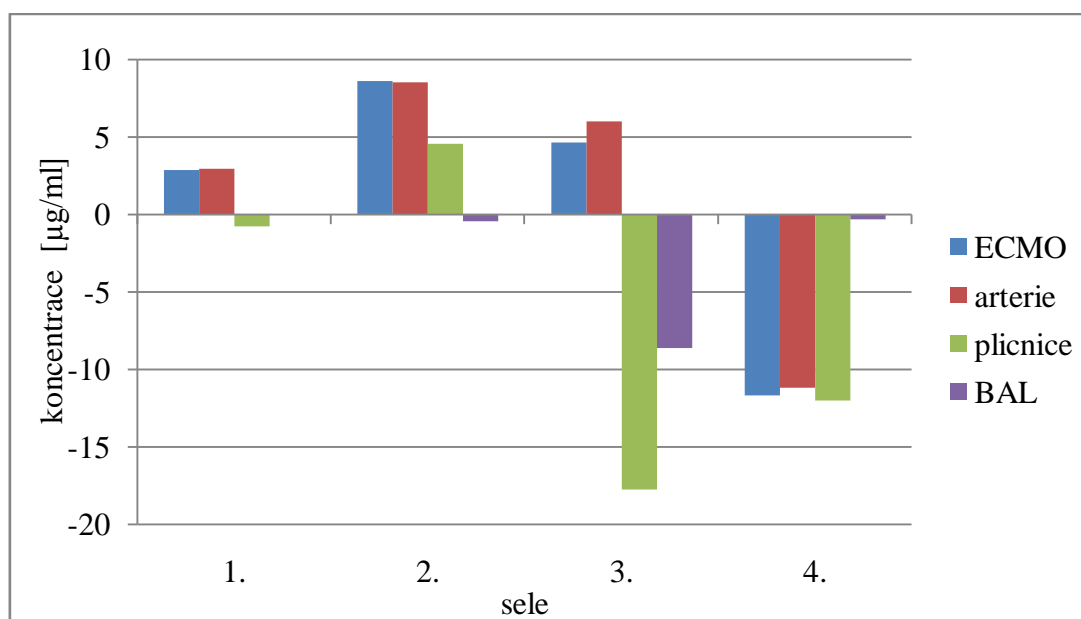


Amikacin

Tab. 11 Amikacin [µg/ml]

sele	Amikacin po 30 minutách				Amikacin po 60 minutách			
	ECMO	arterie	plicnice	BAL	ECMO	arterie	plicnice	BAL
1.	21,31	20,99	18	0,8	18,47	18,04	18,78	0,8
2.	25,11	25,46	23,12	0,8	16,53	16,96	18,57	1,26
3.	21,41	22,46		0,46	16,78	16,46	17,77	9,09
4.					11,69	11,2	12,03	0,33

Graf 6 Amikacin – rozdíl



Urea

Tab. 12 Urea arterie, plicnice, aspirát [mmol/l]

sele	arterie		plicnice		aspirát	
	30 min	60 min	30 min	60 min	30 min	60 min
1.	7	11	4,7	5,8	0,3	0,2
2.			3,4	3,5	0,7	1,4
3.			3,6	3,6	0,1	0,6
4.			1,6	1,5	0,4	0,4

Penetrační poměr

Tab. 13 Vancomycin [µg/ml]

sele	Vancomycin po 30 min.						Vancomycin po 60 min.					
	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Vanco. ALF	pen. poměr	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Vanco. ALF	pen. poměr
1.	4,7	0,3	0,3	18,47	4,7	0,25	5,8	0,2	0,3	22,08	8,7	0,39
2.	3,4	0,7	0,86	26,28	4,18	0,16	3,5	1,4	1,05	21,21	2,63	0,12
3.	3,6	0,1	0,48	28,45	17,28	0,61	3,6	0,6	0,41	21,46	2,46	0,11
4.	1,6	0,4		18,04			1,5	0,4	0,13	14,9	0,49	0,03

Tab. 14 Gentamicin [$\mu\text{g/ml}$]

	Gentamicin po 30 min.						Gentamicin po 60 min.					
	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Vanco. ALF	pen. poměr	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Vanco. ALF	pen. poměr
sele												
1.	4,7	0,3	5,13	7,87	80,37	10,21	5,8	0,2	1,36	8,1	39,44	4,87
2.	3,4	0,7	0,53	9,64	2,5743	0,27	3,5	1,4	1,33	8,46	3,325	0,39
3.	3,6	0,1	0,18	9,7	6,48	0,67	3,6	0,6	0,14	7,15	0,84	0,12
4.	1,6	0,4	0,305	8,81	1,22	0,14	1,5	0,4	0,3	6,42	1,125	0,18

Tab. 15 Amikacin [$\mu\text{g/ml}$]

	Amikacin po 30 min.						Amikacin po 60 min.					
	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Vanco. ALF	pen. poměr	urea plicnice	urea BAL	BAL	plicnice	Vanco. ALF	pen. poměr
sele												
1.	4,7	0,3	0,8	18	12,53	0,70	5,8	0,2	0,8	18,78	23,2	1,24
2.	3,4	0,7	0,8	23,12	3,89	0,17	3,5	1,4	1,26	18,57	3,15	0,17
3.	3,6	0,1	0,46		16,56		3,6	0,6	9,09	17,77	54,54	3,07
4.							1,5	0,4	0,33	12,03	1,24	0,10

Souhrn obou měření

Tab. 16 Penetrační poměr [$\mu\text{g/ml}$]

Penetrační poměr po 30 min.			Penetrační poměr po 60 min.		
Vancomycin	Gentamicin	Amikacin	Vancomycin	Gentamicin	Amikacin
0,51667	1,50858	0,6744	0,33381	0,42267	0,1835
2,94193	0,18947	2,3836	0,15136	0,30523	1,7160
0,25447	0,28928	0,385	1,7160	0,23335	0,3128
0,15895	10,2122	0,2001	0,18483	0,57913	0,4624
0,60738	0,26704	0,6963	0,3219	4,86914	1,2354
	0,66804	0,1681	0,39402	0,39303	0,1696
	0,13848		0,12376	0,11748	3,0692
			0,11463	0,17523	0,1029
			0,03272		
0,52	0,29	0,67	0,18	0,35	0,39

Statistické vyhodnocení

Pro porovnání plazmatické koncentrace ATB v příslušné arterii a plicnici byl použit Wilxonův párový test, p-hodnota $<0,05$ byla považována za statisticky významnou.

Hodnoty plazmatické koncentrace ATB v arterii a plicnici se statisticky významně neliší v případě vancomycinu a gentamicinu po 30 min. a gentamicinu po 30 i 60 min.

U vancomycinu po 60 min. byla p-hodnota 0,006040 a amikacinu po 60 min. 0,015157, hodnoty plazmatické koncentrace ATB v arterii a plicnici se liší, důvodem jsou převládající vyšší hodnoty v plicnici než v arterii.

Tab. 17 vancomycin po 30 min.

Wilxonův párový test - Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$		
	Počet - platných	p-hodn.
arterie & plicnice	10	0,284504

Tab. 18 vancomycin po 60 min.

Wilxonův párový test - Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$		
	Počet - platných	p-hodn.
arterie & plicnice	12	0,006040

Tab. 19 gentamicin po 30 min

Wilxonův párový test - Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$		
	Počet - platných	p-hodn.
arterie & plicnice	9	0,441269

Tab. 20 gentamicin po 60 min.

Wilxonův párový test - Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$		
	Počet - platných	p-hodn.
arterie & plicnice	9	0,109746

Tab. 21 amikacin po 30 min.

Wilcoxonův párový test - Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$		
	Počet -platných	p-hodn.
arterie & plicnice	7	0,865772

Tab. 22 amikacin po 60 min.

Wilcoxonův párový test - Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$		
	Počet - platných	p-hodn.
arterie & plicnice	9	0,015157

6. Závěr

Pilotní studie byla určena pro posouzení časné antibiotické koncentrace v plicní tepně a průniku do plicní tkáně, byl vyhodnocen tracheální bronchiální punktát u pokusných zvířat se srdeční zástavou léčených VA ECMO. Výsledky naznačují, že koncentrace v plicní arterii brzy po podání se neliší od koncentrace arteriální.

U selat s dlouhodobou srdeční zástavou, léčených VA ECMO, a to navzdory zdánlivému snížení plicního průtoku, VA ECMO nesnižuje koncentraci vancomycinu, gentamicinu ani amikacinu v plicní tepně a do jedné hodiny po podání antibiotika mohou být detekována v tracheálním punktátu, u většiny zvířat je penetrační poměr pro vancomycin 18%, gentamicin 35% a amikacin 39%.

Zápal plic a bakteriémie jsou dvě nejčastější závažné nozokomiální infekce u kriticky nemocných pacientů, a riziko zápalu plic vzrůstá 3- až 10- krát při intubaci pacienta s mechanickou ventilací, vykazují vysokou úmrtnost (24-76%). Antimikrobiální léčba hraje významnou roli u těchto infekčních onemocnění. Všeobecně se předpokládalo, že k průniku antibiotik do plic dochází omezeně, protože VA ECMO snižuje plicní průtok krve a rozsah tohoto poklesu je přímo úměrný množství průtoku mimotělním oběhem, ale tento experiment prokázal, že tomu tak není.

Výsledky vyplývající z této studie mají přínos pro klinickou praxi, vypovídají o způsobu pronikání antibiotik do plicnice. Poznatky mohou být dále využity v kardiochirurgických oborech, v oblasti neonatologie, kde je ECMO častěji užívanou léčebnou metodou.

Omezením studie bylo, že nebyly uvažovány interakce mezi antibiotiky, která se v kombinacích při léčbě běžně používají. Tato problematika by mohla být cílem dalšího zkoumání.

U zvířat se zástavou srdce na plné VA ECMO, se nezdá být distribuce výše uvedených antibiotik do plic, i přes zdánlivou plicní hypoperfúzi ovlivněna.

7. Literatura

1. ONDREJ NANKA. *Prehled anatomie*. 2. dopl. vyd. Praha: Karolinum, 2009. ISBN 978-80-246-1717-6.
2. VOKURKA, Martin. *Patofyziologie pro nelékařské směry*. 1.vydání. Praha: Karolinum, 2005, 217 s. ISBN 80-246-0896-0.
3. LONSKÝ, Vladimír. *Mimotelní oběh v klinické praxi*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0653-9.
4. SLÍVA, Jirí. *Farmakologie*. Praha: Triton, 2011. Lékařské repetitorium, sv. 6. ISBN 978-80-7387-500-8.
5. ŠTERN, Petr. *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1025-6.
6. Amaker RD, DiPiro JT, Bhatia J. Pharmacokinetics of vancomycin in critically ill infants undergoing extracorporeal membrane oxygenation. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 May;40(5):1139-42.
7. Lamer C, de Beco V, Soler P, Calvat S, Fagon JY, Dombret MC, Farinotti R, Chastre J, Gibert C. Analysis of vancomycin entry into pulmonary lining fluid by bronchoalveolar lavage in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993 Feb;37(2):281-6.
8. Bělohávek J, Rohn V, Jansa P, Tošovský J, Kunstýř J, Semrád M, Horák J, Lipš M, Mlejnský F, Balík M, Klein A, Linhart A, Lindner J. Veno-arterial ECMO in severe acute right ventricular failure with pulmonary obstructive hemodynamic pattern. *J Invasive Cardiol*. 2010 Aug;22(8):365-9.
9. Abbott Diagnostics Česká republika. *Abbott Diagnostics* [online]. © 2012 [cit. 2012-05-13]. Dostupné z: <http://www.abbottdiagnostics.cz/produkty/imunoanaliza/axsym>
10. Novinky. *Kardiochirurgie* [online]. © 2012, 6.5.2012 [cit. 2012-05-12]. Dostupné z: <http://www.kardiochirurgie.cz/novinky/ecmo-proti-chripce-251>
11. Mulla H, Pooboni S. Population pharmacokinetics of vancomycin in patients receiving extracorporeal membrane oxygenation. *Br J Clin Pharmacol*. 2005 Sep;60(3):265-75.
12. Thiagarajan RR, Laussen PC, Rycus PT, Bartlett RH, Bratton SL. Extracorporeal Membrane Oxygenation to Aid Cardiopulmonary Resuscitation in Infants and Children. *Circulation*. 2007;116:1693-1700
13. Cobas e411. *Roche diagnostics* [online]. © 1996 - 2008 [cit. 2012-05-15]. Dostupné z: http://www.roche-diagnostics.cz/produkty/klinickelaboratore/cobase411_prednosti.aspx

14. LINCOVÁ, Dagmar. ET AL. *Základní aplikovaná farmakologie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-7262-373-0.
15. Ventilační selhání (patofyziologie). In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-05-13]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Ventilacni_selhani_\(patofyziologie\)](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Ventilacni_selhani_(patofyziologie))
16. Abbott Diagnostics Česká republika. *Abbott Diagnostics* [online]. © 2012 [cit. 2012-05-13]. Dostupné z: <http://www.abbottdiagnostics.cz/produkty/imunoanaliza/axsym/>
17. Extrakorporale Herz- Lungenunterstützung. *Uniklinikum-regensburg* [online]. 21.10.2008 [cit. 2012-05-12]. Dostupné z: http://www.uniklinikum-regensburg.de/kliniken-institute/herz-thorax-chirurgie/Kardiotechnik/Extrakorporale_Lungenunterst_tzung/ECLA/index.php
18. STRÍTESKÝ, Jan. *Patologie*. Praha: Epava, 2001. ISBN 80-86297-06-3.
19. Česká pneumologická a fysiologická společnost ČLS JEP. Standardní postup při provádění bronchoalveolární laváže (BAL) a při vyšetřování bronchoalveolární tekutiny (BAT). 2004. Dostupné z: http://www.pneumologie.cz/odborne/doc/BAL_Standard_Studia_po_recenzi_8_2004.pdf.
20. BARTOŠ, Vladimír. Číselníky: FPIA. 1998. Dostupné z: http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/BAAAE.htm

Obrázky

1. Krevní oběh [digitální obraz]. In: *Výukový portál: Oběhová soustava*. © 2009-2012 [cit. 2012-05-06]. Dostupné z: <http://vyuka.zsjarose.cz/index.php>
2. Extrakorporale Herz- Lungenunterstützung [digitální obraz]. In: *Uniklinikum-regensburg: Fachbereich Kardiotechnik*. © 21.10.2008 [cit. 2012-05-12]. Dostupné z: http://www.uniklinikum-regensburg.de/kliniken-institute/herz-thorax-chirurgie/Kardiotechnik/Extrakorporale_Lungenunterst_tzung/ECLA/index.php
3. Abbott Diagnostics AxSYM/AxSYM Plus [digitální obraz]. In: *SSI Healthcare Solutions: Abbott AxSYM*. © 2004-2012 [cit. 2012-05-06]. Dostupné z: <http://www.ssihs.com/index.php>
4. Abbott TDx [digitální obraz]. In: *Hitech diagnostic centre: Instruments*. © 2004 [cit. 2012-05-06]. Dostupné z: <http://www.hitechlabsindia.com/instrumentum.htm>