

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

## 3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



### **Nové biomarkery pro stanovení prognózy po srdeční zástavě**

#### **Dizertační práce**

**Autor: MUDr. Dagmar Vondráková**

**Školitel: Doc. MUDr. Filip Málek, Ph.D., MBA**

**Školitel-konzultant: Doc. MUDr. Petr Ošťádal, Ph.D.**

## **Prohlášení**

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

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

V Praze, 7.8.2017

Dagmar Vondráková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce. Hlavní díky patří mému školiteli, Doc. MUDr. Filipovi Málkovi, Ph.D., za jeho odborné vedení, cenné rady a zkušenosti, a také za čas a trpělivost, které mi ochotně věnoval. Dále bych ráda poděkovala prof. MUDr. Petru Neužilovi, CSc., primáři kardiologického oddělení Nemocnice Na Homolce a školiteli-konzultantovi Doc. MUDr. Petru Ošťádalovi, Ph.D. za jejich za odborné vedení v klinické i vědecké oblasti. Ráda bych také poděkovala všem svým kolegům z pracoviště, bez kterých bych si nedokázala doktorské studium představit. V neposlední řadě musím poděkovat za podporu a pomoc své rodině, především sestře Klaudivii.

**Identifikační záznam:**

VONDRÁKOVÁ Dagmar. *Nové biomarkery ke stanovení prognózy po srdeční zástavě. [New biomarkers for prognostication after cardiac arrest]*. Praha, 2017. Počet stran 92. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta. Vedoucí práce Málek, Filip.

## **Souhrn**

Srdeční zástava je extrémně závažný stav, charakterizovaný globální ischemií, následovanou reperfuční reakcí po úspěšné resuscitaci a obnovení krevního oběhu. Přes veškeré pokroky současné medicíny zůstává prognóza nemocných po srdeční zástavě velmi špatná. Jedním ze zásadních problémů u těchto nemocných je proto včasné a spolehlivé stanovení prognózy, které je nezbytné pro volbu nejvhodnějšího diagnosticko-léčebného postupu. Současné možnosti včasného určení prognózy jsou však velmi omezené.

Cílem naší práce bylo: (i) studium možností ovlivnění oxidativního stresu jako jednoho z klíčových patogenetických faktorů, podílejících se na vývoji tzv. poresuscitačního syndromu, a (ii) zjistit možnosti využití ukazatelů oxidativního stresu, kopeptinu a neuron-specifické enolázy pro časnou predikci prognózy u nemocných po srdeční zástavě.

V experimentální části jsme na zvířecím modelu oběhové zástavy srovnávali účinky hypotermie, ischemického postconditioningu (IPC) a aplikace oxidu dusnatého (NO) na hladiny ukazatelů oxidativního stresu a orgánového poškození; zjistili jsme že ani podání NO, ani IPC neměli větší protektivní účinek než hypotermie. V klinické části jsme v několika studiích ukázali, že jak kopeptin, tak především neuron-specifická enoláza, měřená ve specifický čas, nabízejí vysokou prognostickou hodnotu pro časné stanovení krátkodobé i dlouhodobé prognózy. Naproti tomu, prognostická hodnota ukazatelů oxidativního stresu byla v našich studiích jen nízká a málo citlivá pro klinické využití.

Naše práce tedy ukázala, že především kopeptin a neuron-specifická enoláza mohou být využity v klinické praxi pro zpřesnění současných možností stanovení prognózy po srdeční zástavě.

**Klíčová slova:** srdeční zástava, prognóza, oxidativní stres, kopeptin, neuron-specifická enoláza

## **Summary**

Cardiac arrest is an extremely serious condition characterized by global ischemia followed by reperfusion after successful resuscitation and restoration of spontaneous circulation. Despite all advances in current medicine, the prognosis of cardiac arrest survivors remains very poor. One of the major problems in these patients is, therefore, the early and reliable determination of the prognosis that is necessary for choosing the most appropriate diagnostic and therapeutic approach. However, the current possibilities for early prognostication in cardiac arrest survivors remain very limited.

The aims of our work were: (i) to study the possibilities of influencing oxidative stress as one of the key pathogenic factors involved in the development of so-called post-cardiac arrest syndrome; and (ii) to determine the prognostic value of copeptin, neuron-specific enolase (NSE) and markers of oxidative stress in cardiac arrest survivors.

In the experimental part of the work we used porcine model of cardiac arrest for the comparison of the effects of hypothermia, ischemic postconditioning (IPC) and administration of nitric oxide (NO) on oxidative stress burden and organ damage; we found that neither NO nor IPC did have a superior protective effect over hypothermia. In the clinical part we have in several trials shown that both copeptin and especially NSE, measured at a specific time points, offer a high prognostic value for the determination of short- and long-term prognosis. On the other hand, the prognostic value of the markers of oxidative stress has been low in our studies and not sensitive and specific enough for clinical use.

In conclusion, our results revealed that copeptin and especially NSE can be used in clinical practice to increase the current possibilities of prognostication after cardiac arrest.

**Keywords:** cardiac arrest, prognosis, oxidative stress, copeptin, neuron-specific enolase

## OBSAH

<b>1. KLINICKÝ ÚVOD</b> .....	13
1.1. Srdeční zástava.....	13
1.2. Poresuscitační nemoc.....	14
1.3. Predikce prognózy po srdeční zástavě.....	15
<b>2. VYBRANÉ PATOFYZIOLOGICKÉ MECHANIZMY</b> .....	18
2.1. Srdeční zástava a oxidativní stres.....	18
2.2. Srdeční zástava, vasopresin a kopeptin .....	20
2.3. Srdeční zástava a neuron-specifická enoláza .....	23
<b>3. HYPOTÉZY</b> .....	26
<b>4. CÍLE PRÁCE</b> .....	27
<b>5. OXIDATIVNÍ STRES A SRDEČNÍ ZÁSTAVA</b> .....	28
<b>5.1. Oxidativní stres a srdeční zástava na zvířecím modelu</b> .....	28
5.1.1. Úvod.....	28
5.1.2. Metody.....	29
5.1.2.1. <i>Monitorování vitálních funkcí</i> .....	30
5.1.2.2. <i>Extrakorporální kardiopulmonální resuscitace</i> .....	31
5.1.2.3. <i>Experimentální protokol</i> .....	32
5.1.2.4. <i>Laboratorní testy</i> .....	34
5.1.2.5. <i>Statistická analýza</i> .....	34
5.1.3. Výsledky.....	35
5.1.3.1. <i>Krevní tlak, mozková oxymetrie, resuscitabilita</i> .....	35
5.1.3.2. <i>Ukazatele orgánového poškození a oxidativního stresu</i> .....	35
5.1.4. <i>Diskuse</i> .....	38
5.1.5. <i>Závěr</i> .....	40

5.2. Oxidativní stres u nemocných po srdeční zástavě .....	41
5.2.1. Úvod.....	41
5.2.2. Soubor a metody.....	41
5.2.3. Výsledky.....	43
5.2.4. Diskuse.....	47
5.2.5. Závěr.....	50
6. KOPEPTIN A SRDEČNÍ ZÁSTAVA .....	51
6.1. Využití příjmových hodnot kopeptinu ke stanovení prognózy u nemocných po srdeční zástavě.....	51
6.1.1. Úvod.....	51
6.1.2. Soubor a metodika.....	51
6.1.3. Výsledky.....	52
6.1.4. Diskuse.....	56
6.1.5. Závěr.....	57
7. NEURON-SPECIFICKÁ ENOLÁZA A SRDEČNÍ ZÁSTAVA .....	58
7.1. Vztah mezi hladinou neuron-specifické enolázy a prognózou po srdeční zástavě závisí na době odběru vzorku .....	58
7.1.1. Úvod.....	58
7.1.2. Soubor a metody .....	58
7.1.3. Výsledky.....	60
7.1.3.1. Hodnoty NSE a 30 denní neurologická prognóza.....	62
7.1.3.2. Hodnoty NSE a roční mortalita .....	66
7.1.4. Diskuse.....	68
7.1.5. Závěr.....	71
8. SOUHRN VÝSLEDKŮ PRÁCE.....	72



<b>9. LITERATURA.....</b>	<b>74</b>
9.1. Publikace, které jsou podkladem dizertační práce, v časopisech s IF.....	74
9.2. Publikace autora, nesouvisející s dizertační prací, v časopisech s IF.....	74
9.3. Použitá literatura.....	76
<b>10. PŘILOŽENÉ ORIGINÁLNÍ PRÁCE.....</b>	<b>92</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACT	activated clotting time, aktivovaný koagulační čas
ACTH	adrenokortikotropní hormon
AF	arteria femoralis, femorální tepna
ALT	alanínaminotransferáza
APUD	amin precursors uptake and decarboxylation
AUC	area under the curve, plocha pod křivkou
AVP	vasopressin
BNP	brain natriuretic peptide
CK	kreatínkináza
CPC	Cerebral Performance Category
CT	počítačová tomografie
CysC	cystatin C
cGMP	cyklický guanosin -3',5'- monofosfát
DNA	kyselina deoxyribonukleová
EEG	elektroencefalogram
ECMO	extrakorporální membránová oxygenace
ECPR	extrakorporální kardiopulmonální resuscitace
EKG	elektrokardiogram
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GCS	Glasgow Coma Scale
eGFR	estimated glomerular filtration rate, vypočtená glomerulární filtrace
HF	heart failure, srdeční selhání
HT	terapeutická hypotermie

IABK	intraaortální balónková kontrapulzace
IM	infarkt myokard
IPC	ischemický postconditioning
8-iso-PGF2	8- isoprostan
IR	ischemicko-reperfusion
KPR	kardiopulmonální resuscitace
KVO	kardiovaskulární onemocnění
MAP	střední arteriální tlak
MGB	myoglobin
MR	magnetická rezonance
NIRS	near-infrared spektroskopie
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NSE	neuron-specifická enoláza
NT-proBNP	N- terminální fragment proBNP
NYHA	New York Heart Association klasifikace srdečního selhání
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosin
8-OHG	8-hydroxyguanosin
OTR	oxytocinový receptor
P2R	purinergní receptor
PCAS	Post Cardiac Arrest Syndrome, poresuscitační syndrom
PROPAC	Prognosis in Postanoxic Coma (klinická studie)
PS	pravá síň
RNA	kyselina ribonukleová
ROC	receiver - operating characteristics

ROM	reactiv oxygen metabolites, metabolity reaktivního kyslíku
ROS	reactive oxygen species, reaktivní formy kyslíku
SSEP	somatozenzorické evokované potenciály
STEMI	infarkt myokardu s ST elevacemi
TnI	troponin I
TTM	Target Temperature Managment (klinická studie)
SZ	srdeční zástava
UPV	umělá plicní ventilace
V1-3	receptory pro vasopresin
VF	vena femoralis, femorální žíla
V Fib	fibrilace komor

# 1. KLINICKÝ ÚVOD

## 1.1. Srdeční zástava

K srdeční zástavě mimo nemocnici dochází u 35-100 jedinců na 100000 obyvatel za rok, srdeční zástava v nemocnici nastane v 1-5 z 1000 hospitalizací za rok (1-3). Jen u cca 40-50% jedinců, u kterých byla zahájena kardiopulmonální resuscitace, se podaří alespoň krátkodobě obnovit krevní oběh. Celkově srdeční zástavu mimo nemocnici přežije bez výraznějšího neurologického deficitu do propuštění z nemocnice obvykle méně než 15% jedinců (1-3). Nejčastější příčinou netraumatické srdeční zástavy je akutní koronární syndrom a další kardiovaskulární onemocnění; k srdeční zástavě však mohou vést také primárně nekardiální nemoci (4) (Tabulka 1 a 2).

**Tabulka 1.** Kardiální příčiny srdeční zástavy

Ischemická choroba srdeční
Ischemická kardiomyopatie
Dilatovaná kardiomyopatie
Hypertrofická kardiomyopatie
Neaterosklerotické postižení koronárních tepen
Chlopenní vady
Arytmogenní kardiomyopatie pravé komory
Infiltrativní a zánětlivé poškození myokardu
Vrozené srdeční vady
Primární arytmie

**Tabulka 2.** Nekardiální příčiny srdeční zástavy

Plicní embolie
Plicní onemocnění (hypoxická příčina srdeční zástavy)
Elektrolytová nerovnováha
Netraumatické krvácení (hypovolemická příčina srdeční zástavy)
Mozkové krvácení
Otrava léky
Udušení
Utonutí
Syndrom náhlého úmrtí novorozence

V posledních letech bylo vynaloženo značné úsilí na zefektivnění a optimalizaci péče o nemocné po srdeční zástavě. Bylo ukázáno, že lepších výsledků lze dosáhnout časnější aktivací záchranného procesu, časně zahájenou a kvalitní resuscitací (včetně telefonicky řízené laické resuscitace), časnou defibrilací, co nejčasnějším zahájením rozšířené resuscitace a jak se zdá, také kvalitnější poresuscitační péčí (4-7).

### **1.2. Poresuscitační nemoc**

Úspěšná kardiopulmonální resuscitace a obnovení spontánní cirkulace po srdeční zástavě je zcela nezbytným krokem k záchraně života; povšechná ischemie během oběhové zástavy však vede k aktivaci celé řady patofyziologických procesů, které mohou způsobit další, často fatální poškození. Tento stav bývá označován jako „postresuscitační nemoc“ (8) nebo jako „post-cardiac arrest syndrome (PCAS)“ (1-2).

Patofyziologické pochody, podílející se na PCAS, zahrnují celou řadu mechanismů, přičemž lze očekávat, že jednu z klíčových úloh v tomto procesu hraje oxidativní stres, provázený systémovou zánětlivou reakcí (1-2). Z hlediska klinické manifestace můžeme PCAS rozdělit na tyto oblasti: (i) poškození mozku, (ii) dysfunkci myokardu, (iii) systémovou ischemicko-reperfuzní reakci a (iv) perzistující základní onemocnění (1-2).

Klinická závažnost těchto projevů závisí na celé řadě faktorů, především na stavu organismu před oběhovou zástavou, přítomných komorbiditách a délce trvání povšechné ischemie. Pro další prognózu pacienta je klíčové ovlivnění základního onemocnění, se snahou zabránit opakování oběhové zástavy, hemodynamická stabilizace, zajištění dostatečné oxygenace, normalizace vnitřního prostředí a neuroprotektce. Přes velmi intenzivní výzkum v této oblasti je v současnosti k dispozici pouze jedna léčebná intervence s důkazy o zlepšení výsledků léčby nemocných po srdeční zástavě – je to mírná léčebná hypotermie, respektive kontrola tělesné teploty na úrovni 33°C nebo 36°C (9-11).

### **1.3. Predikce prognózy po srdeční zástavě**

Ještě v 80. letech 20. století bývalo určení prognózy po srdeční zástavě (SZ) a kardiopulmonální resuscitaci (KPR) jednoduché. Z nemocných, kteří byli přijati k hospitalizaci po SZ mimo nemocnici, jen méně než 2% přežila do propuštění (12). Hypoxicko-ischemické poškození mozku bylo považováno za nejvíce poškozující a nejhůře léčitelnou příčinu komatu; pravděpodobnost uzdravení byla pro velkou většinu těchto nemocných mizivá (13).

Postupné zlepšování intenzivní péče o nemocné po srdeční zástavě a zavedení mírné hypotermie do léčby ischemicko-reperfuzního poškození po KPR – poresuscitačního syndromu - v posledních deseti letech znamenalo významné zlepšení prognózy těchto pacientů. Souběžně se zlepšováním výsledků léčby u nemocných po srdeční zástavě však také

vzrůstá potřeba časného stanovení prognózy, které by mohlo být využito při volbě nejvhodnějšího léčebného postupu a zamezilo by plýtvání omezenými prostředky na léčbu infaustních stavů. Je však nutné konstatovat že možnosti stanovení prognózy u nemocných po resuscitaci jsou stále velmi omezené.

Velmi závažným nálezem, spojeným téměř vždy se špatnou prognózou po srdeční zástavě, je přetrvávající absence kmenových reflexů. K nejčastěji využívaným instrumentálním metodám patří elektroencefalografické vyšetření (EEG), provedené po ukončení léčebné hypotermie a normalizaci tělesné teploty. Ukazatelem špatné prognózy po srdeční zástavě je generalizovaný útlum aktivity pod 20  $\mu$ V, status epilepticus nebo epileptiformní komplexy s nízkou aktivitou pozadí (14). Status epilepticus lze pozorovat přibližně u 30% nemocných po srdeční zástavě, jeho nález je spojen se špatnou prognózou, ale sám o sobě ještě neznamena infaustní stav (15-16). Uvažuje se také, že časně zahájené podávání antiepileptik může u těchto pacientů prognózu zlepšit (17).

Prognostické informace poskytuje také vyšetření somatosenzorických evokovaných potenciálů (SSEP). Oboustranná absence korové odpovědi (N20) při vyšetření SSEP se zdá být spojená s velmi špatnou prognózou a to i v případě, že je vyšetření prováděno v průběhu hypotermie (alespoň 14 hodin po srdeční zástavě) (14, 18-19). Přesto byly publikovány kazuistiky ojedinělých přežití s dobrým neurologickým výsledkem při absenci N20; ani vyšetření SSEP se proto nedoporučuje používat jako jediný prognostický ukazatel (19-20). Přítomnost N20 při SSEP má také jen omezenou hodnotu pro predikci dobrého neurologického výsledku (19).

Mezi biochemické prognostické faktory po srdeční zástavě patří především stanovení hladiny neuron-specifické enolázy (NSE) a proteinu S-100B. Podle doporučení American Academy of Neurology z roku 2006 (14) je hladina NSE  $> 33 \mu$ g/L spojena se špatnými výsledky. Tato hranice byla široce, avšak nikdy ne všeobecně, přijímána. Zdálo se, že hladinu



NSE může snižovat hypotermie; byly publikovány práce, dokumentující přežití bez významného neurologického deficitu i u nemocných, kteří měli hladinu NSE vyšší než 33 µg/L (21).

Protein S-100B je v posledních letech jedním z intenzivně zkoumaných biochemických parametrů, u nějž se předpokládá využití ke stanovení prognózy i u neselektované populace nemocných po srdeční zástavě. Několik autorů ukázalo, že zvýšená hladina S-100B v různých časových intervalech od KPR je spojena s vyšším rizikem špatného neurologického výsledku nebo úmrtí u těchto nemocných (22-25).

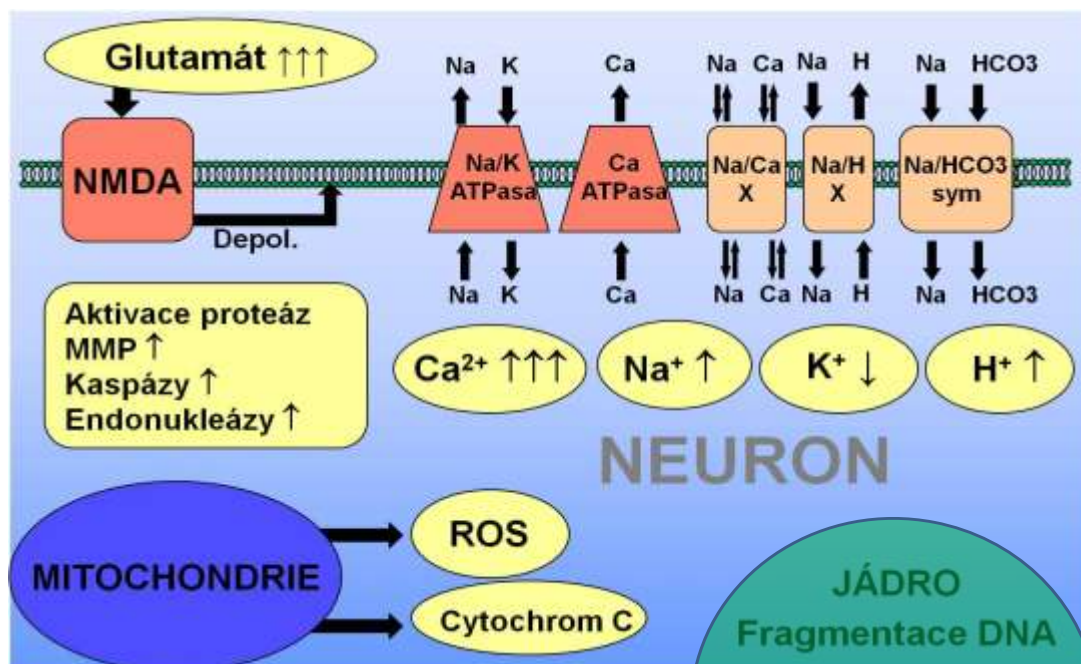
Z hlediska stanovení prognózy u nemocných po srdeční zástavě nelze opomenout ani přínos zobrazovacích metod. Nález edému mozku na CT nebo MR koreluje se špatnou prognózou po resuscitaci (14).

Přes veškeré pokroky v časném stanovování prognózy po srdeční zástavě v posledních letech však zůstává nezodpovězena celá řada otázek. Doposud nebyl nalezen marker se 100% prediktivní hodnotou; není také jasné, v jakém intervalu od obnovení krevního oběhu je nejprínosnější provádět vyšetření jednotlivých prognostických ukazatelů, a k dispozici jsou zatím jen nedostatečné údaje o výtěžnosti prognostických ukazatelů u různých subpopulací pacientů po srdeční zástavě.

## 2. VYBRANÉ PATOFYZIOLOGICKÉ MECHANIZMY

### 2.1. Srdeční zástava a oxidativní stres

Na patogeneze PCAS se podílí celá řada patofyziologických mechanismů, přičemž významnou úlohu hraje pravděpodobně tzv. oxidativní stres. Oxidativní stres je charakterizován nadměrnou tvorbou reaktivních forem kyslíku (ROS – Reactive Oxygen Species – superoxidový radikálový anion, peroxylové radikály, hydroxylový radikál, peroxid vodíku) nebo dusíku (oxid dusnatý, peroxynitrit). Jedná se o velmi nestabilní molekuly a v biologických systémech jsou známé pro svoji duální funkci: mohou být prospěšné, ale i škodlivé; jsou to produkty normálního buněčného metabolismu. K pozitivním účinkům patří jejich účast v odpovědích na negativní vlivy, např. obranné reakce vůči infekčnímu agens, nebo fungují jako buněčné signální molekuly. Naopak při vysokých koncentracích mohou poškozovat různé buněčné struktury, a to lipidy buněčných membrán, proteiny a nukleové kyseliny (26) (Obrázek 1).



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

Aby byla zachována rovnováha v biologickém systému, jejich škodlivé účinky jsou kompenzované činností antioxidantních enzymů (superoxid dismutáza, kataláza, glutathion peroxidáza) a účinkem neenzymatických antioxidantů (vitamin C, E, karotenoidy, flavonoidy, glutathion, melatonin) (27-28). Kapacita antioxidantních systémů je však při oxidativním stresu nedostatečná, a proto může docházet k poškození nebo až k zániku buňky. Experimentální práce ukazují, že oxidativní stres je klíčovým patogenetickým mechanismem ischemicko-reperfučního poškození srdečního svalu a že se podílí pravděpodobně na celé řadě kardiovaskulárních onemocnění (KVO), včetně aterosklerózy, infarktu myokardu nebo srdečního selhání (27-28). Poškození molekuly DNA oxidativním stresem zahrnuje štěpení jednoho nebo obou řetězců DNA a dále poškození purinových a pyrimidinových basí nebo oxidační změny deoxyribozy (29). Doposud bylo identifikováno více než 100 oxidačních produktů DNA, ale ve většině studií bylo využito hodnocení 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu (8-OHdG), protože molekula guaninu nejnadhěji podléhá oxidačnímu poškození z důvodu nízkého oxidačně-redukčního potenciálu, který stoupá v řadě: guanin, adenin, cytosin a thymin. Zvýšená hladina 8-OHdG byla nalezena u nemocných s arteriální hypertenzí (30) u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a jinými klinickými formami aterosklerotického postižení, jako je ischemická choroba dolních končetin nebo cévní mozková příhoda (31). U nemocných se srdečním selháním ischemické etiologie hladina 8-OHdG významně korelovala se závažností NYHA (New York Heart Association functional classification); u srdečního selhání neischemické etiologie byly hladiny 8-OHdG významně nižší a nekorelovaly s tíží HF; hodnota 8-OHdG u srdečního selhání navíc korelovala se stupněm aterosklerotického postižení (32). U pacientů s akutním infarktem myokardu byla prokázána významná redukce hladiny 8-OHdG po reperfuzi (33).

Na různých experimentálních modelech se opakovaně ukázalo, že hypotermie inhibuje tvorbu volných radikálů, snižuje peroxidaci lipidů a ochraňuje jadernou DNA před přímým

poškozením reaktivními formami kyslíku a fragmentací. Doposud však máme k dispozici pouze velmi omezené literární údaje o ovlivnění oxidativního stresu léčebnou hypotermií v klinických studiích; nečetné práce naznačují, že právě ovlivnění oxidativního stresu může být jedním z hlavních mechanismů protektivního účinku hypotermie (34-35).

Současná evidence o přítomnosti oxidativního stresu jako součásti poresuscitačního syndromu zůstává nedostatečná, ještě vzácnější jsou práce, které by se zabývaly ovlivněním oxidativního stresu po srdeční zástavě. Literární údaje o možnosti využití parametrů oxidativního stresu pro predikci prognózy po srdeční zástavě doposud chybějí.

## **2.2. Srdeční zástava, vasopresin a kopeptin**

Vasopresin (AVP) je syntetizován v neuronech hypotalamu a transportován v sekrečních granulích (tzv. Herringova tělíška) axony do zadního laloku hypofýzy. Podnětem k jeho uvolnění jsou hemodynamické a osmotické změny. Fyziologické funkce jsou zprostředkované různými typy receptorů V1, V2, V3, oxytocinovým receptorem (OTR) a P2-purinergním receptorem (P2R). V1 receptory (V1R) se nacházejí v hladké svalovině cév a v kardiomyocytech a jejich stimulace vyvolává vazokonstrikci a má pozitivně inotropní efekt (36).

Antidiuretické působení vasopresinu je dáno aktivací V2 receptorů (V2R). Aktivace V3 receptorů (V3R), které se nacházejí výhradně v předním laloku hypofýzy, vede ke zvýšené sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH). Oxytocinové receptory (OTR) jsou neselektivní vasopresinové receptory, vykazující shodnou afinitu k vasopresinu i k oxytocinu, zatímco V1R mají 30krát vyšší afinitu k vasopresinu než k oxytocinu (37). OTR byly nalezeny nejen v reprodukčních, ale i v nereprodukčních tkáních (38). Důležitá je skutečnost, že OTR jsou hojně zastoupeny v cévním endotelu a že zodpovídají za vasodilataci, zprostředkovanou uvolněním oxidu dusnatého. To, zda vasopresin způsobí vasokonstrikci

nebo vasodilataci, závisí na hustotě výskytu jednotlivých receptorů v určitých tkáních (V1 versus OTR) (39). OTR nacházíme také v srdci, přičemž jejich aktivace spouští uvolňování natriuretického peptidu zapojeného do natriurézy, regulace krevního tlaku a růstu buněk (40).

V klinických studiích s podáváním nízkých dávek vasopresinu nebyl prokázán nežádoucí účinek tohoto hormonu na srdce (41). Byl vysloven předpoklad, že vasokonstrikční působení vasopresinu na koronární tepny i jeho vliv na myokard pravděpodobně závisejí na množství kyslíku v krvi a tento nežádoucí efekt je oslaben během hypoxie (42).

Koncentrace vasopresinu jsou zvýšené u nemocných se srdečním selháním (43). Vasopresin je zapojen do nežádoucí remodelace srdce, zprostředkované aktivací V1R. Stimulace uvedeného receptoru má za následek zvýšenou syntézu kontraktilních proteinů v myocytech a rozvoj hypertrofie myokardu (44); následně jsou stimulovány srdeční fibroblasty, což vede k myokardiální fibróze (45). Stimulace V1R v hladké cévní svalovině způsobuje zvýšení systémové cévní rezistence, zvyšuje afterload levé komory a proto má negativní dopad na funkci komory; dlouhodobě zvýšený afterload má rovněž vliv na remodelaci myokardu.

U AVP lze jen obtížně stanovit jeho plazmatickou koncentraci z mnoha důvodů. Více než 90 % vasopresinu v cirkulaci je vázáno na trombocyty. AVP má krátký poločas (24 min), protože je z oběhu rychle odstraňován. AVP je v izolované plazmě nestabilní, i když jej skladujeme při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ . Kopeptin má v tomto ohledu méně nedostatků, a proto představuje téměř ideální ukazatel, odrážející uvolňování AVP (46-47). Kopeptin je glykopeptid, složený z 39 aminokyselin; jedná se o C-terminální fragment pre-provasopresinu a je uvolňován v ekvimolárním poměru s vasopresinem. Na rozdíl od AVP lze hladinu kopeptinu relativně jednoduše měřit. Kopeptin zůstává stabilní ex vivo v séru nebo plasmě až několik dnů při pokojové teplotě. V několika studiích byl kopeptin popsán jako užitečný biomarker, a to nejen u nemocných s chronickým srdečním selháním (HF), ale i u nemocných

po akutním infarktu myokardu (IM). Stoiser a spol. (48) jako první ukázali, že kopeptin je dobrým ukazatelem klinického stavu pacientů s pokročilým HF. Jeho hodnota dokáže lépe než hodnota BNP predikovat úmrtí a výskyt kombinovaného výsledného ukazatele (úmrtí a rehospitalizace pro HF), ačkoli pomocí BNP bylo stále možno lépe predikovat rehospitalizaci pro chronické HF. Neuhold a spol. (49) popsali, že koncentrace kopeptinu stoupají paralelně s třídami NYHA. U pacientů ve třídách NYHA II a III bylo ukázáno, že kopeptin je lepším prediktorem úmrtí ve srovnání s BNP a NT-proBNP. U nemocných ve třídě NYHA IV měl kopeptin menší výpovědní hodnotu než koncentrace sodíku a zejména glomerulární filtrace. Khan a spol. demonstrovali u pacientů po akutním IM, že kopeptin byl nezávislým prediktorem úmrtí nebo HF, koncentrace kopeptinu byly vyšší u pacientů po infarktu s ST elevacemi než u nemocných po netransmurálním infarktu a plazmatická koncentrace kopeptinu korelovala s koncentrací NT-proBNP (50). V rámci této studie byla vyšetřena koncentrace kopeptinu také u 706 zdravých dobrovolníků; koncentrace kopeptinu byly významně vyšší u mužů než u žen; u mužů koncentrace kopeptinu korelovala s glomerulární filtrací, ale u žen byla uvedená korelace slabá (50). Kelly a spol. (51) ve své studii, zahrnující osoby po infarktu myokardu, potvrdili spojitost mezi koncentrací kopeptinu na jedné straně a ejekční frakcí, objemy a remodelací levé komory a klinickými projevy HF po IM na straně druhé.

Zdá se tedy, že (i) sekrece AVP je stimulovaná hemodynamickými změnami, (ii) elevace kopeptinu, jako ukazatele plazmatických koncentrací AVP, je spojená s nepříznivou prognózou u různých kardiovaskulárních onemocnění a (iii) měření hladiny kopeptinu může zlepšit odhad prognózy. Doposud však chybějí údaje o možnostech využití stanovení hladiny kopeptinu pro určení prognózy u nemocných po srdeční zástavě.

### 2.3. Srdeční zástava a neuron-specifická enoláza

Enoláza je enzym, nacházející se v cytoplasmě a podílející se na glykolýze. Enolázy jsou funkčně aktivní ve formě homo nebo heterodimerů, složených z nekovalentně vázaných podjednotek (alfa, beta nebo gama). U savců existuje enoláza ve třech různých formách, které mají odlišnou tkáňovou distribuci a strukturu. Non-neuronal enolase ( $\alpha\alpha$  isoforma,  $\alpha$  enoláza, enoláza 1) se nachází ve všech fetálních tkáních a ve většině tkání dospělých jedinců. Během vývoje je tato forma v určitých tkáních nahrazovaná jinými isoformami: v kosterním svalu a v myokardu  $\alpha\beta$  a  $\beta\beta$  isoformami ( $\beta$  enoláza, enoláza 3), v neuronech  $\alpha\gamma$  nebo  $\gamma\gamma$  isoformami (neuron-specifická enoláza [NSE],  $\gamma$  enoláza, enoláza 2). Všechny isoformy mají molekulovou hmotnost v rozmezí 78-100 kDa, jsou lokalizované v cytoplasmě a katalyzují proměnu 2-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát; reakce je možná i v opačném směru (53). Molekula enolázy potřebuje ke své stabilitě a katalytické aktivitě dvoumocný kationt kovu – Mg, Mn, Zn, Cd, Co a Ni. Nejčastěji je zastoupen  $Mg^{2+}$ , který zajišťuje nejsilnější enzymovou aktivitu. Uvedené ionty nejsou v pevné vazbě uvnitř proteinové molekuly, proto enoláza není typický metaloenzym, ale je definovaná jako tzv. "ionty kovu aktivovaný enzymatický komplex" (53). NSE byla poprvé popsána Moore a Mcgregorem v roce 1965 (54-55) jako vysoce kyselý solubilní protein mozku. Následné imunologické studie potvrdily, že tento protein je specifický pro neurony a proto název "neuron-specifický protein"; později byla zjištěna jeho enzymatická aktivita v procese glykolýzy a proto definitivní název "neuron-specifická enoláza". NSE je 433 aminokyselin dlouhý acidický dimerický protein, který zahrnuje dva izoenzymy enolázy  $\gamma\gamma$  a  $\alpha\gamma$ . NSE je predominantně lokalizovaná v neuronech a neuroendokrinních buňkách, obzvláště v těch, kde probíhá vychytávání a dekarboxylace prekurzorů aminů, které jsou součástí tzv. APUD systému, např. střevo, plíce, štítná žláza, pankreas, glandula pituitaria. V malých množstvích je přítomna i v jiných tkáních např.

v erythrocytech, trombocytech, prostatě, uteru. Izoforma  $\gamma\gamma$  se vyskytuje hlavně v diferencovaných neuronech, zatímco  $\alpha\gamma$  isoforma je přítomna i mimo neuronální buňky (např. erythrocyty). Hemolýza proto může být příčinou zvýšené hladiny NSE a to proporciálně stupni hemolýzy i bez poškození mozkové tkáně. Biologický poločas je přibližně 24h (56-57).

Zvýšené hodnoty NSE mohou být detekovány v krvi a v mozkomíšním moku v souvislosti s poškozením mozku v celé řadě patologických stavů, jako je vedle hypoxického poškození při srdeční zástavě také cévní mozková příhoda, trauma mozku, Alzheimerova nemoc, epilepsie, roztroušená skleróza, neuroblastom, meduloblastom, retinoblastom, malobuněčný karcinom a nádory neuroendokrinní tkáně (karcinoid či feochromocytom) (57).

NSE se již přes 10 let využívá v klinické praxi jako pomocný ukazatel pro stanovení neurologické prognózy. Bylo opakovaně ukázáno, že vzestup hladiny NSE po srdeční zástavě odráží míru poškození mozku. Na základě výsledků klinické studie PROPAC (Prognosis in Postanoxic Coma) byla roku 2006 hladina NSE  $>33$  ng/mL prvních 72 hodin po srdeční zástavě označena jako spolehlivý faktor pro stanovení špatné neurologické prognózy (58). Následně se roku 2006 tato hodnota stala součástí praktických doporučení pro prognostikaci po srdeční zástavě Americké Neurologické Společnosti (14). Od té doby se v péči o nemocné po srdeční zástavě odehrála řada změn; tou nejzásadnější bylo zavedení terapeutické hypotermie, respektive kontroly tělesné teploty na úrovni  $33^{\circ}\text{C}$  nebo  $36^{\circ}\text{C}$ . Přestože souvislost mezi NSE a prognózou po srdeční zástavě je známa již relativně dlouho, současná evidence je zatím stále nedostatečná. Několik prací naznačilo, že NSE je možné používat ke stanovení prognózy i při řízené hypotermii, a že cílová teplota hladiny NSE neovlivňuje (např. analýza klinické studie TTM (Targeted Temperature Managements)) (59).

Podle současných doporučení je měření hladiny NSE u pacientů po srdeční zástavě doplňujícím prognostickým ukazatelem; vysoké hladiny 48 a 72 hod po srdeční zástavě podporují nepříznivou neurologickou prognózu. Avšak evidence pro toto doporučení je stále



velmi slabá, chybí doporučená mezní (cut-off) hodnota pro stanovení špatné prognózy, zřejmě není ani nejvhodnější doba pro stanovení NSE; práce s měřením NSE po 72 hodinách od kolapsu nejsou doposud k dispozici, nejasná je i prognostická hodnota vývoje změn hladiny NSE.

### 3. HYPOTÉZY

- Na patogeneze poresuscitačního syndromu se významně podílí oxidativní stres. Hladina markerů oxidativního stresu odráží závažnost ischemicko-reperfučního poškození a vyšší hladiny ukazatelů oxidativního stresu jsou spojeny s horší prognózou po srdeční zástavě.
- Těžší ischemické poškození při srdeční zástavě je spojeno s vyšší akutní sekrecí vasopresinu a proto hladina ukazatele této sekrece – kopeptinu – odráží závažnost stavu a její stanovení lze využít k časně predikci prognózy.
- Prediktivní hodnota neuron-specifické enolázy (NSE) pro stanovení prognózy po srdeční zástavě závisí na době odběru krevního vzorku (interval kolaps – odběr) a pro stratifikaci rizika lze využít nejen absolutní hodnoty NSE, ale i změny hladiny v čase.

#### 4. CÍLE PRÁCE

- Na zvířecím modelu srdeční zástavy a v klinické studii zjistit vztah mezi srdeční zástavou a parametry oxidativního stresu.
- Stanovit prognostickou hodnotu ukazatelů oxidativního stresu po srdeční zástavě.
- Stanovit vztah mezi hladinou kopeptinu při přijetí k hospitalizaci, závažností srdeční zástavy a klinickými výsledky u nemocných po srdeční zástavě mimo nemocnici.
- Určit prognostický význam stanovení NSE v jednotlivých dnech po srdeční zástavě a zjistit vztah mezi změnami hladiny NSE v prvních dnech po zástavě a klinickými výsledky.

## 5. OXIDATIVNÍ STRES A SRDEČNÍ ZÁSTAVA

### 5.1. Oxidativní stres a srdeční zástava na zvířecím modelu (Příloha 1)

#### 5.1.1. Úvod

Globální ischemie, která vzniká během srdeční zástavy spouští řadu patologických dějů, které dále zhoršují ischemické poškození, a to i po reperfuzi. Ischemicko-reperfuzní (IR) poškození po srdeční zástavě vede ke vzniku tzv. poresuscitačního syndromu (PCAS – post cardiac arrest syndrome), v důsledku kterého dochází k dalšímu poškození tkání, často s fatálním koncem. Intenzivní snahou je zabránit progresi PCAS. Doposud jedinou prokazatelně protektivní intervencí, která příznivě ovlivňuje poresuscitační poškození organismu a zlepšuje klinické výsledky, je kontrola tělesné teploty a udržování mírné hypotermie. Tato intervence zahrnuje indukci a časově ohraničené udržování mírné hypotermie (HT) nebo kontrolované normotermie (8-10). Bylo prokázáno, že HT zvyšuje homeostázu kalciového a kaliového metabolismu v mozku, zabraňuje transientní hyperemii a zachovává dostatečný krevní průtok mozkem (60), inhibuje uvolňování glutamátu (61), redukuje oxidativní stres (34), tlumí zánětlivou odpověď (62) a snižuje produkci metaloproteináz (63). Během posledních let byly navrženy další intervence, které mohou potenciálně omezovat IR poškození; patří sem také ischemický postconditioning (IPC) a podání oxidu dusnatého (NO).

IPC zahrnuje několik krátkých epizod ischemie během reperfuze po prolongované ischemii (64). Staat a spol. v pilotní studii ukázali, že IPC účinně snižuje postižení myokardu a zlepšuje prognózu u nemocných s akutním infarktem myokardu (65). Také bylo prokázáno, že IPC může zvrátit fibrilaci komor na pravidelný sinusový rytmus (66-67).

NO je molekula, která je součástí mnohých fyziologických dějů v organismu a jedním z jejích hlavních účinků je vazodilatace. NO je syntetizován in vivo působením enzymu NO-

syntáza (NOS1, NOS2 a NOS3). NO v buňce aktivuje guanylátcyklázu a tím zvyšuje koncentraci sekundárního posla - cyklického guanosin-3',5'- monofosfátu (cGMP) a ten zprostředkuje účinky NO v buňce. Produkce NO v mnoha orgánech omezuje IR poškození; zvýšená exprese NOS3 v endoteliálních buňkách (68) nebo v kardiomyocytech (69) zmírňuje negativní důsledky IR v myokardu a naopak nedostatek NOS3 může spouštět ischemií indukovaný stunning myokardu (70).

Příznivý účinek IPC a NO při IR poškození byl prokázán v mnoha experimentálních a klinických pracích. Na základě dostupných výsledků v jiných klinických situacích s IR poškozením jsou IPC a NO zvažovány jako potenciálně protektivní intervence i v léčbě poresuscitačního syndromu (71-73); relevantní údaje u srdeční zástavy a extrakorporální resuscitace však doposud chybí.

Cílem naší práce bylo proto porovnat účinek IPC a podání NO se standardní léčebnou intervencí - mírnou terapeutickou hypotermií na zvířecím modelu resuscitované srdeční zástavy.

### **5.1.2. Metody**

K experimentu bylo použito 15 samic prasete domácího (*Sus scrofa domestica*, stáří 4-5 měsíců, průměrná hmotnost 45 kg). Zvířata byla uvedena do anestezie podáním kombinace azaperonu (2mg/kg) s ketaminem (15-20 mg/kg) intramuskulárně. Úplná anestezie byla navozena podáním propofolu (2 mg/kg) s morfinem (0.1-0.2 mg/kg) iv a pak byla provedena endotracheální intubace. Anestezie byla dále vedena kontinuálním iv podáváním propofolu v dávce 8-10 mg/kg/hod a morfinu (0.1-0.2 mg/kg/hod). Uvedené dávkování bylo upravované podle fyziologických parametrů zvířete, dle korneálního a palpebrálního reflexu, lakrimace a spontánních pohybů. Po skončení experimentu byl zvířeti podán kalium chlorid

v dávce 2 meq/kg; současně se pokračovalo v celkové anestezii a zvíře bylo usmrceno eutanazií.

Zavaděče (sheathy, cévní vstupy) byly zavedené perkutánní Seldingerovou metodou do obou femorálních arterií a žil a do obou jugulárních žil. Po uvedení do anestezie byl podán v infuzi fyziologický roztok (1000 ml), který byl dále podáván kontinuálně rychlostí 200-500 ml/hod s cílem udržet hodnotu středního tlaku v pravé síni mezi 3-7 mmHg. Po zavedení cévních vstupů byl aplikován iv heparin v dávce 100 U/kg a pak bylo pokračováno kontinuálním iv podáváním v dávce 50 U/kg/hod s cílem dosáhnout hodnotu ACT 180-250 s. Hodnoty ACT jsme kontrolovali každou hodinu pomocí přístroje Hemochrom Junior+ Microcoagulation System (ITC, Edison, NJ, USA).

Umělá plicní ventilace byla zajištěna pomocí ventilátoru Hamilton G5 (Hamilton Medical AG, Bonaduz, Švýcarsko), byl použit režim INTELLiVENT – Adaptive Support. Ventilátor byl nastaven tak, aby byla udržena saturace hemoglobinu kyslíkem v arteriální krvi v rozsahu 95-99% a hodnota pCO<sub>2</sub> na konci expíria v rozmezí 38-42 mmHg. V průběhu srdeční zástavy byla ventilace zastavená. Během reperfuze – po obnovení krevního oběhu – byla minutová ventilace nastavena tak, aby dosahovala 100% předikované minutové ventilace podle hmotnosti.

Srdeční zástavu – fibrilaci komor – jsme vyvolali aplikací stimulačních impulzů o vysoké frekvenci s použitím diagnostického dekapolárního katetru (Response CSL, St Jude Medical, Saint Paul, MN, USA), který byl zaveden do pravé komory cestou vena jugularis interna. Stimulační amplituda byla nastavená na dvojnásobek stimulačního prahu.

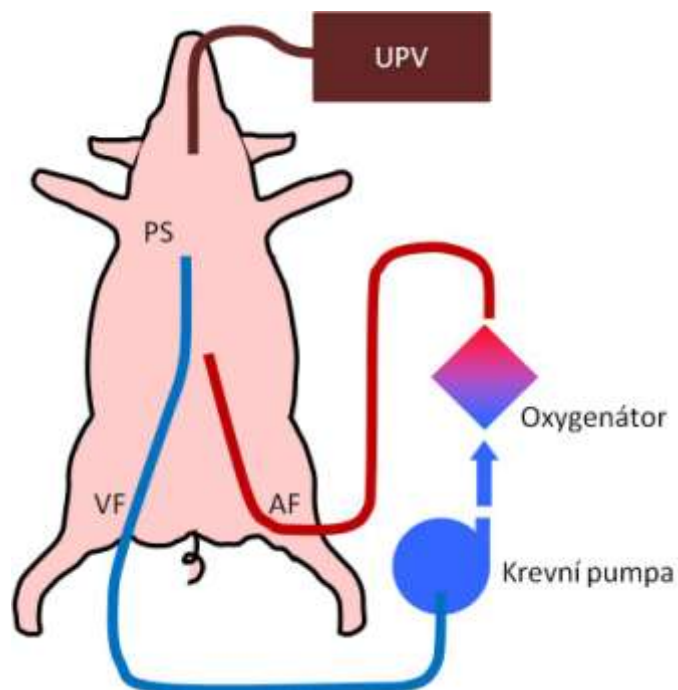
#### ***5.1.2.1. Monitorace vitálních funkcí***

Arteriální krevní tlak byl měřen invazivně pomocí tlakového převodníku (Truwave, Edwards Lifesciences, Irvine, CA, USA) z katetru, který byl umístěn do aortálního oblouku.

Swan-Ganzův katetr by zaveden cestou femorální žíly do arterie pulmonalis. U všech zvířat byly kontinuálně zaznamenávány elektrokardiogram (EKG), invazivní tlak krve (v aortálním obluku a v jugulární žíle), tlak v plicnici a saturace arteriální krve kyslíkem (Monitor Life Scope TR, Nihon Kohden, Tokyo, Japonsko; Vigilance II, Edwards Lifesciences, Irvine, CA, USA). Regionální mozková saturace v kapilární krvi byla měřena přístrojem INVOS (Cerebral/Somatic Oximeter, Covidien, Minneapolis, MN, USA), pracujícím na principu „near-infrared“ spektroskopie (NIRS).

#### ***5.1.2.2. Extrakorporální kardiopulmonální resuscitace (ECPR)***

Okruh extrakorporální membránové oxygenace (ECMO) byl složen z centrifugální pumpy Levitronix Centrimag (Thoratec, Pleasanton, CA, USA), membránového oxygenátoru Quadrox (MAQUET Cardiopulmonary AG, Rastatt, Německo) a mechanického směšovače plynů (Sechrist, Anaheim, California, USA). Kanyly byly zavedené perkutánně Seldingerovou technikou po předchozí dilataci cestou femorální arterie a femorální žíly. Venosní „inflow“ kanyla (21 F) byla umístěna do pravé síně (poloha kanyly byla kontrolována skiaskopicky), arteriální „outflow“ kanyla (15 F) byla zavedena cestou arteria femoralis (Obrázek 2). Tělesná teplota byla udržovaná pomocí tepelného výměníku. Krevní plyny a hladina kalium v krvi, opouštějící oxygenátor, byly monitorovány kontinuálně (CDI Blood Parameter Monitoring Systém 500, Terumo Cardiovascular Systems Corporation, Somerset, NJ, USA). Během srdeční zástavy byl průtok krve krevní pumpou 0.5 l/min a průtok vzduchu a kyslíku oxygenátorem byl přerušen. Po ukončení srdeční zástavy jsme navýšili průtok krevní pumpou na 4.5 l/min (cca 100 mL/kg/min); byl obnoven průtok kyslíku a vzduchu oxygenátorem tak, aby byly udržované následující hodnoty krevních plynů v krvi, která opouští oxygenátor: pO<sub>2</sub> 10-15 kPa a pCO<sub>2</sub> 4.0-6.5 kPa.

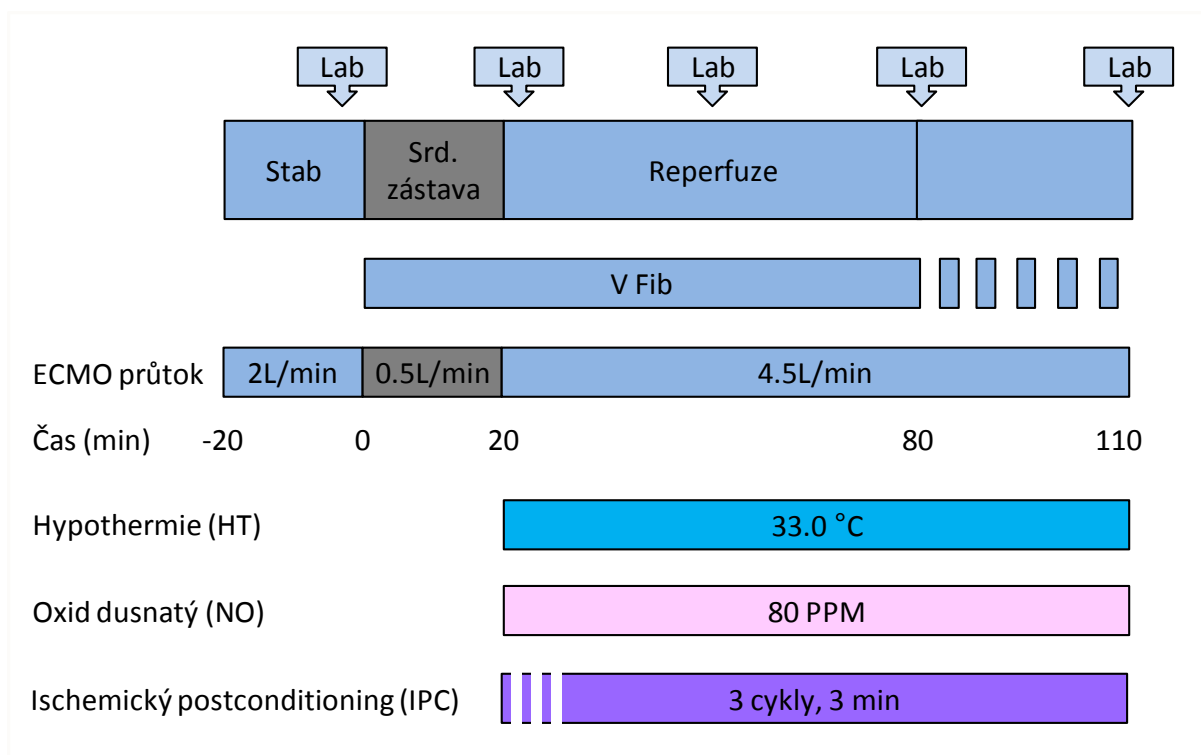


**Obrázek 2.** Schema zavedení veno-arteriální extrakorporální membránové oxygenace (ECMO). Neokysličená, venózní krev je nasávána v oblasti pravé síně (PS) pomocí žilní (inflow) kanyly, zavedené cestou femorální žíly (VF). Krevní pumpou je potom krev poháněna do oxygenátoru, kde dochází k výměně plynů a okysličená krev se vrací cestou femorální tepny (AF). UPV, umělá plicní ventilace.

### **5.1.2.3. Experimentální protokol**

Po zavedení všech katetrů a kanyl, spuštění mimotělního oběhu a po 10 min stabilizace byla vyvolána srdeční zástava indukci fibrilace komor. Srdeční zástava trvala 20 min, poté byla cirkulace obnovena zvýšením extrakorporálního průtoku z 0.5 l/min na 4.5 l/min a následovalo 90 min reperfuze. Po iniciálních 60 min reperfuze, byly umožněny u každého zvířete maximálně 3 pokusy o defibrilaci (bifázickým výbojem 200-270-270J) s cílem nastolit sinusový rytmus; poté následovalo dalších 30 min sledování bez ohledu na výsledek defibrilace (Obrázek 3).





**Obrázek 3.** Schema experimentálního protokolu. Stab - stabilizace; ECMO - extrakorporální membránová oxygenace; V Fib - fibrilace komor.

Zvířata byla randomizována po pěti do tří skupin: 1. skupina HT, 2. skupina NO a 3. skupina IPC. Zvířata v kontrolní – hypotermické (HT) skupině byla ochlazená na cílovou teplotu 33°C na začátku reperfuze, uvedená cílová teplota byla dosažena v průběhu prvních 5 min reperfuze u všech hypotermických zvířat a byla udržována až do konce experimentu pomocí tepelného výměníku, napojeného na oxygenátor. Ve skupině NO, byl NO v koncentraci 80 ppm podáván se směsí plynů do oxygenátoru během celé reperfuzní periody. Tato dávka NO byla určena na základě publikovaných údajů, které prokázaly protektivní účinek NO po inhalaci u prasat (60). Ve skupině IPC byla zvířata vystavena 3 cyklům 3 min trvající globální ischemie, následovaných 3 min reperfuze ihned po obnovení cirkulace (Obrázek 3).

Střední arteriální tlak (MAP) jsme po dobu reperfúze mohli podle protokolu regulovat i podáním noradrenalinu: při přetrvávání MAP <60 mmHg po dobu 10 min, mohl být noradrenalin nasazen iv kontinuálně v dávce 0.2 mcg/kg/min a dávku jsme mohli zdvojnásobit každých 10 min při MAP <60 mmHg až do dosažení maximální dávky 1.6 mcg/kg/min.

#### **5.1.2.4. Laboratorní testy**

Krevní vzorky ke stanovení ukazatelů orgánového poškození jsme odebírali prasatům v 90 min reperfúze, po odběru byly vzorky ihned centrifugované a sérum bylo zmrazeno na teplotu -70 °C až do dalšího zpracování. Stanovovali jsme troponin I (TnI), myoglobin (MGB), kreatinkinázu (CK), alaninaminotransferázu (ALT), neuron-specifickou enolázu (NSE) a cystatin C (CysC). Vzorky ke stanovení reaktivních metabolitů kyslíku (ROM), byly odebrané před srdeční zástavou, 1 min po obnovení oběhu a dále 3 min, 60 min a 90 min reperfúze; měření ROM bylo prováděno okamžitě po získání krve.

TnI a MGB byly měřené pomocí chemiluminescenční imunoanalýzy (Access Immunoassay System, Beckman Coulter Inc; Brea, CA, USA). CK a ALT hodnoty byly stanovené podle metody, schválené Mezinárodní Federací Klinické Chemie, využitím Synchron System. NSE bylo měřeno pomocí imunoradiometrické metody (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). Cys C byl měřen pomocí imunoturbidimetrické metody (Gentian AS, Moss, Norsko). Hladiny ROM byly měřeny s využitím analytického systému Fras 4 Evolve (H&D srl, Parma, Itálie).

#### **5.1.2.5. Statistické analýzy**

K posouzení statistické významnosti rozdílů v MAP, dávce noradrenalinu, v hodnotách mozkové oxymetrie a v hladinách ROM byl použit ANOVA test a Bonferoniho

mnohonásobný srovnávací test. Kruskal-Wallisův test a Dunnova vícenásobná srovnávací analýza byly použity k porovnání ostatních laboratorních parametrů.  $\chi^2$  test byl použit k posouzení rozdílů v resuscitabilitě. Za statisticky významné rozdíly byly považovány hodnoty  $P < 0.05$ . Statistické analýzy byly provedené pomocí programu GraphPad Prism verze 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

### **5.1.3. Výsledky**

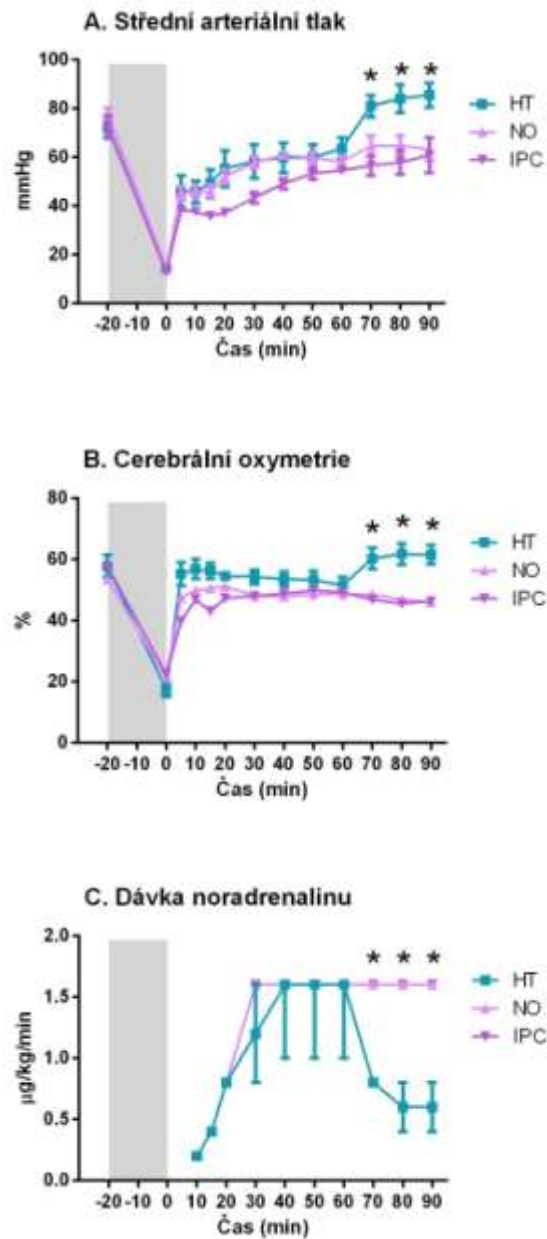
#### ***5.1.3.1. Krevní tlak, mozková oxymetrie a resuscitabilita***

Vstupní hodnoty monitorovaných parametrů byly srovnatelné u jednotlivých skupin zvířat. MAP, hodnoty mozková oxymetrie a dávky noradrenalinu byly podobné mezi jednotlivými skupinami (HT, NO a IPC) v průběhu prvních 60 minut reperfuze. V 70., 80. a 90. min byly MAP a mozková saturace významně vyšší ve skupině HT, zatímco dávka noradrenalinu byla v této skupině nižší ve srovnání s IPC a NO skupinou (Obrázek 4). Defibrilace byla úspěšná u všech zvířat HT skupiny, naproti tomu ve skupinách NO a IPC jenom u jednoho z pěti zvířat ( $P=0.01$ ).

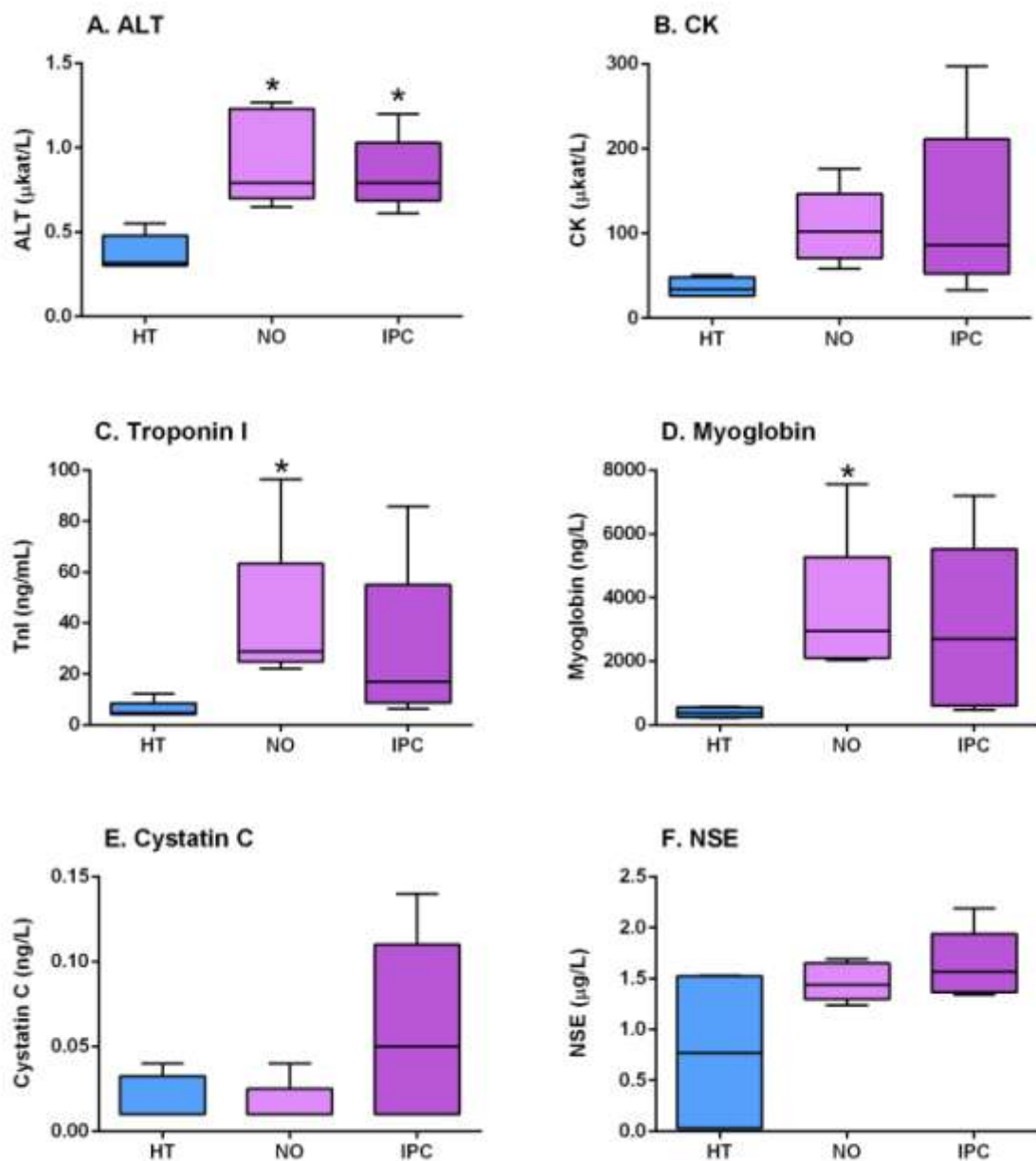
#### ***5.1.3.2. Ukazatelé orgánového poškození a oxidativní stres***

Významné rozdíly byly nalezené v hladinách ALT, CK, MGB a TnI (Obrázek 5). Mnohonásobný srovnávací test ukázal, že hladiny ALT byly signifikantně nižší ve skupině HT ve srovnání s jinými skupinami. Hladiny MGB, CK a TnI byly též signifikantně nižší v HT skupině ve srovnání s NO skupinou, zatímco rozdíly mezi HT a IPC skupinou nedosahovaly statistické významnosti. NO a IPC skupiny byly srovnatelné ve všech měřených parametrech (Obrázek 5). Hladiny CysC, NSE byly též srovnatelné ve všech skupinách (Obrázek 5). Hladiny ROM byly významně vyšší ve 30. a 90. min reperfuze ve srovnání se vstupní hodnotou u skupin NO a IPC; ve skupině HT byly hodnoty ROM ve všech měřeních

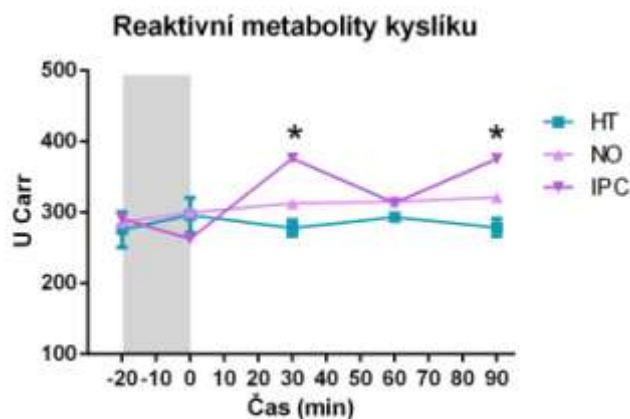
srovnatelné (Obrázek 6). Při vzájemném srovnání skupin HT, NO a IPC v jednotlivých časových bodech nebyl nalezen významný rozdíl (Obrázek 6).



**Obrázek 4.** Vývoj hodnot cerebrální oxymetrie, středního arteriálního tlaku, dávky noradrenalinu. HT – hypotermie, NO – oxid dusnatý, IPC – ischemický postconditioning



**Obrázek 5.** Hladiny ukazatelů orgánového poškození 90 min po obnovení krevního oběhu po srdeční zástavě. HT – hypotermie; NO – oxid dusnatý; IPC – ischemický postconditioning, CK – kreatinkináza, ALT- alaninaminotranferáza, NSE - neuron-specifická enoláza.



**Obrázek 6.** Hladiny metabolitů reaktivního kyslíku po srdeční zástavě. HT – hypotermie; NO – oxid dusnatý; IPC – ischemický preconditioning; \* $P < 0.05$  vs. vstupní hodnota (platí pro NO a IPC)

#### 5.1.4. Diskuse

Hlavním výsledkem naší studie je pozorování, že NO a IPC na zvířecím modelu srdeční zástavy nemají větší protektivní účinek na poresuscitační syndrom než mírná terapeutická hypotermie. Zjistili jsme, že prasata v HT skupině vykazovala vyšší krevní tlak, lepší mozkovou saturaci a potřebovala nižší dávky noradrenalinu ve srovnání s IPC a NO skupinou; uvedené rozdíly však dosáhly statistické významnosti až v 70., 80. a 90. min reperfuze, po úspěšné defibrilaci u všech HT zvířat; hemodynamicky účinný srdeční rytmus byl však nastolen pouze u jednoho z 5 zvířat NO a IPC skupiny. Je proto pravděpodobné, že vyšší hodnoty krevního tlaku a mozkové oxygenace u HT zvířat mohly být ovlivněné sinusovým rytmem, který byl nastolen po úspěšné defibrilaci. Na druhou stranu, krevní tlak, tkáňová saturace, spotřeba vazopresorů a srdeční rytmus jsou vzájemně se ovlivňující proměnné; z klinického pohledu je proto těžké identifikovat, který z uvedených faktorů má dominantní roli. Nicméně 100% úspěšná defibrilace u hypotermických zvířat (versus 20% ve zbylých dvou skupinách) ukazuje na významný protektivní účinek mírné hypotermie.

Všechny ukazatele orgánového poškození byly srovnatelné nebo vyšší v IPC a NO skupině než v HT skupině. V naší experimentální práci jsme tedy neprokázali superioritu IPC a NO ve srovnání s mírnou TH v prevenci orgánového poškození po srdeční zástavě.

Naše výsledky se odlišují od práce, kterou publikovali Yannopoulos a spol. (74), kteří popsali lepší přežívání a neuroprotektivní účinek IPC u prasečího modelu srdeční zástavy. Tento rozdíl můžeme vysvětlit odlišným zvířecím modelem, kratším trváním srdeční zástavy a IPC s kratšími cykly. Naproti tomu podobně jako v naší práci také Meybohm a spol. (75) nezjistili protektivní účinek postconditioningu s anestetikem isofluranem po srdeční zástavě.

I když je podání exogenního NO uznávanou terapeutickou intervencí v určitých specifických situacích, výsledky naší práce nepotvrzují pozorování dalších autorů, kteří popisují protektivní účinek inhalace NO po srdeční zástavě. Naše práce se liší od výsledků, publikovaných Nishidou a spol. (76), kteří prokázali, že NOS3 zmenšuje myokardiální a neurologickou dysfunkci a tlumí zánět u potkanů po srdeční zástavě. Podobně Minamishima a spol. (77) popsali lepší přežívání u myši po srdeční zástavě, kterým se aplikoval hydrogen sulfid, stimulační NOS. Uvedené rozdíly je možné vysvětlit rozdílným typem experimentu, ale hlavně exogenním podáním NO v naší studii. Naše výsledky se však liší také od publikovaných výsledků jiných autorů, kteří hodnotili účinek inhalovaného NO po srdeční zástavě. Minamishima a spol. v další studii (78) popsali lepší výsledky po resuscitaci u myši, které inhalovaly NO 23 hod po srdeční zástavě a Kida a spol. (79) zjistili lepší přežívání u myši, které byly léčené kombinací HT s inhalací NO. Popsané diskrepance mohou být vysvětleny nejen rozdílným experimentálním modelem, ale také podáním NO přes oxygenátor v naší studii.

V naší práci jsme ověřovali účinky IPC a NO odděleně, i když IPC a produkce NO jsou pravděpodobně velmi úzce propojené. Yang a spol. (80) demonstrovali signifikantně vyšší expresi inducibilní NOS ve svalových vláknech u potkanů jako účinek IPC. Nemůžeme

proto vyloučit možnost protektivního vlivu při současné aplikaci NO a IPC, nebo dokonce jejich kombinací s mírnou terapeutickou hypotermií. Dokonce je pravděpodobné, že terapeutická hypotermie sama indukuje produkci NO, jak popsali Zoerner a spol. (81) u prasečího modelu resuscitované srdeční zástavy.

Dále jsme prokázali, že hladiny ROM byly srovnatelné mezi NO, IPC a HT skupinou. Řada autorů prokázala, že mírná terapeutická hypotermie po srdeční zástavě signifikantně redukuje oxidativní stres (34-35, 82). Naše výsledky tedy naznačují, že IPC a podání NO mohou potlačit oxidativní stres v podobném rozsahu jako HT. Nicméně při srovnání vývoje hladin ROM uvnitř jednotlivých skupin jsme našli – na rozdíl od HT – u NO a IPC vyšší hodnoty v průběhu reperfúze ve srovnání s hodnotami vstupními.

Naše studie má několik limitací. V každé skupině bylo pouze 5 zvířat a po srdeční zástavě byla doba sledování jenom 90 min. Je pravděpodobné, že delší čas sledování po zástavě by mohl dále zpřesnit hodnocení účinku testovaných, potenciálně protektivních intervencí. Není rovněž zřejmé, zda můžeme naše výsledky, získané po extrakorporální resuscitaci, aplikovat na poresuscitační syndrom po konveční kardiopulmonální resuscitaci. Tento model ECPR však zajišťuje úspěšné obnovení cirkulace u všech zvířat a eliminuje potenciální interindividuální variabilitu v obnově oběhu při použití standardních resuscitačních metod.

#### **5.1.5. Závěr**

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



## **5.2. Oxidativní stres u nemocných po srdeční zástavě (Příloha 2)**

### **5.2.1. Úvod**

V klinické studii jsme stanovovali hladiny produktů oxidativního stresu u nemocných po srdeční zástavě. Jednalo se o ukazatele oxidativního poškození molekuly DNA (8-hydroxydeoxyguanosin, 8-OHdG), RNA (8-hydroxyguanosin, 8-OHG), fosfolipidů (8-isoprostane) a u podskupiny pacientů byly měřené hladiny nitrotyrosinu (ukazatel oxidativního stresu) a nitrátů/nitritů jako markeru produkce oxidu dusnatého (NO).

### **5.2.2. Soubor a metody**

Do souboru bylo zařazeno 111 nemocných po srdeční zástavě mimo nemocnici s úspěšnou kardiopulmonální resuscitací, kteří zůstávali v bezvědomí (perzistující koma s GCS  $\leq 8$ , průměrný věk 65 let, muži 79%). U těchto pacientů byla zahájena léčba mírnou hypotermií ještě před přijetím do nemocnice podáváním chlazeného fyziologického roztoku rychlostí 30 ml/kg/hod. Infuze byla přerušena v nemocnici po dosažení tělesné teploty 34°C pomocí endovaskulárního systému Thermogard XP (Zoll, Chelmsdorf, MA, USA). U všech nemocných byl použit protokol s cílovou tělesnou teplotou 33°C na dobu 24 hodin (34). Po uplynutí hypotermické fáze byli nemocní postupně ohříváni o 0.15°C za hodinu na cílovou tělesnou teplotu 36.8°C, normotermie byla pak udržována až do návratu vědomí pacienta.

Tam, kde příčinou srdeční zástavy byl akutní koronární syndrom s elevacemi ST úseku, byla provedena diagnostická koronarografie a podle nálezu případně perkutánní koronární intervence. Střední arteriální tlak byl udržován v rozmezí 65-90 mmHg na vazopresorické či inotropní podpoře (noradrenalin, vasopresin, dobutamin, milrinon), nikdo ze souboru neměl mechanickou podporu oběhu. Podskupinu s opakovaným stanovením nitrotyrosinu a nitrátů/nitritů tvořilo 11 nemocných.

Krev ke stanovení ukazatelů oxidativního poškození DNA, RNA a fosfolipidů jsme odebírali ihned po přijetí do nemocnice, pak za 12 a za 30 hod po příjmu. Krev k měření nitrotyrosinu a nitrátů/nitritů byla odebíraná ihned po příjmu do nemocnice a poté každých 6 hod po dobu 54 hod. Centrifugací vzorků krve při otáčkách 1500/min po dobu 5 minut jsme získali sérum, které bylo okamžitě zamraženo a uloženo při teplotě -70 °C až do měření hladin uvedených markerů. Nitrotyrosin (3-nitrotyrosin) je ukazatel produkce peroxynitritu, který vzniká z reakce NO a superoxidu (83). Hladiny nitrotyrosinu byly měřené pomocí standardní metody ELISA, použitím monoklonálních protilátek; detaily uvedené metody jsou popsány v práci Fišárkové a spol. (84). Nitráty/nitrity jsou nepřímé ukazatele produkce NO a byly měřené v séru použitím Sieversova chemiluminiscenčního analyzátoru (GE Analytical Instruments, USA). Hladiny markerů oxidativního poškození DNA, RNA a fosfolipidů byly měřené pomocí ELISA testu (Cell Biolabs, Inc, San Diego, CA, USA).

Neurologický stav byl hodnocen pomocí CPC (Cerebral Performance Category) (Tabulka 3) (85) a to 30. den po přijetí do nemocnice. Uvedený skórovací systém je standardně používán k popisu neurologického stavu po srdeční zástavě.

**Tabulka 3.** Kategorie CPC (Cerebral Performance Category)

- CPC 1 - bez neurologického deficitu
- CPC 2 - lehká až střední neurologická dysfunkce
- CPC 3 - těžký neurologický deficit (není schopen existence bez pomoci jiné osoby)
- CPC 4 - koma
- CPC 5 - smrt

Hladiny ukazatelů oxidativního stresu byly analyzovány ANOVA testem za použití Newman-Keulsovy vícenásobné post-test analýzy. Dále byly konstruovány ROC (Receiver

operating characteristic) křivky k analýze a určení senzitivity a specifity hladin uvedených markerů pro predikci prognózy. Hodnota  $P < 0.05$  byla považována za statisticky významnou. Ke zpracování statistických analýz byl použit software GraphPad Prism verze 4.0 (GraphPad, USA) a MedCalc verze 12 (MedCalc, Mariakerke, Belgie).

### 5.2.3. Výsledky

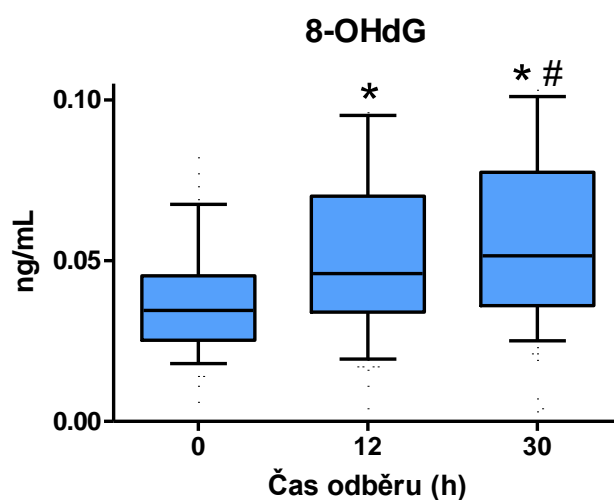
Základní charakteristika souboru je uvedena v Tabulce 4.

**Tabulka 4.** Základní charakteristika souboru.

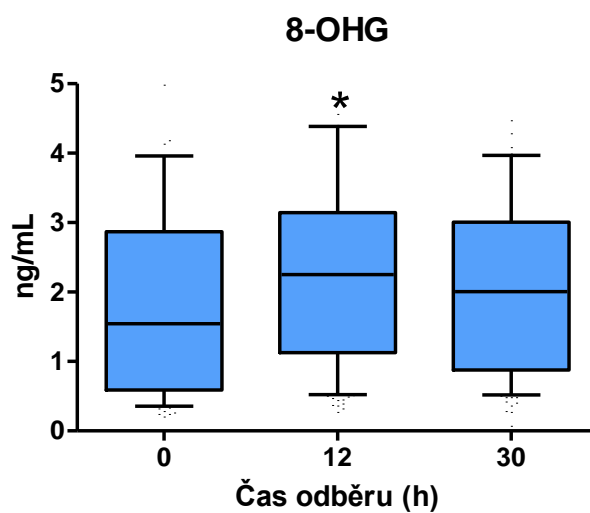
Počet pacientů	111
Průměrný věk	65 (31-88)
Muži	79%
ROSC (min)	20.65 (5 -60)
Vstupní laktát (mmol/l)	6.65 (0.7-20.0)
Vstupní pH	7.18 (6.68 - 7.56)
EF LK při přijetí	39.4%
Vstupně defibrilovatelný rytmus	74%

*Data jsou prezentovaná jako medián (min-max) nebo n (%). ROSC - čas do obnovení krevního oběhu; EF LK - ejekční frakce levé komory.*

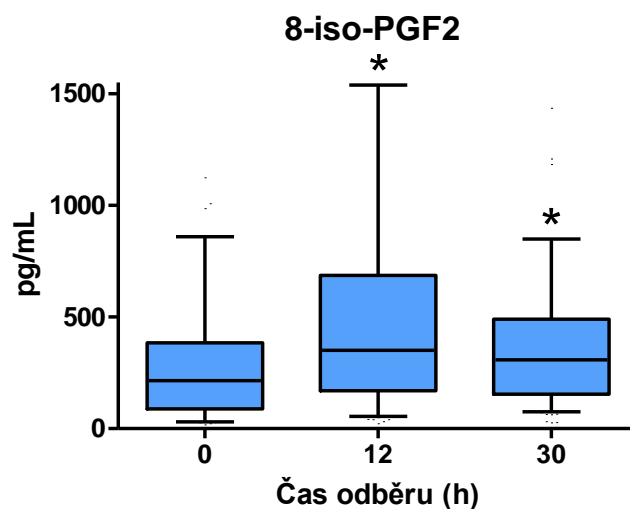
Zaznamenali jsme významné změny v hladinách ukazatelů oxidativního poškození DNA (8-hydroxydeoxyguanosin; 8-OHdG), RNA (8-hydroxyguanosin; 8-OHG) a fosfolipidů (8-isoprostan) v jednotlivých časech měření (0, 12, 30 hod) (Obrázek 7-9).



**Obrázek 7.** Vývoj hladiny ukazatele oxidativního poškození DNA, 8-hydroxydeoxyguanosinu (8-OHdG) u nemocných po srdeční zástavě. \*P<0.05 vs. hodnota při přijetí (čas 0); #P<0.05 vs. hodnota za 12 hodin.

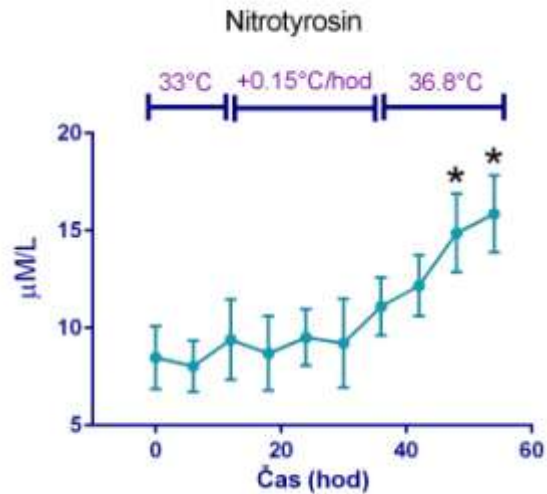


**Obrázek 8.** Vývoj hladiny ukazatele oxidativního poškození RNA, 8-hydroxyguanosinu (8-OHG) u nemocných po srdeční zástavě. \*P<0.05 vs. hodnota při přijetí (čas 0).

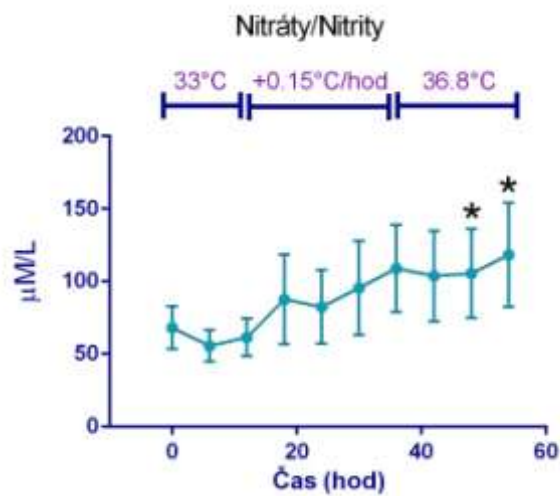


**Obrázek 9.** Vývoj hladiny ukazatele oxidativního poškození fosfolipidů, 8-isoprostanu (8-iso-PGF2) u nemocných po srdeční zástavě. \* $P < 0.05$  vs. hodnota při přijetí (čas 0).

V podskupině s častějším měřením vybraných parametrů jsme pozorovali vysoce významné rozdíly v produkci nitrotyrosinu ( $P < 0.001$ ). Hladina nitrotyrosinu během normotermie (48. a 54. hodina) byla významně vyšší ve srovnání se všemi měřeními v průběhu hypotermie (Obrázek 10). Významné změny jsme zaznamenali také u hladin nitrátů/nitritů ( $P < 0.05$ ). Také zde byly hodnoty při normotermii (48. a 54. hodina) významně vyšší ve srovnání s hypotermií (6. a 12. hodinou) (Obrázek 11).

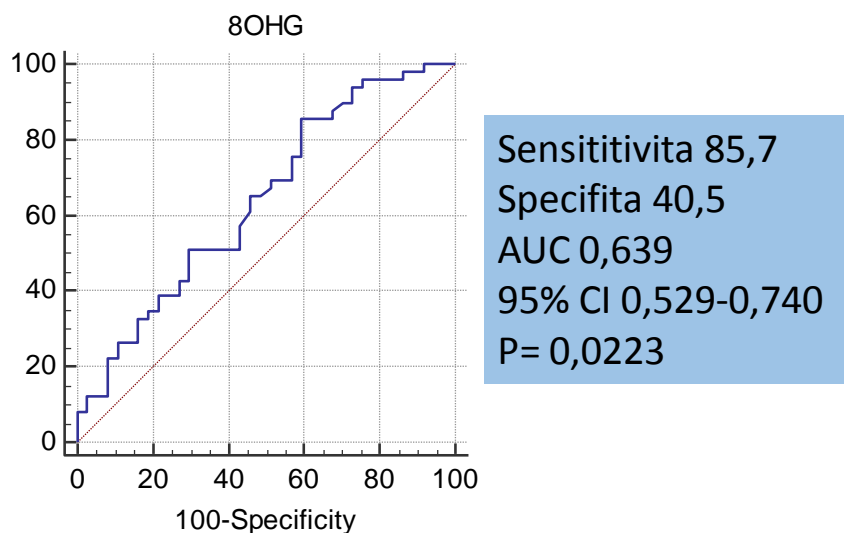


**Obrázek 10.** Hladiny nitrotyrosinu u nemocných se srdeční zástavou, léčených endovaskulární hypotermií po dobu 24 hodin. \* $P < 0.05$  vs. 0, 6, 12, 18 a 24 hod.



**Obrázek 11.** Hladiny nitrátů/nitritů u nemocných se srdeční zástavou, léčených endovaskulární hypotermií po dobu 24 hodin. \* $P < 0.05$  vs. 6 a 12 hod.

Ze sledovaných ukazatelů oxidativního stresu jsme našli vztah s klinickými výsledky pouze pro vstupní hodnotu ukazatele oxidativního poškození RNA, 8-hydroxyguanosinu (8OHG); plocha pod ROC křivkou byla 0.639,  $P=0.0223$ , optimální cut-off  $>0.59$  ng/ml, senzitivita 85.7% a specifita 40.5% pro špatnou prognózu (Obrázek 12).



**Obrázek 12.** Receiver-operating characteristic (ROC) křivka pro hodnoty 8-hydroxyguanosinu (8-OHG) a predikci prognózy u nemocných po srdeční zástavě.

#### 5.2.4. Diskuse

Hlavním výsledkem této studie je zjištění dynamických změn v hladinách parametrů oxidativního stresu po srdeční zástavě, nepřímo naznačující aktivní úlohu oxidativního stresu v patofyziologických procesech poresuscitačního syndromu. Vývoj hladin nitrátů/nitritů a nitrotyrosinu, měřených opakovaně v 6-hodinových intervalech, ukazují také na vliv hypotermie na tyto parametry a tedy na supresi oxidativního stresu. Ze sledovaných parametrů však pouze vstupní hodnota 8-OHG měla vztah s klinickými výsledky – prognózou nemocných – a to jen na hranici klinického významu.

Je známo, že oxidativní stres hraje jednu z hlavních úloh v patogeneze IR poškození (27-28). Rychlý vzestup ukazatelů oxidativního stresu a zvýšená produkce NO byly popsány u různých akutních klinických situací, jako je trauma, cévní mozková příhoda, selhání jater nebo infekce (86-87). Zatím však není možné porovnat naše výsledky s žádnou jinou publikovanou klinickou prací, která by sledovala parametry oxidativního stresu po srdeční zástavě. Výsledky naší práce jsou ale v souladu s několika uveřejněnými experimentálními studiemi, které ukazují projevy oxidativního stresu na různých modelech srdeční zástavy (77, 88).

Po publikaci dvou klinických studií, které dokumentují pozitivní vliv hypotermie na neurologickou prognózu (9-10), se mírná terapeutická hypotermie stala nedílnou součástí péče o pacienty po oběhové zástavě. Snížení oxidativního stresu za použití hypotermie bylo popsáno naší skupinou u zvířecího modelu srdeční zástavy (35). V naší práci jsme však poprvé i v klinické studii prokázali, že hypotermie po srdeční zástavě může příznivě ovlivňovat také oxidativní stres, což je dalším prioritním výsledkem této studie.

Toto naše pozorování je také v souladu s doposud publikovanými experimentálními pracemi, zaměřenými na účinky hypotermie u jiných patologických stavů. Jiang a spol. (87) popsali normalizaci hladin nitrátů/nitritů a signifikantní ovlivnění exprese NO syntázy v mozku za použití hypotermie na modelu akutního ischemického jaterního selhání u potkanů. Stefanutti a spol. (89) pozorovali, že hypotermie u potkanů snižuje oxidativní stres u ischemicko-reperfučního poškození střeva. Scumpia a spol. (90) pozorovali při hypotermii inhibici produkce NO a myeloperoksidázou zprostředkované poškození srdce po podání endotoxinu u potkanů. Han a spol. (91) zjistili, že hypotermie inhibuje tvorbu NO na experimentálním modelu cévní mozkové příhody a zánětu. Hypotermií zprostředkované ovlivnění exprese isoformy NO syntázy po lokální mozkové ischemii u potkanů popsali



Karabiyikoglu a spol. (92). Lei a spol. (93) pozorovali snížení peroxidace lipidů se zachovalou antioxidační obranou účinkem hypotermie na modelu oběhové zástavy u psa.

Výsledky naší práce jsou v souladu i s dosud publikovanými klinickými studiemi, zaměřenými na vliv hypotermie na oxidativní stres u různých patologických stavů. Hayashi a spol. (86) pozorovali snížené hladiny nitrátů/nitritů jako výsledek ochlazení na cílové teploty 32-33 °C u nemocných s poraněním mozku nebo mozkovým krvácením. Podobně Wenisch a spol. (94) zjistili redukci tvorby reaktivních forem kyslíku při aplikaci mírné hypotermie během chirurgických výkonů. Bayir a spol. (95) pozorovali ochranný účinek hypotermie na antioxidační kapacitu po těžkém poranění mozku u dětí.

V naší práci jsme ukázali, že pouze vstupní hladina 8-OHG, tedy ukazatele oxidativního poškození RNA, měla statisticky významný vztah ke klinickým výsledkům a tedy k prognóze pacienta. Relativně nízká senzitivita a specifita 8-OHG pro stanovení prognózy však výrazně omezuje potenciální klinickou využitelnost stanovení tohoto ukazatele. Můžeme pouze spekulovat, proč v naší studii markery oxidativního stresu nesouvisely nebo jen slabě souvisely s prognózou. Jako možné vysvětlení se nabízí, že rozsah námi měřeného poškození oxidativním stresem souvisí se systémovou reakcí, naproti tomu prognóza je ovlivněná spíše poškozením mozku, které se systémovým oxidativním stresem nemusí korelovat. Nelze však vyloučit, že jiné parametry oxidativního stresu, které jsme v naší práci nesledovali, by mohly s prognózou po srdeční zástavě souviset lépe.

Naše studie má celou řadu omezení, vyplývající především z velikosti sledovaného souboru a z absence kontrolní skupiny. Z etického hlediska by však bylo neobhajitelné neposkytnout nemocným po srdeční zástavě léčbu mírnou terapeutickou hypotermií. Z dnešního pohledu by se jistě nabízela možnost srovnání účinků kontroly tělesné teploty na úrovni 33°C a 36°C. V době provádění naší studie však byla tělesná teplota 33°C jedinou doporučenou cílovou teplotou v léčbě poresuscitačního syndromu. Oxidativní stres a

produkce NO může být také ovlivněna iontovou nerovnováhou (např. dysbalancí hladin draslíku nebo vápníku) či laktátovou acidózou. V souladu se současnou klinickou prací byly však u všech nemocných, zařazených do studie, tyto poruchy korigovány v prvních hodinách od přijetí.

#### **5.2.5. Závěr**

Tato studie ukázala dynamické změny parametrů oxidativního stresu po srdeční zástavě, redukcí oxidativního stresu a nižší produkci NO během mírné terapeutické hypotermie, avšak klinicky jen omezeně využitelnou prognostickou hodnotu parametrů oxidativního stresu u nemocných po srdeční zástavě. Tyto výsledky přinášejí nepřímou evidenci, že se oxidativní stres podílí na patofyziologických procesech po srdeční zástavě a že hypotermie může ovlivnit oxidativní stres a produkci NO u těchto nemocných.

## **6. KOPEPTIN A SRDEČNÍ ZÁSTAVA.**

### **6.1. Využití příjmových hodnot kopeptinu ke stanovení prognózy u nemocných po srdeční zástavě (Příloha 3)**

#### **6.1.1. Úvod**

V klinické studii jsme studovali otázku možnosti využití stanovení hodnoty kopeptinu při přijetí k hospitalizaci u nemocných po srdeční zástavě pro velmi časnou predikci prognózy.

#### **6.1.2. Soubor a metody**

Do souboru byli zařazeni pacienti po srdeční zástavě mimo nemocnici s úspěšnou kardiopulmonální resuscitací, kteří zůstávali v bezvědomí (perzistující koma s GCS  $\leq 8$ ). U těchto pacientů byla zahájena léčba mírnou hypotermií ještě před přijetím do nemocnice podáváním chlazeného fyziologického roztoku rychlostí 30 ml/kg/hod. Infuze byla přerušena v nemocnici po dosažení tělesné teploty 34°C endovaskulárně pomocí systému Thermogard XP (Zoll, Chelmsdorf, MA, USA). U všech nemocných byl použit protokol s cílovou tělesnou teplotou 33°C na dobu 24 hodin (34). Tam, kde pravděpodobnou příčinou srdeční zástavy byl akutní koronární syndrom, byla provedena urgentní koronarografie a případně perkutánní koronární intervence.

Krev ke stanovení kopeptinu jsme odebírali ihned po přijetí do nemocnice před jakoukoli intervencí. Centrifugací vzorku krve při otáčkách 1500/min po dobu 5 minut jsme získali sérum, které bylo okamžitě zamrazeno a uloženo při teplotě -70 °C až do měření hladiny kopeptinu. K určení hladiny byly použité komerčně dostupné testy od firmy BRAHMS (BRAHMS, Hennigsdorf, Německo). Hranice ke stanovení kopeptinu byla 4.8

pmol/l a senzitivita metody byla <12 pmol/l. Hodnoty laktátu byly měřené rutinně u všech nemocných při přijetí do nemocnice pomocí analyzátoru (SIEMENS, Mnichov, Německo).

Neurologický stav jsme hodnotili pomocí CPC (Cerebral Performance Category) (Tabulka 3) (85) a to 30. den po přijetí do nemocnice. Uvedený skórovací systém je standardně používán k popisu neurologického stavu po srdeční zástavě.

Lékaři, vykonávající klinické vyšetření včetně stanovení CPC, neznali hodnoty kopeptinu. Čas do obnovení spontánní cirkulace (ROSC) byl definovaný jako čas od vzniku srdeční zástavy (kolapsu) až do obnovení spontánního oběhu.

### ***Statistické hodnocení***

Sledované parametry byly prezentované jako průměrné hodnoty (aritmetický průměr) se standardní odchylkou a srovnávané pomocí nepárového t-testu s jednocestnou analýzou odchylek pomocí Newman-Keuls výběrového srovnávacího testu. Kategorické proměnné byly ukázané v procentech a srovnávané pomocí Fischerovho testu. Pomocí ROC (Receiver operating characteristic) analýz byly vytvořené křivky k určení senzitivity a specificity hladin kopeptinu k predikci prognózy.

Využitím multivariantní analýzy byly určeny nezávislé prediktory špatné neurologické prognózy včetně smrti a prognostická hodnota kopeptinu. Hodnota  $P < 0.05$  byla považována za statisticky významnou. Statistická analýza byla prováděna pomocí softwaru GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) a MedCalc version 12 (MedCalc, Mariakerke, Belgie)

### **6.1.3. Výsledky**

Do naší studie bylo zařazeno celkově 46 nemocných po srdeční zástavě, během června 2010 až prosince 2011. Jeden pacient byl vyloučen pro technický problém se zpracováním

vzorku krve a dalších 5 pacientů bylo vyloučeno z důvodu nepodepsání informovaného souhlasu pacientem nebo rodinou. Celkově zůstalo v souboru 40 subjektů (průměrný věk 58 let), vyšší zastoupení měli muži (32 ze 40) (Tabulka 4).

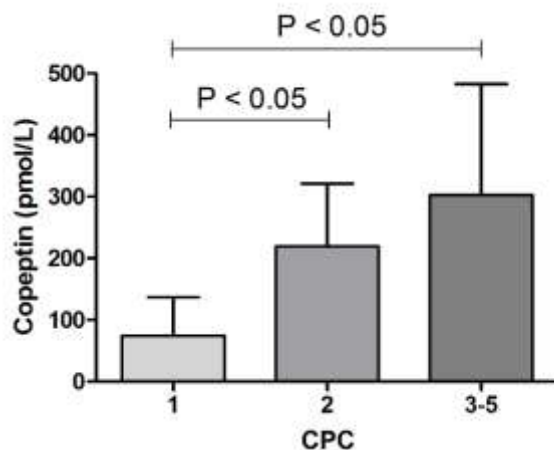
**Tabulka 4.** Charakteristika souboru.

	CPC 1-2	CPC 3-5	P	OR	95% CI
	N = 28	N = 12			
Věk	64.4 ± 12.4	69.3 ± 13.7	0.30		-14 to 4.5
Pohlaví (M, %)	85.7	66.7	1.00	1.00	0.2 to 6.0
Diabetes (%)	46.4	41.7	1.00	1.21	0.3 to 4.8
Hypertenze (%)	78.3	66.6	0.45	1.81	0.4 to 8.2
Fibrilace komor (%)	71.4	75.0	1.00	0.83	0.2 to 3.9
Asystolie (%)	21.4	25.0	1.00	0.82	0.2 to 4.0
IM (%)	50.0	58.3	0.74	0.71	0.2 to 2.8
ROSC (min)	16.64 ± 9.34	22.82 ± 11.44	0.12		-14 to 1.7
LVEF (%)	35.87 ± 12.67	30.00 ± 15.67	0.26		-4.6 to 16
Laktát* (mmol/L)	5.08 ± 3.19	8.25 ± 4.10	0.08		-6.7 to 0.4

*Hodnoty jsou ukázány jako průměr ± SD, pokud není uvedeno jinak. \*Hladina laktátu při přijetí. CPC - cerebral performance category; OR - odds ratio; CI - interval spolehlivosti; IM - infarkt myokardu; ROSC - doba do obnovení spontánní cirkulace; LVEF - ejekční frakce levé komory při přijetí.*

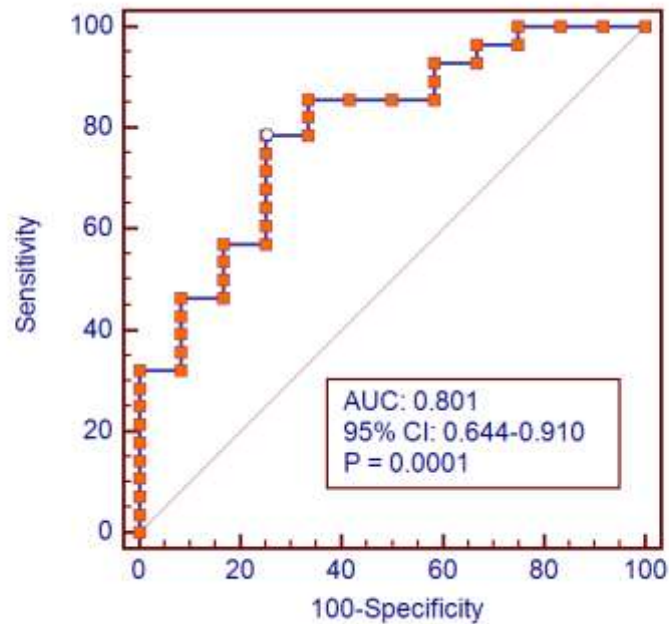
Z celé skupiny nemocných po srdeční zástavě 19 přežilo bez neurologického deficitu (CPC 1), 9 jedinců přežilo s lehkým až středně těžkým neurologickým postižením (CPC 2), u 3 přeživších byl těžký neurologický deficit (CPC 3-4), a 9 pacientů zemřelo (CPC 5).

Hladina kopeptinu byla významně nižší u jedinců s CPC 1 ve srovnání se CPC 2 nebo CPC 3-5 (74.3±65.6 pmol/l, 219.8±101.7 pmol/l a 302.7±180.5 pmol/l; P < 0.0001) (Obrázek 13).



**Obrázek 13.** Hladiny kopeptinu (průměr ± směrodatná odchylka), měřené při přijetí do nemocnice u nemocných po srdeční zástavě podle kategorií CPC.

ROC křivka byla použita k určení optimální cut-off hodnoty kopeptinu pro predikci dobré neurologické prognózy (CPC 1-2; area under the curve (AUC) 0.801; 95% interval spolehlivosti (CI) 0.644 až 0.910;  $P=0.0001$ ) (Obrázek 14). Optimální cut-off hodnota  $\leq 217.9$  pmol/l, měla senzitivitu pro dobrou neurologickou prognózu 78.6% a specifitu 75% (Obrázek 14).



**Obrázek 14.** Receiver-operating characteristics (ROC) křivka pro kopeptin a predikci neurologické prognózy u nemocných po srdeční zástavě, 95% interval spolehlivosti (95% CI) (tečkovaná čára). Optimální cut-off hodnota pro dobrou neurologickou prognózu (CPC 1-2) vypočtena z ROC křivky byla  $\leq 217.9$  pmol/l, se senzitivitou 78.6% a specificitou 75%. AUC – plocha pod křivkou.

Použitím multivariantní regresní analýzy jsme ověřovali, zda může být hladina kopeptinu nezávislým ukazatelem špatné neurologické prognózy nebo smrti (CPC 3-5); zjistili jsme, že hladina kopeptinu  $>217.9$  pmol/l byla nezávislým prediktorem, adjustované odds ratio 27.00 (95% CI 2.27 až 321.68;  $P=0.009$ ) (Tabulka 5).

**Tabulka 5.** Výsledky multivariantní analýzy prediktorů špatné neurologické prognózy nebo úmrtí.

Proměnná	Adjustovaný OR	95% CI	P-hodnota
Copeptin level >217.9 pmol/L	27.00	2.2670 to 321.6817	0.0091
Infarkt myokardu	6.26	0.4466 to 87.8582	0.1733
Komorová fibrilace	0.85	0.0452 to 16.0444	0.9146
Věk	1.07	0.9714 to 1.1701	0.1773
ROSC	1.02	0.9419 to 1.1122	0.5831

*OR, odds ratio; CI, interval spolehlivosti; ROSC, doba do obnovení spontánní cirkulace*

#### 6.1.4. Diskuze

Hlavním výsledkem této práce bylo pozorování, že vstupní hodnota kopeptinu, měřená u nemocných po srdeční zástavě ihned po přijetí do nemocnice, může sloužit k predikci prognózy. Stanovili jsme optimální cut-off hodnotu kopeptinu a ukázali, že nemocní s hladinou kopeptinu  $\leq 217.9$  pmol/l měli vyšší pravděpodobnost přežití s dobrým neurologickým výsledkem ve srovnání s pacienty, u kterých byla hladina  $> 217.9$  pmol/l.

Časně a přesné stanovení neurologické prognózy u nemocných po srdeční zástavě je zcela zásadní pro zvolení nejvhodnějšího diagnosticko-léčebného postupu, může zabránit nadměrné intenzivní péči a pomůže časně a adekvátně informovat příbuzné. V klinické praxi při hodnocení prognózy využíváme evropská doporučení, která se opírají o opakované klinické vyšetření, laboratorní a zobrazovací metody. Žádný z uvedených doporučovaných postupů však není vhodný ke stanovení prognózy ihned po přijetí do nemocnice – v tuto dobu jsou k dispozici zpravidla pouze omezené anamnestické údaje a charakteristiky, související s okolnostmi srdeční zástavy; v tomto ohledu mohou naše výsledky přispět k rozšíření prognostických možností.



Výsledky naší studie jsou v souladu s publikovanými pracemi, které vyšetřovaly hladinu kopeptinu u jiných akutních a kritických stavů (96). Hladina kopeptinu koreluje s klinickým výstupem u následujících stavů: akutní exacerbace chronické obstrukční plicní nemoci (97), ischemická cévní mozková příhoda (98); infarkt myokardu (99-100) srdeční selhání (101-102) a dokonce u nemocných, kteří jsou vyšetřeni na urgentním příjmu s nespecifickými potížemi (103). Jarai a spol. zjistili, že předoperačně stanovená hladina kopeptinu predikuje postoperační klinický vývoj v oblasti vaskulární chirurgie (104). Naše výsledky jsou také v souladu s prací Kima a spol., kteří popsali, že nemocní po srdeční zástavě s relativní adrenální insuficiencí, vyšší hladinou adrenokortikotropního hormonu a vazopresinu mají špatnou neurologickou prognózu (105).

Naše práce má několik limitací. Největším nedostatkem je jistě omezený počet jedinců v souboru. Všichni nemocní v naší studii byli po zástavě mimo nemocnici a byli léčeni endovaskulárně řízenou hypotermií 33°C; není proto jasné, zda naše výsledky můžeme aplikovat i na pacienty po srdeční zástavě v nemocnici a na nemocné, kteří podstoupili jiný druh kontroly tělesné teploty. Jinou možnou limitací je, že nebyli vyloučeni nemocní s chronickými nemocemi, které jsou spojené se zvýšenou hladinou kopeptinu.

#### **6.1.5. Závěr**

Výsledky této práce prokázaly, že hladina kopeptinu, měřená při příjmu do nemocnice u pacientů po srdeční zástavě, může být časným pomocným ukazatelem pro stanovení neurologické prognózy a mortality.

## **7. NEURON-SPECIFICKÁ ENOLÁZA A SRDEČNÍ ZÁSTAVA**

### **7.1. Vztah mezi hladinou neuron-specifické enolázy a prognózou po srdeční zástavě závisí na době odběru vzorku (Příloha 4)**

#### **7.1.1. Úvod**

V klinické studii jsme studovali prognostický význam stanovení NSE v jednotlivých dnech po srdeční zástavě a vztah mezi změnami hladiny NSE v prvních dnech po zástavě a klinickými výsledky.

#### **7.1.2. Soubor a metody**

Soubor tvořili nemocní po srdeční zástavě mimo nemocnici s perzistujícím komatem (Glasgow koma score  $\leq 8$ ). Mírná léčebná hypotermie byla zahajována už v přednemocniční fázi nebo ihned po přijetí do nemocnice infuzí chlazeného fyziologického roztoku rychlostí 30 ml/kg/hod, dokud teplota tělesného jádra neklesla pod 34°C. K navození hypotermie a k jejímu udržování na úrovni 33°C po dobu 24 hodin jsme používali endovaskulární systém Thermoguard XP (Zoll, Chelmsdorf, MA, USA), který byl standardně zaveden do 60 minut od přijetí do nemocnice. Pacientům s ST elevacemi na EKG, hemodynamickou nebo pokračující elektrickou nestabilitou byla provedena koronarografie a dle nálezu i koronární intervence. Pacienti s extrakorporální kardiopulmonální resuscitací (ECPR) a s intraaortální balonkovou kontrapulzací (IABK) byli ze souboru vyloučeni.

Vzorky krve ke stanovení hladiny NSE byly odebírané nemocným první ráno po přijetí do nemocnice (6-30 hodin od kolapsu, den 1), pak každé následující ráno hospitalizace (den 2: 30-54 hodin od kolapsu; den 3: 54-78 hodin od kolapsu; den 4: 78-102 hodin od kolapsu). Krev po odběru byla ihned centrifugovaná po dobu 5 min, při 1500 otáčkách/min,

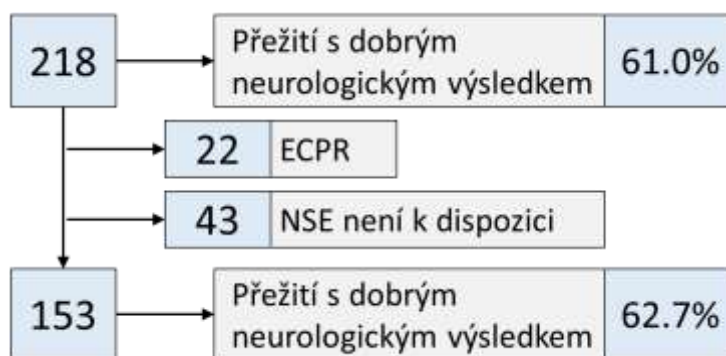
sérum bylo zmrazené a při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$  uchované až do měření (nejdéle 7 dní od odběru). Ke stanovení NSE byla použita imunoradiometrická metoda (BeckmanCoulter, Brea, CA, USA). Laboratorní pracovníci neznali klinické výsledky a současně ošetřujícímu personálu nebyly známé hodnoty NSE, aby nedošlo k ovlivnění terapeutických postupů.

Neurologický stav byl hodnocen 30. den po zástavě pomocí CPC (85) (viz Tabulka 3) Lékaři, kteří hodnotili neurologický stav dle CPC, neznali hodnoty NSE. Údaje o roční mortalitě byly získány z Ústavu zdravotnických informací a statistiky.

Kontinuální proměnné s normální distribucí jsou prezentované jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka; kontinuální proměnné s nenormálním rozložením jsou ukázané jako střední hodnota a interval min-max; kategoričké proměnné jsou uváděny v procentech. Srovnání distribuce NSE mezi jednotlivými CPC skupinami bylo provedeno pomocí Wilcoxonova testu. Pomocí ROC (Receiver operating characteristics) analýzy byla stanovena senzitivita a specificita hodnot NSE v jednotlivých časových bodech (den 1 až den 4) pro predikci klinických výsledků. ROC křivky pro jednotlivé dny jsme srovnávali s použitím DeLongova testu. Dále jsme provedli ROC analýzu pro změny hodnot NSE v jednotlivých dnech a pro každou optimální cut-off hodnotu byl vypočten poměr  $100 \cdot (D_x - D_y) / D_x$ . NSE hodnoty v jednotlivých dnech a maximální NSE hodnoty byly hodnoceny i v multivariantní analýze, která dále zahrnovala věk, pohlaví, vstupní hodnotu laktátu a pH, čas do ROSC, iniciální rytmus a EEG nález (burst-supression nebo status epilepticus).  $P < 0.05$  bylo hodnoceno jako statisticky významné. ROC analýzy byly prováděny s využitím programu MedCalc verze 12 (MedCalc, Mariakerke, Belgie); ostatní statistické výpočty byly získány pomocí softwaru GraphPad Prism verze 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

### 7.1.3. Výsledky

V průběhu zařazovacího období (leden 2012 až březen 2015) bylo přijato k hospitalizaci 218 nemocných po srdeční zástavě mimo nemocnici; z uvedeného počtu bylo 153 nemocných zařazeno do souboru (Obrázek 15). Základní charakteristiky studijního souboru jsou uvedené v Tabulce 6.



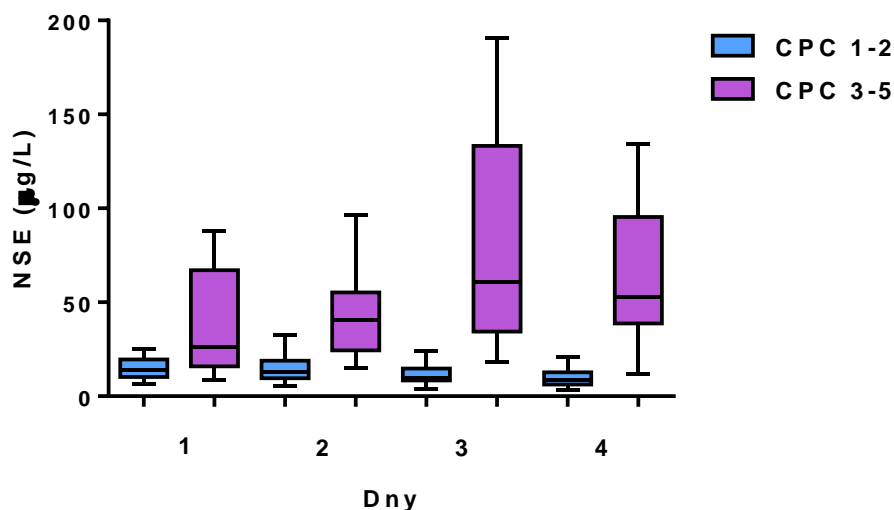
**Obrázek 15.** Přehled zařazování pacientů do studie. ECPR – Extrakorporální kardiopulmonální resuscitace; NSE – neuron-specifická enoláza

**Tabulka 6.** Základní charakteristika a klinické výsledky souboru (n=153).

<b>Charakteristika souboru</b>	
Věk	64.2±12.2
Muži	115 (74.4)
ROSC	21.7±15.9
Vstupní pH při přijetí do nemocnice	7.2±0.2
Vstupní laktát (mmol/L)	6.3±4.1
VT/VF	119 (77.3)
Urgentní koronarografie	126 (82.4)
Perkutánní koronární intervence	104 (68.0)
<b>Klinické výsledky</b>	
<b>30-dnů</b>	
CPC 1-2	96 (62.7)
CPC 3-4	23 (15.0)
CPC 5	34 (22.2)
<b>12-měsíční mortalita</b>	46 (30.1)
<i>Data jsou prezentovaná jako aritmetický průměr±směrodatná odchylka nebo n (%). CPC – Cerebral Performance Category; VF - komorová fibrilace; VT - komorová tachykardie</i>	

Střední hodnota NSE byla 1. den po srdeční zástavě 16.8 mcg/l (min 6.6, max 196.2 mcg/l [n=66]); 2. den 18.3 mcg/l (min 5.5, max 123.6 mcg/l [n=112]); 3. den 14.6 mcg/l (min 4.1, max 368.6 mcg/l [n=108]); 4. den 12 mcg/l (min 3.5, max 300.0 mcg/l [n=112]). Hodnoty NSE byly v jednotlivých dnech významně nižší ve skupině se CPC 1-2 než ve skupině nemocných, u kterých bylo CPC 3-5 (P<0.05): 1. den 14.1 mcg/l vs. 26.1 mcg/l; 2. den 13.1

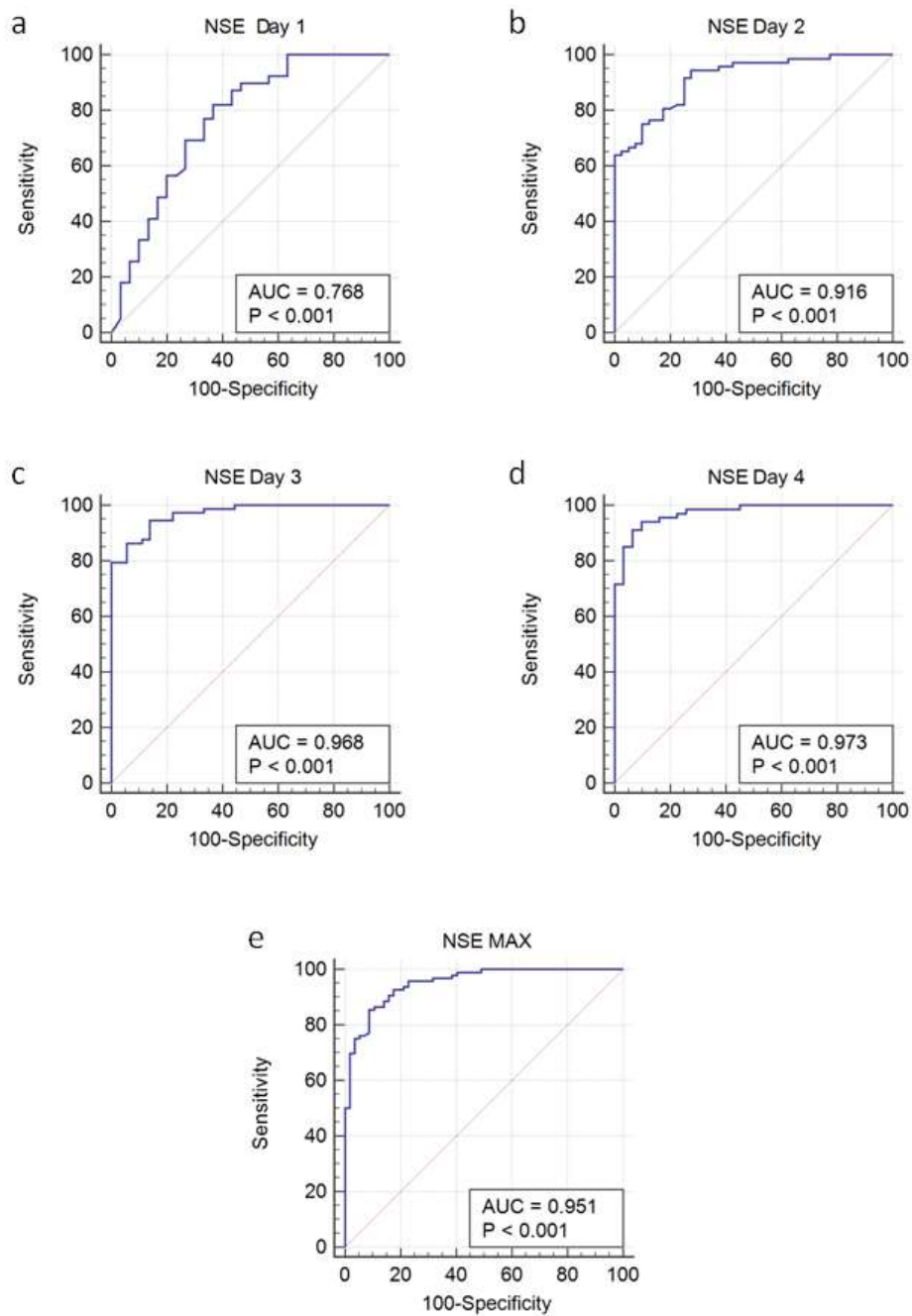
mcg/l vs. 40.8 mcg/l; 3. den 9.9 mcg/l vs. 60.8 mcg/l; 4. den 8.7 mcg/l vs. 53.0 mcg/l (Obrázek 16).



**Obrázek 16.** Hladiny neuron – specifické enolázy (NSE) měřené v jednotlivých dnech. Hladiny NSE byly signifikantně nižší ve skupině CPC 1-2 ve srovnání se skupinou CPC 3-5 v každém měření první čtyři dny po srdeční zástavě.

#### 7.1.3.1. Hodnoty NSE a 30 denní neurologická prognóza

Pomocí ROC analýzy byly zjištěny následující optimální cut-off hodnoty NSE pro predikci špatné neurologické prognózy (CPC 3-5) 30. den od přijetí k hospitalizaci po srdeční zástavě: NSE den 1 >20.4 mcg/l (senzitivita 63.3%; specifita 82.1%;  $P=0.002$ ); NSE den 2 >29 mcg/l (senzitivita 72.5%; specifita 94.4%;  $P<0.001$ ); NSE den 3 >20.7 mcg/l (senzitivita 94.4%; specifita 86.7%;  $P<0.001$ ); NSE den 4 >19.4 mcg/l (senzitivita 93.5%; specifita 91.0%;  $P<0.001$ ); a maximální hodnota NSE >27.6 mcg/l (senzitivita 91.2%; specifita 85.4%;  $P<0.001$ ) (Obrázek 17).



**Obrázek 17.** Vztah neuron specifické enolázy (NSE) ke špatné neurologické prognóze (CPC 3-5). AUC – plocha pod křivkou; MAX maximální

Porovnáním ROC křivek jsme zjistili, že prediktivní hodnota NSE 1. den po srdeční zástavě je významně nižší než 2., 3. a 4. den a maximální NSE (Tabulka 8). Numericky největší plocha pod křivkou byla 4. den po srdeční zástavě, následovaná 3. dnem a pak maximální hodnotou NSE (Tabulka 8, Obrázek 17).

**Tabulka 8.** Srovnání ROC křivek neuron-specifické enolázy v jednotlivých dnech pro špatnou krátkodobou neurologickou prognózu

ROC	Rozdíl AUC	95% Interval spolehlivosti	P
Den 1 - Den 2	0.277	0.074 - 0.480	0.0075
Den 1 - Den 3	0.273	0.072 - 0.474	0.0079
Den 1 - Den 4	0.296	0.095 - 0.498	0.0040
Den 1 - MAX	0.281	0.085 - 0.476	0.0049
Den 2 - Den 3	0.004	-0.016 - 0.023	0.6901
Den 2 - Den 4	0.020	-0.023 - 0.062	0.3646
Den 2 - MAX	0.004	-0.033 - 0.041	0.8349
Den 3 - Den 4	0.024	-0.015 - 0.062	0.2283
Den 3 - MAX	0.008	-0.029 - 0.045	0.6750
Den 4 - MAX	0.016	-0.020 - 0.051	0.3852

Hodnota NSE >39.8 mcg/l den 1 po srdeční zástavě je spojená se špatnou neurologickou prognózou (CPC 3-5) se 100% specifitou a 42% senzitivitou; NSE >51.1 mcg/l den 2 po srdeční zástavě byla spojená se špatnou neurologickou prognózou se 100% specifitou a 24% senzitivitou; NSE >49.2 mcg/l den 3 po srdeční zástavě byla spojená se špatnou neurologickou prognózou se 100% specifitou a 52% senzitivitou; NSE >50.2 mcg/l den 4 po srdeční zástavě byla asociovaná se špatnou neurologickou prognózou se 100%



specifitou a 42% senzitivitou; maximální hodnota NSE >57.1 mcg/l byla spojená s nepříznivou neurologickou prognózou se 100% specifitou a 51% senzitivitou. Multivariantní analýza ukázala, že NSE 3. den (P=0.002) a 4. den (P=0.007) po srdeční zástavě jsou nezávislými prediktory krátkodobé (30-denní) prognózy.

Avšak nejen absolutní hodnoty NSE, ale také rozdíly mezi absolutními hodnotami byly významně spojené s 30-denní neurologickou prognózou; nejvyšší prediktivní hodnotu pro špatnou neurologickou prognózu měla změna mezi 4. a 1. dnem po srdeční zástavě (Tabulka 9). Použití kombinace absolutních hodnot NSE u nemocných po srdeční zástavě s vývojem hladin může významně zvýšit prognostickou přesnost a přínos v klinické praxi: hodnota NSE 4. den >20.0 mcg/l; současně se změnou v hladině mezi 4. a 3. dnem >0.0 mcg/l (jakýkoli vzestup) predikuje špatnou neurologickou prognózu (CPC 3-5) se 100% specifitou a 73% senzitivitou.

**Tabulka 9.** ROC analýza rozdílů mezi individuálními hodnotami NSE pro predikci špatné 30-denní prognózy (CPC 3-5). Pro každou optimální cut-off hodnotu je uveden v závorce poměr  $100 \cdot (D_x - D_y) / D_x$ .

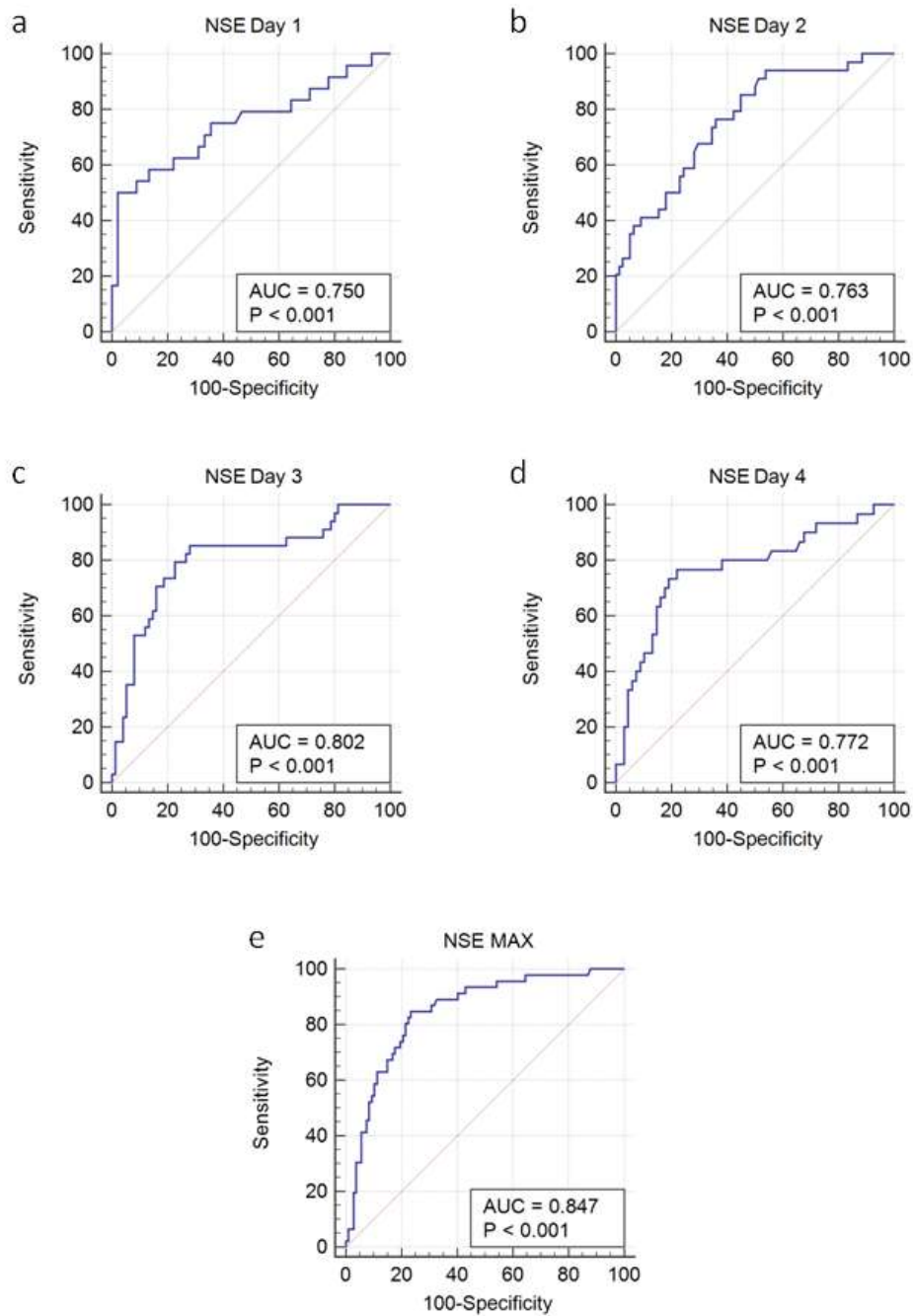
Rozdíl	Optimální cut-off	Senzitivita	Specifita	AUC	P
D2-D1	>5.3 mcg/L (>31%)	72.7%	90.6%	0.824	P<0.001
D3-D1	>7.1 mcg/L (>42%)	82.4%	92.3%	0.889	P<0.001
D4-D1	>4.0 mcg/L (>24%)	100.0%	90.9%	0.983	P<0.001
D3-D2	>2.1 mcg/L (>11%)	89.3%	86.2%	0.878	P<0.001
D4-D2	>11.5 mcg/L (>63%)	77.3%	95.8%	0.867	P<0.001
D4-D3	>3.8 mcg/L (>26%)	66.7%	96.4%	0.677	P<0.043

*AUC- plocha pod křivkou*

### **7.1.3.2. Hodnoty NSE a roční mortalita**

Pomocí ROC analýzy jsme našli následující optimální cut-off hodnoty pro NSE a predikci roční mortality: den 1  $>35.8$  mcg/l (senzitivita 50%; specifita 97.8%;  $P<0.001$ ); den 2  $>18.7$  mcg/l (senzitivita 76.5%; specifita 64.1%;  $P<0.001$ ); den 3  $>18.1$  mcg/l (senzitivita 85.3%; specifita 72.0%;  $P<0.001$ ); den 4  $>18.5$  mcg/l (senzitivita 76.7%; specifita 77.9%;  $P<0.001$ ); a maximální hodnota NSE  $>29.1$  mcg/l (senzitivita 84.8%; specifita 76.6%;  $P<0.001$ ) (Obrázek 18). Predikce roční mortality se 100% specifitou byla spojená s velmi nízkou senzitivitou, která nepřesáhla 20.6%. Mezi jednotlivými ROC křivkami pro NSE a roční mortalitu nebyl významný rozdíl; numericky největší plocha pod křivkou byla pro maximální hodnoty NSE, následována křivkou pro 3. a 4. den (Obrázek 18).

Multivariantní analýza ukázala, že maximální hodnota NSE byla nezávislým prediktorem mortality. Významná asociace s jednorocní mortalitou byla také nalezena pro vybrané změny mezi jednotlivými hodnotami NSE (Tabulka 10).



**Obrázek 18.** Vztah neuron-specifické enolázy (NSE) k roční mortalitě. AUC – plocha pod křivkou; MAX – maximum.

**Tabulka 10.** ROC analýza rozdílů mezi individuálními hodnotami NSE pro predikci roční mortality. Pro každou optimální cut-off hodnotu je uveden v závorce poměr  $100*(D_x-D_y)/D_x$ .

Rozdíl	Optimální cut-off	Senzitivita	Specifita	AUC	P
D2-D1	>6.8 mcg/L (>40%)	52.6%	80.2%	0.603	P=0.310
D3-D1	>1.5 mcg/L (>9%)	76.5%	73.1%	0.716	P=0.019
D4-D1	>7.1 mcg/L (>42%)	73.3%	90.0%	0.730	P=0,031
D3-D2	>2.1 mcg/L (>11%)	76.9%	78.3%	0.728	P=0.001
D4-D2	>11.5 mcg/L (>63%)	58.3%	89.1%	0.695	P=0.009
D4-D3	>4.3 mcg/L (>29%)	51.8%	92.7%	0.599	P=0.227

*AUC – plocha pod křivkou*

#### 7.1.4. Diskuse

Naše studie ukázala, že hladina NSE, měřená během prvních 4 dnů po přijetí do nemocnice po srdeční zástavě mimo nemocnici, je významně spojená s krátkodobou i dlouhodobou prognózou. Hlavním výsledkem této práce je pozorování, že prediktivní hodnota NSE závisí na čase, kdy byl proveden odběr krve ke stanovení NSE. Jako první jsme popsali významnou prognostickou hodnotu stanovení NSE 4. den po srdeční zástavě a ukázali jsme i významnou asociaci i mezi vývojem hodnot NSE a neurologickou prognózou, především změny mezi 1. a 4. dnem měření. Stanovení hodnot NSE 4. den po srdeční zástavě může být přínosné zvláště u pacientů, kteří zůstávají v bezvědomí 4. den po srdeční zástavě, kdy je určení prognózy zcela zásadní pro volbu dalšího léčebného postupu.

I když hladiny NSE ve všech jednotlivých dnech predikovaly 30-denní prognózu, naše pozorování ukazují, že asociace s klinickými výsledky je závislá na času odběru krve. Hodnota NSE měřená 1. den po srdeční zástavě měla nižší prediktivní hodnotu ve srovnání s ostatními dny a s maximální hodnotou NSE. Nejsilnější asociace s krátkodobou prognózou byla pozorována pro hladinu NSE, stanovenou 4. den po srdeční zástavě, těsně následována

hodnotou NSE, měřenou 3. den, a pak maximální hodnotou NSE. Na druhou stranu prediktivní hodnota pro dlouhodobou prognózu (roční mortalitu) se u jednotlivých měření NSE významně neliší. Numericky nejsilnější asociace byla nalezena pro maximální hodnotu NSE, následovaná hladinou NSE 3. a 4. den po kolapsu. Asociace s roční mortalitou byly nižší ve srovnání s 30-denními výsledky.

Mezinárodní doporučení pro nemocné po srdeční zástavě mimo nemocnici neobsahují konkrétní hodnotu NSE pro stanovení prognózy ani optimální čas pro odběr krve a nejednotná v tomto ohledu je i další dostupná literární evidence (7). Velká variabilita mezi publikovanými cut-off hodnotami NSE může být zapříčiněna velkou citlivostí měření na správný odběr krve, na manipulaci se vzorky a na skladování krevních vzorků – všechny uvedené procesy mohou způsobit hemolýzu, která vede k falešně zvýšeným hodnotám NSE (56, 106); výsledky měření mohou být ovlivněny i typem použité laboratorní metody (56, 106-107). Nelze také nezmínit, že většina publikovaných prací má velmi omezenou velikost studovaného souboru (7). Abychom minimalizovali riziko hemolýzy v naší práci, byly vzorky krve ihned po odebrání zpracované a uchovány při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$  maximálně po dobu jednoho týdne.

Naše výsledky jsou v souladu s dalšími publikovanými pracemi, které popisují vzájemný vztah mezi hodnotami NSE a prognózou nemocných po srdeční zástavě mimo nemocnici. Největší publikovaná studie s opakovaným měřením NSE byla analýza studie TTM (59), která zahrnovala 700 pacientů. Autoři našli vztah mezi hladinou NSE 24, 48 a 72 hodin po srdeční zástavě a 6-měsíční neurologickou prognózou, což je v souladu s našimi výsledky i přes značné rozdíly v metodách stanovení NSE a kontrolou tělesné teploty mezi TTM a naší studií. Srovnání hodnot plochy pod ROC křivkou mezi TTM a naší studií ukazuje, že plocha pro 6-měsíční výsledky v TTM je numericky menší než u 30-denních výsledků, ale vyšší než u roční mortality v naší práci. Lze předpokládat, že uvedený klesající

trend v čase po srdeční zástavě mimo nemocnici, odráží vyšší a přesnější prediktivní hodnotu NSE pro stanovení krátkodobé prognózy. Naše výsledky jsou v souladu s řadou dalších menších studií, které vyhodnocovaly opakované stanovení NSE a popsaly vztah mezi klinickými výsledky a hodnotami NSE (22, 25, 108-113). Žádná z výše zmíněných studií však nezahrnovala srovnání ROC křivek v jednotlivých dnech.

Naše studie má několik limitací. Jeden z hlavních nedostatků je omezený počet nemocných v našem souboru. Nicméně ve srovnání s jinými publikacemi, zabývajícími se touto problematikou, jen dvě práce měly větší soubor. O analytických metodách bylo částečně pojednáno už výše. Nedostatkem naší práce bylo, že jsme nehodnotili index hemolýzy v krevních vzorcích před stanovením NSE; pravděpodobnost arteficiální hemolýzy jsme však minimalizovali výše popsaným postupem s okamžitým zpracováním a krátkým skladováním vzorků. Ze souboru jsme také vyřadili nemocné, u kterých byla použita v léčbě intraaortální balónková kontrapulzace (IABK) nebo kteří podstoupili extrakorporální resuscitaci (oba uvedené léčebné postupy jsou známé jako faktory, zvyšující riziko hemolýzy a tím falešné zvýšení hladiny NSE). I tak však nemůžeme s jistotou vyloučit, že některé hladiny NSE v naší studii byly ovlivněné hemolýzou. Dalším podstatným nedostatkem byla absence hodnot NSE u nemocných, kteří zemřeli před odběrem krevního vzorku nebo kde vzorek nebyl k dispozici; tento fakt může snížit statistickou sílu naší analýzy, ale neměl by mít vliv na spolehlivost výsledků. Všichni pacienti v našem souboru byli léčeni terapeutickou hypotermií 33°C s pomocí endovaskulárního systému Thermogard XP. I když naše výsledky můžeme aplikovat pouze na podobnou skupinu nemocných, léčených terapeutickou hypotermií, jsou práce, které popisují, že terapeutická hypotermie pravděpodobně neovlivňuje hladiny NSE (22, 59, 114-115). V naší práci jsme hodnotili vztah hladin NSE ke krátkodobé prognóze a roční mortalitě. Dlouhodobá prognóza je podstatnější informace, avšak spolehlivé stanovení krátkodobé prognózy je užitečné jak ve volbě nejvhodnějšího diagnosticko-léčebného postupu, tak pro

informování rodiny pacienta. Přesto, že naše výsledky potvrzují významný prognostický přínos měření hladin NSE, jednotlivé hodnoty NSE mohou být ovlivněné typem laboratorní metody, hemolýzou nebo jinými faktory. S jistotou lze proto doporučit vyšetřování hodnot NSE u nemocných po srdeční zástavě mimo nemocnici jako aditivní prognostický nástroj, ale pouze v rámci multimodálního přístupu v souladu se současnými doporučeními Evropské Resuscitační Rady (7).

#### **7.1.5. Závěr**

Naše výsledky ukazují, že hodnota NSE je užitečný pomocný ukazatel pro stanovení krátkodobé (30-denní) neurologické prognózy a roční mortality u nemocných po srdeční zástavě, kteří jsou léčeni terapeutickou hypotermií s cílovou tělesnou teplotou 33°C. Nejvyšší prognostickou hodnotu mělo stanovení NSE 3. a 4. den po srdeční zástavě.

## 8. SOUHRN DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ

Naše výsledky ukázaly, že oxidativní stres hraje pravděpodobně aktivní úlohu v patogeneze oxidativního stresu, a že hypotermie oxidativní stres tlumí. Hladina ukazatelů oxidativního stresu však v naší práci měla jen slabý, i když statisticky významný vztah s klinickými výsledky a prognózou nemocných po srdeční zástavě. Potenciálně protektivní mechanismy, jako je ischemický postconditioning nebo podání NO, neměly lepší účinek než hypotermie na výši krevního tlaku, spotřebu vasopresorů, mozkovou oxygenaci či známky orgánového poškození, ani na ukazatele oxidativního stresu.

Potvrdili jsme tedy hypotézu, že na patogeneze poresuscitačního syndromu se významně podílí oxidativní stres. Naproti tomu se nepodařilo zcela potvrdit hypotézu, že hladina markerů oxidativního stresu odráží závažnost ischemicko-reperfuzního poškození a vyšší hladiny ukazatelů oxidativního stresu jsou spojeny s horší prognózou po srdeční zástavě.

Naše práce ukázala, že vstupní hladina kopeptinu (měřená při přijetí k hospitalizaci nemocného po srdeční zástavě) je významně vyšší u nemocných se špatnými klinickými výsledky a že vstupní hodnotu kopeptinu je možné využít k velmi časnému stanovení prognózy u nemocných o srdeční zástavě.

Potvrdili jsme tedy hypotézu, že těžší ischemické poškození při srdeční zástavě je spojeno s vyšší akutní sekrecí vasopresinu a proto hladina ukazatele této sekrece – kopeptinu – odráží závažnost stavu a její stanovení lze využít k časně predikci prognózy.

V neposlední řadě naše práce ukázala, že prediktivní hodnota neuron-specifické enolázy je významně závislá na čase odběru, nejvyšší prognostickou hodnotu má stanovení NSE 4. a 3 den. Vyšší prognostickou hodnotu jsme našli pro stanovení 30-denní



neurologické prognózy než pro určení roční mortality. Pomocí relativně jednoduchého postupu s využitím dvou hodnot NSE a jejich změny můžeme stanovit špatnou prognózu se 100% specificitou a vysokou, 73% senzitivitou.

Potvrdili jsme proto hypotézu, že prediktivní hodnota NSE pro stanovení prognózy po srdeční zástavě závisí na době odběru krevního vzorku (interval kolaps – odběr) a pro stratifikaci rizika lze využít nejen absolutní hodnoty NSE, ale i změny hladiny v čase.

## 9. LITERATURA

### 9.1. Publikace, které jsou podkladem dizertační práce, v časopisech s IF (Přílohy 1-4)

1. Vondrakova D, Kruger A, Janotka M, Malek F, Dudkova V, Neuzil P, Ostadal P. Association of neuron-specific enolase values with outcomes in cardiac arrest survivors is dependent on the time of sample collection. *Crit Care*. 2017 Jul 8;21(1):172. (IF 5.358)
2. Psotova H, Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, Janotka M, Vondrakova D, Svoboda T, Hrachovina M, Taborsky L, Dudkova V, Strunina S, Kittnar O, Neuzil P. Ischemic Postconditioning and Nitric Oxide Administration Failed to Confer Protective Effects in a Porcine Model of Extracorporeal Cardiopulmonary Resuscitation. *Artif Organs*. 2016 Apr;40(4):353-9. (IF 2.403)
3. Ostadal P, Kruger A, Zdrahalova V, Janotka M, Vondrakova D, Neuzil P, Prucha M. Blood levels of copeptin on admission predict outcomes in out-of-hospital cardiac arrest survivors treated with therapeutic hypothermia. *Crit Care*. 2012 Oct 4;16(5):R187. (IF 5.358)
4. Krüger A, Ošťádal P, Vondráková D, Janotka M, Herget J. Nitrotyrosine and nitrate/nitrite levels in cardiac arrest survivors treated with endovascular hypothermia. *Physiol Res*. 2012;61(4):425-30. (1.461)

### 9.2. Publikace autora, nesouvisející s dizertační prací v časopisech s IF

1. Ostadal P, Rokyta R, Kruger A, Vondrakova D, Janotka M, Smíd O, Smalcova J, Hromadka M, Linhart A, Bělohávek J. Extra-corporeal membrane oxygenation in the therapy of cardiogenic shock (ECMO-CS): rationale and design of the multicenter randomized trial. *Eur J Heart Fail*. 2017 May;19 Suppl 2:124-127. (IF 6.526)

2. Ostadal P, Mlcek M, Strunina S, Hrachovina M, Kruger A, Vondrakova D, Janotka M, Hala P, Kittnar O, Neuzil P. Novel porcine model of acute severe cardiogenic shock developed by upper-body hypoxia. *Physiol Res.* 2016 Nov 8;65(4):711-715. **(1.461)**
3. Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, Hala P, Lacko S, Mates M, Vondrakova D, Svoboda T, Hrachovina M, Janotka M, Psotova H, Strunina S, Kittnar O, Neuzil P. Increasing venoarterial extracorporeal membrane oxygenation flow negatively affects left ventricular performance in a porcine model of cardiogenic shock. *J Transl Med.* 2015 Aug 15;13:266. **(IF 3.786)**
4. Littnerova S, Parenica J, Spinar J, Vitovec J, Linhart A, Widimsky P, Jarkovsky J, Miklik R, Spinarova L, Zeman K, Belohlavek J, Malek F, Felsoci M, Kettner J, Ostadal P, Cihalik C, Spac J, Al-Hiti H, Fedorco M, Fojt R, Kruger A, Malek J, Mikusová T, Monhart Z, Bohacova S, Pohludkova L, Rohac F, Vaclavik J, Vondrakova D, Vyskocilova K, Bambuch M, Dusek L. Positive influence of being overweight/obese on long term survival in patients hospitalised due to acute heart failure. *PLoS One.* 2015 Feb 24;10(2):e0117142. **(IF 2.806)**
5. Ostadal P, Kruger A, Vondrakova D, Janotka M, Psotova H, Neuzil P. Noninvasive assessment of hemodynamic variables using near-infrared spectroscopy in patients experiencing cardiogenic shock and individuals undergoing venoarterial extracorporeal membrane oxygenation. *J Crit Care.* 2014 Aug;29(4):690.e11-5. **(IF 2.648)**
6. Ostadal P, Vondrakova D, Kruger A, Janotka M, Psotova H, Prucha M. Alteration in lipoprotein-associated phospholipase A2 levels during acute coronary syndrome and its relationship to standard biomarkers. *Lipids Health Dis.* 2012 Nov10;11:153. **(IF 2.073)**
7. Málek F, Ošťádal P, Pařenica J, Jarkovský J, Vítovec J, Widimský P, Linhart A, Fedorco M, Coufal Z, Miklík R, Krüger A, Vondráková D, Špinar J. Uric acid, allopurinol therapy, and mortality in patients with acute heart failure--results of the Acute HEart FAilure Database registry. *J Crit Care.* 2012 Dec;27(6):737.e11-24. **(IF 2.648)**

8. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* 2010 Dec;345(1-2):91-104. (IF 2.669)
9. Vondrakova D, Ostadal P, Kruger A. Immediate effect of intensive atorvastatin therapy on lipid parameters in patients with acute coronary syndrome. *Lipids Health Dis.* 2010 Jul 14;9:71. (IF 2.073)
10. Vondráková D, Málek F, Ošťádal P, Vránová J, Sedláčková L, Šedivá L, Petřů J, Škoda J, Neužil P. Short term effect of CRT on biomarkers of cardiac remodelling and fibrosis: NT-proBNP, sST2, galectin-3, and a marker of oxidative stress--ceruloplasmin--a pilot study. *Int J Cardiol.* 2012 Aug 23;159(2):159-60. (IF 6.189)
11. Vondráková D, Málek F, Ošťádal P, Vránová J, Miroslav P, Schejbalová M, Neužil P. Correlation of NT-proBNP, proANP and novel biomarkers: copeptin and proadrenomedullin with LVEF and NYHA in patients with ischemic CHF, non-ischemic CHF and arterial hypertension. *Int J Cardiol.* 2011 Aug 4;150(3):343-4. (IF 6.189)
12. Kutil B, Ostadal P, Vejvoda J, Kukacka J, Cepova J, Alan D, Krüger A, Vondrakova D. Alterations in serum selenium levels and their relation to troponin I in acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2010 Dec;345(1-2):23-7. (IF 2.669)

### **9.3. Použitá literatura**

1. Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A consensus statement from the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, European Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Asia, and the Resuscitation Council of Southern Africa); the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the

Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; and the Stroke Council. *Circulation*. 2008;118(23):2452-83. Epub 2008/10/25.

2. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation*. 2008;79(3):350-79. Epub 2008/10/31.

3. Grasner JT, Lefering R, Koster RW, Masterson S, Bottiger BW, Herlitz J, et al. EuReCa ONE-27 Nations, ONE Europe, ONE Registry: A prospective one month analysis of out-of-hospital cardiac arrest outcomes in 27 countries in Europe. *Resuscitation*. 2016;105:188-95. Epub 2016/06/21.

4. Hollenberg J, Svensson L, Rosenqvist M. Out-of-hospital cardiac arrest: 10 years of progress in research and treatment. *Journal of internal medicine*. 2013;273(6):572-83.

5. Perkins GD, Handley AJ, Koster RW, Castren M, Smyth MA, Olasveengen T, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 2. Adult basic life support and automated external defibrillation. *Resuscitation*. 2015;95:81-99.

6. Soar J, Nolan JP, Bottiger BW, Perkins GD, Lott C, Carli P, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 3. Adult advanced life support. *Resuscitation*. 2015;95:100-47. Epub 2015/10/20.

7. Nolan JP, Soar J, Cariou A, Cronberg T, Moolaert VR, Deakin CD, et al. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines for Post-

resuscitation Care 2015: Section 5 of the European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015. *Resuscitation*. 2015;95:202-22. Epub 2015/10/20.

8. Negovsky VA, Gurvitch AM. Post-resuscitation disease--a new nosological entity. Its reality and significance. *Resuscitation*. 1995;30(1):23-7.

9. HACA-Study-Group. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *The New England journal of medicine*. 2002;346(8):549-56. Epub 2002/02/22.

10. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *The New England journal of medicine*. 2002;346(8):557-63. Epub 2002/02/22.

11. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C, et al. Targeted temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest. *The New England journal of medicine*. 2013;369(23):2197-206.

12. Lombardi G, Gallagher J, Gennis P. Outcome of out-of-hospital cardiac arrest in New York City. The Pre-Hospital Arrest Survival Evaluation (PHASE) Study. *JAMA*. 1994;271(9):678-83. Epub 1994/03/02.

13. Levy DE, Caronna JJ, Singer BH, Lapinski RH, Frydman H, Plum F. Predicting outcome from hypoxic-ischemic coma. *JAMA*. 1985;253(10):1420-6. Epub 1985/03/08.

14. Wijdicks EF, Hijdra A, Young GB, Bassetti CL, Wiebe S. Practice parameter: prediction of outcome in comatose survivors after cardiopulmonary resuscitation (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2006;67(2):203-10. Epub 2006/07/26.

15. Rossetti AO, Oddo M. The neuro-ICU patient and electroencephalography paroxysms: if and when to treat. *Curr Opin Crit Care*. 2010. Epub 2010/01/26.

16. Rossetti AO, Logroscino G, Liaudet L, Ruffieux C, Ribordy V, Schaller MD, et al. Status epilepticus: an independent outcome predictor after cerebral anoxia. *Neurology*. 2007;69(3):255-60. Epub 2007/07/20.
17. Rossetti AO, Oddo M, Liaudet L, Kaplan PW. Predictors of awakening from postanoxic status epilepticus after therapeutic hypothermia. *Neurology*. 2009;72(8):744-9. Epub 2009/02/25.
18. Bouwes A, Binnekade JM, Zandstra DF, Koelman JH, van Schaik IN, Hijdra A, et al. Somatosensory evoked potentials during mild hypothermia after cardiopulmonary resuscitation. *Neurology*. 2009;73(18):1457-61. Epub 2009/11/04.
19. Oddo M, Rossetti AO. Predicting neurological outcome after cardiac arrest. *Curr Opin Crit Care*. 2011;17(3):254-9. Epub 2011/02/25.
20. Leithner C, Ploner CJ, Hasper D, Storm C. Does hypothermia influence the predictive value of bilateral absent N20 after cardiac arrest? *Neurology*. 2010;74(12):965-9. Epub 2010/03/24.
21. Fugate JE, Wijdicks EF, Mandrekar J, Claassen DO, Manno EM, White RD, et al. Predictors of neurologic outcome in hypothermia after cardiac arrest. *Ann Neurol*. 2010;68(6):907-14. Epub 2010/11/10.
22. Tiainen M, Roine RO, Pettila V, Takkunen O. Serum neuron-specific enolase and S-100B protein in cardiac arrest patients treated with hypothermia. *Stroke*. 2003;34(12):2881-6. Epub 2003/11/25.
23. Bottiger BW, Mobes S, Glatzer R, Bauer H, Gries A, Bartsch P, et al. Astroglial protein S-100 is an early and sensitive marker of hypoxic brain damage and outcome after cardiac arrest in humans. *Circulation*. 2001;103(22):2694-8. Epub 2001/06/08.
24. Shinozaki K, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Abe R, Nakada TA, et al. Serum S-100B is superior to neuron-specific enolase as an early prognostic biomarker for neurological

outcome following cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2009;80(8):870-5. Epub 2009/06/19.

25. Mortberg E, Zetterberg H, Nordmark J, Blennow K, Rosengren L, Rubertsson S. S-100B is superior to NSE, BDNF and GFAP in predicting outcome of resuscitation from cardiac arrest with hypothermia treatment. *Resuscitation*. 2011;82(1):26-31. Epub 2010/11/13.

26. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84. Epub 2006/09/19.

27. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000;18(6):655-73. Epub 2000/06/29.

28. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2000;47(3):446-56. Epub 2000/08/30.

29. Candeias LP, Steenken S. Reaction of HO\* with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H)\*. *Chemistry*. 2000;6(3):475-84. Epub 2000/04/05.

30. Redon J, Oliva MR, Tormos C, Giner V, Chaves J, Iradi A, et al. Antioxidant activities and oxidative stress byproducts in human hypertension. *Hypertension*. 2003;41(5):1096-101. Epub 2003/04/23.

31. Di Minno A, Turnu L, Porro B, Squellerio I, Cavalca V, Tremoli E, et al. 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Levels and Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Literature. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24(10):548-55. Epub 2015/12/10.

32. Nagayoshi Y, Kawano H, Hokamaki J, Uemura T, Soejima H, Kaikita K, et al. Differences in oxidative stress markers based on the aetiology of heart failure: comparison of



oxidative stress in patients with and without coronary artery disease. *Free Radic Res.* 2009;43(12):1159-66. Epub 2009/11/13.

33. Himmetoglu S, Dincer Y, Bozcali E, Ali Vural V, Akcay T. Oxidative DNA damage and antioxidant defense after reperfusion in acute myocardial infarction. *J Investig Med.* 2009;57(4):595-9. Epub 2009/02/26.

34. Kruger A, Ostadal P, Vondrakova D, Janotka M, Herget J. Nitrotyrosine and nitrate/nitrite levels in cardiac arrest survivors treated with endovascular hypothermia. *Physiol Res.* 2012;61(4):425-30. Epub 2012/06/08.

35. Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, Horakova S, Skabradova M, Holy F, et al. Mild therapeutic hypothermia is superior to controlled normothermia for the maintenance of blood pressure and cerebral oxygenation, prevention of organ damage and suppression of oxidative stress after cardiac arrest in a porcine model. *J Transl Med.* 2013;11:124. Epub 2013/05/22.

36. Morgenthaler NG, Struck J, Jochberger S, Dunser MW. Copeptin: clinical use of a new biomarker. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19(2):43-9. Epub 2008/02/23.

37. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit Care.* 2003;7(6):427-34. Epub 2003/11/20.

38. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 2001;81(2):629-83. Epub 2001/03/29.

39. Garcia-Villalon AL, Garcia JL, Fernandez N, Monge L, Gomez B, Dieguez G. Regional differences in the arterial response to vasopressin: role of endothelial nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 1996;118(7):1848-54. Epub 1996/08/01.

40. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(21):11704-9. Epub 1997/10/23.

41. Holmes CL, Landry DW, Granton JT. Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology. *Crit Care*. 2004;8(1):15-23. Epub 2004/02/21.
42. Boyle WA, 3rd, Segel LD. Attenuation of vasopressin-mediated coronary constriction and myocardial depression in the hypoxic heart. *Circ Res*. 1990;66(3):710-21. Epub 1990/03/01.
43. Chatterjee K. Neurohormonal activation in congestive heart failure and the role of vasopressin. *Am J Cardiol*. 2005;95(9A):8B-13B. Epub 2005/04/26.
44. Fukuzawa J, Haneda T, Kikuchi K. Arginine vasopressin increases the rate of protein synthesis in isolated perfused adult rat heart via the V1 receptor. *Mol Cell Biochem*. 1999;195(1-2):93-8. Epub 1999/07/08.
45. Fan YH, Zhao LY, Zheng QS, Dong H, Wang HC, Yang XD. Arginine vasopressin increases iNOS-NO system activity in cardiac fibroblasts through NF-kappaB activation and its relation with myocardial fibrosis. *Life Sci*. 2007;81(4):327-35. Epub 2007/07/03.
46. Preibisz JJ, Sealey JE, Laragh JH, Cody RJ, Weksler BB. Plasma and platelet vasopressin in essential hypertension and congestive heart failure. *Hypertension*. 1983;5(2 Pt 2):I129-38. Epub 1983/03/01.
47. Vondrakova D, Malek F, Ostadal P, Kruger A, Neuzil P. New biomarkers and heart failure. *Cor et Vasa*. 2013;55:e345-e54.
48. Stoiser B, Mortl D, Hulsmann M, Berger R, Struck J, Morgenthaler NG, et al. Copeptin, a fragment of the vasopressin precursor, as a novel predictor of outcome in heart failure. *Eur J Clin Invest*. 2006;36(11):771-8. Epub 2006/10/13.
49. Neuhold S, Huelsmann M, Strunk G, Stoiser B, Struck J, Morgenthaler NG, et al. Comparison of copeptin, B-type natriuretic peptide, and amino-terminal pro-B-type natriuretic

peptide in patients with chronic heart failure: prediction of death at different stages of the disease. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(4):266-72. Epub 2008/07/19.

50. Khan SQ, Dhillon OS, O'Brien RJ, Struck J, Quinn PA, Morgenthaler NG, et al. C-terminal proavopressin (copeptin) as a novel and prognostic marker in acute myocardial infarction: Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide (LAMP) study. *Circulation.* 2007;115(16):2103-10. Epub 2007/04/11.

51. Kelly D, Squire IB, Khan SQ, Quinn P, Struck J, Morgenthaler NG, et al. C-terminal proavopressin (copeptin) is associated with left ventricular dysfunction, remodeling, and clinical heart failure in survivors of myocardial infarction. *J Card Fail.* 2008;14(9):739-45. Epub 2008/11/11.

52. Masson S, Latini R, Carbonieri E, Moretti L, Rossi MG, Ciricugno S, et al. The predictive value of stable precursor fragments of vasoactive peptides in patients with chronic heart failure: data from the GISSI-heart failure (GISSI-HF) trial. *Eur J Heart Fail.* 2010;12(4):338-47. Epub 2010/01/26.

53. Vizin T, Kos J. Gamma-enolase: a well-known tumour marker, with a less-known role in cancer. *Radiol Oncol.* 2015;49(3):217-26. Epub 2015/09/25.

54. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965;19(6):739-44. Epub 1965/06/09.

55. Moore BW, McGregor D. Chromatographic and Electrophoretic Fractionation of Soluble Proteins of Brain and Liver. *J Biol Chem.* 1965;240:1647-53. Epub 1965/04/01.

56. Rundgren M, Cronberg T, Friberg H, Isaksson A. Serum neuron specific enolase - impact of storage and measuring method. *BMC Res Notes.* 2014;7:726. Epub 2014/10/17.

57. Johnsson P, Blomquist S, Luhrs C, Malmkvist G, Alling C, Solem JO, et al. Neuron-specific enolase increases in plasma during and immediately after extracorporeal circulation. *The Annals of thoracic surgery.* 2000;69(3):750-4. Epub 2000/04/06.

58. Zandbergen EG, Hijdra A, Koelman JH, Hart AA, Vos PE, Verbeek MM, et al. Prediction of poor outcome within the first 3 days of postanoxic coma. *Neurology*. 2006;66(1):62-8. Epub 2006/01/13.
59. Stammet P, Collignon O, Hassager C, Wise MP, Hovdenes J, Aneman A, et al. Neuron-Specific Enolase as a Predictor of Death or Poor Neurological Outcome After Out-of-Hospital Cardiac Arrest and Targeted Temperature Management at 33 degrees C and 36 degrees C. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(19):2104-14. Epub 2015/05/16.
60. Liu L, Yenari MA. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front Biosci*. 2007;12:816-25. Epub 2006/11/28.
61. Busto R, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke*. 1989;20(7):904-10. Epub 1989/07/01.
62. Deng H, Han HS, Cheng D, Sun GH, Yenari MA. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke*. 2003;34(10):2495-501. Epub 2003/09/13.
63. Lee JE, Yoon YJ, Moseley ME, Yenari MA. Reduction in levels of matrix metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke. *J Neurosurg*. 2005;103(2):289-97. Epub 2005/09/24.
64. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(2):H579-88. Epub 2003/07/16.
65. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005;112(14):2143-8. Epub 2005/09/28.

66. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, Valen G, Vaage J. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;25(6):1006-10. Epub 2004/05/18.
67. Segal N, Matsuura T, Caldwell E, Sarraf M, McKnite S, Zviman M, et al. Ischemic postconditioning at the initiation of cardiopulmonary resuscitation facilitates functional cardiac and cerebral recovery after prolonged untreated ventricular fibrillation. *Resuscitation*. 2012;83(11):1397-403. Epub 2012/04/24.
68. Jones SP, Greer JJ, Kakkar AK, Ware PD, Turnage RH, Hicks M, et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(1):H276-82. Epub 2003/09/13.
69. Elrod JW, Greer JJ, Bryan NS, Langston W, Szot JF, Gebregzlabher H, et al. Cardiomyocyte-specific overexpression of NO synthase-3 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(7):1517-23. Epub 2006/04/29.
70. Hannan RL, John MC, Kouretas PC, Hack BD, Matherne GP, Laubach VE. Deletion of endothelial nitric oxide synthase exacerbates myocardial stunning in an isolated mouse heart model. *J Surg Res*. 2000;93(1):127-32. Epub 2000/08/18.
71. Mangus DB, Huang L, Applegate PM, Gatling JW, Zhang J, Applegate RL, 2nd. A systematic review of neuroprotective strategies after cardiac arrest: from bench to bedside (Part I - Protection via specific pathways). *Medical gas research*. 2014;4:9.
72. Kruzliak P, Pechanova O, Kara T. New perspectives of nitric oxide donors in cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation treatment. *Heart Fail Rev*. 2014;19(3):383-90. Epub 2013/05/29.
73. Ichinose F. Improving outcomes after cardiac arrest using NO inhalation. *Trends Cardiovasc Med*. 2013;23(2):52-8. Epub 2013/01/08.

74. Yannopoulos D, Segal N, Matsuura T, Sarraf M, Thorsgard M, Caldwell E, et al. Ischemic post-conditioning and vasodilator therapy during standard cardiopulmonary resuscitation to reduce cardiac and brain injury after prolonged untreated ventricular fibrillation. *Resuscitation*. 2013;84(8):1143-9. Epub 2013/02/05.
75. Meybohm P, Gruenewald M, Zacharowski KD, Albrecht M, Lucius R, Foesel N, et al. Mild hypothermia alone or in combination with anesthetic post-conditioning reduces expression of inflammatory cytokines in the cerebral cortex of pigs after cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care*. 2010;14(1):R21. Epub 2010/02/18.
76. Nishida T, Yu JD, Minamishima S, Sips PY, Searles RJ, Buys ES, et al. Protective effects of nitric oxide synthase 3 and soluble guanylate cyclase on the outcome of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *Crit Care Med*. 2009;37(1):256-62. Epub 2008/12/04.
77. Minamishima S, Bougaki M, Sips PY, Yu JD, Minamishima YA, Elrod JW, et al. Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation*. 2009;120(10):888-96. Epub 2009/08/26.
78. Minamishima S, Kida K, Tokuda K, Wang H, Sips PY, Kosugi S, et al. Inhaled nitric oxide improves outcomes after successful cardiopulmonary resuscitation in mice. *Circulation*. 2011;124(15):1645-53. Epub 2011/09/21.
79. Kida K, Shirozu K, Yu B, Mandeville JB, Bloch KD, Ichinose F. Beneficial effects of nitric oxide on outcomes after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in hypothermia-treated mice. *Anesthesiology*. 2014;120(4):880-9. Epub 2014/02/06.
80. Yang M, Angel MF, Pang Y, Angel JJ, Wang Z, Neumeister MW, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in muscle flaps treated with ischemic postconditioning. *Hand (N Y)*. 2012;7(3):297-302. Epub 2013/09/03.

81. Zoerner F, Wiklund L, Miclescu A, Martijn C. Therapeutic hypothermia activates the endothelin and nitric oxide systems after cardiac arrest in a pig model of cardiopulmonary resuscitation. *PLoS One*. 2013;8(5):e64792. Epub 2013/05/30.
82. Sunde K, Pytte M, Jacobsen D, Mangschau A, Jensen LP, Smedsrud C, et al. Implementation of a standardised treatment protocol for post resuscitation care after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 2007;73(1):29-39. Epub 2007/01/30.
83. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271(5 Pt 1):C1424-37. Epub 1996/11/01.
84. Fisarkova B, Vytasek R, Mikova D, Vizek M. Hyperoxia attenuated nitrotyrosine concentration in the lung tissue of rats with experimental pneumonia. *Physiol Res*. 2004;53(5):487-92. Epub 2004/10/14.
85. Jennett B, Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet*. 1975;1(7905):480-4. Epub 1975/03/01.
86. Hayashi N, Utagawa A, Kinoshita K, Izumi T. Application of a novel technique for clinical evaluation of nitric oxide-induced free radical reactions in ICU patients. *Cell Mol Neurobiol*. 1999;19(1):3-17. Epub 1999/03/18.
87. Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Hypothermia attenuates oxidative/nitrosative stress, encephalopathy and brain edema in acute (ischemic) liver failure. *Neurochem Int*. 2009;55(1-3):124-8. Epub 2009/05/12.
88. Fiskum G, Danilov CA, Mehrabian Z, Bambrick LL, Kristian T, McKenna MC, et al. Postischemic oxidative stress promotes mitochondrial metabolic failure in neurons and astrocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:129-38. Epub 2008/12/17.
89. Stefanutti G, Pierro A, Vinardi S, Spitz L, Eaton S. Moderate hypothermia protects against systemic oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock*. 2005;24(2):159-64. Epub 2005/07/27.

90. Scumpia PO, Sarcia PJ, Kelly KM, DeMarco VG, Skimming JW. Hypothermia induces anti-inflammatory cytokines and inhibits nitric oxide and myeloperoxidase-mediated damage in the hearts of endotoxemic rats. *Chest*. 2004;125(4):1483-91. Epub 2004/04/14.
91. Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, Yenari MA. Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *J Neurosci*. 2002;22(10):3921-8. Epub 2002/05/23.
92. Karabiyikoglu M, Han HS, Yenari MA, Steinberg GK. Attenuation of nitric oxide synthase isoform expression by mild hypothermia after focal cerebral ischemia: variations depending on timing of cooling. *J Neurosurg*. 2003;98(6):1271-6. Epub 2003/06/21.
93. Lei B, Tan X, Cai H, Xu Q, Guo Q. Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. *Stroke*. 1994;25(1):147-52. Epub 1994/01/01.
94. Wenisch C, Narzt E, Sessler DI, Parschalk B, Lenhardt R, Kurz A, et al. Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. *Anesthesia and analgesia*. 1996;82(4):810-6. Epub 1996/04/01.
95. Bayir H, Adelson PD, Wisniewski SR, Shore P, Lai Y, Brown D, et al. Therapeutic hypothermia preserves antioxidant defenses after severe traumatic brain injury in infants and children. *Crit Care Med*. 2009;37(2):689-95. Epub 2008/12/31.
96. Katan M, Christ-Crain M. The stress hormone copeptin: a new prognostic biomarker in acute illness. *Swiss Med Wkly*. 2010;140:w13101. Epub 2010/09/28.
97. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Leuppi J, Miedinger D, Bingisser R, et al. Copeptin, C-reactive protein, and procalcitonin as prognostic biomarkers in acute exacerbation of COPD. *Chest*. 2007;131(4):1058-67. Epub 2007/04/12.



98. Katan M, Fluri F, Morgenthaler NG, Schuetz P, Zweifel C, Bingisser R, et al. Copeptin: a novel, independent prognostic marker in patients with ischemic stroke. *Ann Neurol*. 2009;66(6):799-808. Epub 2009/12/26.
99. Potocki M, Reichlin T, Thalmann S, Zellweger C, Twerenbold R, Reiter M, et al. Diagnostic and prognostic impact of copeptin and high-sensitivity cardiac troponin T in patients with pre-existing coronary artery disease and suspected acute myocardial infarction. *Heart*. 2012;98(7):558-65. Epub 2012/02/18.
100. Narayan H, Dhillon OS, Quinn PA, Struck J, Squire IB, Davies JE, et al. C-terminal pro-vasopressin (copeptin) as a prognostic marker after acute non-ST elevation myocardial infarction: Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide II (LAMP II) study. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121(2):79-89. Epub 2011/02/12.
101. Miller WL, Hartman KA, Grill DE, Struck J, Bergmann A, Jaffe AS. Serial measurements of midregion proANP and copeptin in ambulatory patients with heart failure: incremental prognostic value of novel biomarkers in heart failure. *Heart*. 2012;98(5):389-94. Epub 2011/12/24.
102. Alehagen U, Dahlstrom U, Rehfeld JF, Goetze JP. Association of copeptin and N-terminal proBNP concentrations with risk of cardiovascular death in older patients with symptoms of heart failure. *JAMA*. 2011;305(20):2088-95. Epub 2011/05/26.
103. Nickel CH, Ruedinger J, Misch F, Blume K, Maile S, Schulte J, et al. Copeptin and peroxiredoxin-4 independently predict mortality in patients with nonspecific complaints presenting to the emergency department. *Acad Emerg Med*. 2011;18(8):851-9. Epub 2011/08/17.
104. Jarai R, Mahla E, Perkmann T, Archan S, Tentzeris I, Huber K, et al. Usefulness of pre-operative copeptin concentrations to predict post-operative outcome after major vascular surgery. *Am J Cardiol*. 2011;108(8):1188-95. Epub 2011/07/30.

105. Kim JJ, Hyun SY, Hwang SY, Jung YB, Shin JH, Lim YS, et al. Hormonal responses upon return of spontaneous circulation after cardiac arrest: a retrospective cohort study. *Crit Care*. 2011;15(1):R53. Epub 2011/02/09.
106. Mlynash M, Buckwalter MS, Okada A, Caulfield AF, Venkatasubramanian C, Eynhorn I, et al. Serum neuron-specific enolase levels from the same patients differ between laboratories: assessment of a prospective post-cardiac arrest cohort. *Neurocrit Care*. 2013;19(2):161-6. Epub 2013/07/11.
107. Stern P, Bartos V, Uhrova J, Bezdickova D, Vanickova Z, Tichy V, et al. Performance characteristics of seven neuron-specific enolase assays. *Tumour Biol*. 2007;28(2):84-92. Epub 2007/01/30.
108. Huntgeburth M, Adler C, Rosenkranz S, Zobel C, Haupt WF, Dohmen C, et al. Changes in neuron-specific enolase are more suitable than its absolute serum levels for the prediction of neurologic outcome in hypothermia-treated patients with out-of-hospital cardiac arrest. *Neurocrit Care*. 2014;20(3):358-66. Epub 2013/07/10.
109. Cronberg T, Rundgren M, Westhall E, Englund E, Siemund R, Rosen I, et al. Neuron-specific enolase correlates with other prognostic markers after cardiac arrest. *Neurology*. 2011;77(7):623-30. Epub 2011/07/22.
110. Storm C, Nee J, Jorres A, Leithner C, Hasper D, Ploner CJ. Serial measurement of neuron specific enolase improves prognostication in cardiac arrest patients treated with hypothermia: a prospective study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 2012;20:6. Epub 2012/01/31.
111. Daubin C, Quentin C, Allouche S, Etard O, Gaillard C, Seguin A, et al. Serum neuron-specific enolase as predictor of outcome in comatose cardiac-arrest survivors: a prospective cohort study. *BMC Cardiovasc Disord*. 2011;11:48. Epub 2011/08/10.

112. Bouwes A, Binnekade JM, Kuiper MA, Bosch FH, Zandstra DF, Toornvliet AC, et al. Prognosis of coma after therapeutic hypothermia: a prospective cohort study. *Ann Neurol*. 2012;71(2):206-12. Epub 2012/03/01.
113. Oksanen T, Tiainen M, Skrifvars MB, Varpula T, Kuitunen A, Castren M, et al. Predictive power of serum NSE and OHCA score regarding 6-month neurologic outcome after out-of-hospital ventricular fibrillation and therapeutic hypothermia. *Resuscitation*. 2009;80(2):165-70. Epub 2008/10/29.
114. Steffen IG, Hasper D, Ploner CJ, Schefold JC, Dietz E, Martens F, et al. Mild therapeutic hypothermia alters neuron specific enolase as an outcome predictor after resuscitation: 97 prospective hypothermia patients compared to 133 historical non-hypothermia patients. *Crit Care*. 2010;14(2):R69. Epub 2010/04/21.
115. Pfeifer R, Franz M, Figulla HR. Hypothermia after cardiac arrest does not affect serum levels of neuron-specific enolase and protein S-100b. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 2014;58(9):1093-100. Epub 2014/09/03.

# **Příloha 1**

## **Příloha 2**

# **Příloha 3**

# **Příloha 4**