

**Univerzita Karlova v Praze**

**Lékařská fakulta v Plzni**



Autoreferát dizertační práce

**Multiplexní imunoanalýza u kriticky nemocných dětí  
Multiplex immunoassay in critically ill children**

**MUDr. Lumír Šášek**

Plzeň 2014

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu Pediatrie na Dětské klinice LF UK v Plzni.

Uchazeč: MUDr. Lumír Šašek

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Kobr, PhD.

Konzultant:

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne: .....

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací studijního programu  
Pediatrie

se koná dne:

Místo obhajoby:

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Prof. MUDr. Jiří Kobr  
předseda komise pro obhajobu dizertačních prací studijního programu Pediatrie  
Dětská klinika Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice v Plzni

## Abstrakt

Těžké plicní postižení vedoucí k respiračnímu selhání patří k nejčastějším příčinám kritických stavů v dětském věku. Z prognostického pohledu je v mnohých případech obtížné určit další vývoj onemocnění, a tím i umožnit nastavení adekvátní terapie. Plicní postižení vede k systémové odpovědi organismu, a míra této odpovědi by měla být na cytokinové úrovni přímo úměrná stupni plicního postižení. 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 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.

Jedná se o prospektivní nerandomizovanou klinickou observační studii. Sledovaný soubor tvoří 32 pacientů. Do studie byli zařazeni pacienti kriticky nemocní podle PRISM III-12 a LIS s respiračním selháním s nutností invazivní umělé plicní ventilace. Pacienti byli sledováni po dobu 48 hodin od přijetí.

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 MMP-9 s následnou kontraregulační produkcí TIMP-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 – u 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).

## Summary

Severe lung diseases leading to respiratory failure are the most common causes of critical conditions in childhood. From the perspective of the forecasting is in many cases difficult to identify the further development of the disease and thus allow the setting of adequate therapy. Pulmonary involvement leads to system response, and the response intensity should be at the level of the cytokines directly proportional to the degree of pulmonary disability. This work aims to follow in pediatric patients, the systemic inflammatory response dependence on the degree of lung injury using a multiplex immunoassay on the one hand and clinical, laboratory and imaging parameters on the other. It should identify, if possible, expression of early systemic cytokine markers that correlate with the degree of lung injury, which was determined by standardized scoring and monitoring parameters.

This is a prospective, non-randomized observational study. The study group included 32 patients. The study included critically ill patients by PRISM III-12 and LIS with respiratory failure with the need for invasive mechanical ventilation. Patients were followed for up to 48 hours.

Correlation between clinical (and laboratory) manifestations of lung disease and the early systemic inflammatory cytokine responses has been demonstrated in the group of patients. Clear evidence of this is early and particularly significant expression of MMP-9 and followed by subsequent counter-regulatory production of TIMP-1 and early expression of adhesion molecules, especially VCAM-1.

Protective ventilation - along with complex causal and supportive resuscitation treatment – should in these critically ill pediatric patients should to not only to temporarily replace the function of the respiratory system but also as far as possible to prevent secondary pulmonary lesion, which would further worsen pre-existing injury. We were able to document it on the development of monitored ventilation, indexed and laboratory markers (paO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, oxygenation index, alveolar-arterial difference, etc), but also on the dynamics of selected cytokine markers (MMP-9/TIMP-1, VCAM-1, ICAM-1).

## **Cíle studie**

Těžké plicní postižení vedoucí k respiračním selháním patří k nejčastějším příčinám kritických stavů v dětském věku. 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.

## **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.

Všichni pacienti byli intubováni, všichni standardně zajištěni invazivními vstupy.

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 [ $\text{min}^{-1}$ ]), použitá koncentrace kyslíku ve vdechované směsi ( $\text{FiO}_2$ ), vrcholový ventilační tlak (PIP [ $\text{cmH}_2\text{O}$ ]), střední tlak v dýchacích cestách ( $\text{Paw}$  [ $\text{cmH}_2\text{O}$ ]), end-expirační tlak v dýchacích cestách (PEEP [ $\text{cmH}_2\text{O}$ ]), dechový objem ( $\text{Vt}$  [ $\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]), dále kalkulované indexy, a to hypoxemický index  $\text{paO}_2/\text{FiO}_2$  ( $\text{paO}_2/\text{FiO}_2$  [ $\text{mmHg}$ ]), oxygenační index ( $\text{OI} = \text{Paw} \times \text{FiO}_2 \times 100 / \text{paO}_2$ ), arterioalveolární diference ( $\text{AaDO}_2$  [ $\text{kPa}$ ]), a dále v této práci nehodnocené a/A  $\text{DO}_2$ , ventilační index (VI), mrtvý prostor ( $\text{Vd}/\text{Vt}$ ), dynamická compliance ( $\text{C}_{\text{dyn}}$ ), rezistence v dýchacích cestách ( $\text{R}_{\text{awe}}$ ).

Laboratorně byly stanovovány sérové hladiny inflamatorních cytokinů: Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$  [ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ], Luminex), interleukin 6 (IL-6 [ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ], Luminex), natriuretický peptid B, přesněji řečeno N-terminal pro-BNP (NTProBNP, dále označován jako BNP [ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ], Luminex), kardiální troponin I (cTn-I [ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ], DxI), matrixová metaloproteináza 9 (MMP-9 [ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ], Luminex), tkáňový inhibitor metaloproteinázy 1 (TIMP-1 [ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ], RD-Elisa), fraktalkin (CX3CL1 [ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ], Luminex), intercelulární adhezní molekula 1 (ICAM-1 [ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ], Luminex), vaskulární adhezní molekula 1 (VCAM-1 [ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ], Luminex) a prokalcitonin (PCT [ $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ], Kryptol). Dále byla prováděna analýza krevních plynů z arteriální krve a pro účely určení PRISM skóre.

## 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).

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.

$p_aO_2$  se v průběhu statisticky významně neměnilo.

$p_aCO_2$  se v průběhu statisticky významně neměnilo.

$P_{aw}$  se v průběhu statisticky významně neměnilo.

PEEP se v průběhu statisticky významně neměnil.

$V_t/kg$  se v průběhu statisticky významně neměnil.

Statisticky významná změna AADO<sub>2</sub> v čase (kritérium 23,2;  $P=0,0$ ). Je přítomno statisticky významné snížení alveolo-arteriální diference 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.

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.

$p_aO_2/FiO_2$  se v průběhu statisticky významně neměnilo.

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

TNF- $\alpha$  se v průběhu statisticky významně neměnilo.

Il-6 se v průběhu statisticky významně neměnil.

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;  $P=0,05$ ).

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 velká heterogenita hodnot a jejich rozložení (u jednoho z pacientů měřeny vysoké hodnoty).

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.

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 se v průběhu statisticky významně neměnil.

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 se v průběhu statisticky významně neměnilo.

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;  $P=0,01$ ).

## Diskuse

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. 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 adhezních molekul. K signifikantním změnám dochází časné a jejich dynamika je zřetelná již v krátkém 12hodinovém trvání experimentu. 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. Neprrotektivně vedená umělá plicní ventilace (dechovými objemy 10 ml.kg<sup>-1</sup> 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 morbiditativ 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..

V pilotní experimentální studii na prasečím modelu [20] Kobr navíc prokázal, že 120minutová umělá plicní ventilace vedená neprrotektivně způsobuje zřetelně patrné poškození makroskopické, a zejména mikroskopické, které je 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.

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<sub>a</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> ve ventilačním režimu.

p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> se v průběhu statisticky významně neměnilo. Měřené vysoké hodnoty p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> jsou dány kombinací těžké plicní patologie a protektivní ventilace, splňující kritéria permisivní 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<sub>2</sub>O 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<sub>2</sub>O. Maxima PEEP jsou v začátku umělé plicní ventilace až 16 cmH<sub>2</sub>O, 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<sup>-1</sup>. V naprosté většině byli pacienti ventilováni v tlakově řízených režimech. Vyšší hodnoty dechových objemů jsou pochopitelně snadno vysvětlitelné snahou o co nejučinnější 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<sup>-1</sup>. 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 diference. 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- $\alpha$  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- $\alpha$  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 nitrohruďního 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.

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 časné 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 adhezních molekul ICAM-1 a především VCAM-1. Jak již bylo řečeno výše, obě tyto adhezní 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.

## **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 Piglets. 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.