

LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PLZNI

MULTIPLEXNÍ IMUNOANALÝZA U KRITICKY NEMOCNÝCH DĚTÍ

MULTIPLEX IMMUNOASSAY IN CRITICALLY ILL CHILDREN

DIZERTAČNÍ PRÁCE

Plzeň 2014

MUDr. Lumír Šašek

Poděkování

Chtěl bych na tomto místě poděkovat především svému školiteli Prof. MUDr. Jiřímu Kobrovi, PhD. za pro mne zcela nepostradatelnou pomoc během celého mého studia, za poskytnuté materiály a výsledky z předchozích experimentálních i klinických studií, za cenné rady, inspirující nápady a směřování, a konečně i za jeho nekonečnou trpělivost. Bez něj by tato práce vzniknout nemohla.

Mé velké díky patří MUDr. Kateřině Pizingerové, PhD., nejen za pomoc v rámci experimentální studie, ale i za nezměrnou podporu během celého studia.

Mé další díky patří kolegům z týmu, kteří participovali na předchozí experimentální studii a především na této klinické studii, a sestřám JIRP Dětské kliniky LF UK a FN Plzeň za pomoc při shromažďování dat během studie. A v neposlední řadě děkuji Mgr. Jindře Vrzalové, PhD. za zajištění imunoanalytických metod na OID FN Plzeň a RNDr. Františku Šefrnovi za statistické vyhodnocení dat.

Obsah

Úvod, cíle studie	4
Teoretický úvod.....	6
Respirační selhání.....	6
ALI / ARDS, plicní a systémové cytokiny.....	7
Lung Injury Score (LIS, Murray skóre).....	12
Principy protektivní strategie umělé plicní ventilace	14
Sledované markery.....	16
Tumor necrosis factor alpha (TNF- α).....	16
Interleukin-6 (Il-6).....	16
Adhezivní molekuly VCAM-1 a ICAM-1	17
Matrixová metaloproteináza 9 (MMP-9, gelatináza-B), tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 (TIMP-1).....	18
Fraktalkin (CX ₃ CL ₁ , neurotaktin)	19
Soubor pacientů, materiál a metodika.....	21
Výsledky.....	25
Monitorované parametry.....	26
Sledované markery.....	30
Diskuse	35
Dosavadní literární údaje	35
Diskuse k vlastní práci	40
Závěry	48
Literatura	49

Úvod, cíle studie

Těžké plicní postižení vedoucí k respiračnímu selhání patří k nejčastějším příčinám kritických stavů v dětském věku. Onemocnění způsobující dechové obtíže tvoří více než 20 % všech hospitalizací dětských pacientů a je dominujícím důvodem hospitalizace dětských pacientů na odděleních intenzivní péče. Respirační selhání může mít i v dětském věku mimoplicní příčiny – centrální, oběhové, či metabolické. Může být příčinou, či součástí syndromu multiorgánové dysfunkce. Respirační insuficience, či selhání plicní etiologie je nejčastější indikací k napojení dětí na umělou plicní ventilaci, jako rutinní metody podpory nebo náhrady funkce respiračního systému.

Z pohledu léčebného je respirační selhání urgentní situací, vyžadující okamžitá a povětšinou standardizovaná léčebná opatření. Z prognostického pohledu je v mnohých případech klinicky i s pomocí komplementárních vyšetření obtížné určit další vývoj onemocnění, a tím i umožnit nastavení adekvátní terapie. Respirační děje, podobně jako oběhové, jsou pro organismus kritické a jejich selhání se na rozdíl od postižení ostatních orgánových systémů projevuje bezprostředně. Další stále studovanou otázkou je vzájemný vliv plicního postižení na ostatní orgánové systémy a naopak. Je nepochybné, že plicní postižení vede k systémové odpovědi organismu, a je tedy logické, že míra této odpovědi by měla být přímo úměrná stupni plicního postižení. Tuto systémovou odpověď a její intenzitu lze sledovat s pomocí vybraných cytokinů.

Tato práce si klade za cíl sledovat u dětských pacientů závislost systémové zánětlivé odpovědi na stupni plicního postižení s využitím multiplexní imunoanalýzy na straně jedné a klinických, laboratorních i zobrazovacích parametrů, obecně užívaných ke skórování tíže plicního postižení, na straně druhé. Měla by identifikovat pokud možno časně produkované

systémové cytokinové markery, které korelují se stupněm plicního postižení, stanoveným za pomoci standardizovaných skórovacích i monitorovaných parametrů.

Hlavním cílem a smyslem této práce je získání možnosti adekvátně posoudit a časně léčebně reagovat na různě závažné plicní postižení, a zároveň možnosti určovat míru systémové (zánětlivé) reakce u pacientů s respiračním selháním. To by mělo především vést ke zkvalitnění umělé plicní ventilace s její adekvátně a co nejprotektivněji nastavenou intenzitou, bez rizika zbytečného poškození pacienta.

Jedná se o prospektivní nerandomizovanou klinickou observační studii.

Práce navazuje na klinické a především experimentální studie autorů Kobr J., Fremuth J., et al, odcitované v dalším textu. Z jejich prací vyplývá i volba sledovaných cytokinových markerů, které jsou však nyní – jak odpovídá názvu práce – multiplexně sledovány přímo v klinické praxi.

Práce byla financována z Výzkumného záměru Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni MSM0021620819-6096.

Teoretický úvod

Respirační selhání

Diagnóza respiračního selhání označuje neschopnost plic dostát metabolickým požadavkům organismu na oxygenaci, potom hovoříme o hypoxemickém selhání, či na eliminaci oxidu uhličitého, hovoříme o ventilačním hyperkapnickém selhání. Termín akutní respirační insuficience definuje stav hypoxémie bez hyperkapnie ($p_aO_2 < 9,5$ kPa s $p_aCO_2 < 6,0$ kPa), termín akutní respirační selhání definuje stav těžké hypoxémie, či hypoxémie s hyperkapnií ($p_aO_2 < 6,5$ kPa nebo $p_aO_2 < 9,5$ s $p_aCO_2 \geq 6,0$ kPa). Tato kritéria je možno s výhodou použít při rozvaze o zahájení umělé plicní ventilace.

V pediatrii je v této souvislosti mnohdy užíván termín respiratory compromise. Termín respirační distress je v užším slova smyslu vyhrazen pro soubor klinických příznaků abnormálního způsobu dýchání, ke kterému dochází, pokud dýchání nenaplnuje potřeby na oxygenaci, či ventilaci. V této situaci dominuje u plicních příčin tachypnoe a zvýšené dechové úsilí s eventuální patologickou dechovou mechanikou a známkami obstrukce dýchacích cest. U mimoplicních příčin může zvýšené dechové úsilí chybět, u centrálních neurologických příčin často chybí i tachypnoe. Dušnost je subjektivním pocitem, v mladších věkových kategoriích je obtížné, či přímo vyloučené dušnost jako subjektivní pocit vůbec hodnotit, a mnohdy jsou termíny dušnost a respirační distress používány v pediatrii promiscue.

Etiologie respiračního selhání, či kompromitace u dětí je velmi široká, ale její patofyziologické mechanismy jsou poměrně uniformní: hypoxémie, hyperkapnie, obtížná mechanika dýchání (obstrukce dýchacích cest, svalová slabost, bolest, apod.), porucha centrální regulace ve smyslu deprese dechového centra (intoxikace, trauma), či stimulace (metabolická acidóza,

intoxikace). V kombinaci s vysokým metabolickým obratem a malými rezervami jsou děti z hlediska rychlosti vzniku respiračního selhání obzvláště zranitelné. Respirační selhání je u dětí nejčastější příčinou náhlé zástavy oběhu. Mnohé asfyktické srdeční zástavy jsou předcházeny fází kardiopulmonální kompromitace, která je klinicky dobře rozpoznatelná a je jasnou výzvou ke včasnému komplexnímu léčebnému zajištění takových pacientů, včetně zajištění dýchacích cest s umělou plicní ventilací.

ALI / ARDS, plicní a systémové cytokiny

Acute (dříve Adult) Respiratory Distress Syndrome (ARDS) představuje nejzávažnější formu plicního postižení. V důsledku přímého plicního, či systémového inzultu dochází k poškození na úrovni alveolo-kapilární jednotky. Jako Acute Lung Injury (ALI) se označuje méně závažná forma tohoto plicního postižení. Příčiny ALI/ARDS jsou velmi různorodé, nejčastěji to jsou těžké pneumonie, aspirační postižení plic a sepsy.

Definice ARDS se vyvíjela od roku 1967, kdy byl syndrom jako Adult Respiratory Distress Syndrome poprvé popsán Ashbaughem jako klinická jednotka s dušností, s cyanózou rezistentní k podání kyslíku a s bilaterálními plicními infiltráty na rentgenovém snímku plic. Tato z pohledu diagnostických standardů velmi nejednoznačná definice bránila po dlouhou dobu přesnějšímu klinickému hodnocení skutečné incidence a prognózy onemocnění. Na základě konsenzu AECC z roku 1994 byly stanoveny definice termínů ARDS a ALI, diagnóza byla postavena na přítomnosti bilaterálních plicních infiltrátů na rentgenovém snímku plic, poměru parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi ke koncentraci inhalovaného kyslíku (p_aO_2/FiO_2) a hodnocení plicního tlaku levé síně z plicnicového tlaku v zaklínění, či z klinického hodnocení. V roce 2011 byla na základě meta-analýz patientských dat vytvořena

z iniciativy ESICM tzv. Berlínská definice ARDS a tím i zásadně modifikována klasifikace onemocnění, která nyní rozeznává 3 stupně závažnosti podle p_aO_2/FiO_2 na mírné, střední a těžké ARDS a používá 4 přidružené proměnné k definování těžkého ARDS. Ve srovnání s předchozí AECC definicí má ESICM definice signifikantně lepší prediktivní schopnost mortality a trvání umělé plicní ventilace.

Berlínská definice ARDS 2011

stupně ARDS	mírné	střední	těžké
nástup onemocnění	akutní začátek do 1 týdne od primárního inzultu		
hypoxémie	p_aO_2/FiO_2 201–300 + PEEP \geq 5	p_aO_2/FiO_2 < 200 + PEEP \geq 5	p_aO_2/FiO_2 < 100 + PEEP \geq 10
etiologie edému	respirační selhání nevysvětlitelné srdečním selháním nebo tekutinovým přetížením		
radiologický nález	bilaterální plicní infiltráty	bilaterální plicní infiltráty	bilaterální plicní infiltráty minimálně ve 3 kvadrantech
přidružený patologický nález			V_{Ecorr} (= $V_E \times pCO_2 / 40$) > 10 L/min C_{RS} < 40 ml / cmH ₂ O

Charakteristickým znakem patofyziologie ALI/ARDS je rozsáhlá destrukce alveolárního epitelu a následné zaplavení alveolů proteinovým exsudátem obsahujícím množství polymorfonukleárů. Dalším – i když nedominujícím – znakem je přítomnost cévního

postižení. Tradičně se rozlišují tři fáze rozvoje syndromu – exsudativní, proliferativní a konečná fibrotická.

Buněčná a molekulární podstata plicního postižení při ARDS zůstává ne zcela objasněná již po více než 30 let. S prudkým vývojem poznatků cytokinových kaskád hrajících roli

v inflamatorních reakcích se prohlubuje i pochopení role cytokinů v patogenezi ARDS.

Cytokiny jsou solubilní proteiny o nízké molekulární hmotnosti (zpravidla méně než 30 kDa), přenášející signály mezi buňkami. Cytokiny jsou funkčně řazeny do kaskád, ve kterých jsou iniciální signály mnohokrát amplifikovány. V rámci kaskád fungují i zpětnovazebné vztahy s regulační a koordinační funkcí. Předchozí představy o výlučné tvorbě cytokinů lymfoidními a myeloidními buňkami je dnes již minulostí. Je známo, že cytokiny jsou produkovány i epiteliálními a mezenchymálními buňkami, a že tyto cytokiny zesilují zánětlivou orgánovou odpověď, a to i v plicích. Mezi cílové buňky cytokinových kaskád patří endoteliální buňky, epiteliální buňky, či fibroblasty.

Pochopení patogeneze ARDS by mělo napomoci predikci rizikových pacientů, jejich časné terapii a zároveň predikci jejich prognózy. Snaha o identifikaci takových cytokinových markerů je proto velmi intenzivní. Prozatím se nepodařilo identifikovat solitární cytokin, který by byl schopen předpovídat rozvoj ARDS, jeho tíži a výsledek. Pozornost se spíše zaměřuje na komplexní interakce mezi buňkami a cytokiny a na popis rovnováhy mezi prozánětlivými a protizánětlivými faktory. Definování takové cytokinové rovnováhy v plicích na počátku ARDS a její vývoj v čase bude pravděpodobně správnou cestou.

Studium cytokinové rovnováhy, tedy výběr setu cytokinů, přináší potenciální omezení.

Studium v krvi přítomných cytokinů ale přináší jen odhad plicních zánětlivých procesů. Ani stanovení čistě plicních cytokinů mnohdy nedokáže dát do přesného vztahu plicní

kompartment se systémovými změnami v rámci SIRS / sepse.

Stanovení v plicích přítomných cytokinů je obtížné, protože alveolární i intersticiální tkáňová komponenta plicního kompartmentu nejsou jednotné, nelze odhadnout přesný poměr obou poolů, a tudíž ani standardizovaný odběr vzorků alveolární tekutiny nemusí být reprezentativní. Týká se obou zavedených standardů odběru, tedy jak bronchoalveolární laváže (BAL), kdy navíc dochází k naředění cytokinů (až 100x), tak i přímé aspirace edematózní tekutiny.

Ke stanovování hladin cytokinů v biologických materiálech jsou nejčastěji používány Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) používající poly-, či monoklonální protilátky, často v kombinaci několika protilátek. Výhodou této metodiky bývá vysoká specifita. Je nutno vzít v úvahu, že v odebíraném biologickém materiálu jsou přítomny nejen studované cytokiny, ale i další inhibiční, či modulující molekuly. Problematické pak může být sdílení testovaného epitopu jinou molekulou, snižující jeho specifitu, či skrytí testovaného epitopu inhibitorem. Cytokiny iniciovaná migrace polymorfonukleárů do poškozených tkání spolu s přítomností cévního postižení je spojujícím mechanismem vzájemného vztahu systémového a plicního postižení. Na reakci se podílejí jak systémové, tak v plicích produkované cytokiny. Jedním z pojitků plicního poškození při systémových procesech je CD14 dependentní kaskáda. CD14 antigen na povrchu monocytů a makrofágů zprostředkuje odpověď na produkty buněčné stěny bakterií, typicky se jedná o lipopolysacharidy. Solubilní forma CD14 receptoru (SCD14) je uvolňována z povrchové membrány CD14-pozitivních buněk a zprostředkuje tak odpověď na CD14-negativních endotelových a epitelálních buňkách. Interleukin 6 a 4 (IL-6 a IL-4) modulují expresi CD14 na alveolárních makrofázích a jejich uvolňování z buněčného povrchu v solubilní podobě. Zvýšená koncentrace CD14 na začátku ARDS je pravděpodobně zodpovědná za migraci polymorfonukleárů a následnou destrukci alveolárního epitelu a

exsudaci. Inhibice sCD14 monoklonální protilátkou představuje v tomto směru i léčebný potenciál.

Leukotytární migrace je řízena chemotaktickými cytokiny – chemokiny. α -chemokiny působí na polymorfonukleáry, β -chemokiny na lymfocyty a monocyty. V dýchacích cestách jsou jejich zdrojem alveolární makrofágy, jejichž aktivace je popsána v předchozím odstavci.

Zajímavá je i role dvou cytokinů časně fáze – TNF- α a IL-1. Tyto systémově produkované cytokiny jsou rovněž přítomny v alveolární tekutině v začátku ARDS a podílejí se na stimulaci epiteliálních a mezenchymálních buněk v odpověď na přítomnost bakterií. Stimulují expresi adhezivní molekuly ICAM-1. U pacientů rizikových z rozvoje ARDS i u pacientů s již rozvinutým ARDS jsou v plicích exprimovány solubilní receptory IL-6R. Dalším interleukinem, který by mohl být využit i jako prediktivní marker, je interleukin 8 a jeho hladiny plicní i systémové.

Hledání spojujícího článku systémových a plicních pochodů zánětlivé reakce se zaměřuje i na roli cytokinové odpovědi při poškození endotelu plic. Systémovým markerem takového poškození může být například von Willebrandův faktor, specifické plicní markery však dosud nalezeny nebyly.

Dalšími cytokiny, které se uplatňují v patogenezi ARDS jsou kontraregulační interleukin 10 (IL-10) a Macrophage Inhibitory Factor (MIF).

Cytokiny ovlivňují nejen chemotakticky migraci polymorfonukleárů do tkání, ale i jejich přežívání tak, že inhibují apoptózu polymorfonukleárů.

Cytokiny určují i produkci kolagenu a reparační pochody (Transforming Growth Factor alpha zvyšující produkci kolagenu ve fibroblastech a zároveň stimuluje proliferaci epiteliálních buněk, etc). Tyto procesy mohou být důležité v predikci outcome, či stupně plicní fibrotizace (například stanovení hladin Procollagen Peptide III).

Lung Injury Score (LIS, Murray skóre)

Jedná se o skórovací systém, který může být použit v hodnocení plicního postižení. Skórovací metoda je jednoduchá a přesná a navíc schopná monitorování dynamiky plicního postižení.

Je však do jisté míry vhodná především pro uměle ventilované pacienty.

V hodnocení jsou využívány RTG snímek plic, paO_2/FiO_2 index, PEEP a plicní compliance.

Plicní compliance je kalkulována jako $V_t / (PIP-PEEP)$ [$ml.cmH_2O^{-1}$], kde V_t je dechový objem,

PIP vrcholový ventilační tlak a PEEP tlak na konci expira.

LIS

Parametr	Nález	Hodnota
RTG plic	Bez alveolární konzolidace	0
	Alveolární konzolidace 1 kvadrantu	1
	Alveolární konzolidace 2 kvadrantů	2
	Alveolární konzolidace 3 kvadrantů	3
	Alveolární konzolidace 4 kvadrantů	4
Hypoxemický index	$paO_2/FiO_2 > 300$ mmHg	0
	paO_2/FiO_2 225–299 mmHg	1
	paO_2/FiO_2 175–224 mmHg	2
	paO_2/FiO_2 100–174 mmHg	3
	$paO_2/FiO_2 < 100$ mmHg	4
PEEP	≤ 5 cmH ₂ O	0
	6–8 cmH ₂ O	1
	9–11 cmH ₂ O	2
	12–14 cmH ₂ O	3
	≥ 15 cmH ₂ O	4
Plicní compliance	≥ 80 ml.cmH ₂ O ⁻¹	0
	60–79 ml.cmH ₂ O ⁻¹	1
	40–59 ml.cmH ₂ O ⁻¹	2
	20–39 ml.cmH ₂ O ⁻¹	3
	≤ 19 ml.cmH ₂ O ⁻¹	4

Nutno skórovat alespoň ve 2 parametrech, obvykle RTG plic a hypoxemický index.

Výpočet: LIS = suma hodnot parametrů / počet parametrů

Interpretace:

LIS skóre 0: Bez plicního postižení.

LIS skóre 0,1–2,5: Lehké až středně těžké plicní postižení.

LIS skóre > 2,5: Těžké plicní postižení.

Principy protektivní strategie umělé plicní ventilace

Hlavním principem protektivní umělé plicní ventilace je ventilace nízkými dechovými objemy.

Menší dechové objemy způsobují menší alveolární overdistenzi, což je jedna z hlavních příčin

VILI. Dechové objemy by v souladu s tímto principem měly být nastaveny na 6 ml.kg^{-1} . U

některých pacientů však toto nastavení způsobuje hyperkapnii s respirační acidózou

(permissivní hyperkapnie). K udržení normálního minutového dechového objemu při nízkých

dechových objemech je obvykle nutno použít vyšší dechovou frekvenci. Tím dochází ke

zkrácení času expirace, a tudíž k vytváření auto-PEEPu. Ten hraje v udržení otevřené

provzdušnělé plíce důležitou roli. U mělce sedovaných (anestezovaných) pacientů obvykle

způsobují nízké dechové objemy spolu s hyperkapnií významnou vlastní dechovou aktivitu

pacienta. Přitom dochází k překročení dechových objemů 7 ml.kg^{-1} , takže je nutno pacienta

hlouběji tlumit a velmi často – především v počátečních 48 hodinách umělé plicní ventilace –

i přistoupit k neuromuskulární blokádě. Obvyklým iniciálním nastavením jsou dechové

objemy 8 ml.kg^{-1} a dechová frekvence k udržení normální minutové ventilace. V dalších

hodinách se dechové objemy postupně snižují na 6 ml.kg^{-1} . Je doporučeno během ventilace

nepřekračovat $P_{\text{plateau}} 28\text{-}30 \text{ cmH}_2\text{O}$ (minimalizace střižných sil).

Dalším důležitým principem, který se kombinuje s ventilací nízkými dechovými objemy, je

adekvátní nastavení PEEP k maximalizaci alveolárního recruitmentu. V praxi se používá buď

nastavení 2 cmH₂O nad dolním inflekčním bodem PV křivky. Pokud stanovení tohoto bodu není jasné, pak je nastavena hodnota 16 cmH₂O, nebo je PEEP rovnou nastaven na tuto maximální hodnotu a postupně snižován za měření statické plicní compliance a saturace hemoglobinu. Tyto způsoby aplikace jsou často v pediatrii obtížně použitelné, včetně hledání dolního inflekčního bodu, a především pro většinu dětí znamená PEEP >10-12 cmH₂O i významné hemodynamické zatížení. Proto bývá v pediatrii iniciálně nastavena hodnota 8 cmH₂O, která je pak podle potřeby měněna. Je nutné se vyhnout delší ventilaci s použitím nízkých PEEP <5 cmH₂O.

K protektivně vedené ventilaci patří i nastavení nejmenší nutné FiO₂, pokud možno pod 0,40 a v každém případě tak, aby nedocházelo k hyperoxémii >20,0 kPa.

Sledované markery

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

Je spolu s interleukinem-1 hlavním cytokinem zprostředkujícím zánětlivou reakci organismu.

Je produkován především aktivovanými makrofágy. Sekrece může být stimulována endotoxiny, imunokomplexy, fyzickou zátěží a celou řadou dalších zánětlivých podnětů.

Nejdůležitějším momentem jeho působení je ovlivnění endotelu, leukocytů a fibroblastů a nastartování systémové akutní zánětlivé reakce. Podílí se na aktivaci endotelu, na kterém dochází k expresi adhezivních molekul, na produkci interleukinu-1, zvyšuje trombogenicitu endotelu. Aktivačně působí i na leukocytech. Zároveň však podporuje proliferaci fibroblastů a syntézu kolagenu, a tím přispívá k reparačním pochodům. K jeho systémovým efektům patří horečka, leukocytóza, sekrece dalších proteinů akutní fáze, dále snížení chuti k jídlu, únava, spavost.

Efekt TNF- α je zprostředkován dvěma receptory: TNFRI p55 a TNFRII p75, které jsou uvolňovány z povrchu makrofágů a dalších buněk. Poměr imunoreaktivního TNF- α a jeho receptorů se v průběhu zánětlivé odpovědi mění. Receptory tak působí stran aktivity TNF- α inhibičně.

Spolu s IL-1 se TNF- α podílí na pozitivní regulaci adhezivní molekuly ICAM-1.

Interleukin-6 (IL-6)

Je komplexní cytokin produkováný několika typy buněk, aktivovanými makrofágy, ale i T-lymfocyty a monocyty. Indukuje syntézu imunoglobulinů v B lymfocytech a je zapojen do diferenciaci cytotoxických T lymfocytů. Původně byl identifikován jako růstový faktor B

lymfocytů. Je hlavním faktorem regulace akutní fáze syntézy proteinů v játrech, jako je C-reaktivní protein, a dále alfa1-antitrypsinu, haptoglobinu a fibrinogenu. Receptor Il-6 je heterodimer složený z nescifického transmembránového glykoproteinu gp130, sdíleného s jinými cytokiny, a specifického Il-6R řetězce. Solubilní forma Il-6 se váže na gp130, exprimovaný hojně na buněčných membránách, v přítomnosti Il-6. Samostatně nemá in vitro žádnou hematopoetickou aktivitu. V součinnosti s ostatními cytokiny akutní fáze, například s Il-3, podporuje proliferaci progenitorových buněk kostní dřeně, přičemž část této hematopoetické aktivity je nepřímá, a to stimulací ostatních cytokinů. Má synergický účinek s kolonie stimulujícími faktory granulocytů a makrofágů, podobně se chová při stimulaci megakaryocytů.

Jedná se o excelentní diagnostický marker používaný v diagnostice a časně empirické léčbě sepse.

Adhezivní molekuly VCAM-1 a ICAM-1

Adhezivní molekuly patří do širší imunoglobulinové rodiny a jedná se o skupinu proteinů, podílejících se na rozpoznávacích, vazebních a adhezních pochodech. Adhezivní molekuly zprostředkují pevnou adhezi leukocytů na endoteliální buňky, prezentaci antigenů a následnou aktivaci leukocytů. Fixace leukocytů zprostředkovaná adhezivními molekulami je pevnější než fixace zprostředkovaná selektiny.

ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, CD54) je uspořádána do pěti imunoglobulinům podobných domén, je exprimována na povrchu endoteliálních buněk, a dále na leukocytech, epiteliálních buňkách a fibroblastech. Může být exprimována i na eozinofilech, či na buňkách respiračního epitelu. Míra exprese významně stoupá po stimulaci cytokiny (Il-6, TNF- α , IFN-

y), či bakteriálními endotoxiny. IFN- γ způsobuje selektivní expresi ICAM-1 bez ovlivnění exprese ostatních signálních molekul. Ligandy zahrnují LFA-1, fibrinogen, rhinoviry, Mac-1, a další.

VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule 1, CD106) je cytokiny indukovatelná endoteliální buněčná adhezivní molekula, která je exprimována ve dvou alternativně spojených verzích – v sedmi- a šestidoménové verzi. Exprese VCAM-1 byla detekována na jiných než endoteliálních buňkách, včetně makrofágů, dendritických buněk, astrocytů, stromálních buněk kostní dřeně a buněk respiračního epitelu. VCAM-1 buňky mohou být indukovány de novo během několika hodin po expozici IL-1, TNF- α , či bakteriálním endotoxinům s maximální úrovní exprese ve 24-48 hodinách. IL-1, TNF- α a bakteriální endotoxiny způsobují zároveň expresi ICAM-1 a E-selektinu. Naproti tomu IL-4 a IL-13 indukují selektivní expresi VCAM-1 molekul. Selektivita, či synergie působení cytokinů na expresi VCAM-1 se mezi různými částmi endotelu liší.

Dalšími adhezivními molekulami jsou například ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), PECAM-1 (CD31).

Matrixová metaloproteináza 9 (MMP-9, gelatináza-B), tkáňový inhibitor metaloproteináz 1 (TIMP-1)

Matrixové metaloproteinázy (MMPs) jsou zinek-dependentní endopeptidázy, patřící do větší skupiny proteáz zvaných metzincinová nadčeleď. Jsou zavzaty do procesu degradace a přestavby všech druhů extracelulárních matrixových proteinů a podílí se na širokém spektru buněčných pochodů, ať už jde o produkci bioaktivních molekul, expresi apoptotických ligandů (FAS), či štěpení buněčných povrchových receptorů. Hrají tak hlavní roli v buněčné proliferaci, migraci a adhezi, diferenciaci, angiogenezi, apoptóze a imunitních pochodech.

Matrixové metaloproteinázy jsou produkovány jako inaktivní zymogen. Aktivace probíhá odštěpením propeptidové domény, která je součástí takzvaného „cysteinového switchu“. Cysteinové reziduum interaguje se zinkovým atomem na aktivním místě a brání tak vazbě a odštěpování substrátu, čímž udržuje enzym v inaktivní formě. Aktivace může u některých metaloproteináz probíhat i jinými mechanismy.

Metaloproteinázy lze z funkčního hlediska dělit na kolagenázy, gelatinázy, stromelyziny a metaloproteinázy membránového typu. Gelatinázy mají navíc vazebnou doménu umístěnou před vazebným místem pro zinek, substrátem pro tyto enzymy je kolagen IV a gelatin.

Metaloproteinázy jsou inhibovány specifickými inhibitory – tkáňovými inhibitory metaloproteináz (TIMPs). Jsou známy čtyři typy inhibitorů – TIMP-1–TIMP-4. Existují i syntetické inhibitory, vážící se na aktivní katalytický zinkový atom MMP.

Fraktalkin (CX₃CL₁, neurotaktin)

Jedná se o chemokin patřící do skupiny CX₃C chemokinů. Je to polypeptid (373 aminokyselin). Tvoří jej vlastní chemokinová doména a mucinu podobný stonek, zodpovědný za vazbu na cirkulující leukocyty. Primárně je exprimován na povrchu endoteliálních buněk. V této původní a častější vázané formě podporuje pevnou a na integrinu nezávislou adhezi leukocytů na aktivované endoteliální buňky. Vzácnější je jeho solubilní forma. Za odštěpování fraktalkinu od povrchu epiteliálních buněk jsou zodpovědné metaloproteinázy. V solubilní formě působí jako signální molekula – tedy jako silný chemoatraktant monocytů a T-lymfocytů v průběhu časně zánětlivé odpovědi a má významné antiapoptotické působení především na monocyty (význam například v patogenezi aterosklerózy).

Soubor pacientů, materiál a metodika

Jedná se o prospektivní nerandomizovanou klinickou observační studii.

Sledovaný soubor tvoří 32 pacientů hospitalizovaných v období od června 2007 do března 2009 na JIRP Dětské kliniky LF UK a FN Plzeň. Do studie byli zařazeni pacienti kriticky nemocní s Pediatric Risk of Mortality Score (PRISM III-12) > 10,0 s těžkým plicním postižením s LIS skóre > 1,0 vedoucím k respiračnímu selhání s nutností invazivní umělé plicní ventilace. Z celkového počtu pacientů bylo 18 chlapců a 14 dívek. Průměrný věk zařazených pacientů byl 39,5 měsíce, rozmezí 0,0–192,0 měsíců. Průměrná hmotnost pacienta byla 14,2 kg, rozmezí 1,9–64,0 kg.

Z 32 zařazených pacientů bylo 28 pacientů s primárně plicním postižením ALI/ARDS na podkladě aspirace, infekce, autoimunitního procesu, či zhmoždění, u 1 pacienta se jednalo o plicní arteriální hypertenzi, u 3 pacientů o ARDS při septickém šoku a MODS. Přesný rozpis diagnóz je uveden v tabulce.

Tabulka diagnóz

Tonutí	4
Aspirace	11
Bakteriální pneumonie	7
Bronchiolitida	3
Wegenerova granulomatóza, MODS	1
Kontuze plic, polytrauma	2
Septický šok, MODS	3
Plicní arteriální hypertenze	1

Umělá plicní ventilace byla realizována na přístrojích Viasys Avea, Maquet Servo-i a SensorMedics. Všichni pacienti byli intubováni, všichni standardně zajištěni invazivními vstupy, tedy centrálním žilním katétre, arteriální linkou, permanentním močovým katétre a nazogastrickou sondou, a invazivně monitorováni.

Pacienti byli sledováni po dobu 48 hodin od přijetí. Nultá hodina byla dána přijetím na oddělení v případě, že byla umělá plicní ventilace zahájena před transportem záchrannou službou (tedy maximálně 1 hodinu před přijetím na oddělení), či časem intubace a zahájením umělé plicní ventilace přímo na oddělení.

V 1., 12., 24. a 48. hodině pak byl zaznamenán klinický stav pacientů, vitální parametry a zejména nastavené a monitorované ventilační parametry a indexy. Zároveň byly provedeny laboratorní odběry. Současně bylo pro účely jiné paralelně probíhající studie provedeno echokardiografické vyšetření.

Z nastavených a monitorovaných ventilačních parametrů byl zaznamenáván ventilační režim, frekvence dechů (RR [min^{-1}]), použitá koncentrace kyslíku ve vdechované směsi (FiO_2),

vrcholový ventilační tlak (PIP [cmH₂O]), střední tlak v dýchacích cestách (Paw [cmH₂O]), end-expirační tlak v dýchacích cestách (PEEP [cmH₂O]), dechový objem (Vt [ml.kg⁻¹]), dále kalkulované indexy, a to hypoxemický index paO₂/FiO₂ (paO₂/FiO₂ [mmH₂O]), oxygenační index (OI = P_{aw} × FiO₂ × 100 / paO₂), arterioalveolární difference (AaDO₂ [kPa]), a dále v této práci nehodnocené a/A DO₂, ventilační index (VI), mrtvý prostor (Vd/Vt), dynamická compliance (C_{dyn}), rezistence v dýchacích cestách (R_{aw}).

Laboratorně byly stanovovány sérové hladiny inflamatorních cytokinů: Tumor necrosis factor alpha (TNF-α [pg.ml⁻¹], Luminex), interleukin 6 (IL-6 [pg.ml⁻¹], Luminex), natriuretický peptid B, přesněji řečeno N-terminal pro-BNP (NTProBNP, dále označován jako BNP [pg.ml⁻¹], Luminex), kardiální troponin I (cTn-I [pg.ml⁻¹], Dxl), matrixová metaloproteináza 9 (MMP-9 [pg.ml⁻¹], Luminex), tkáňový inhibitor metaloproteinázy 1 (TIMP-1 [ng.ml⁻¹], RD-Elisa), fraktalkin (CX3CL1 [pg.ml⁻¹], Luminex), intercelulární adhezivní molekula 1 (ICAM-1 [ng.ml⁻¹], Luminex), vaskulární adhezivní molekula 1 (VCAM-1 [ng.ml⁻¹], Luminex) a prokalcitonin (PCT [ng.ml⁻¹], Kryptol). Dále byla prováděna analýza krevních plynů z arteriální krve a pro účely určení PRISM skóre a pro paralelně probíhající studie prováděno stanovení standardních biochemických a koagulačních markerů (alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, celkový bilirubin, glukóza, natrium v séru a v moči, kalium v séru a v moči, chloridy v séru a v moči, osmolalita séra a moči, močovina v séru a v moči, kreatinin v séru a v moči, poměr aktuálního aktivovaného parciálního tromboplastinového času a protrombinového času k normálu, fibrinogen, antitrombin 3).

V 1., 12., 24. a 48. hodině byli pacienti echokardiograficky vyšetřeni (data použita v rámci týmu pro účely jiné paralelně probíhající studie), byly průběžně vylučovány kardiogenní příčiny plicní patologie.

Statistická analýza byla krom základních statistik provedena testováním normality rozložení vstupních kritérií, monitorovaných parametrů a sledovaných markerů (test šikmosti a špičatosti). Pro hodnocení změn veličin v čase byl použit Friedmanův neparametrický test. U veličin prokázány statisticky významnými změnami byla na dotestování použita Nemenyiho metoda mnohonásobného porovnávání pro odlišení statistické významnosti změn v jednotlivých sledovaných obdobích. Ke zhodnocení korelace veličin byl použit výpočet Spearmanova a Kendallova koeficientu.

Výsledky

Průměrné PRISM skóre u zařazených pacientů bylo 18,5 v rozmezí 10,0–40,0, průměrné LIS skóre bylo 2,0 v rozmezí 1,0-3,1. Do 24 hodin po ukončení experimentu zemřeli 3 z 32 pacientů, což představuje 9,4 %. Průměrné PRISM skóre u zařazených pacientů bylo 18,5 v rozmezí 10,0–40,0, průměrné LIS skóre bylo 2,0 v rozmezí 1,0-3,1.

Umělá plicní ventilace byla u většiny pacientů vedena v tlakově řízených režimech (obvykle PCV/AC) podle zásad protektivní ventilace (viz výše zmíněná pravidla v teoretickém úvodu). Závažné plicní postižení si u 5 pacientů z celkových 32 vyžádalo konvertování na nekonvenční ventilace HFOV. Důvodem byla u 1 pacienta těžká aspirace s ARDS, u 1 pacienta těžká oboustranná pneumonie se sepsí a rozvojem ARDS, u 1 pacienta akutní RSvirová bronchiolitida s progresí do ARDS a u 2 pacientů septický šok s rozvojem ARDS. Navíc bylo nutno u 4 pacientů s progresí plicní arteriální hypertenze přechodně zařadit selektivní vazodilatační doplněk inhalací oxidu dusnatého (iNO). Ve všech těchto případech se jednalo děti nízkých věkových skupiny do 1 roku věku – 1 pacient s plicní arteriální hypertenzí a 3 pacienti s ARDS na podkladě aspirace (a přidružené srdeční vady).

Monitorované parametry

pH

	průměr	směrodatná odchylka	minimum	maximum
PH_1	7.234	0.171	6.920	7.520
PH_12	7.336	0.152	6.930	7.540
PH_24	7.344	0.115	6.980	7.540
PH_48	7.375	0.098	7.060	7.530

Statisticky významná změna pH v čase (kritérium 15,2; P=0,002). Normalizace pH ve 24. a 48. hodině je oproti 1. hodině významná (kritérium 31,0, respektive 36,0; P=0,05, respektive 0,01). Rozdíl vzestupu mezi 24. a 48. statisticky významný není.

p_aO₂

PAO2_1	18.79	11.16	5.20	49.10
PAO2_12	19.62	10.66	6.60	47.20
PAO2_24	18.26	6.02	8.20	35.80
PAO2_48	18.19	7.51	8.00	38.60

p_aO₂ se v průběhu statisticky významně neměnilo.

$p_a\text{CO}_2$

PACO2_1	8.887	4.277	4.200	23.200
PACO2_12	8.031	3.402	3.700	19.100
PACO2_24	8.425	3.368	3.500	18.200
PACO2_48	8.657	3.975	4.700	20.800

$p_a\text{CO}_2$ se v průběhu statisticky významně neměnilo.

P_{aw}

PAW_1	14.65	2.40	11.00	20.00
PAW_12	14.68	3.64	10.00	26.00
PAW_24	14.35	2.94	10.00	24.00
PAW_48	13.93	3.20	7.00	24.00

P_{aw} se v průběhu statisticky významně neměnilo.

PEEP

PEEP_1	9.290	1.755	8.000	16.000
PEEP_12	9.517	1.573	8.000	14.000
PEEP_24	9.517	1.379	8.000	12.000
PEEP_48	9.407	1.551	6.000	12.000

PEEP se v průběhu statisticky významně neměnil.

V_t/kg

VTKG_1	7.868	2.031	4.700	14.100
VTKG_12	8.300	2.366	2.500	15.400
VTKG_24	7.689	1.414	3.000	9.900
VTKG_48	7.700	1.425	3.200	10.800

V_t/kg se v průběhu statisticky významně neměnil.

AADO₂

AADO2_1	24.64	17.34	-17.47	63.25
AADO2_12	16.27	13.58	-15.27	57.1
AADO2_24	14.71	9.93	0.05	45.00
AADO2_48	14.05	9.19	-8.75	35.21

Statisticky významná změna AADO₂ v čase (kritérium 23,2; P=0,0). Je přítomno statisticky významné snížení alveolo-arteriální difference ve 24. a 48. hodině oproti 1. hodině (kritérium 43,0, respektive 40,0; P=0,001, respektive 0,001). Rozdíl vzestupu mezi 24. a 48. statisticky významný není.

OI

OI_1	8.016	6.765	1.470	38.920
OI_12	5.835	4.553	1.490	28.250
OI_24	5.285	3.294	2.430	16.890
OI_48	5.428	3.711	1.390	20.270

Statisticky významná změna OI v čase (kritérium 17,3; $P=0,001$). Je přítomno statisticky významné snížení oxygenačního indexu ve 24. a 48. hodině oproti 1. hodině (kritérium 39,0, respektive 30,0; $P=0,001$, respektive 0,05). Rozdíl vzestupu mezi 24. a 48. statisticky významný není.

p_aO_2/FiO_2

PAO2F_1	264.22	184.63	49.00	886.00
PAO2F_12	313.97	162.43	62.00	807.00
PAO2F_24	311.72	106.29	77.00	538.00
PAO2F_48	309.27	127.60	100.00	725.00

p_aO_2/FiO_2 se v průběhu statisticky významně neměnilo.

Sledované markery

Statistickým testem normality (test šikmosti a špičatosti) byla u všech markerů ve všech sledovaných časových obdobích zavržena hypotéza normality rozložení – okomentováno v diskusi.

TNF- α

TNFA_1	16.04	18.17	0.64	70.57
TNFA_12	11.54	15.56	0.00	71.30
TNFA_24	53.51	253.62	0.64	1419.50
TNFA_48	19.33	61.82	0.64	345.15

TNF- α se v průběhu statisticky významně neměnilo.

IL-6

IL6_1	409.27	765.86	3.30	2979.40
IL6_12	211.08	383.22	2.00	1829.60
IL6_24	423.67	1753.11	2.00	1000.00
IL6_48	153.97	314.92	3.00	1588.40

IL-6 se v průběhu statisticky významně neměnil.

Prokalcitonin

PCT_1	21.89	80.38	0.03	456.20
PCT_12	30.55	107.02	0.07	604.70
PCT_24	31.31	119.08	0.06	677.50
PCT_48	30.51	95.05	0.10	526.10

Statisticky významné změny PCT v čase (kritérium 11,3; $P=0,01$). Je přítomno statisticky významné zvýšení prokalcitoninu mezi 1. a 12. hodinou (kritérium 28,0; $P=0,05$) a snížení mezi 12. a 48. hodinou (kritérium 29,5; $P=0,05$).

BNP

BNP_1	5542.1	12661.7	3.2	50000.0
BNP_12	4348.4	10000.3	3.2	50000.0
BNP_24	7619.3	13641.6	25.7	50000.0
BNP_48	3971.5	10274.5	3.2	50000.0

Statisticky významné změny BNP v čase (kritérium 8,2; $P=0,04$). V Nemenyiho multiply comparison je však významné jen snížení mezi 24. a 48. hodinou (kritérium 25,5; $P=0,05$). Průměrné hodnoty jsou vysoké, ale zároveň je patrna veliká heterogenita hodnot a jejich rozložení (u jednoho z pacientů měřeny vysoké hodnoty).

cTn-I

CTNI_1	0.167	0.425	0.000	2.420
CTNI_12	0.142	0.335	0.010	1.850
CTNI_24	0.121	0.291	0.000	1.670
CTNI_48	0.190	0.627	0.010	3.270

Statisticky významné změny cTn-I v čase (kritérium 8,0; P=0,05). V Nemenyiho multiply comparison však nejsou mezi jednotlivými časy vysledovatelné statisticky významné rozdíly.

MMPs-9

MMPS9_1	273298	392585	6159	2188173
MMPS9_12	112114	106507	6393	492743
MMPS9_24	122758	120981	5694	409787
MMPS9_48	9649%	75198	11622	386699

Statisticky významné změny MMP-9 v čase (kritérium 19,1; P=0,0). Je přítomno statisticky významné snížení matrixové metaloproteinázy ve 12., 24. a 48. hodině oproti 1. hodině (kritérium 36,0, respektive 38,0, respektive 28,0; P=0,01, respektive 0,001, respektive 0,05). Rozdíly mezi 12. a 48. hodinou statisticky významné nejsou.

TIMP-1

TIMPS1_1	242.29	215.61	47.00	891.00
TIMPS1_12	274.35	235.55	54.90	867.00
TIMPS1_24	1130.09	4857.32	68.10	27277.40
TIMPS1_48	1512.21	7199.51	42.00	39622.30

TIMP-1 se v průběhu statisticky významně neměnil.

CX3CL1

CX3CL1_1	104.97	138.17	3.20	527.39
CX3CL1_12	86.66	152.11	3.20	644.62
CX3CL1_24	117.84	244.16	1.77	1028.07
CX3CL1_48	89.94	145.43	3.20	530.21

Statisticky významné změny CX3CL1 v čase (kritérium 10,0; P=0,02). Je přítomno statisticky významné zvýšení fraktalkinu mezi 1. a 12. hodinou (kritérium 24,0; P=0,05).

ICAM-1

ICAM_1	206.48	170.00	35.05	885.98
ICAM_12	203.82	160.22	36.53	834.38
ICAM_24	191.47	129.30	41.05	573.12
ICAM_48	193.78	128.12	41.36	601.59

ICAM-1 se v průběhu statisticky významně neměnilo.

VCAM-1

VCAM_1	1199.11	600.68	447.35	2991.03
VCAM_12	1109.26	650.74	405.98	3633.08
VCAM_24	1127.61	562.82	480.83	2566.46
VCAM_48	970.38	462.26	466.71	2218.20

Statisticky významné změny VCAM-1 v čase (kritérium 190; $P=0,00$). Je přítomno statisticky velmi významné snížení aktivity VCAM-1 mezi 1. a 48. hodinou (kritérium 41,0; $P=0,001$) a dále statisticky významné snížení aktivity VCAM-1 mezi 24. a 48. hodinou (kritérium 31,0; $P=0,01$).

Při statistickém zpracování bylo provedeno i vyhodnocení korelace monitorovaných parametrů a sledovaných imunoanalytických markerů bez pozitivních výsledků.

Diskuse

Dosavadní literární údaje

Naše práce vychází z předchozích prací týmu kolem Kobra [17, 18, 19, 20, 21], vedených v začátku na experimentálních modelech mláďat prasete domácího, a z pozdějších prací čistě klinických. Citovaná práce [17] studuje vliv umělé plicní ventilace na zdravou plíci nezatíženou předchozí patologií. Během citovaného 12hodinového experimentu byla skupina A ponechána na spontánní ventilaci, skupiny B a C na umělé plicní ventilaci v kontinuální anestézii. U prasat byly kontrolovány a udržovány normální hodnoty oxémie, kapnie, oběhové parametry i vnitřní prostředí. Skupina B byla ventilována za použití dechových objemů 6 ml.kg^{-1} , skupina C 10 ml. kg^{-1} . Během studie byly sledovány ventilační indexy, invazivně monitorovány oběhové parametry a neinvazivně echokardiograficky sledovány parametry srdečních funkcí, dále byly pravidelně odebírány hladiny vybraných cytokinů. Cílem bylo zjistit, či spíše prokázat, že umělá plicní ventilace ovlivňuje mimoplicní orgány a že má systémové generalizující dopady. To bylo v práci prokázáno a krom jasného ovlivnění srdečních funkcí měřených echokardiograficky (růst s agresivitou ventilace) byly z pohledu této nynější klinické studie zajímavé zejména výsledky imunoanalytických metod, především ve skupině solubilních adhezivních molekul. K signifikantním změnám dochází časně a jejich dynamika je zřetelná již v krátkém 12hodinovém trvání experimentu. V obou ventilovaných skupinách došlo k signifikantní elevaci VCAM-1 oproti kontrolní skupině a k signifikantní elevaci ICAM-1 oproti kontrolní skupině i vzájemně ve skupině protektivní a neprotektivní ventilace. V souladu s literárními údaji lze předpokládat, že poškozený plicní cévní endotel produkuje solubilní adhezivní molekuly a dále uvolnění cytokinů z alveolárních

makrofágů. V důsledku toho dochází ke změnám cévní permeability se všemi důsledky, a to nejen v plicním řečišti. Změny nitrohručních tlaků ovlivňují negativně diastolické plnění srdečních oddílů, snižují srdeční výdej, což aktivuje neurohumorální autoregulační mechanismy (natriuretický peptid, systém renin-angiotenzin-aldosteron) k udržení stability oběhu. Autoři uzavřeli, že: Umělá plicní ventilace trvalým pozitivním přetlakem aktivuje časnou zánětlivou reakci, a to i u nepoškozených plic, a do jisté míry zánětlivou reakci aktivuje i u protektivně vedené umělé plicní ventilace. Efektivita neurohumorální regulace ke stabilizaci funkcí orgánů je v průběhu umělé plicní ventilace časově limitovaná.

Neprotektivně vedená umělá plicní ventilace (dechovými objemy $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ a vyššími) adverzní systémové vlivy signifikantně zhoršuje. Je to zřetelný apel pro klinickou praxi, aby umělá plicní ventilace v pediatrii byla vedena strategií nižších dechových objemů a aby doba umělé plicní ventilace byla v zájmu snížení morbidit pacientů maximálně zkrácena jen na nezbytně dlouhou dobu.

Práce Kobra z roku 2011 [21] se v rámci experimentálního modelu podrobněji věnuje využití signálních molekul pro časnou detekci plicních a systémových změn během umělé plicní ventilace. Nejčasnějším markerem nastupujícího poškození je již po jedné hodině umělé plicní ventilace detekovatelná signifikantní elevace hladin VCAM-1 a ICAM-1 ve skupině s neprotektivní umělou plicní ventilací. Po 12 hodinách dochází k významné elevaci TNF- α , BNP a i IL-6.

V pilotní experimentální studii na prasečím modelu [20] Kobr navíc prokázal, že 120minutová umělá plicní ventilace vedená neprotektivně způsobuje zřetelně patrné poškození makroskopické, a zejména mikroskopické, prokazatelné imunohistochemickými metodami. Dominující je difúzní, ale nehomogenní alveolární destrukce v důsledku hyperinflace s časnou přítomností zánětlivých změn. Ty jsou zdrojem pro spuštění cytokinových kaskád

vedoucích k VILI a k systémové zánětlivé odpovědi, jak bylo detailněji studováno v souvisejících experimentech.

Výsledky experimentálních studií vedly k postavení této experimentální klinické studie, popsané v rámci této práce. Přenáší dosavadní poznatky do klinické praxe u kriticky nemocných dětských pacientů s těžkým plicním postižením.

Na své experimentální práce v současnosti Kobr, Fremuth et al navazují dalším studiem plicní a oběhové interakce, mimo jiné neinvazivním sledováním funkčních oběhových parametrů u pacientů s těžkým plicním postižením pomocí dopplerovského měření přístrojem USCOM (UltraSonic Cardiac Output Monitor).

Vliv protektivně vedené umělé plicní ventilace na outcome pacientů s těžkým plicním postižením je prokázán a prokázaly jej mimo jiné i výše citované práce Kobra. Sama neadekvátně vedená umělá plicní ventilace může být příčinou závažného plicního postižení ventilator-induced lung injury (VILI). Ve svém přehledovém článku z roku 1998 Dreyfuss a Salmon [16] mění dosud platnou definici VILI jako synonyma barotraumatu v důsledku umělé plicní ventilace a ukazují komplexnost změn, ke kterým lokálně v plicích i systémově dochází v důsledku umělé plicní ventilace. Je definován pojem biotraumatu. Plicní postižení v důsledku neadekvátně vedené umělé plicní ventilace není specifické makroskopicky, ani mikroskopicky. Poškozením cévního endotelu a respiračního epitelu je navíc spouštěna kaskáda pochodů se systémovými důsledky. Podílí se na tom nejen tlakové změny související například s vysokými dechovými objemy při užití vysokých inspiračních tlaků, ale i použití PEEP a plicní hyperinflace, a mimo jiné i používání vysokých koncentrací kyslíku. Umělá plicní ventilace, především nastavený PEEP, má přímý vliv na hemodynamiku. Tlakové změny způsobují střížnými silami mechanotransdukci s expresí mediátorů zánětu. Endoteliální a

epiteliální poškození s sebou nese i zvýšení alveolo-kapilární permeability. Intesticiální a alveolární změny s přítomností tekutiny v těchto kompartmentech vedou ke kongesci a především k mikroatektatickému poškození s dalšími nepříznivými změnami na plicní mechaniku. To spouští začarovaný kruh vedoucí k progresi potenciálně až do obrazu ARDS. Ke stejným závěrům došel například i De Prost [11], který prokázal, že u ovcí s modelově navozenou endotoxíní vede protektivně vedená ventilace k redukci stupně a heterogenity zánětlivé celulární plicní aktivity a může zlepšit výměnu plynů v plicích, především v dependentních plicních partiích. Zánětlivá aktivita neutrofilů v plicním parenchymu se protektivně vedenou umělou plicní ventilací snižuje, migrace neutrofilů do plic v rámci endotoxémie ovlivněna není (koreluje s přítomností neutropénie).

Studiem profilu systémových cytokinů u těžkých plicních postižení se zabýval již Schutte v roce 1996 [4]. Cílem studie bylo odlišit pacienty s kardiogenním plicním edémem od pacientů s ARDS. U pacientů s ARDS a s těžkou pneumonií našel významně zvýšené hladiny IL-6 a TNF- α v séru i v BAL.

V roce 2003 Flori et al [6] predikoval pomocí hladin sICAM-1 u dětských pacientů s ALI riziko úmrtí a prodloužení doby umělé plicní ventilace.

Cytokiny, které využívá naše práce, jsou induktory exprese dalších cytokinových kaskád. De Luca et v práci z roku 2013 [10] stanovoval v BAL kojenců s ARDS sekreční fosfolipázu A2. Jedná se o v organismu všudypřítomný enzym, který hraje důležitou roli v zánětlivé kaskádě odštěpováním mastných kyselin z fosfolipidů s produkcí derivátů kyseliny arachidonové. Tento enzym je detekovatelný v plicních extraktech, přičemž v plicích způsobuje jeho aktivita přímý katabolismus a destrukci surfaktantu. Induktorem tohoto enzymu je TNF- α , jeho sérové hladiny v práci De Lucy korelují s hladinami sekreční fosfolipázy A2 v BAL kojenců s ARDS.

Široce studované jsou role matrixových metaloproteináz a jejich inhibitorů v patogenezi zánětlivé odpovědi systémové i lokální. Metaloproteinázy se podílejí na recruitmentu leukocytů z krevního řečiště do místa poškození, či infekce, a krom proteolytických pochodů v extracelulární matrix při eradikaci infekce modulují pozitivně i inflamatorní a protrombotickou odpověď.

Kong v recentní studii z roku 2014 [22] prokázala, že infekce RSV je potentním stimulem pro expresi a uvolnění MMP-9 z epitelu dýchacích cest. MMP-9 aktivita je prediktorem závažnosti onemocnění s RSV způsobeným respiračním selháním. Peak aktivity MMP-9 je kolem 48. hodiny.

Experimentální práce Li et al [23] ukazuje přítomnost dysbalance MMP-9/TIMP-1 u zvířat po navozené komorové fibrilaci, přičemž hladiny TIMP-1 klesají s délkou fibrilace a naopak rostou s poresuscitační výkonností levé komory.

Lorente et al prokázal v klinické prospektivní studii [13] vliv genetických polymorfismů na prognózu pacienta se systémovou zánětlivou odpovědí. Podobné výsledky publikuje i práce Behnes et al [15]. Genetický polymorfismus alely 372 T/C pro TIMP-1 je spojený s vyššími hladinami TIMP-1 v séru a s horší prognózou pacientů se sepsí na přežití.

Poměr MMP-9/TIMP-1 se zdá být určující pro zánětlivou a prokoagulační odpověď organismu, u výše uvedeného polymorfismu je odpověď mnohem dramatičtější (vyšší PAI-1 a prokoagulační změny). Význam i dalších genetických polymorfismů na rozvoj kaskády vedoucí k projevům ARDS a pro prognózování pacientů je nasnadě.

V experimentálním modelu sepse ukázala Herzigová [14] terapeutický význam časně protilátkové blokády receptoru CXCR3 pro fraktalkin na rozvoj systémové zánětlivé odpovědi v experimentálním modelu.

Diskuse k vlastní práci

Literárních prací, zabývajících se do této studie zařazenými cytokinovými markery u dětských pacientů nízkých věkových kategorií se závažným plicním postižením, není mnoho.

Do naší klinické studie byli zařazeni kriticky nemocní dětští pacienti (PRISM III > 10,0) se závažným plicním postižením (LIS > 1,0). Podle PRISM III skórování oproti predikované mortalitě 24,0 % pacientů zemřelo v našem souboru do 24 hodin od ukončení studie 9,4 % pacientů.

Je však potřeba konstatovat, že z pohledu etiologického skupina nebyla jednotná, z 32 pacientů mělo 29 primárně plicní postižení, 3 pacienti postižení sekundárně v rámci septického šoku. Ani pacienti s primárně plicním postižením netvořili zcela homogenní skupinu – etiologie byla aspirační, infekční, asfyktická, infekční u hemato-onkologického pacienta a autoimunní. Tato nehomogenita souboru může bezpochyby studii do jisté míry limitovat, nicméně mají všichni tito pacienti společného jmenovatele s identickými klinickými a laboratorními projevy a i léčebná ventilační strategie byla u všech těchto pacientů bez ohledu na etiologii plicního postižení jednotná. Výběr byl daný zavedenými skórovacími systémy – LIS, PRISM, kritéria ARDS.

Vzhledem k nevyváženému poměru primárních a sekundárních postižení nebylo v daném souboru ani možno obě skupiny proti sobě statisticky testovat. Pacienti byli do studie zařazováni vždy automaticky při přijetí na JIRP, pokud splňovali definovaná vstupní kritéria; nebyla tedy prováděna žádná selekce vhodných pacientů.

Zařazení pacienti pokrývají typické diagnostické spektrum pacientů s akutním respiračním selháním na pracovištích pediatrické intenzivní medicíny.

V mnoha ohledech limitující – z hlediska možných intervencí především – je i charakter studie – jedná se o klinickou studii, nikoli experimentální.

Potenciálním zdrojem nepřesnosti může být ne zcela přesně daný začátek plicního patologického procesu. Proto je v této studii považován za počáteční bod čas, kdy pacient upadl do respiračního selhání s nutností náhrady respirační funkce umělou plicní ventilací. Může se jednat o časovou nepřesnost v řádu desítek minut.

Důvody volby multiplexní analýzy se stanovením většího rozsahu sledovaných markerů jsou dány především předpokládaným multiorgánovým postižením pacientů.

Při hodnocení monitorovaných markerů je zřetelně patrné, že se jedná o ventilované pacienty s plicním orgánovým poškozením.

Pokud se týče krevních plynů, pak pH při přijetí v pásmu klinicky nevýznamné acidózy se do 24 hodin v průběhu studie normalizovalo, přičemž změna ve 24. a 48. hodině je oproti 1. hodině statisticky významná ($P=0,05$, $P=0,01$). p_aO_2 se v průběhu statisticky významně neměnilo. V iniciálních 12. hodinách se vyskytují minima hluboké hypoxémie pod 7,0 kPa. Po 24 hodinách již nejsou zaznamenána žádná ani žádná minima pod 8,0 kPa. Jsou přítomna maxima převyšující hodnoty 30,0 kPa, což by již mělo vést lékaře k úpravě FiO_2 ve ventilačním režimu.

p_aCO_2 se v průběhu statisticky významně neměnilo. Měřené vysoké hodnoty p_aCO_2 jsou dány kombinací těžké plicní patologie a protektivní ventilace, splňující kritéria permissivní hyperkapnie. Navíc jsou ve studovaném souboru zařazeny i děti nízkých věkových skupin do 1 roku, u kterých bývá velmi častým problémem minimalizace mrtvého prostoru, což při závažných plicních postiženích tento problém ještě více akceleruje.

Ve sledovaných ventilačních parametrech se P_{aw} v průběhu statisticky významně neměnilo. V průměrech jsou patrné statisticky nevýznamné klesající hodnoty středních tlaků v dýchacích cestách. To může být dáno zlepšením plicní mechaniky při léčbě, a tedy snížením nároků na udržení otevřené plíce. Tlaky $P_{plateau}$ v této studii sledovány z technických důvodů nebyly.

PEEP se v průběhu statisticky významně neměnil. PEEP byl nastaven v průměru na téměř 10 cmH_2O k udržení otevřené plíce (princip nastavení nad dolní inflekční bod bývá u nízkých věkových skupin mnohdy obtížně aplikovatelný – viz teoretický úvod) a v souladu s principy protektivní ventilace při plicním postižení. Až po 48 hodinách jsou zaznamenaná minima PEEP 6 cmH_2O . Maxima PEEP jsou v začátku umělé plicní ventilace až 16 cmH_2O , což je opět u protektivních ventilačních strategií v kontextu konceptu otevřené plíce v pořádku. Je potřeba nicméně zdůraznit, že vysoké hodnoty PEEP zejména u dětí nízkých věkových skupin mají systémové, především hemodynamické dopady a dopady na neurohumorální regulaci hospodaření s tekutinami ve smyslu tendence k retenci tekutin.

Dechové objemy V_t/kg se v průběhu statisticky významně neměnily. Jsou patrné v průměru vyšší hodnoty dechových objemů 7,7-8,3 $mlkg^{-1}$. V naprosté většině byli pacienti ventilováni v tlakově řízených režimech. Vyšší hodnoty dechových objemů jsou pochopitelně snadno vysvětlitelné snahou o co nejúčinnější ventilaci těžce poškozené plíce, ale je již na hranici zásad protektivní ventilace. Na druhou stranu především pediatričtí pacienti ne vždy dobře tolerují strategii nízkých dechových objemů a tato relativní hypoventilace spolu s tendencí k hyperkapnií (jež má mnohdy i další příčiny) neumožňuje u některých, a to ani u svalově relaxovaných dětských pacientů dosahovat optimální protektivní dechové objemy kolem 6 $ml.kg^{-1}$. Výše uvedené v této studii měřené dechové objemy by však v žádném případě neměly být příčinou sekundárního zhoršení plicního poškození charakteru VILLI!

V měřených indexovaných parametrech je přítomno statisticky silně významné snížení alveolo-arteriální difference ve 24. a 48. hodině oproti 1. hodině ($P=0,001$). Snižování alveolo-arteriální difference během 24 hodin chápeme z hlediska průběhu jako příznivou známku účinnosti výměny krevních plynů.

Stejně tak je přítomno statisticky významné snížení oxygenačního indexu ve 24. a 48. hodině oproti 1. hodině ($P=0,001$, $P=0,05$). Rozdíl vzestupu mezi 24. a 48. statisticky významný není, tedy ke snížení dochází během prvních 24 hodin. Snižování oxygenačního indexu v čase je z hlediska průběhu experimentu příznivým markerem, podobně jako dynamika vývoje alveolo-arteriální difference. V průměru nízké hodnoty oxygenačního indexu odpovídají spíše lehčímu plicnímu postižení, než jaké bychom očekávali podle vstupních kritérií.

U p_aO_2/FiO_2 je patrné statisticky nevýznamné zlepšení p_aO_2/FiO_2 poměru mezi 1. a 12. hodinou experimentu. A podobně jako u oxygenačního indexu odpovídají hodnoty p_aO_2/FiO_2 u části pacientů jen mírnému stupni ARDS (podle Berlínské klasifikace), či ALI (podle AECC klasifikace). Při podrobnějším zkoumání splnily v začátku studie kritéria těžkého ARDS 3 pacienti, středního 11 pacientů a mírného 18 pacientů z celkových 32.

Lze říci, že z pohledu výše uvedených statistických hodnocení korespondují měřené markery se zřetelným, ale povětšinou nikoli extrémním plicním postižením pacientů, vyžadujícím umělou plicní ventilaci, a že dynamika vývoje ukazuje na postupné zlepšování stavu s udržením normálních krevních plynů. Jak již bylo uvedeno výše, u většiny pacientů toho bylo možno dosáhnout za použití konvenční ventilace, u zbylých nekonvenční oscilační ventilace.

Z hlediska cílů práce je zásadní analýza sledovaných laboratorních imunologických markerů.

Z markerů systémové zánětlivé odpovědi se hladiny TNF- α v průběhu statisticky významně neměnily. Relativně vyšší průměrné hodnoty ve 24. hodině jsou dány pravděpodobně statisticky potvrzenou nenormalitou rozložení hodnot (u jednoho z pacientů měřena extrémní hodnota – jednalo se o pacienta se septickým šokem). Absolutní průměrné hodnoty TNF- α jsou zvýšené. Tento marker systémové zánětlivé reakce tedy nebyl u našeho souboru pacientů zásadně ovlivněn v čase, ale jeho zvýšení se s největší pravděpodobností mohlo se podílet na stimulaci další zánětlivé kaskády.

Il-6 se v průběhu rovněž statisticky významně neměnil. Průměrné hodnoty jsou velmi vysoké, ale zároveň je patrna jejich velká heterogenita (s extrémními maximy měřenými u pacientů se septickým šokem). To odpovídá etiologické heterogenitě souboru (zařazeny těžké sepse na straně jedné a zároveň čistě plicní postižení na straně druhé). Ani Il-6 jako marker systémové zánětlivé odpovědi neodpovídal dynamice plicního postižení, ale spíše odpovídal primární etiologii u pacientů se septickým šokem.

Prokalcitonin se statisticky významně zvyšoval mezi 1. a 12. hodinou ($P=0,05$) a následně statisticky významně snižoval mezi 12. a 48. hodinou ($P=0,05$). Je patrna setrvačnost dynamiky vysokých hladin prokalcitoninu s vrcholem ve 24. hodině. Prokalcitonin byl vysoký po celou dobu trvání studie.

Lze říci, že míru systémové zánětlivé odpovědi na plicní postižení jsme s použitím jen tří výše uvedených markerů nebyli schopni zcela posoudit, a především u pacientů se sekundárním plicním postižením (septický šok, MODS) jsme nebyli schopni odlišit příčinu a následek.

Všechny sledované zánětlivé markery ale byly vysoce nadnormální. Indexované ventilační parametry naznačují, že sledovaný soubor pacientů odpovídal povětšinou střednímu stupni ARDS.

U sledovaných kardiálních markerů se u BNP v Nemenyiho testu objevilo významné snížení mezi 24. a 48. hodinou ($P=0,05$), tedy peak BNP byl u pacientů dosažen po 24 hodinách. Průměrné hodnoty jsou BNP vysoce patologické, je ale opět patrna nehomogenita rozložení hodnot. Vysoké hodnoty potvrzují, že u ventilovaných dětských pacientů s plicní patologií dochází k v důsledku zvýšení nitrohrudního tlaku k hemodynamickým změnám s tendencí k pravostranné kardiální dysfunkci a k neurohumorální odpovědi s tendencí k retinování tekutin. Extrémní hodnoty BNP by pak mohly odpovídat síňové dilataci při vysoké plicní arteriální rezistenci. To dobře koreluje s faktem, že u pacientů se septickým šokem, plicní arteriální hypertenzí, či přetrvávající fetální cirkulací byly právě tyto extrémní hodnoty BNP (v řádu tisíc až desítek tisíc $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$) naměřeny.

U kardiálního troponinu nejsou v Nemenyiho testu mezi jednotlivými časy vysledovatelné statisticky významné rozdíly hodnot. Hraničně elevované hodnoty svědčí proti závažnějšímu myokardiálnímu poškození hypoxicko-ischemickému.

Poslední skupina markerů byla pro studii nejvíce důležitá. Hladiny sérové matrixové metaloproteinázy 9 byly extrémně vysoké v řádech až stovek tisíc $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$, a to časně, již v první hodině experimentu. Dále bylo přítomno statisticky významné snížení ve 12., 24. a 48. hodině oproti 1. hodině ($P=0,01$, $P=0,001$, $P=0,05$). Rozdíly mezi 12. a 48. hodinou statisticky významné nebyly, hladina metaloproteinázy klesala, ale již jen bez statistické významnosti. Plicní postižení je mohutným stimulem k velmi časně hyperexpresi MMP-9 ovlivňující neutrofilní migraci. Pokles MMP-9 během následujících 48 hodin léčby při protektivně vedené terapii je příznivý.

Hodnoty TIMP-1 byly od počátku zvýšené, do 24 hodin však strmě stoupaly do vysokých hodnot, jak odpovídá inhibiční odpovědi na vzestup MMP-9. Přesto překvapivě nebyl vzestup statisticky významný.

Prognosticky negativní hodnota vysokých a stoupajících hladin MMP-9 bývá ve studiích spíše nahrazována poměrem MMP-9/TIMP-1, ukazujícím na kontraregulační mechanismy a jejich dysbalanci. Závažnost pozitivně koreluje s výší poměru MMP-9/TIMP-1. V této studii tento poměr prudce klesá, což považujeme opět za příznivou známku.

Poměr MMP-9/TIMP-1

Čas [h]	1	12	24	48
MMP-9/TIMP-1	1127,9	408,6	108,6	63,8

V rámci studie byla v séru testována i exprese fraktalkinu, u kterého došlo k jeho statisticky významnému zvýšení mezi 1. a 12. hodinou ($P=0,05$). Fraktalkin působí ve své volné formě jako signální molekula se silným chemokinovým působením na monocyty a T-lymfocyty v průběhu časně zánětlivé odpovědi. Ve své na buňky vázané formě podporuje pevnou adhezi leukocytů na aktivované endoteliální buňky. V této své vázané formě se fraktalkin vyskytuje častěji. Zajímavý je vztah matrixové metaloproteinázy 9 a fraktalkinu. Za odštěpování vázaného fraktalkinu od endoteliálních buněk do solubilní formy jsou zodpovědné metaloproteinázy. Jejich peak jsme detekovali již po 1. hodině studie, vzestup fraktalkinu probíhal až v období mezi 1. a 12. hodinou studie. Hypoteticky by tedy mohl být vzestup fraktalkinu navázán na vzestup metaloproteinázy.

V rámci systémové odpovědi na plicní postižení bylo velmi důležité stanovení adhezivních molekul ICAM-1 a především VCAM-1. Jak již bylo řečeno výše, obě tyto adhezivní molekuly jsou zodpovědné za adhezi leukocytů na endoteliální buňky, aktivaci leukocytů a podílejí se tím i na aktivaci endotelu jako motoru další kaskády pochodů.

ICAM-1 se v průběhu statisticky významně neměnila. Je patrný statisticky nevýznamný setrvalý pokles v průběhu experimentu s časovým peakem v 1. hodině. To odpovídá, podobně jako u fraktalkinu, časné expresi těchto molekul při nastupujícím plicním postižení. Hladiny VCAM-1 vykazují snižování mezi 1. a 48. hodinou, které je statisticky velmi silné ($P=0,001$) a dále je přítomno statisticky významné snížení aktivity VCAM-1 i mezi 24. a 48. hodinou ($P=0,01$). Peak aktivity VCAM-1 je opět velmi časný, již v 1. hodině experimentu. Předpokládáme, že tato aktivita zřetelně odráží reakci endotelu cévního řečiště v poškozených plicích. Postupný pokles je nutno opět hodnotit příznivě.

Na rozdíl od citovaných předchozích experimentálních studií nebyla prováděna pravidelná bronchoalveolární laváž u pacientů ke zjištění plicních markerů. Důvody byly jednak etické vzhledem k invazivitě vyšetření, a dále technické, neboť do studie byli zařazeni i pediatričtí pacienti novorozeneckých a kojeneckých věkových skupin. U většiny pacientů byl získán materiál z tracheálních aspirátů, ale u tohoto typu materiálu nelze přesně říci, ze které části dýchacích cest pochází a zda není technikou odběru ovlivněn. Proto výsledky imunoanalýz tracheálních aspirátů, provedených jen u části pacientů, nebyly do této práce zavzaty. Jistě by pomohly přesněji a více specificky posoudit skutečnou míru plicního postižení.

Závěry

Na souboru zařazených pacientů se závažným plicním postižením byla prokázána souvislost mezi klinickými (a laboratorními) projevy plicního postižení a mezi časnou systémovou cytokinovou inflamatorní odpovědí. Časná a významná exprese především matrixové metaloproteinázy 9 s následnou kontraregulační produkcí tkáňového inhibitoru metaloproteináz 1, a dále časná exprese adhezních molekul, především VCAM-1 u našich pacientů, jsou toho zřetelným dokladem.

Protektivně vedená ventilace – spolu s další komplexní kauzální i podpůrnou resuscitační léčbou – těchto kriticky nemocných dětských pacientů by měla krom náhrady funkce respiračního systému v co největší míře zabránit sekundárnímu plicnímu iatrogennímu postižení, které by dále zhoršilo postižení již preexistující. To je tato práce rovněž schopna dokladovat, jednak na vývoji monitorovaných ventilačních, indexovaných i laboratorních markerů (p_aO_2/FiO_2 , oxygenační index, alveolo-arteriální diference, etc), ale i na dynamice sledovaných cytokinových markerů (MMP-9/TIMP-1, VCAM-1, ICAM-1).

Literatura

1. Mitchell Roger S. Lung Cytokines and ARDS, Chest
2. Murray et al. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis. 1988; 138: 720-723.
3. Ware et al. Biomarkers of lung epithelial injury and inflammation distinguish severe sepsis patients with acute respiratory distress syndrome. Critical Care 2013, 17:R253.
4. Schutte et al. Bronchoalveolar and systemic cytokine profiles in patients with ARDS, severe pneumonia and cardiogenic pulmonary oedema. Eur Respir J, 1996, 9, 1858-1867.
5. Levitt et al. Early acute lung injury: Criteria for identifying lung injury prior to the need for positive pressure ventilation. Critical Care Medicine, 2013, 1929-1937.
6. Flori et al. Early elevation of plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 in pediatric acute lung injury identifies patients at increased risk of death and prolonged mechanical ventilation. Pediatr Crit Care Med 2003 Vol 4, No. 3.
7. Low tidal volume protects pulmonary vasomotor function from „second-hit“ injury in acute lung injury rats. Respiratory Research 2012 13:77.
8. Lorente et al. Matrix metalloproteinase-9, -10, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 blood levels as biomarkers of severity and mortality in sepsis. Critical Care 2009, 13:R158
9. Kushimoto et al. Relationship between extravascular lung water and severity categories of acute respiratory distress syndrome by the Berlin definition. Critical Care 2013, 17:R132.

10. De Luca et al. Clinical and biological role of secretory phospholipase A2 in acute respiratory distress syndrome infants. *Critical Care* 2013, 17:R163.
11. De Prost et al. Effect of ventilation strategy on distribution of lung inflammatory cell activity. *Critical Care* 2013, 17:R175.
12. Pierrakos Ch., Vincent J.-L. Sepsis biomarkers: a review. *Critical Care* 2010, 14:R15.
13. Lorente et al. The 372 T/C genetic polymorphism of TIMP-1 is associated with serum levels of TIMP-1 and survival in patients with severe sepsis. *Critical Care* 2013, 17:R94.
14. Herzig et al. Therapeutic Efficacy of CXCR3 Blockade in an Experimental Model of Severe Sepsis. *Critical Care* 2012, 16:R168.
15. Behnes et al. TIMP-1 gene polymorphism: Are genetics able to predict outcome of septic patients? *Critical Care* 2013, 17:170.
16. Dreyfuss D., Saumon G. Ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, Vol 157. pp 294-323, 1998.
17. Kobr et al. Vliv ventilace trvalým pozitivním tlakem na stupeň zánětlivé reakce a funkce orgánů – experimentální studie. *Anest. intenziv. Med.*, 20, 2009, č. 2, s. 88-95.
18. Kobr et al. Total body response to Mechanical Ventilation of Healthy Lungs: An Experimental Study in Pigs. *Physiol. Res.* 59: 545-552, 2010.
19. Kobr et al. Diffuse Alveolar Damage due to Inappropriate Strategy of Mechanical Ventilation in an Experimental Porcine Model. *In Vivo* 24 (2010).
20. Kobr et al. Adverse effects of the high tidal volume during mechanical ventilation of normal lung in pigs. *Bratisl Lek Listy* 2008; 109(2).
21. Kobr et al. Signaling Molecules for Early Detection of Adverse Interactions during Mechanical Ventilations in Animal Models. *In Vivo* 25 (2011).

22. Kong et al. Pulmonary matrix metalloproteinase-9 activity in mechanically ventilated children with respiratory syncytial virus. *European Respiratory Journal* 2014; Vol 43, 1086-1096.
23. Li et al. Imbalance between tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and matrix metalloproteinase 9 after cardiopulmonary resuscitation. *American Journal of Emergency Medicine* 2012; Vol 30, 1202-1209.

Souhlasím s půjčováním doktorské dizertační práce “Multiplexní imunoanalýza u kriticky nemocných dětí”