

**Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta**

FYZIOLOGIE A PATOFYZIOLOGIE ČLOVĚKA



MUDr. Jan Máca

**Role alarminů v perioperační medicíně
Role of alarmins in perioperative medicine**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Ostrava 2018

Doktorand:

MUDr. Jan Máca

Pracoviště:

- Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Fakultní nemocnice
Ostrava-Poruba
17. listopadu 1790
Ostrava-Poruba, 708 52
tel. +420 597 371 111, +420 738 141 111
- Katedra intenzivní medicíny, urgentní medicíny a forezních oborů, Lékařská fakulta,
Ostravská univerzita v Ostravě
Syllabova 19
Ostrava-Zábřeh, 703 00
tel. +420 597 091 111, +420 553 461 111

Školitel:

prof. MUDr. Michal Holub, Ph.D.

Pracoviště:

- Klinika infekčních nemocí 1. LF UK a ÚVN
U Vojenské nemocnice 1200
Praha 6, 169 02
tel. +420 973 208 333, +420 973 203 023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Dále prohlašuji, že všechny obrazové přílohy (tabulky a obrázky) jsou publikovány v této disertační práci se souhlasem vydavatele příslušných článků.

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

V Ostravě 30. 3. 2018

Jan Máca

.....

Identifikační záznam:

MÁČA, JAN. Role alarminů v perioperační medicíně. [Role of alarmins in perioperative medicine]. Ostrava, 2018. 130 s., 4 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Fyziologický Ústav, vedoucí práce prof. MUDr. Michal Holub, Ph.D.

Poděkování

Rád bych poděkoval:

svému školiteli, profesoru MUDr. Michalu Holubovi, Ph.D., za nesmírně vstřícný a přátelský přístup v rámci vedení celého studia a také za supervizi a významnou pomoc při realizaci vědecko-výzkumných projektů souvisejících i nesouvisejících s tématem studia.

panu profesoru MUDr. Pavlovi Ševčíkovi, CSc. za významnou profesní, vědeckou a osobní podporu, a za shovívavost při realizaci studijního plánu.

panu primáři RNDr. Zdeňkovi Švagerovi, Ph.D. za významnou pomoc v průběhu řešení doktorandského projektu a MUDr. Mirce Matýsové a MUDr. Simoně Arientové, Ph.D. za pomoc při jazykové revizi finálního dokumentu.

Projekt byl realizován v rámci grantové podpory Lékařské fakulty Ostravské univerzity SGS08/LF/2013, a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy SVV-260152.

Obsah

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST – PATOFYZIOLOGIE STERILNÍHO ZÁNĚTU	11
2.1 ROZPOZNÁVÁNÍ POŠKOZENÍ A TEORIE NEBEZPEČÍ.....	11
2.2 SIGNALIZACE POŠKOZENÍ	12
2.3 ALARMINY	20
2.3.1 PROTEINY S100A	21
2.3.3. HIGH MOBILITY GROUP BOX 1	25
2.3.2 PROTEINY TEPLOTNÍHO ŠOKU	26
2.2.4. OSTATNÍ ALARMINY	26
3. HYPOTÉZY	28
4. CÍLE PPROJEKTU	30
4.1 PRIMÁRNÍ CÍL	30
4.1 SEKUNDÁRNÍ CÍLE	30
5. MATERIÁL a METODIKA	32
5.1 CHARAKTERISTIKA STUDIE A STUDIJNÍ SKUPINY	32
5.2 DEFINICE A LOKALIZACE CHIRURGICKÉHO ZÁKROKU.....	34
5.3 STUDIJNÍ PROTOKOL A MĚŘENÍ.....	35
5.4 MATERIÁL A LABORATORNÍ METODIKA	39
5.5 STATISTICKÉ METODY	40
6. VÝSLEDKY	42
6.1 CHARAKTERISTIKA SKUPIN	42
6.2 VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ HYPOTÉZ.....	43
7. DISKUZE	53
8. ZÁVĚR.....	70
9. SOUHRN	71
10. SUMMARY	73
11. SEZNAM ZKRATEK.....	75
12. LITERATURA	79
13. SEZNAM OBRAZOVÝCH PŘÍLOH	88
14. PŘÍLOHY.....	90

1. ÚVOD

Zánětlivá odpověď (ZO) je základní reakcí organismu na poškození buněk a tkání různého typu. Jde o komplexní a vysoce konzervativní proces, do kterého jsou zapojeny základní součásti imunitního systému (vrozená a adaptivní imunita). Jednotlivé fáze zánětu jsou z pohledu časového průběhu neostře ohraničené, řada z nich probíhá paralelně, vzájemně se ovlivňují pozitivními i negativními zpětnými vazbami a jsou propojeny s řadou dalších funkčně významných, primárně neimunologických systémů (složky hemostázy, makrocirkulační systém a tkáňová mikrocirkulace). Cílem ZO je zvrát patologického procesu s cílem zachování strukturální a funkční integrity živého organismu. Za fyziologického stavu je výsledkem ZO reparace anebo regenerace poškozených tkání, zatímco za patologického stavu dochází k dlouhodobé poruše funkční nebo strukturální integrity cílové tkáně.

Zánět je iniciován rozpoznáním patologického signálu (poškození) infekčního či neinfekčního charakteru, kdy je primárně aktivován málo specifický a evolučně starý vrozený imunitní systém a poté je, podle potřeby, koordinovaně zapojen i adaptivní imunitní systém. Souběžně s aktivací imunitního systému v místě patologického procesu, jsou také iniciovány procesy vedoucí k ohraničení (kompartimentizaci) poškození, např. prokoagulační aktivita na postkapilární úrovni mikrocirkulace a protizánětlivé neurohumorální reakce mimo ložisko poškození. Účelem je regulace prozánětlivého stavu a zabránění nežádoucímu šíření (dekompartimentizaci) zánětu do okolních tkání a systému makroorganismu.

Pokud má působení vyvolávajícího inzultu nadhraniční (nepřiměřenou) intenzitu anebo dobu trvání, může dojít k dysregulaci ZO nejprve na lokální, a poté i na systémové úrovni. Zánět potom změní svůj původně příznivý (obranný, regulovaný) žádoucí charakter na nepříznivý (destruktivní, dysregulovaný) nežádoucí. Možným následkem je pak rozvoj nejen

tkáňové (orgánové) dysfunkce v místě původního inzultu, ale tento stav může vést k patofyziologickým změnám ve vzdálených orgánových systémech. Všechny faktory, které ovlivňují výsledný typ imunitní reakce (tzv. effector class of response), prozatím nejsou plně objasněny, a na toto téma se vedou již několik desítek let odborné diskuze (*Seong SY et al., 2004*).

Inzulty, které vedou k takovému poškození tkání, aby vyvolaly nežádoucí zánětlivou reakci, se dají orientačně rozdělit na dvě základní skupiny: 1) infekční a 2) neinfekční.

Infekční inzulty jsou již po mnoho desetiletí extenzivně zkoumány na všech výzkumných úrovních (experimentální a humánní studie). Za patogen může být považována jakákoliv bakteriální, virová, mykotická i parazitární infekce se schopností poškodit buňku. Imunitní systém rozpoznává konkrétní antigenní struktury mikrobiální stěny, produkty mikrobiálního metabolismu, toxiny, apod. Po rozpoznání dojde k příslušné reakci vedoucí v optimálním případě k lokální eliminaci patogenu, neutralizaci toxinu a vytvoření paměťové stopy (protilátkové a buněčné). Mezi **neinfekční inzulty** lze zařadit nadměrné působení mechanických, fyzikálních a chemických faktorů. Na podkladě těchto neinfekčních podnětů dochází k: a) přímé destrukci (nekróze) buněk spojené s nekontrolovaným, nebo jen částečně kontrolovaným (nekroptóza), vyplavením intracelulárního obsahu mimo buňku, b) tkáňové a buněčné ischemii, tj. snížené nebo úplné vymizení krevní perfúze spojené s hypoxií/anoxií tkáně společně se snížením přívodu nutričních substrátů a lokální aktivací mikrocirkulační koagulace, c) hromadění produktů anaerobního metabolismu (zvýšení intracelulární koncentrace kyseliny mléčné (laktát) provázené metabolickou acidózou) a d) po případném obnovení prokrvení tkáně, k tzv. reperfučnímu poškození spojenému s tvorbou nadměrného množství reaktivních kyslíkových (ROS) a dusíkových (RNS) sloučenin, oxidativním poškozením různých buněčných struktur (enzymatické systémy, nukleové kyseliny, apod.) a dysregulaci redoxní signalizace (*Lee MY et al., 2008*).

K inzultům, které mají potenciál vyvolat systémovou reakci, tzv. syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS), lze zařadit i rozsáhlé chirurgické výkony. Tyto extenzivní výkony jsou obvykle provázeny tkáňovým poškozením, které zahrnuje lokální mechanický a termický stres, krvácení provázené lokální tkáňovou hypoxií a ischemicko-reperfúzním poškozením.

Zvyšující se počet extenzivních chirurgických výkonů je považován v posledních letech za velký problém zdravotní péče (*Barrie PS et al., 2000; Khuri SF et al., 2005; Jakobson T et al., 2014; Dobson GP et al., 2015*). Tyto výkony často vedou ke klinickému obrazu v literatuře popsanému jako tzv. critical surgical illness (*Barrie PS et al., 2000*). Mezi klíčové faktory zvyšující riziko nepříznivého klinického výsledku chirurgických pacientů se řadí: pokročilý věk, komorbidity a rozsah a neodkladnost výkonu (*Pearse RM et al., 2006; Jhanji S et al., 2008*). Odhaduje se, že se každý rok celosvětově provede až 234 miliónů rozsáhlých operačních výkonů. To odpovídá cca 1000 úmrtím a 4000 závažných komplikací každou hodinu, z nichž až polovině lze dle některých autorů předejít (*Dobson GP et al., 2015*). Typickým představitelem vysoce rizikového výkonu jsou gastrointestinální resekční výkony (*Jakobson T et al., 2014*).

Existuje řada klinicko-fyziologických a laboratorních parametrů, na jejichž podkladě je možno orientačně hodnotit stupeň pooperačního SIRS: dechová frekvence (DF), tepová frekvence (TF), tělesná teplota (TT), celkový počet a diferenciální rozpočet leukocytů, sérová hladina C-reaktivního proteinu (CRP), interleukinu (IL)-6 a albuminu (*Bone et al., 1992*). Jejich výpovědní hodnota má ovšem svoje limity. Obecně akceptované biomarkery efektivně hodnotící míru chirurgického inzultu (chirurgického traumatu), a tím i velikost rizika vzniku dysregulované imunitní ZO, nejsou prozatím k dispozici. Takovéto biomarkery by mohly pomoci, např.: 1) k lepšímu porozumění patofyziologie chirurgického traumatu, 2) k časně diagnostice možných lokálních či systémových komplikací, 3) ke zpřesnění

monitorace efektu pooperačních terapeutických intervencí a 4) k odhadu krátkodobého a dlouhodobého klinického výsledku pacientů.

Další z možných markerů odrážející charakter, popřípadě míru, inzultu by mohly být považovány tzv. molekulární vzorce asociované s poškozením (DAMPs). Jsou tak označovány látky se signalizačním potenciálem, které se vyplavují po poškození tkání neinfekčními a infekčními inzulty (*Seong SY et al., 2004; Lotze MT et al., 2005; Foell D et al., 2007; Kaczmarek et al. 2013*). Podskupinu DAMPs představují tzv. alarminy. Jde převážně o primárně intracelulární proteiny, které hrají svou specifickou fyziologickou roli v různých buňkách organismu, např. fagocyty, epitelální buňky, keratinocyty apod. Při poškození strukturální integrity buňky (např. vlivem nadměrného fyzikálního působení), nebo při její aktivaci (např. vlivem zánětu) jsou alarminy uvolněny, popř. aktivně secernovány, do extracelulárního prostředí, kde uplatňují svou bioaktivní funkci. (*Foell D et al., 2007; Pugin J., 2012*).

Dynamika sérových hladin alarminů má tedy potenciál časně reflektovat také míru chirurgického traumatu. Zjištění role vybraných alarminů v rámci ZO na chirurgické perioperační poškození tkání je hlavním cílem této vědecké práce.

2. TEORETICKÁ ČÁST – PATOFYZIOLOGIE STERILNÍHO ZÁNĚTU

2.1 ROZPOZNÁVÁNÍ POŠKOZENÍ A TEORIE NEBEZPEČÍ

Původní teorie snažící se vysvětlit a popsat principy odpovědi imunitního systému organismu na inzult byla založena na teorii o rozpoznávání tělu **vlastních** a **cizích** antigenů, tzv. **self/non-self** (SNS) **teorie**, za kterou Burnet a Medawar obdrželi v roce 1960 Nobelovu cenu. Novějším pohledem je koncept tzv. **teorie nebezpečí** (angl. danger theory, popř. danger model), který je v mnoha aspektech odlišný, neboť je založen na schopnosti imunitního systému rozlišit podněty na tělu **bezpečné** a **nebezpečné** (Matzinger P, 2002). Jinými slovy, vlastní struktury (self) jsou schopny vyvolat imunologickou reaktivitu, pouze pokud jsou nebezpečné (způsobují poškození), a naopak cizí struktury (non-self) jsou tolerovány, pokud nejsou nebezpečné. Výhodou teorie nebezpečí je, že je schopna univerzálněji vysvětlit některé specifické aspekty imunoreaktivity. Jedná se například o situace, kdy jsou při laktaci tolerovány nově vzniklé „cizí“ antigeny mateřského mléka anebo situaci, kdy při čištění zubů pravidelně dochází k obvykle dobře tolerované bakteriemi, která nebývá imunocyty vnímána jako „nebezpečná“. Dále jde o některé případy autoimunitních reakcí, kdy jsou rozpoznány i tělu vlastní antigeny, protože jsou vnímány jako potenciálně nebezpečné. Teorie nebezpečí dále popisuje, že k tomu, aby imunitní systém reagoval, je obvykle nezbytná nejen přítomnost antigenu, ale i současného tkáňové poškození. Příkladem může být např. vakcinace, kdy aplikace pouze antigenů infekčního agens často nevyvolá požadovanou imunitní odpověď, pokud není přítomna alespoň minimální tkáňová iritace (poškození). Zajímavou myšlenkou je, že imunitní odpověď je kontrolována především na podkladě vzájemné komunikace mezi imunitním systémem a tkáněmi a vlastní antigeny

patogenních mikroorganismů hrají jen doplňující roli. V rozhodovacím procesu o výsledné imunitní reakci je tedy tato komunikace považována dokonce za důležitější faktor než samotný vliv typu patogenu (*Seong SY et al., 2004*).

Teorie nebezpečí je součástí snahy o vysvětlení patofyziologie aktivace a modulace reakce imunitního systému v rámci neinfekčního inzultu a byla inspirací a podkladem pro vědecké aktivity popsané dále v rámci této disertační práce.

2.2 SIGNALIZACE POŠKOZENÍ

V rámci evoluce se vyvinuly mechanismy sloužící k rozpoznání signálů vznikajících v rámci neinfekčního (a také infekčního) poškození organismu. Při narušení buněčné integrity jsou pasivně uvolněny a vyplaveny, popřípadě aktivně generovány signály nebezpečí. Tyto signály jsou na tkáňové úrovni detekovány specifickým systémem receptorů pro rozpoznávání molekulových vzorců, tzv. pattern recognition receptors (PRRs), poté dále zpracovány a vyhodnoceny. Následně dochází k určitému typu buněčné reakce. V roce 2004 byla formulována velice zajímavá teorie hydrofobicity, založená na tom, že aktivaci imunitního systému jsou schopny vyvolat pouze hydrofobní části molekul příslušných antigenů. Součástí této teorie je tvrzení, že role PRRs zpočátku vývoje vícebuněčných organismů spočívala pouze v rozpoznávání signálů sterilního poškození a infekčnímu agens tyto transmembránové molekuly sloužily pouze jako kanál ke vstupu do buňky. Posléze si buňky postupně rozvinuly schopnost rozpoznávat a reagovat na antigeny patogenů právě cestou PRRs, což je zvýhodnilo v rámci jejich přežití (*Seong SY et al., 2004*).

Signály poškození mohou z funkčního hlediska vyvolat v cílové buňce několik základních typů reakce, viz **Tab. 1**.

Tabulka 1. Typy buněčných reakcí po stimulaci (podle Krysko DV et al., 2001)

Typ buněčné reakce	Charakter	Proces
chemotaktická	„najdi“	řízená migrace do místa poškození
fagocytární	„sněž“	pohlcení a zpracování cílové struktury
imunostimulační	„aktivuj“	zvýšená exprese povrchových molekul, zvýšení produkce a sekrece prozánětlivých látek, redukce či potlačení sekrece protizánětlivých látek
imunosupresivní	„toleruj“	anergie, redukce produkce prozánětlivých humorálních faktorů a produkce a sekrece protizánětlivých látek
reparační	„regeneruj“	znovuobnovení strukturální a funkční integrity tkáně

O povaze této odpovědi rozhoduje nejen povaha inzultu, ale i lokální mikroprostředí zahrnující buněčné (rezidenční tkáňové buňky), nebuněčné intersticiální struktury (molekuly extracelulární matrix), ale i přítomnost různých humorálních faktorů (cytokiny, chemokiny, růstové faktory). Základním typem odpovědi na sterilní inzult je zánětlivá reakce, která je primárně určena především vyřešení a reparaci přítomného tkáňového poškození, ale také ke kontrole šíření inzultu. Iniciace a průběh ZO jsou realizovány vrozeným a adaptivním imunitním systémem. Za normálních fyziologických podmínek je ZO pečlivě řízena mnoha kontrolními mechanizmy a zpětnými vazbami, je vzájemně koordinována a propojena s řadou dalších systémů jako jsou hemostáza a komplementová kaskáda.

V rámci inzultu **infekční etiologie** se primárního rozpoznání patogenu v první řadě účastní vrozený imunitní systém. Makrofágy (M ϕ) a dendritické buňky (DC) rozpoznávají antigen, aktivují se a produkují řadu bioaktivních molekul, například cytokinů, chemokinů, ROS a RNS. Tyto působky mají za úkol přímo zničit patogen a/nebo iniciovat a potencovat obranou zánětlivou reakci zajištěním další aktivace a migrace aktivovaných imunokompetentních buněk do ložiska infekce za účelem destrukce patogenu. Jejich dalším úkolem je aktivace buněk adaptivního imunitního systému (zejména T- a B-lymfocyty) a pomoc při vytvoření patogen-specifické odpovědi cestou humorální (protilátkové) imunity a/nebo přímého cytotoxického působení. V situaci, kdy dojde k dysregulaci a tzv. dekompartmentizaci zánětlivé odpovědi, vzniká sepse, která se vyznačuje sníženou funkcí vzdálených orgánů, například ledvin, plic, apod.

Při inzultu **neinfekční etiologie** imunitní systém reaguje na vypavení signálů, které vznikají při tkáňovém poškození (hypoxémie, chemický, termický, mechanický a oxidativní stres) provázeném smrtí buněk (náhodná/prostá nekróza, nekroptóza, nekróza následující po apoptóze, překotná apoptóza a autofagie), (*Krysko et al., 2001*). Mezi stavy, které v rámci sterilního inzultu mohou vést až k jeho dekompartmentizaci, patří: rozsáhlé chirurgické intervence, traumata, akutní pankreatitida, závažná forma ischemicko-reperfúzního poškození, refrakterní fáze šoku, vícečetné převody krevních derivátů apod. Patologické signály vznikající poškozením původně zdravých buněčných struktur se označují souhrnným názvem alarminy.

Nadměrná dysregulovaná zánětlivá reakce organismu se může rozvinout také mírně odlišným patofyziologickým mechanismem v situaci, kdy původně sterilní základní onemocnění, provázená významným tkáňovým poškozením, například mnohočetné trauma, akutní nekrotizující pankreatitida, jsou po určité době v průběhu hospitalizace v intenzivní

pěči komplikovány superinfekcí infekčním agens (*Pittet D et al., 1995*). Tento stav obvykle ve výsledku vede často k neobvykle rychle se rozvíjejícím klinickým projevům závažného septického šoku, multiorgánovému selhávání a bezprostřednímu ohrožení života pacienta.

Termín SIRS byl poprvé zmíněn Nelsonem (Univerzita Toronto) na prezentaci v rámci Nordic Micro Circulation Meeting v Norsku v únoru 1983. Definován a oficiálně akceptován byl v rámci konsenzuální konference American College of Chest Physician a Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) v roce 1992 (*Bone RC et al., 1992*). Diagnóza syndromu je založena na přítomnosti alespoň dvou ze čtyř základních komponent: horečka nebo hypotermie, tachykardie, tachypnoe, leukocytóza nebo leukopenie (*viz Tab 2*).

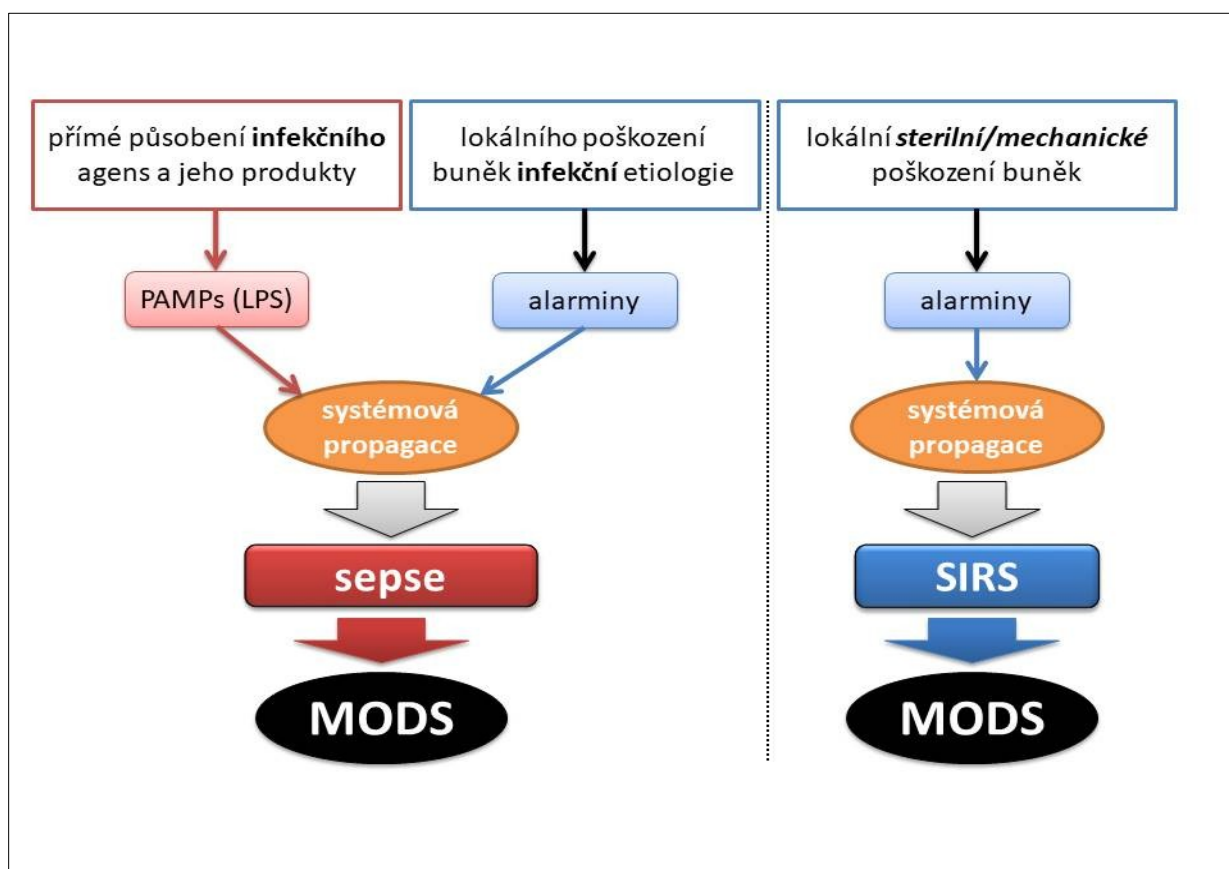
Tab. 2. Syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS)

SIRS		
podmínky	parametry ke splnění diagnózy	poznámky
tělesná teplota	> 38 nebo < 36 °C	teplota jádra: měřeno v rektu, ústech, močovém měchýři anebo krvi
tepová frekvence	> 90/min.	při absenci bolesti, farmakoterapii, primární poruchy srdečního rytmu (např. bradykardie)
dechová frekvence	> 20/min. nebo PaCO ₂ < 32 mm Hg	nebo potřeba mechanické plicní ventilace
počet leukocytů	< 4 . 10 ⁹ /l (<4000/mm ³), > 12 . 10 ⁹ /l (> 12000/mm ³), nebo 10 % tyčí	

PaCO₂, parciální tlak oxidu uhličitého

Prognostická závažnost SIRS se zvyšuje se splněním více kritérií (*Nesmith EG et al., 2009*). Validita těchto kritérií byla v posledních desetiletích opakovaně kriticky přehodnocována, nicméně jejich platnost nadále trvá a do budoucna se neočekává jejich zásadní změna, spíše doplnění o některé parametry (spolehlivé biochemické markery).

Jako sepse je označován SIRS při prokázané, popřípadě důvodně předpokládané, infekci. V literatuře se objevují i termíny těžký SIRS při přítomnosti orgánových dysfunkcí (severe SIRS) a SIRS šok (SIRS shock) při přítomnosti hypotenze navzdory adekvátní tekutinové resuscitaci souběžně s nutností použití vazoaktivní terapie. Tyto termíny odpovídají v zásadě těžké sepsi, respektive septickému šoku, jsou ovšem neinfekční etiologie. Podle nové definice sepse již provázanost sepse a SIRS není zdůrazňována (Singer M et al., 2016). Zjednodušené schéma rozvoje sepse, SIRS a syndromu polyorgánové dysfunkce (MODS) na podkladě inzultu infekční a neinfekční etiologie je znázorněno na **Obr. 1**



Obr. 1. Schéma rozvoje sepse SIRS a MODS na podkladě infekční a neinfekční etiologie. Při infekčním inzultu dochází ke zvýšení hladin PAMPs a alarminů, zatímco u sterilního poškození jsou stimulem pro aktivaci imunitního systému alarminy. Při nadhraničním anebo protrahovaném působení lokálního infekčního, popř. sterilního zánětu může dojít k jeho dekompartmentizaci a následně k rozvoji vzdálených orgánových dysfunkcí.

SIRS je ve své podstatě značně uniformní s mírnými odchylkami v závislosti na vyvolávajícím faktoru. Orientačně lze vznik a průběh SIRS rozdělit do 3 fází:

Fáze 1, kdy v místě inzultu dochází k lokální cytokinové produkci se vznikem zánětlivé reakce s cílem reparace patologického procesu (aktivace lokálních imunocytů a retikulárního systému, odklizení poškozených struktur a tvorba nových funkčních struktur).

Fáze 2, kdy jsou do lokální mikrocirkulace uvolňovány menší dávky cytokinů a chemokinů. Cílem je zlepšení efektivity lokální tkáňové zánětlivě/reparační odpovědi a také zajištění kompartmentizace této prozatím lokální reakce. Dochází k migraci a aktivaci imunocytů a některých krevních elementů (trombocyty), je zvýšený přísun kyslíku a živin do místa inzultu. Tato akutní fáze je kontinuálně kontrolována uvolňováním protizánětlivých mediátorů ve snaze o udržení zánětu na lokální úrovni a redukci hladiny prozánětlivých působků v krevním řečišti (v systému).

Fáze 3, kdy homeostáza není efektivně obnovena a dochází k dekompartmentizaci lokální reakce systémově. Tato stimulace často vede k aktivaci řady důležitých humorálních i buněčných procesů (aktivace retikuloendoteliálního systému, hemostázy, komplementu apod.), což může mít ve svém důsledku významně negativní dopad na vzdálené orgánové systémy, a to až v podobě iniciace a rozvoje MODS. Navíc, tzv. multi-hit teorie týkající se rozvoje MODS při SIRS je založena na předpokladu, že poté co primární inzult vyvolá SIRS, každý následující inzult zhoršuje (alteruje, dysreguluje) průběh onemocnění a zvyšuje riziko rozvoje MODS.

Jeden z nejzávažnějších život ohrožujících stavů je sepse, která se dá zjednodušeně definovat jako infekcí způsobený SIRS. Spolu s antigeny infekční etiologie (inzult v podobě PAMPs pocházejících z bakterií, virů, hub a parazitů) se na modulaci a amplifikaci, a

pravděpodobně i dysregulaci zánětlivé odpovědi organismu (zvýšení sekrece cytokinů, degranulace enzymů, lipidových mediátorů, zvýšení tvorby ROS a RNS) v rámci sepse podílí také alarminy vyplavené při poškození tkání. Alarminy tak mají významnou roli i v patogenezi toho klinicky nesmírně významného patologického stavu.

Vlastního rozpoznání DAMPs se účastní několik známých systémů označovaných souhrnně PRRs. PRRs jsou lokalizovány na mnoha buňkách těla, ale predilekčně jde o buňky vrozeného imunitního systému (monocyto-makrofágový systém, neutrofilní granulocyty, DCs, fibroblasty, endoteliální buňky, buňky hladkého svalstva apod.). PRRs se vyskytují v povrchové membráně, v cytosolu anebo v jádru buňky. Dle své molekulární struktury, specifické afinity vůči ligandům a typu výsledné efektorové funkce se dají zhruba rozdělit na dvě základní skupiny:

a. **endocytické**

Úkolem endocytických PRRs je zajistit přichycení, pohlcení a aktivovat destrukci mikroorganismů fagocyty.

b. **signální** – toll-like receptor (TLR) dependentní a TLR non-dependentní signalizace (viz níže).

Signální PRRs rozpoznávají PAMPs i alarminy. To následně vede k aktivaci různých buněčných funkcí, například expesí příslušných genů je iniciována a/nebo potencována produkce a uvolňování cytokinů, produkce některých enzymů, tvorba ROS a RNS, iniciace diferenciačních procesů buňky, změny morfologie a migračních aktivit buňky. PRRs hrají zásadní roli ve funkci nejen vrozené, ale i adaptivní imunity.

Mezi nejvíce zkoumané PRRs patří TLRs, které jsou základní součástí tzv. TLR-dependentní signalizace. TLRs jsou vývojově velmi starým a konzervovaným systémem. Kromě signálů sterilního poškození, alarminů, mají TLRs schopnost rozpoznat široké spektrum PAMPs přicházejících z vnějšího okolí buňky (bakterie, houby, paraziti, ale i viry),

ale i po jejich proniknutí intracelulárně. TLRs jsou transmembránové glykoproteiny vyskytující se na různých imunitních buňkách: M ϕ , B-lymfocyty, DCs, přirozené zabíječe (NK), epitelové a endotelové buňky. Jsou lokalizovány jak v povrchové membráně, tak i v cytosolu uvedených buněk a v membráně endozomů. Skládají se ze dvou částí: 1. extracelulární LRR (leucine-rich repeat) domény a 2. transmembránové TIR (Toll/IL-1 receptor) domény. Zatímco LRR se podílí na rozpoznání antigenu (ligandu), TIR přenáší signál přes adaptorové molekuly (MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM) tak, aby mohlo v dalších krocích dojít k postupné řetězové aktivaci různých intracelulárních proteinově-enzymatických signálních i efektorových systémů. Výsledkem této transdukce signálu je například několik mechanismů vedoucích k produkci cytokinů:

1. fosforylace a degradace proteinu inhibujícího κ B (I κ B), což umožní aktivaci nukleárního faktoru (NF)- κ B v buněčném jádru a expresi genů pro některé cytokiny.
2. aktivace některých proteinkináz (např. MAPK) také zodpovědných za produkci cytokinů.
3. aktivace regulačních faktorů interferonu (IRFs) řídících tvorbu interferonů (IFN) typu I.

Variabilita a rozsah rozpoznávání cestou TLRs je umožněna charakterem LRR a také vytvářením dimerů (např. heterodimer TLR 4/6, TLR 2/4, homodimer TLR 4/4, apod).

Kromě TLRs, existují i další systémy (tzv TRLs-nondependentní signalizace), které jsou schopny přenosu patologického infekčního signálu. Jedná se o:

- **RLRs** (RIG-like receptory), což jsou intracelulárními senzory určené zejména pro rozpoznání virové dsRNA (dvouvláknové RNA) a ssRNA (jednovláknové RNA) a DNA. Jejich prostřednictvím dojde převážně k aktivaci IRF (produkce IFN I. typu) a v menší míře i k aktivaci NF- κ B. RLRs v kooperaci s TLRs slouží k aktivaci obrany proti

širokému spektru virových infekcí (respiračně syncytiální virus, virus lymfocytární choriomeningitidy a virus chřipky).

- **NLRs** (NOD-like receptory) představují cytoplazmatický receptorový systém podílející se na regulaci procesů zánětu a apoptózy (kaspáza 1). Tento systém se rovněž účastní na rozpoznávání mikrobiálních (peptidoglykan, bakteriální DNA, toxiny, dsRNA apod.) i endogenních (vč. stresových) antigenů (extracelulární ATP, krystaly kyseliny močové apod.).
- **CLRs** (C-type lektinové receptory) patří mezi PRRs s lokalizací v povrchové membráně imunocytů. Mají převážně endocytickou funkci, podílí se tím na destrukci patogenů v endozomech, ale mohou se účastnit i signalizace. Dokáží rozpoznat např. patogenní antigeny mnoha bakterií, virů, hub, parazitů i mykobakterií (manóza, fukóza, glukany apod.). Dokáží také rozpoznat i některé neoantigeny (onkofetální-carcinoembryonální antigen) na buněčných membránách a tím aktivovat jejich destrukci (přímá komplementová cytotoxicita) nebo sekvestraci (fagocytóza).
- **RAGE** (receptory pro konečné produkty glykace) jsou transmembránové receptory imunoglobulinové povahy s funkcí PRRs. Jejich ligandem jsou HMGB1, S100A (typ 7), S100B, S100 P, amyloid- β -protein, AGE (konečné produkty pokročilé glykace u diabetes mellitus), apod. Po interakci se svým ligandem jsou aktivovány prozánětlivé geny. RAGE je dáván do spojitosti s řadou komplikací chronických onemocnění (diabetická neuropatie, diabetická nefropatie, alzheimerova choroba, ateroskleróza apod.). Má i svoji solubilní formu s-RAGE, která je považována za funkčního antagonistu RAGE.

2.3 ALARMINY

Alarminy jsou molekuly endogenního původu, které jsou zodpovědné za signalizaci sterilního poškození pro imunokompetentní buňky. Patří do větší skupiny signálů, pomocí kterých tkáň rozpoznává hrozící, nebo již probíhající, nebezpečí (DAMPs). Vyskytují se za normálních okolností intracelulárně (intracytoplazmaticky nebo intramitochondriálně). Při fyzikálním (mechanickém, termickém) poškození tkání a buněk se alarminy pasivně uvolňují anebo jsou aktivně secernovány postiženými buňkami a v některých případech i imunocyty. Jejich význam spočívá ve schopnosti iniciovat a modulovat imunitní odpověď včetně reparační reakce na poškození. Alarminy ovlivňují nejen funkci klasických antigen-prezentujících buněk, např. monocytů/Mφ a DCs, ale také eozinofilů, žírných buněk a neutrofilních granulocytů. Mohou vyvolat zánět buď přímo, nebo také jako pomocné látky modulující efekt jiných antigenů infekčního i neinfekčního původu. Mohou mít například funkci **kofaktoru**, popř. **ko-alarminu**, anebo **chaperonu** pro PAMPs, například lipopolysacharid (LPS), (*Tsan MF et al., 2011*).

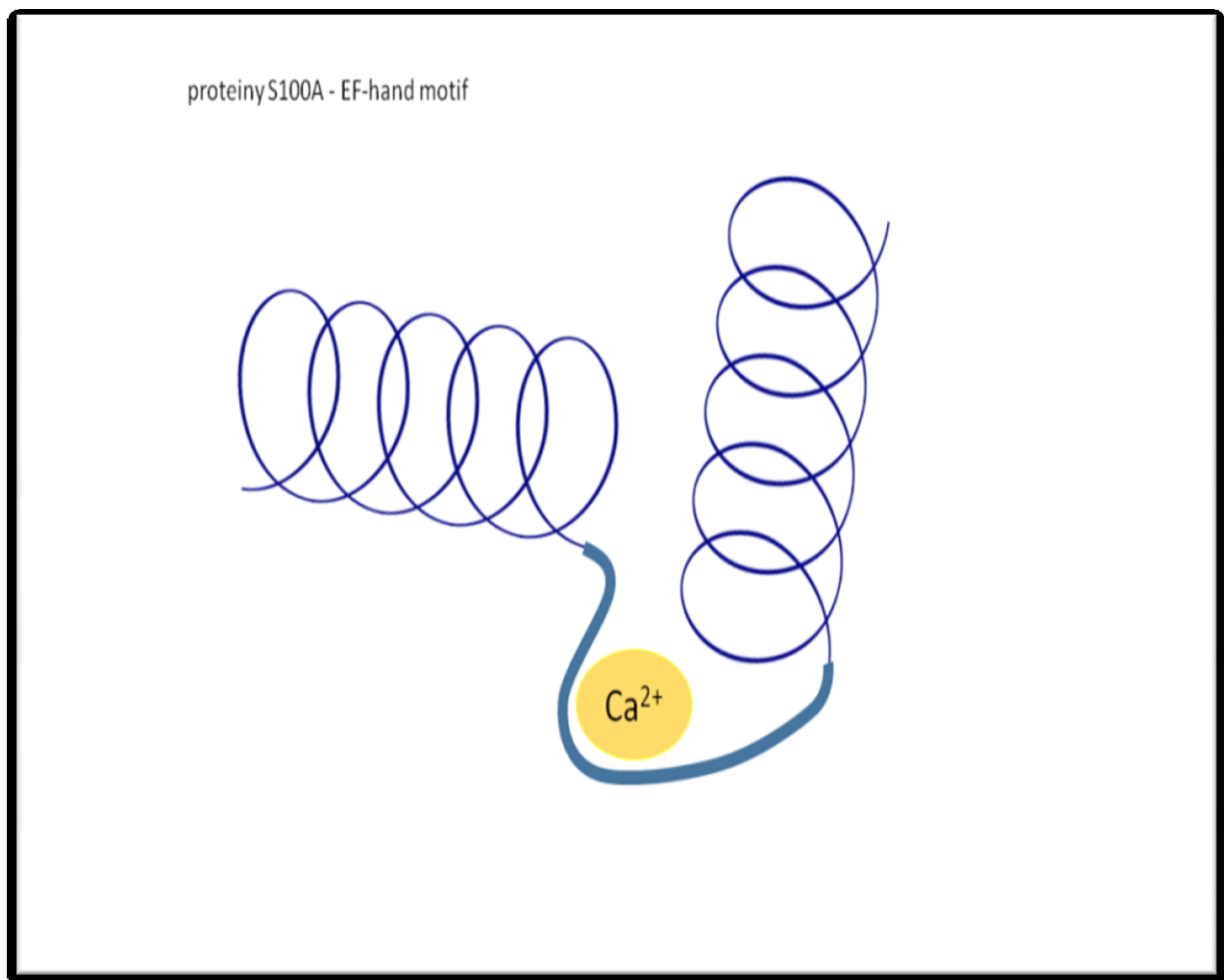
Pozn: dřívější označení DAMPs se nyní častěji užívá k označení celé skupiny látek signalizujících nebezpečí/poškození, patří do nich tedy i s patogeny asociované molekulové vzory, PAMPs.

2.3.1 PROTEINY S100A

Proteiny S100A byly popsány již téměř před 50 lety. Jedná se o molekuly proteinové povahy, které váží Ca^{2+} do své struktury dvou tzv. EF-hand motivů, které jsou spojeny centrálním můstkem. EF-hand motiv se skládá z dvou helixů propojených obloukem s afinitou k vápníku (**Obr. 2**). Název celé skupiny byl odvozen od 100% rozpustnosti v amoniu sulfátu. Dosud bylo popsáno již více než 20 S100 proteinů (*Moore BW et al., 1965; Heizmann CW et al., 2002*). Proteiny S100A jsou především zodpovědné za regulaci intracelulárního

metabolizmu kalcia (Ca^{2+}) a na kalcium závislé signalizaci. Za normálního normálního stavu se podílejí také na mnoha dalších fyziologických buněčných funkcích (transkripce, proteinové fosforylaci, funkci cytoskeletu, růstu a diferenciaci buněk apod.). Kromě kalcia váží některé proteiny S100A i atomy zinku a mědi.

Konkrétní zástupci této rodiny, zejména subtyp A, jsou považovány za potenciální alarminy pro jejich schopnost interakce s TLR 4 a RAGE.



Obr. 2. Schematické znázornění molekuly proteinu S100A

Proteiny S100A se nachází převážně v buňkách myeloidní řady. S100A8 (taktéž calgranulin A, MRP8) a S100A9 (taktéž calgranulin B, MRP14) se vyskytuje v granulocytech, monocytech a v časném stadiu diferenciaci $\text{M}\phi$ (Foell D et al., 2007; Zwadlo G et al., 1988).

V podmínkách zánětu lze expresi těchto proteinů také vysledovat v epiteliálních buňkách a keratinocytech (Frosch M et al., 2005). Protein S100A8 tvoří často heterodimer s proteinem S100A9 (S100A8/9). Extracelulární sekrece S100A je realizována převážně aktivně, mimo klasickou cestu přes Golgiho aparát. Tento způsob je typický pro celou řadu alarminů, jejichž primární rolí je podíl na udržování intracelulární homeostázy, a které se za patologických podmínek stanou zdrojem signálů aktivujících vrozený imunitní systém (Foell D et al., 2007). Alarminy jsou zvýšeně produkovány v místě zánětu a jejich tkáňová hladina koreluje s intenzitou zánětu (Foell D et al., 2004). Hlavním a převažujícím extracelulárním efektem S100A proteinů je prozánětlivý stav, který vede aktivací endoteliálních buněk ke zvýšené expresi některých adhezivních molekul, jako jsou adhezivní molekula vaskulárních buněk (VCAM-1) a intercelulární adhezivní molekula (ICAM-1). Dochází zároveň ke zvýšené endoteliální permeabilitě spojené s únikem intravaskulární tekutiny do tkáňového intersticia. Aktivace imunocytů se projevuje například navýšením efektu NF- κ B, což je spojeno se zvýšenou expresí některých genů pro cytokiny s jejich následnou vyšší produkcí. Stimulována je rovněž tkáňová migrace granulocytů a monocytů. Dalším efektem proteinu S100A8/9, s úzkou vazbou na aktivaci imunitního systému, je protrombotický efekt (Foell D et al. 2007; Foell D et al., 2004). Výše uvedené extracelulární funkce proteinu S100A8 jsou realizovány cestou RAGE a jiných receptorů (scavenger receptor CD36, karboxylované N-glykany apod.) (Robinson MJ et al., 2002). Přesto, že S100A8 neaktivuje přímo TLR 4, zvyšuje cytokinovou produkci imunocytů po souběžné stimulaci lipopolysacharidem (LPS), (Vogl T et al., 2007). Heterodimer S100A8/9 se také podílí na formaci tzv. neutrofilních extracelulárních pastí (NETs) z umírajících neutrofilních granulocytů. NETs se skládají z chromatinových vláken s navázanými antimikrobiálními proteiny, které jsou součástí imunitní obrany proti některým patogenům, například *Candida albicans* (Urban CF et al., 2009). Navíc, protein S100A8/9 má, na podkladě chelace atomů Zn^{2+} a Mn^{2+} , také antimikrobiální efekt proti *Staphylococcus*

aureus (Hsu K et al., 2009). Pokud je produkován keratinocyty, zvyšuje rezistenci kožního krytu proti invazi patogenů (Hsu K et al., 2009). Zároveň ovšem pomáhá růstu patogenům rodu *Mycobacterium*, například *M. tuberculosis*, což naznačuje jeho aktivní roli v imunopatogenezi tuberkulózy (Pechkovsky DV et al, 2000). Dále zvyšuje transkripční aktivitu viru lidské imunodeficiencie (HIV-1) a virovou replikaci v infikovaných CD4+ T-lymfocytech (Ryckman C et al., 2002).

Protein S100A12 (calgranulin C, EN-RAGE) je konstitutivně exprimován v neutrofilních granulocytech (Vogl T et al., 1999), nicméně faktor nekrotizující tumory (TNF)- α , interleukin (IL)-6 a LPS indukují expresi genu pro jeho transkripci také v buňkách monocyto/makrofágového systému a buňkách hladké svaloviny (Yang Z et al., 2001). S100A12 je detekován především cestou RAGE (Hofman MA, 1999) nicméně jeho efekt je také zprostředkován tzv. scavenger receptory (Pietzsch J et al., 2009) a receptory spřaženými s G-proteiny (Yang Z et al., 2001). Bylo prokázáno, že protein S100A12 má antiparazitární vlastnosti, kdy inhibuje růst a motilitu filariálních parazitů pravděpodobně narušením funkce kontraktilních elementů (Moroz OV et al., 2003). C-terminální peptid (kalcitermin) molekuly proteinu S100A12 dále vykazuje antimikrobiální aktivitu, především proti gramnegativním bakteriím (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) a kvasinkám (*C. albicans*). Tento efekt je potencován v kyselém prostředí (nízké pH) a za přítomnosti iontů Zn^{2+} (Cole AM et al., 2001).

Kromě schopnosti aktivovat některé specifické buňky jako jsou fagocyty, epitelální buňky a keratinocyty je proteinům S100A připisována role také v iniciaci a modulaci reparativních procesů (Foell D et al., 2007; Kacmarek A et al. 2013). Publikována byla rovněž celá řada prací popisující komplexní roli proteinů S100A v rozvoji nádorových onemocnění. Vysoká exprese proteinů S100A byla nalezena v některých solidních

gastrointestinálních nádorech (*Shrikrishna G et al., 2009; Nedjadi T et al., 2009; Chen H et al., 2014*).

2.3.3. HIGH MOBILITY GROUP BOX 1

High mobility group box 1 (HMGB1) je ubikviterní chromozomální protein lokalizovaný v jádru buňky v úzké souvislosti s chromatinem. Jeho primární fyziologická role je pomocný vliv na replikaci, transkripci, rekombinaci a reparaci jaderné DNA. Dále slouží k indukci buněčné migrace a diferenciaci. Vyplavení HMGB1 do systémové cirkulace vede k prozánětlivému efektu, při kterém HMGB1 významně potencuje cytokinovou produkci infekčními antigeny aktivovaných imunitních buněk. HMGB1 *per se* je považován za tzv. „pozdní“ cytokin. Mechanismus, který je za tento efekt zodpovědný, je pravděpodobně aditivní funkce HMGB1 jako chaperonu při rozpoznávání některých bakteriálních produktů, které jsou na něj přímo navázány, např. LPS. HMGB1 má význam i v expresi různých adhezivních molekul na povrchu endoteliálních buněk a hraje roli i v integraci ZO a tkáňové reparační. Podání HMGB1 intravenózně i intratracheálně vedlo k prozánětlivé odpovědi s rozvojem plicního poškození. Stav byl charakterizován akumulací neutrofilních granulocytů v plicním parenchymu, rozvojem plicního edému, elevací plicní produkce cytokinů jako IL-1 β a TNF- α a vyplavením chemokinu pro neutrofilní granulocyty, zánětlivý makrofágový protein 2 (MIP-2) (*Lotze MT et al., 2007*). V posledních letech ovšem někteří autoři význam HMGB1 jako cytokinu spíše zpochybňují. Důvodem je absence prozánětlivé aktivity vysoce purifikovaných preparátů HMGB1 při jeho prokazatelně zachovalé biologické aktivitě (*Tsan MF et al., 2011*). HMGB1 je rozpoznáván buňkami, které exprimují na svém povrchu TLR 2 a 4 a RAGE. Popsána je také role HMGB1 při rozvoji některých gastrointestinálních nádorových onemocnění (*Sims GP et al., 2010*)

2.3.2 PROTEINY TEPLOTNÍHO ŠOKU

Proteiny teplotního šoku (HSP), jmenovitě HSP60, 70, 90 a gp96 (glykoprotein 96 jako forma HSP 90, která se vyskytuje převážně v endoplazmatickém retikulu), jsou ubikviterní proteiny (cytoplazma, jádro, mitochondrie). Jde o látky proteinové povahy, které jsou produkovány v případě buněčného stresu, především termického poškození. Jejich prozánětlivá aktivita (cytokinová funkce) je malá. Hlavní funkcí HSP je, podobně jako HMGB1, zprostředkovávat interakci mezi PAMPs (mikrobiální produkty – LPS, flagellin, lipopolypetidy apod.) a imunokompetentními buňkami (funkce kofaktoru). Vzhledem k tomu, že mají jen minimální prozánětlivou aktivitu, byla zpochybněna také jejich role u čistě neinfekčního SIRS (*Tsan MF et al., 2011*). HSP se váží a jsou rozpoznávány prostřednictvím TLR 2 a TLR 4. Jejich role spočívá také v regulaci reparačních procesů jako molekulárních vzorců asociovaných s reparací (RAMPs).

2.2.4. OSTATNÍ ALARMINY

Mitochondriální alarminy jsou molekulární struktury, které svým efektem nejlépe odpovídají definici endogenního signálu nebezpečí. Jedním z nich je mitochondriální DNA (**mtDNA**), která byla detekována extracelulárně u pacientů po traumatu. Dalším je tzv. formylovaný peptid Met-Leu-Phe (**fMLP**) působící stimulačně na neutrofilní granulocyty. V experimentu bylo prokázáno, že aplikace mitochondriálních alarminů dokáže vyvolat plicní poškození podobné akutnímu syndromu dechové tísně (ARDS). Mitochondriální DNA signalizuje přes TLR 9, fMLP přes receptor pro formylovaný peptid (FPR1). Extracelulární adenosin trifosfát (**ecATP**) působí také jako signál nebezpečí zejména lokálně v místě poškození. Biologický efekt ecATP závisí na lokální hladině: v nízkých extracelulárních

koncentracích má ecATP funkci chemoatraktanu a koalarminu potencující zánětlivou odpověď, například aktivace transkripce genů pro-IL-1 β a pro-IL-18 na některé bakteriální produkty (LPS). Ve vyšších koncentracích ecATP blokuje syntézu prozánětlivých cytokinů.

3. HYPOTÉZY

NULOVÉ HYPOTÉZY

1H₀

Sérové hladiny vyšetřovaných markerů (proteiny S100A, HMGB1, HSP70) u pacientů po elektivním chirurgickém výkonu (Ch-skupina) charakteru rozsáhlého chirurgického výkonu (MAS) se neliší od zdravé populace bez operačního zákroku (NCh-skupina).

2H₀

Hladiny alarminů (proteiny S100A, HMGB1, HSP70) studijní skupiny nekorelují s tíží stavu vyjádřenou hladinou rutinních biomarkerů (CRP, IL-6, albumin).

3H₀

Hladiny alarminů (proteiny S100A, HMGB1, HSP70) studijní skupiny nekorelují s parametry chirurgického zákroku (krevní ztráta [KZ], délka výkonu [DV], použití vazoaktivní terapie [VT], množství intraoperačního příjmu tekutin [IT], TT po ukončení operačního zákroku).

4H₀

Hladiny alarminů (proteiny S100A, HMGB1, HSP70) se neliší mezi etážemi gastrointestinální resekce (horní, střední a dolní gastrointestinální trakt [GIT]).

5H₀

Hladiny alarminů (proteiny S100A, HMGB1, HSP70) studijní skupiny nemají vztah k významným parametrům klinického výsledku (délka hospitalizace na jednotce intenzivní péče [JIP], celková délka hospitalizace, 28denní a hospitalizační mortalita).

6H₀

Laparoskopické výkony se neliší od otevřeného klasického chirurgického přístupu (laparotomie) z hlediska míry traumatizace odhadované na podkladě hladiny alarminů (protein S100A, HSP70, HMGB1) a rutinních biomarkerů zánětu (leukocyty, CRP, IL-6).

7H₀

Chirurgické poškození se neodlišuje mezi skupinou otevřené klasické chirurgie (laparotomie) a laparoskopie v rámci podskupiny pacientů podstupujících operační výkon pro maligní onemocnění.

8H₀

Hladina alarminů (proteiny S100A8 a S100A12) u skupiny po operačním výkonu dolního GIT (kolorektální resekce) se neliší od kontrolní skupiny nechirurgických subjektů.

9H₀

Hladiny alarminů (proteiny S100A8 a S100A12) při kolorektálních resekcích nekorelují s hladinou rutinních biomarkerů zánětu (leukocyty, CRP a IL-6).

4. CÍLE PPROJEKTU

4.1 PRIMÁRNÍ CÍL

Na podkladě sledování absolutních hodnot a dynamiky hladin vybraných alarminů (proteiny S100A5, S100A6, S100A8, S100A11, S100A12, HSP70 a HMGB1) v séru po dobu tří dnů zjistit jakou roli hrají tyto alarminy v rozvoji systémové ZO na rozsáhlé chirurgické trauma (elektivní extenzivní chirurgický výkon, spojený s resekci trávicí trubice, tzv. major abdominal surgery, MAS), což lze zjednodušeně rozdělit na dvě skupiny otázek: 1) zjistit, zdali se liší hladiny alarminů mezi chirurgickou a kontrolní nechirurgickou skupinou a 2) zjistit vztah mezi hladinou vybraných alarminů u chirurgické skupiny a rutinně odebíraných biomarkerů zánětu (počet leukocytů, CRP a IL-6) a hladinou sérového albuminu.

4.1 SEKUNDÁRNÍ CÍLE

- Zjistit vztah mezi hladinou vybraných alaminů a vybranými parametry chirurgického zákroku - KZ, DV, použití VT, množství IT, TT po ukončení operačního zákroku. Tyto chirurgické charakteristiky pravděpodobně mohou mít schopnost reflektovat míru chirurgického stresu (poškození).
- Zjistit prediktivní hodnotu vybraných alarminů posouzením vztahu jejich hladin a významných parametrů klinického výsledku (délka hospitalizace JIP, délka hospitalizace v nemocnici, 28denní a hospitalizační mortalita).

Pozn. v souladu se zahraniční odbornou literaturou v dalším textu termín mortalita označuje počet zemřelých z vybrané skupiny pacientů s danou chorobou, v našem případě chirurgickým zákrokem. Jde o popisnou epidemiologickou charakteristiku správně česky nazývanou smrtnost (letalita).

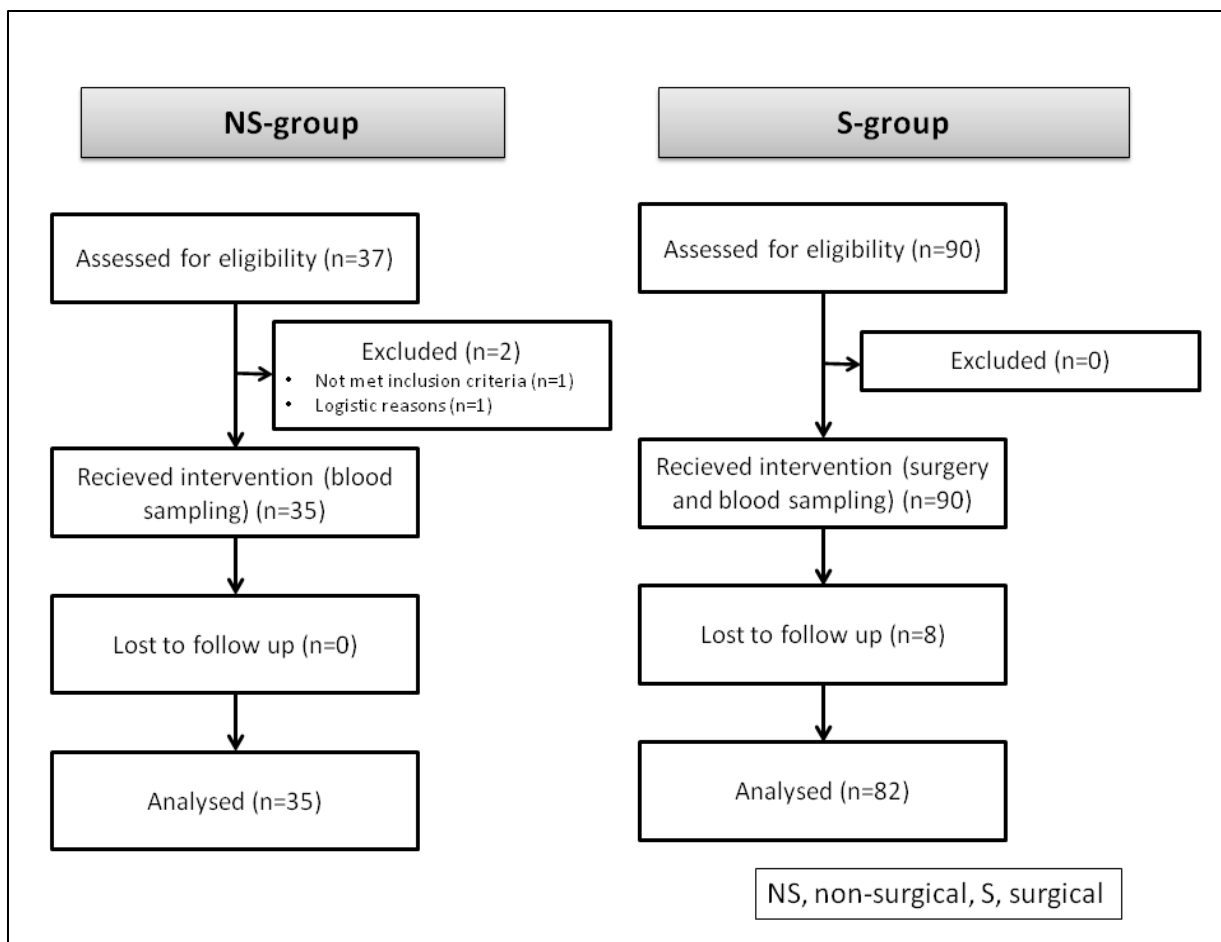
- Zjistit vztah mezi hladinou vybraných alarminů a lokalizací gastrointestinální resekce (horní, střední a dolní GIT).
- Srovnat míru chirurgické traumatizace dvou základních chirurgických přístupů používaných v rámci resekčních GIT operací, tj. 1) otevřená klasická chirurgie (laparotomie) a 2) laparoskopie, a to ve vztahu k hladinám alarminů a rutinních biomarkerů zánětu.
- Zjistit, zda se liší chirurgická traumatizace mezi skupinou otevřené klasické chirurgie (laparotomie) a laparoskopie v rámci podskupiny pacientů podstupujících operační výkon pro maligní onemocnění.
- V podskupině pacientů podstupujících resekční výkon dolního GIT (kolorektální resekce) provést post hoc srovnání hladin alarminů a kontrolní skupiny bez chirurgického výkonu. Dále zjistit vztah mezi hladinou vybraných alarminů a rutinních biomarkerů zánětu v této chirurgické skupině. Tato post hoc analýza byla snahou o maximální možnou homogenizaci sledované studijní kohorty pacientů.

5. MATERIÁL a METODIKA

5.1 CHARAKTERISTIKA STUDIE A STUDIJNÍ SKUPINY

Prospektivní, observační, neintervenční, monocentrická studie byla schválena Etickou komisí (EK) Fakultní nemocnice (FN) Ostrava (referenční číslo: 435/2013). NCh-skupina se skládala ze zdravých dobrovolníků, kteří podstoupili odběr krve tři po sobě jdoucí dny na Odběrovém centru FN Ostrava (n=37). Do Ch-skupiny (n=90) byli zařazeni pacienti bezprostředně po elektivním chirurgickém resekcčním výkonu splňujícím kritéria MAS. Zařazování subjektů do studie probíhalo 12 měsíců (od 1. června 2013 do 1. června 2014). Pacienti byli po chirurgickém zákroku přijati a dále léčeni na lůžkách intenzivní péče Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny (KARIM), FN Ostrava. Do finální statistické analýzy bylo zařazeno 35 subjektů v NCh-skupině (jeden kontrolní subjekt měl v době odběrů známky akutního infekčního onemocnění a druhý byl vyřazen pro jeden chybějící krevní odběr) a 82 subjektů v Ch-skupině (8 subjektů bylo vyřazeno pro chybějící krevní odběry po časném překladu na standardní oddělení).

Zařazovací kritéria pro obě skupiny byla: 1) více než 18 let věku, včetně, 2) absence souběžného akutního nebo aktivního zánětlivého onemocnění, popřípadě sepse, 3) hospitalizace na JIP (pro Ch-skupinu) a 4) elektivní MAS při které byla provedena střední resekce s následnou rekonstrukcí (pro Ch-skupinu). Vyřazovací kritéria zahrnovala: 1) těhotenství a 2) očekávanou délku přežití ≤ 24 hodin. Detailní výběr pacientů zobrazuje přehledně tzv. Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow diagram, viz *Obr. 3.*



Obř. 3. CONSORT flow diagram (převzato z publikace Maca J et al., *APMIS*, 2018)

Péče o pacienty v prostředí intenzivní péče KARIM FN Ostrava zahrnovala důslednou hemodynamickou optimalizaci, preventivní i terapeutické užití antimikrobiálních léků, různé typy analgetizace, odbornou péči o operační rány, adekvátní nutriční podporu, fyzioterapii a další součásti standardní podpůrné terapie v rámci tzv. Enhanced Recovery After Surgery (ERAS) protokolu (Steenhaggen E, 2016). Péče byla zajištěna zkušeným zdravotnických personálem v souladu s aktuálními doporučeními České společnosti intenzivní medicíny (ČSIM) a Society of Critical Care Medicine (SCCM). Pooperační klinický stav pacientů byl individuálně průběžně hodnocen. Za podmínek příznivého vývoje, hemodynamické stability a při absenci pooperačních a jiných komplikací, byli pacienti časně vertikalizováni a překládáni zpět do péče příslušného chirurgického standardního oddělení.

5.2 DEFINICE A LOKALIZACE CHIRURGICKÉHO ZÁKROKU

Elektivní MAS byl definován jako chirurgický zákrok s očekávanou délkou trvání >2 hod. a očekávanou krevní ztrátou více než 500 ml (*Davies SJ, 2013*). Chirurgické intervence zahrnovaly výkony na GIT spojené s resekci trávicí trubice nebo souvisejícího orgánového systému (játra, slinivka břišní), a to bez ohledu na polohu resekce. Chirurgické resekcční výkony v oblasti GIT jsme pro naši studii vybrali z několika důvodů: obvykle se vyznačují dlouhou dobou operace, a to především kvůli nutnosti a) precizní chirurgické manipulace s intraabdominálními orgány, b) vlastní resekce a c) následné tkáňové strukturální a funkční rekonstrukci. Často je také přítomna větší KZ při chirurgické intervenci v bezprostředním okolí mezenterálních a pánevních cévních pletení, ale i v oblasti magistralních tepen, především abdominální aorty a jejích hlavních větví. Právě dlouhodobé výkony v obtížném terénu gastrointestinální chirurgie představují riziko zvýšené a protrahované mechanické a termické zátěže tkání a orgánů dutiny břišní, které je možno definovat jako chirurgické poškození.

Souběžně se specifickými chirurgickými výkony se také zvyšuje nárok na důsledné vedení celkové anestezie, jejíž hlavním cílem je, kromě vyvolání cílené a kontrolované iatrogenní poruchy vědomí a analgezie, také udržení hemodynamické a respirační stability pacienta, a dále adekvátní hrazení krevních ztrát náhradami složenými převážně s krystaloidními roztoky a v případě nutnosti i krevních transfuzí (erytrocytární koncentráty a koncentráty krevních destiček). Detailní výčet lokalizace a popisy konkrétních chirurgických zákroků je zobrazen v **Tab. 3**.

Tab. 3. Popis typu chirurgických intervencí (převzato z publikace Maca J et al., *APMIS*, 2018)

GIT lokalizace	Typ chirurgické intervence	Počet (n)
Horní GIT	parciální a totální (radikální) resekce jícnu	5
	parciální a totální (radikální) resekce žaludku	12
Střední GIT	parciální a totální (radikální) resekce pankreatu (duodenopankreatická) resekce	7
	radikální cystektomie s vytvořením ureteroileostomie	8
	resekce jater	6
	jiné resekce tenkého střeva (ileus, gynekologická chirurgie)	6
Dolní GIT	resekce tlustého střeva (kolektomie s/bez vytvoření kolostomie)	38
		n = 82

5.3 STUDIJNÍ PROTOKOL A MĚŘENÍ

Základní charakteristiky (věk, pohlaví, hmotnost a výška) subjektů v kontrolní skupině byly odebrány anamnesticky první den krevních odběrů, u zařazených studijních chirurgických subjektů byly údaje zjištěny a zaznamenány bezprostředně po přijetí na JIP KARIM (Den 0), viz **Tab. 4.**

Tab. 4. Základní charakteristiky Ch-skupiny a NCh-skupiny (převzato z publikace Maca J et al., *APMIS*, 2018)

Základní charakteristiky	Ch-skupina	NCh-skupina	hodnota p
--------------------------	------------	-------------	-----------

Základní charakteristiky	Ch-skupina	NCh-skupina	hodnota p
Počet	82	35	
Věk [roky] ± SD	60,29 ± 14,07	39,97 ± 10,05	<0,01
Pohlaví [muž % (n)]	67 % (55)	43 % (15)	0,03
Hmotnost [kg] ± SD	80,9 ± 17,26	72,86 ± 12,22	<0,01
Výška [cm] ± SD	172,94 ± 8,83	172,54 ± 8,29	0,82

Nominální hodnoty jsou charakterizovány absolutními čísly a relativními četnostmi (v %), numerické hodnoty jsou charakterizovány průměrem ± standardní odchylky (SD).

V NCh skupině byly zjištěny pouze výše uvedené antropometrické údaje. V Ch-skupině byly navíc sledovány klinické a chirurgické charakteristiky a parametry klinického výsledku. Fyzický stav a anesteziologické riziko bylo předoperačně zhodnoceno podle standardního klasifikačního systému Americké anesteziologické společnosti (ASA). Odhad tíže stavu v průběhu prvního dne po přijetí byl proveden pomocí standardního skórovacího systému APACHE II, což je obecně akceptovaný doporučený parametr, který je standardně kalkulován z nejhorších hodnot vybraných klinických a laboratorních parametrů v průběhu prvních 24 hodin od přijetí na JIP (*Knauss WA et al., 1985*). Míra orgánového postižení byla hodnocena v každém ze tří pooperačních dnů pomocí skóre SOFA (Den 1-3), (*Vincent JL et al., 1996*), což je skórovací systém hodnotící přítomnost a stupeň dysfunkce v šesti významných orgánových systémech: 1) respirační, 2) kardiovaskulární, 3) koagulační, 4) hepatobiliární, 5) centrální nervový a 6) uropoetický. Přítomnost a závažnost systémové ZO byla kalkulována na podkladě tzv. SIRS skóre (*Nesmith EG et al., 2009; Bone RC et al., 1992*). Výskyt sepse byl hodnocen na pokladě v té době standardně používaných ACCP/SCCM kritérií formulovaných v roce 1992 (*Bone RC et al., 1992*). Sledovány byly i

další parametry: délka hospitalizace na JIP, celková délka hospitalizace, 28denní a hospitalizační mortalita, viz **Tab. 5**.

Tab. 5. Klinické, chirurgické charakteristiky a charakteristiky klinického výsledku (Ch-skupina), (převzato z publikace Maca J et al., *APMIS*, 2018)

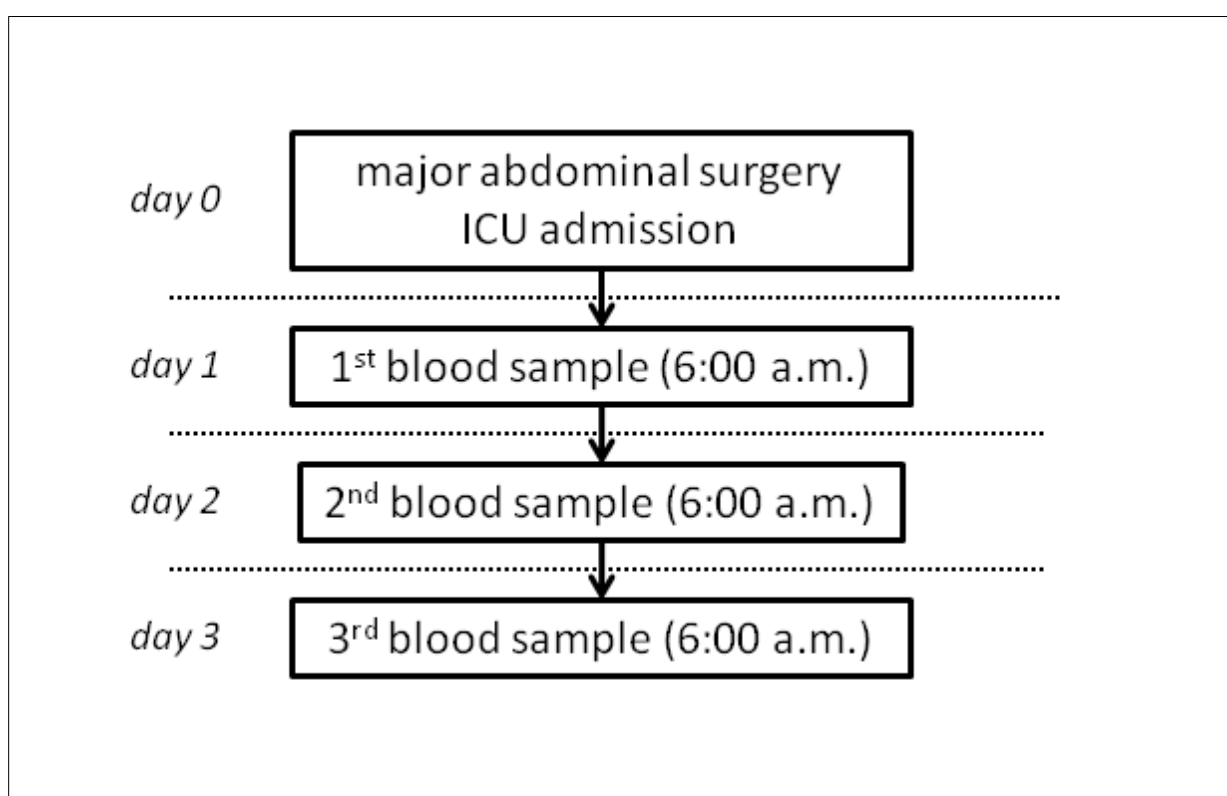
Klinické charakteristiky	
ASA	2 (2-3)
ASA I [ano % (n)]	7 % (6)
ASA II [ano % (n)]	51 % (41)
ASA III [ano % (n)]	35 % (28)
ASA IV [ano % (n)]	7 % (6)
APACHE II	9,12 ± 6,84
SOFA (Den 1)	2,39 ± 3,72
SOFA (Den 2)	2,34 ± 3,82
SOFA (Den 3)	2,52 ± 3,68
SIRS [ano % (n)]	93 % (76)
Sepse [ano % (n)]	7 % (6)
Chirurgické charakteristiky	

- horní GIT [% (n)]	21 % (17)
- střední GIT [% (n)]	33 % (27)
- dolní GIT [% (n)]	46 % (38)
Maligní nádor [ano % (n)]	79 % (65)
Délka chirurgického zákroku [min.]	285,00 ± 113,16
Krevní ztráta [ml]	727,44 ± 807,46
Transfuzní přípravky (EBR) [ano % (n) / ml]	33 % (27) / 749,85 ± 357,81
Tranfuzní přípravky (FFP) [ano % (n) / ml]	30 % (25) / 836,04 ± 427,81
Vazopresorická terapie [ano % (n)]	38 % (31)
Inotropická podpora [ano % (n)]	24 % (20)
Tekutiny podané intraoperačně [ml]	3712,20 ± 1811,05
Umělá plicní ventilace pooperačně [ano % (n)]	25 % (20)
Teplota těla při přijetí na JIP [°C]	35,87 ± 0,48
Klinické výsledky	
Komplikace po chirurgickém zákroku [ano % (n)]	19 % (15)
Délka pobytu na JIP [dny]	6 (4-8)
Délka pobytu v nemocnici [dny]	16 (10-25)
Mortalita v nemocnici [ano % (n)]	11 % (9)

Nominální hodnoty jsou charakterizovány absolutními čísly a relativními četnostmi (v %), numerické hodnoty jsou charakterizovány průměrem ± standardní odchylky (SD).

5.4 MATERIÁL A LABORATORNÍ METODIKA

Krevní vzorky k analýze sérové hladiny alarminů (proteiny S100A5, 6, 8, 9, 11, 12, HMGB1, HSP70) a rutinních biomarkerů (leukocyty, CRP, IL-6, albumin) byly odebírány ve stejných intervalech tři po sobě jdoucí dny bezprostředně po operačním výkonu (Den 1, 2, 3) v ranních hodinách, viz **Obr. 4**.



Obr. 4. Schéma odběrů krevních vzorků. *Major abdominal surgery, rozsáhlý chirurgický výkon; ICU, intensive care unit; blood sample, krevní vzorek (převzato z publikace Maca J et al., APMIS, 2018)*

K odběru krve pro vyšetření alarminů a biochemických markerů byl použit systém S-Monovette® (Sarstedt®, Norimberk, Německo). Bezprostředně po odběru byly krevní vzorky transportovány do lokální laboratoře a byly ponechány 30 minut v klidu do vytvoření krevní

sraženiny. Supernatant byl následně centrifugován při 2500 g po dobu 10 minut při 4 °C k oddělení séra. Bezprostředně poté byly vyšetřeny sérové koncentrace těchto analytů: CRP, albumin (AU 5420, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) a IL-6 (Immulite 2000, DPC, Los Angeles, USA). Interesejové koeficienty variability pro vyšetření CRP, albuminu a IL-6 byly 4,8 %, 1,9 % a 6,7 %. Koncentrace HMGB1 byla kvantitativně stanovena pomocí sendvičové imunoeseje (Biovendor-Laboratorní medicína, Brno, Česká republika). Koncentrace proteinů S100A byly stanoveny komerčně dostupnými kolorimetrickými kity pro sendvičovou imunoesej (Biovendor-Laboratorní medicína). Interesejové koeficienty variability byly 10,9 % (HMGB1), 6,2 % (S100A5), 6,9 % (S100A6), 5,6 % (S100A8), 7,1 % (S100A9), 8,8 % (S100A11), a 6,9 % (S100A12). Koncentrace HSP70 byla kvantitativně stanovena komerčně dostupnými kity pro sendvičovou imunoesej (StressMarq, Cadboro Bay, Canada) s interesejovým koeficientem variability 10,2 %. Stanovení počtu leukocytů bylo provedeno bezprostředně po odběry krevního vzorku v lokální hematologické laboratoři.

5.5 STATISTICKÉ METODY

Biostatistik použil pro statistické analýzy a grafické výstupy této studie R software verze 3.2.2 (<https://www.R-project.org>, 2015). Data byla před analýzou očištěna, extrémní hodnoty zkontrolovány a ošetřeny, chybějící hodnoty doplněny nebo označeny. Hodnoty alarminů a biochemických parametrů vykazovaly nadměrné zešíkmení, proto byly před samotnými analýzami upraveny logaritmickou transformací. Nominální hodnoty jsou charakterizovány absolutními čísly a relativními četnostmi (v %), numerické hodnoty odpovídající svou distribucí normálnímu rozdělení jsou charakterizovány průměrem ± směrodatnou odchylkou (SD), numerické veličiny, u nichž se nedá předpokládat normalita

anebo u nichž byla normalita zamítnuta Shapiro-Wilkovým statistickým testem, jsou v tabulkách charakterizovány mediánem a intervalem tvořeným prvním a třetím kvantilem.

Ke srovnání rozdílů mezi dvěma skupinami (studijní vs. kontrolní) vzhledem k jednoduchým proměnným (viz $5H_0$, $6H_0$, $7H_0$, $8H_0$) byl použit Fisherův exaktní test nebo test chí-kvadrát (pro nominální data), dvouvýběrový Studentův t test (pro numerická data s normálním rozdělením) a dvouvýběrový Wilcoxonův test (pro data neodpovídající normálnímu rozdělení). Vztah mezi numerickými veličinami (viz $2H_0$, $3H_0$, $5H_0$, $9H_0$) byl ohodnocen pomocí Pearsonova korelačního koeficientu r (v případě veličin s normálním rozdělením) a pomocí Spearmanova pořadového koeficientu korelace ρ (v případě veličin bez předpokladu normality). Koeficienty korelace doplňují patřičné statistické testy vyčísující p -hodnotu s jakou se korelační koeficient rovná nule. Srovnání vzájemných rozdílů mezi třemi a více skupinami ($4H_0$) bylo provedeno pomocí Tukeyova HSD testu.

Pro složitější design experimentu, ve kterém byly sledované veličiny měřeny na subjektech opakovaně v pravidelných časových intervalech, a pro srovnání rozdílů mezi skupinami (studijní vs. kontrolní, viz $1H_0$, $7H_0$, $8H_0$) byla použita analýza rozptylu pro opakovaná měření (RM ANOVA). Kromě porovnávané proměnné byly do modelu jako vysvětlující proměnné zahrnuty také věk a pohlaví a tím jsme získali výsledky očištěné od jejich vlivu. Do modelu byla také zahrnuta interakce mezi dnem měření a skupinou. Statistická významnost rozdílů mezi skupinami v rámci jednotlivých dnů byla určena pomocí patřičného dvouvýběrového testu aplikovaného na rezidua lineárního modelu zahrnujícího věk a pohlaví, čímž jsme opět získali výsledky očištěné od jejich vlivu. Hladina významnosti statistických testů byla stanovena na 0,05.

6. VÝSLEDKY

6.1 CHARAKTERISTIKA SKUPIN

Do statistické analýzy v rámci pilotní analýzy bylo zařazeno 82 pacientů v Ch-skupině a 35 v NCh-skupině (Maca J et al., *APMIS*, 2018). Pacienti v Ch-skupině měli signifikantně vyšší věk ($p < 0,01$) a vyšší hmotnost ($p < 0,01$) ve srovnání s NCh-skupinou.

Pro pilotní srovnávací analýzu byly obě skupiny hodnoceny v celém rozsahu. Pro následnou analýzu týkající se srovnání typu chirurgického výkonu (laparotomická otevřená chirurgie versus laparoskopie) byla chirurgická skupina rozdělena na skupinu laparotomickou ($n=31$) a laparoskopickou ($n=51$), následně byly vybrány podskupiny pacientů podstupujících výkon pro maligní onemocnění (laparoskopie pro malignitu, $n=47$, laparotomie, $n=18$). Pro post hoc analýzu byla z celkové skupiny MAS vybrána nejvíce zastoupená podskupina pacientů podstupujících kolorektální resekci ($n=38$) a byla srovnána s NCh skupinou ($n=35$).

Téměř všichni pacienti v Ch-skupině (93 %, $n=76$) rozvinuli v průběhu prvních tří pooperačních dní SIRS. Pouze u minimálního počtu subjektů z Ch-skupiny ve stejném období se rozvinula sepse (7 %, $n=6$). SIRS a sepse byly diagnostikovány na podkladě stávající standardní definice (Bone RC et al., 1992). Všichni pacienti v Ch skupině dostali před výkonem anebo v průběhu začátku výkonu antibiotickou profylaxi za účelem redukce rizika pooperačních infekčních komplikací. V Ch-skupině bylo 65 pacientů (79 %) operováno pro diagnózu maligního onemocnění. Sérové hladiny alarminů a biomarkerů v jednotlivých skupinách jsou znázorněny v **Tab. 6**.

Tab. 6. Sérové hladiny alarminů a biomarkerů (převzato z publikace Maca J et al., *APMIS*, 2018)

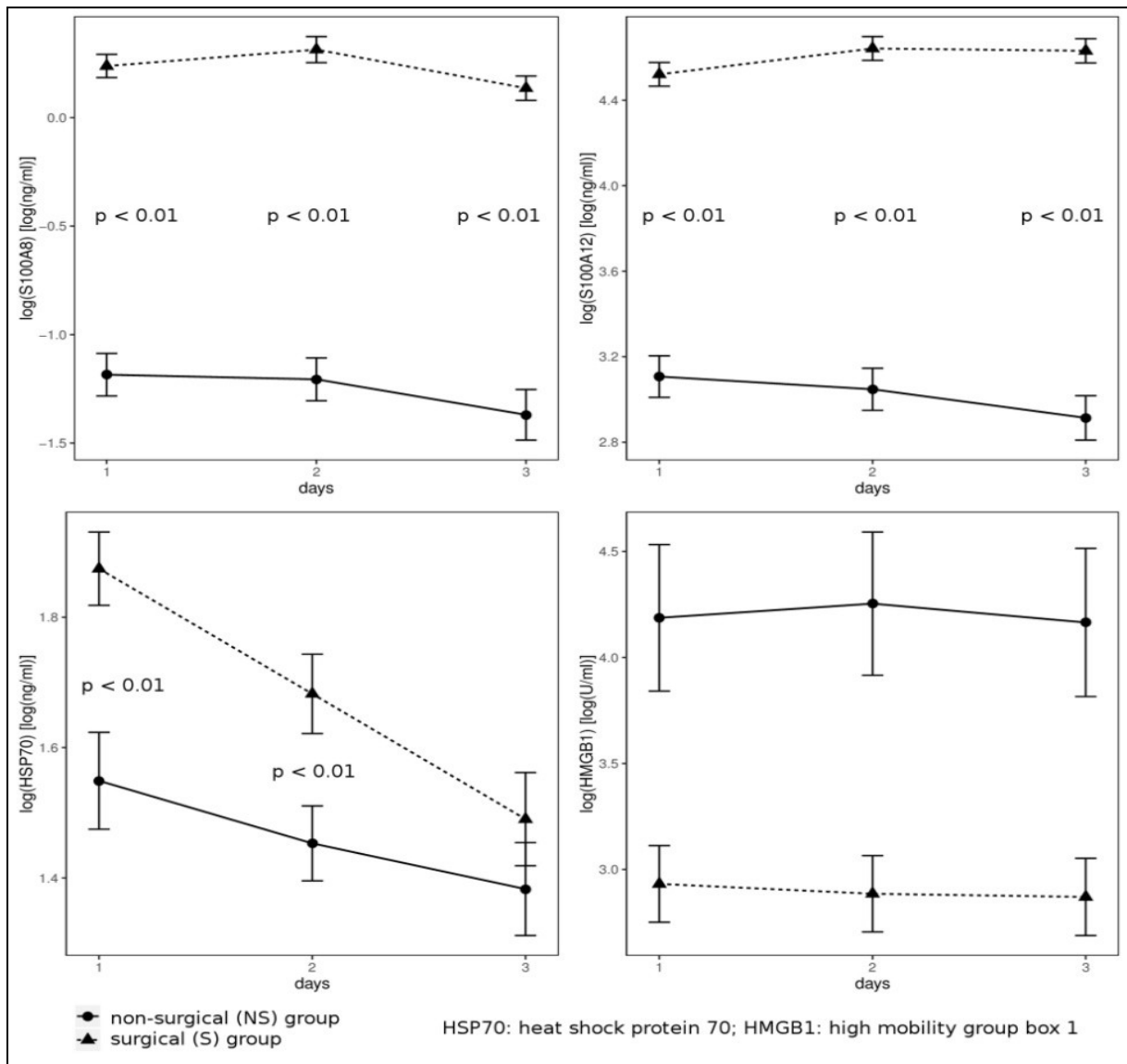
alarminy	Ch-skupina			NCh-skupina		
	Den 1	Den 2	Den 3	Den 1	Den 2	Den 3
S100A8 [ng/ml] (SD)	1,45 (0,98)	1,60 (0,99)	1,30 (0,67)	0,37 (0,34)	0,37 (0,34)	0,33 (0,37)
S100A12 [ng/ml]	103,71 (53,36)	116,9 (58,77)	116,52 (62,06)	26,11 (14,70)	24,54 (13,1)	21,95 (12,68)
HSP70 [ng/ml]	7,35 (3,71)	6,18 (3,45)	5,31 (3,09)	5,14 (2,16)	4,53 (1,58)	4,34 (1,87)
HMGB1 [ng/ml]	82,89 (200,30)	81,52 (193,74)	88,52 (218,73)	285,71 (441,17)	298,4 (470,33)	295,14 (463,48)
biomarkery						
leukocyty [10 ⁹ /l]	10,60 (3,55)	10,90 (5,01)	9,90 (5,20)	6,20 (0,90)	6,00 (0,80)	5,90 (0,60)
IL-6 [ng/l]	255,13 (275,93)	157,12 (232,92)	85,85 (153,68)	2,02 (0,08)	2,13 (0,28)	2,41 (1,57)
CRP [mg/l]	105,59 (39,93)	181,71 (64,62)	162,39 (75,43)	2,19 (2,22)	2,12 (2,32)	2,14 (2,26)
albumin [g/l]	29,62 (4,54)	28,93 (4,23)	29,29 (5,01)	44,92 (3,05)	44,8 (2,84)	45,22 (2,52)

Numerické hodnoty jsou charakterizovány mediánem \pm směrodatná odchylka (SD).

6.2 VÝSLEDKY TESTOVÁNÍ HYPOTÉZ

1H₀: V Ch-skupině byly zjištěny signifikantně vyšší sérové hladiny u všech alarminů ($p < 0,001$) kromě HMGB1 (viz **Obr. 5**). Významné rozdíly byly zjištěny také pro biomarkery CRP, IL-6 a albumin ($p < 0,001$). K určení rozdílů mezi skupinami jsme navíc provedli

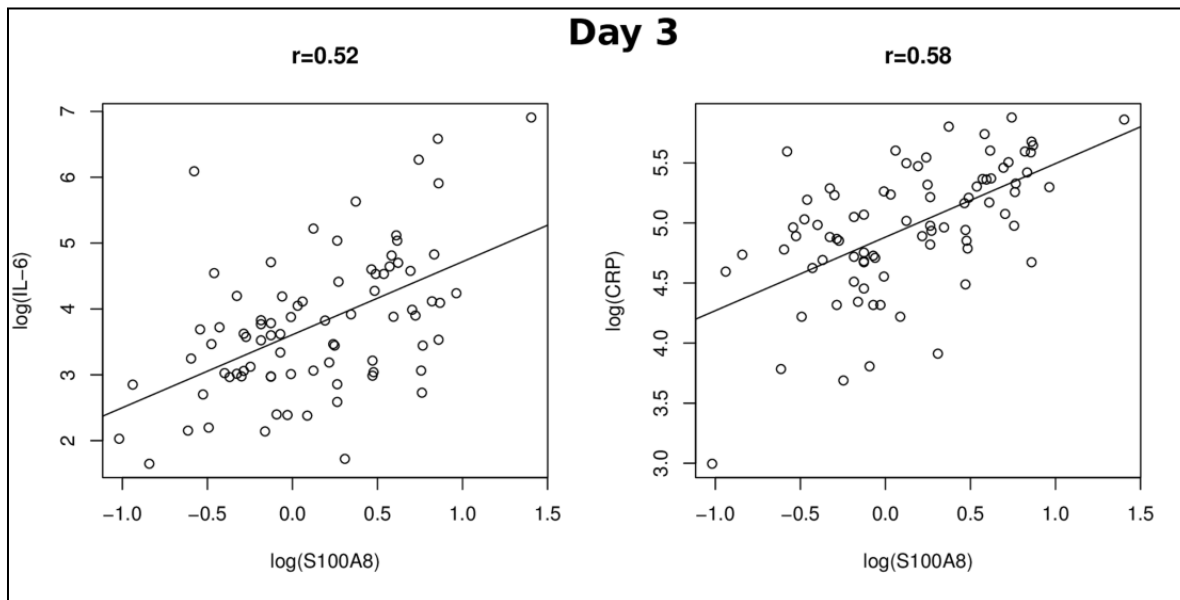
výpočet testem ANOVA pro každý den zvlášť (Den 1, 2 a 3). Hladiny HMGB1 nebyly rozdílné žádný den ($p=0,12; 0,60; 0,10$). Pro alarminy S100A8 a S100A9, HSP70 zamítáme nulovou hypotézu a přijímáme alternativní hypotézu. Pro HMGB1 přijímáme nulovou hypotézu.



Obr. 5. Hladiny alarminů v Ch-skupině (S group) a NCh-skupině (NS group), (převzato z publikace Maca J et al., APMIS, 2018).

2H₀: Protein S100A8 projevil významnou středně silnou pozitivní korelaci s vybranými biomarkery: 1) vztah k CRP byl signifikantní Den 2 a 3 ($r=0,51; 0,58$), 2) vztah k

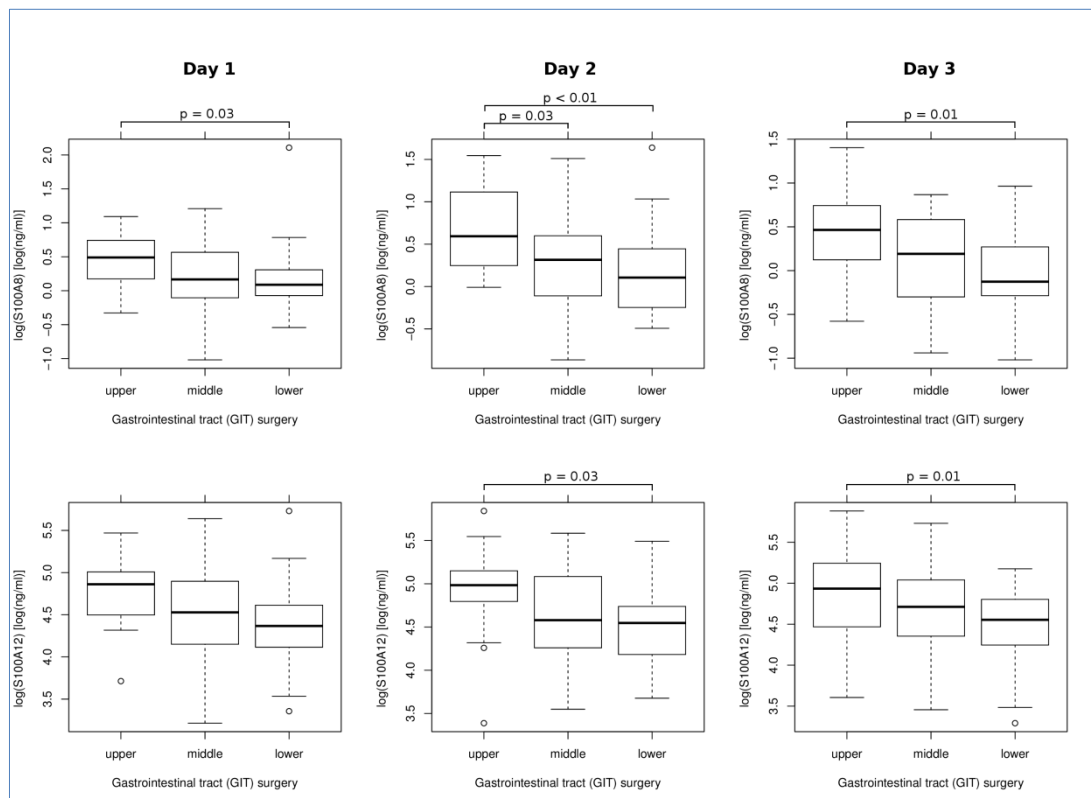
IL-6 byl signifikantní po všechny tři sledované dny (korelační koeficient $r=0,44; 0,50; 0,52$). Nejvýznamnější korelace jsou zobrazeny v **Obr. 6**. Pro alarmin S100A8 zamítáme nulovou hypotézu a přijímáme alternativní hypotézu.



Obr. 6. Nejvýznamnější korelace mezi S100A8 a CRP a IL-6 (převzato z publikace Maca J et al., *APMIS*, 2018). Parametr r označuje Pearsonův korelační koeficient.

3H₀: Byl otestován vztah mezi sérovými hladinami vybraných alarminů a několika důležitými chirurgickými charakteristikami: DV, KZ, IT, VT a TT na konci operačního výkonu. Signifikantní mírně až středně silně pozitivní korelace byly nalezeny mezi HMGB1 a některými chirurgickými charakteristikami: DV ($r=0,26; 0,26; 0,24$; pro Den 1, 2 a 3), KZ ($r=0,38; 0,38; 0,38$), a IT ($r=0,29; 0,28; 0,29$). Proteiny S100A8 a S100A12, a HSP70 nevykázaly žádnou významnou korelaci s parametry chirurgického výkonu. Pro alarmin HMGB1 zamítáme nulovou hypotézu a přijímáme alternativní hypotézu. Pro alarminy (protein S100A8 a S100A12, a HSP70) potvrzujeme nulovou hypotézu.

4H₀: Statisticky významný vztah alarminů a místa chirurgické resekce (horní, střední a dolní GIT) byl pozorován u proteinů S100A8 a S100A12. Resekční výkon v horní etáži GIT byl spojen s vyšší sérovou hladinou S100A8 ve srovnání s dolní etáží po všechny tři dny ($p=0,03$; $<0,01$; $<0,01$). Protein S100A12 byl signifikantně zvýšen při resekci horního GIT v Den 2 a 3 ($p=0,03$; $0,01$). Při srovnání výkonů v horní a střední etáží GIT byl zjištěn signifikantní rozdíl v hladině S100A8 v Den 2 ($p=0,03$), viz **Obr. 7**. Pro alarminy (proteiny S100A8 a S100A12) zamítáme nulovou hypotézu a přijímáme alternativní hypotézu.



Obr. 7. Vztah proteinu S100A8 a S100A12 k místu chirurgické resekce pro Den 1, 2 a 3. *Horní (upper), střední (middle) a dolní (lower) resekce (převzato z publikace Maca J et al., APMIS, 2018).*

5H₀: Analýzou vztahu hladiny alarminů a významných klinických výsledků (délka hospitalizace na JIP, délka hospitalizace v nemocnici, 28denní mortalita, hospitalizační mortalita) přinesla následující výsledky: A) byla zjištěna významná středně silná pozitivní korelace mezi S100A8 a délkou hospitalizace na JIP ($r=0,44$; 0,43; 0,34, pro Den 1 až 3), B) nebyla přítomna významná korelace s celkovou délkou hospitalizace, C) hladina proteinu S100A8 byla vyšší u pacientů, kteří nepřežili 28. pooperační den ($p=0,01$; $p<0,01$; 0,01; pro Den 1 až 3), a u pacientů kteří zemřeli během hospitalizace v nemocnici ($p<0,01$; pro Den 1 až 3), D) protein S100A12 naznačil pozitivní korelaci s délkou hospitalizace na JIP ($r=0,25$ a 0,28, pro Den 2 a 3), a E) a jeho hladiny byly signifikantně vyšší ($p<0,05$ pro všechny dny) u skupiny pacientů, kteří nepřežili 28. pooperační den ($p=0,03$; $p<0,05$; $p=0,04$; pro Den 1-3) a také hospitalizaci ($p=0,04$; $p=0,04$; $p=0,01$; pro Den 1-3). Pro sledované alarminy (proteiny S100A8 a S100A12) zamítáme nulovou hypotézu.

6H₀: Naše výsledky nepotvrdily signifikantní rozdíl v hladině alarminů (S100A8, S100A12, HMGB1, HSP70) mezi skupinou otevřené laparotomické chirurgie a laparoskopickými výkony. A to i přesto, že jsme našli signifikantně delší DV ($p<0,001$), větší KZ ($p=0,04$) a vyšší potřebu IT ($p=0,03$) v laparoskopické skupině. Nicméně, sérové hladiny IL-6 byly Den 2 ($p=0,03$) a Den 3 ($p=0,04$) signifikantně vyšší v laparoskopické skupině, více *viz Tab. 7*. Pro sledované alarminy přijímáme nulovou hypotézu (*Maca J et al., Ther Clin Risk Manag., 2018*).

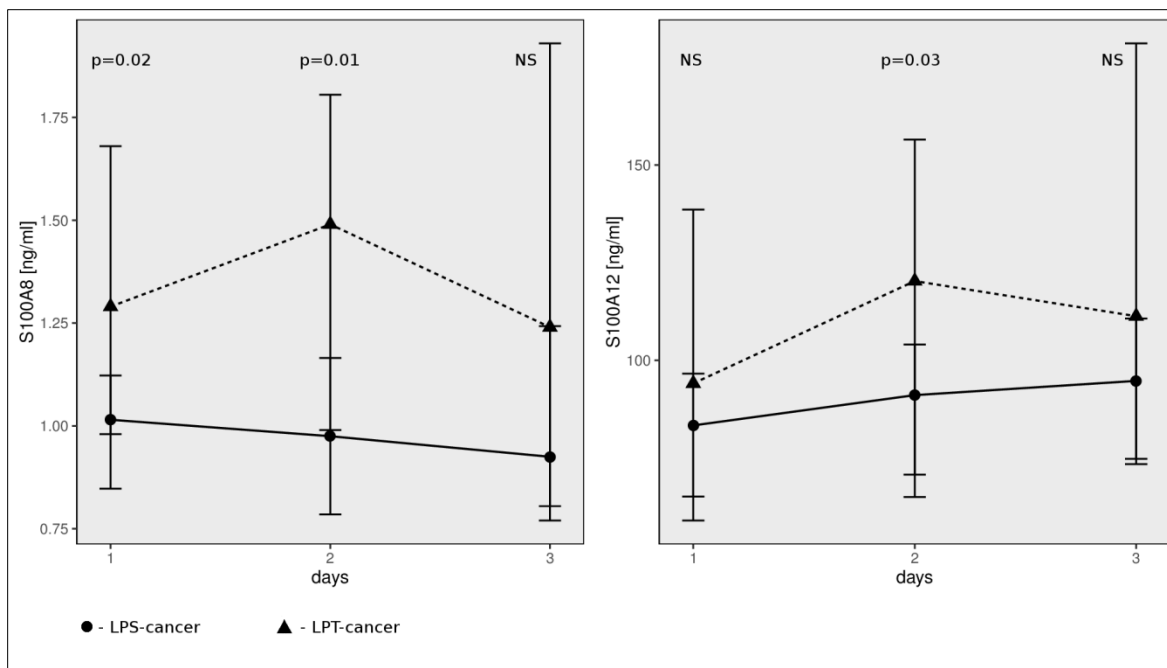
Tab. 7. Seróvé hladiny vybraných alarminů (S100A8, S100A12, HSP70 a HMGB1) a biomarkerů (počet leukocytů, CRP a IL-6) ve skupině otevřené chirurgie (laparotomie) a laparoskopie pro Den 1, 2 a 3. (*převzato z publikace Maca J., et al, J Invest Surg., 2017*).

	laparotomie	laparoskopie	Hodnoty p
S100A8 [ng/ml]			
Den 1	1,10 (0,98-1,7)	1,24 (0,93-1,68)	0,50
Den 2	1,13 (0,86-1,99)	1,45 (0,98-1,79)	0,35
Den 3	1,04 (0,83-1,62)	1,21 (0,77-1,84)	0,68
S100A12 [ng/ml]			
Den 1	89,40 (75,20-101,40)	93,00 (59,00-138,60)	0,94
Den 2	96,40 (86,80-116,50)	120,30 (70,8-156,50)	0,24
Den 3	98,05 (76,88-122,75)	110,50 (71,40-170,15)	0,42
HSP70 [ng/ml]			
Den 1	5,34 (4,21-7,33)	7,64 (4,82-10,29)	0,06
Den 2	4,72 (3,46-7,00)	5,30 (4,08-8,14)	0,21
Den 3	5,13 (3,42-6,46)	4,68 (3,16-7,13)	0,99
HMGB1 [j/ml]			
Den 1	14,00 (4,00-46,50)	12,00 (4,00-58,50)	0,83
Den 2	14,00 (4,00-36,50)	11,00 (4,00-50,50)	0,90
Den 3	15,50 (4,00-40,00)	10,00 (4,00-49,50)	0,95
Počet leukocytů [10 ⁹ /l]			
Den 1	9,80 (8,50-11,80)	9,90 (8,50-12,75)	0,80
Den 2	9,40 (6,65-12,65)	10,00 (8,40-12,25)	0,47
Den 3	8,60 (5,90-12,15)	8,60 (6,90-11,80)	0,60
CRP [mg/l]			
Den 1	115,00 (88,00-129,50)	109,00 (73,50-135,50)	0,96
Den 2	181,00 (130,50-221,00)	184,00 (141,00-212,50)	0,82

	laparotomie	laparoskopie	Hodnoty p
S100A8 [ng/ml]			
Den 3	146,00 (104,50-190,00)	145,00 (114,50-214,50)	0,33
IL-6 [ng/l]			
Den 1	111,00 (63,65-278,50)	149,00 (110,50-281,00)	0,13
Den 2	69,10 (28,40-109,50)	95,20 (54,90-155,50)	0,03
Den 3	31,30 (16,95-48,85)	45,80 (23,45-93,50)	0,04

Proměnné jsou vyjádřeny jako medián (25th-75th percentil); j, jednotky

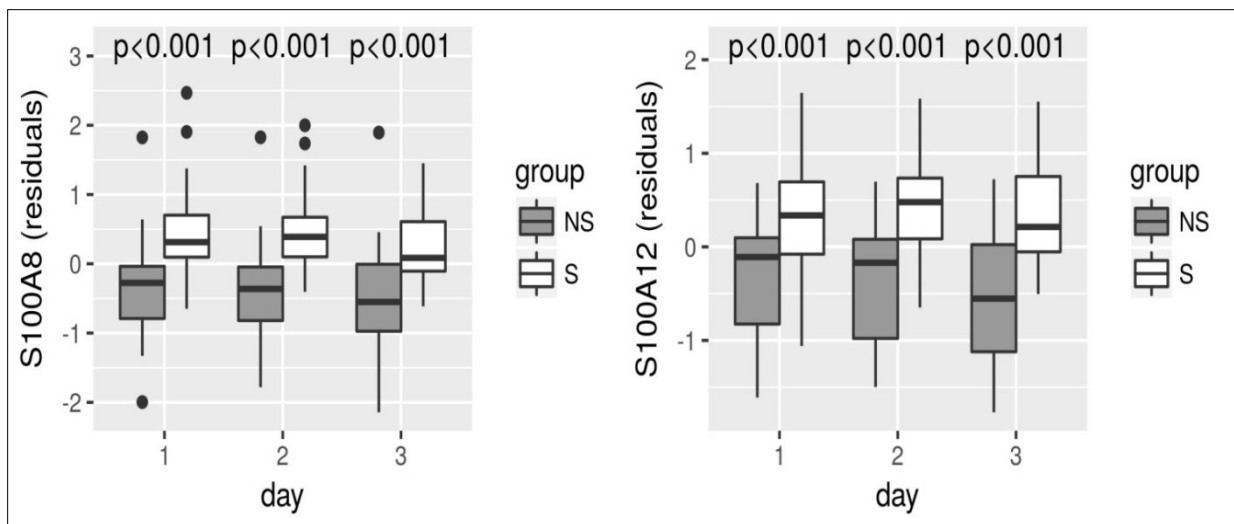
7H₀: Nenalezli jsme žádně signifikantní rozdíly v základních charakteristikách mezi laparoskopickou a laparotomickou podskupinou pacientů podstupujících chirurgický výkon pro maligní onemocnění. Nicméně naše výsledky potvrzují významně delší DV ($p < 0,001$), větší KZ ($p < 0,001$), vyšší potřebu IT ($p < 0,01$) a větší množství podané čerstvě zmražené plazmy ($p = 0,02$) v laparoskopické podskupině. Navíc, doba pobytu na JIP ($p < 0,01$) a také v nemocnici ($p < 0,01$) byla významně delší v laparoskopické skupině s malignitou. Ve stejné skupině jsme našli signifikantně vyšší hladinu proteinu S100A8 v Den 1 ($p = 0,02$) a Den 2 ($p = 0,01$), a proteinu S100A12 v Den 2 ($p = 0,03$), (**Obr. 8**).



Obr. 8. Významné rozdíly mezi laparoskopickou a laparotomickou podskupinou podstupující chirurgický zákrok pro maligní onemocnění. (převzato z publikace Maca J., et al, *J Invest Surg.*, 2017). LPS-cancer, laparoskopická operace pro malignitu; LPT-cancer, laparotomická operace pro malignitu; NS, nesignifikantní

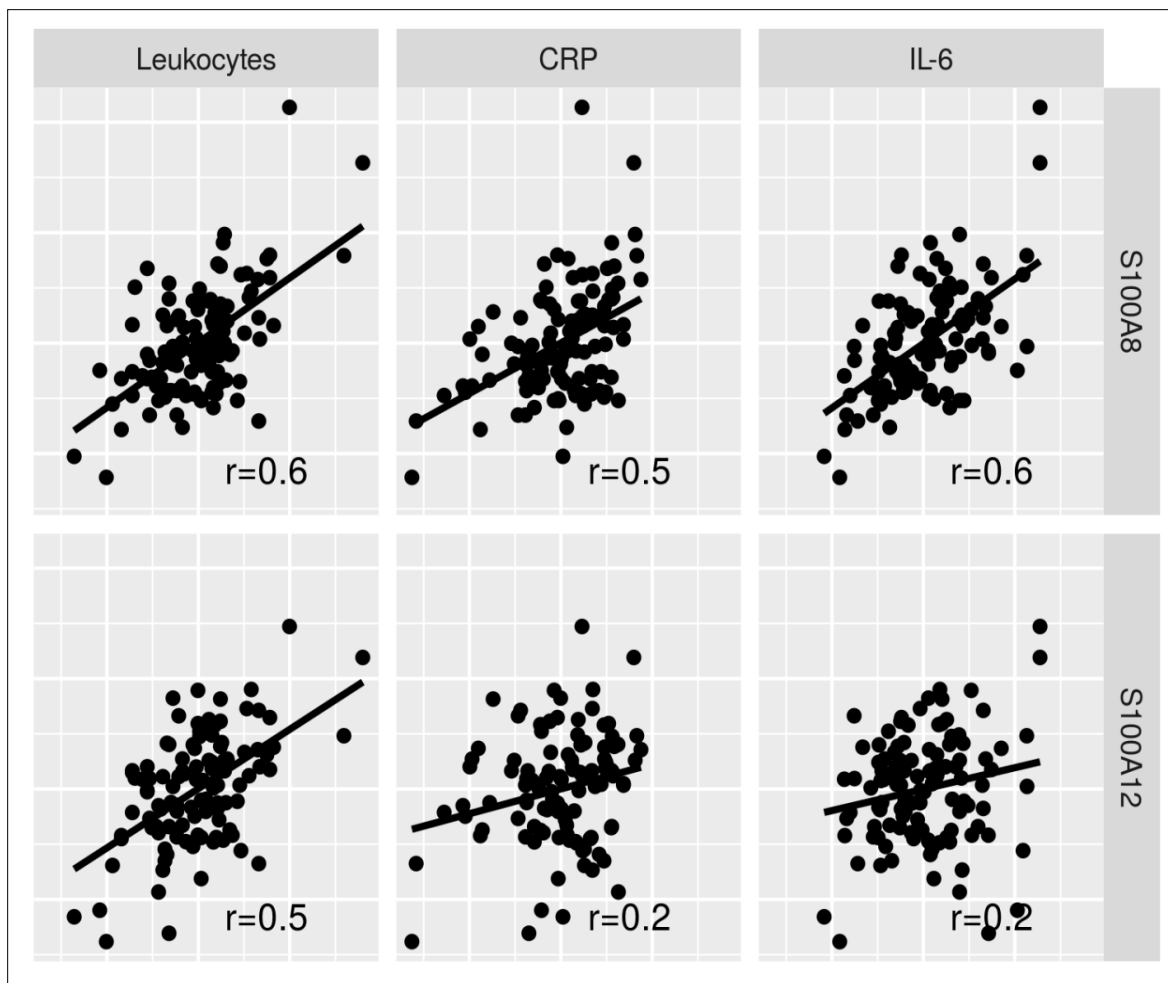
Dále byly zjištěny významně vyšší hladiny IL-6 ($p < 0,01$, pro všechny 3 dny) v laparoskopické podskupině s malignitou. Pro proteiny S100A8 a S100A12 a pro biomarker IL-6 zamítáme nulovou hypotézu.

8H₀: V rámci post-hoc analýzy jsme srovnávali hladiny alarminů (protein S100A8 a S100A12) mezi skupinou po resekčním operačním výkonu dolního GIT (kolorektální resekce) a kontrolní skupiny nechirurgických subjektů. Zjistili jsme signifikantně zvýšenou hladinu alarminů ve všech třech sledovaných dnech ($p < 0,001$), viz **Obr. 9**. Pro sledované alarminy zamítáme nulovou hypotézu a přijímáme alternativní hypotézu.



Obr. 9. Srovnání hladin alarminů (protein S100A8 a S100A12) mezi skupinou pacientů po kolorektálním resekcčním výkonu a kontrolní skupinou bez chirurgického výkonu (převzato Maca et al., abstrakt ISICEM, 2018). NS group označuje nechirurgickou kontrolní skupinu, S group označuje chirurgické pacienty po kolorektální resekcii.

9H₀: Naše analýza prokázala signifikantní korelaci mezi hladinou alarminů (protein S100A8 a S100A12) a hladinou rutinních biomarkerů (leukocyty, CRP a IL-6) u pacientů po kolorektální resekcii. Středně významné korelace byly zjištěny mezi proteinem S100A8 a všemi biomarkery: leukocyty ($r=0,6$), CRP ($r=0,5$) a IL-6 ($r=0,6$). Protein S100A12 vykázal středně významné pozitivní korelace s leukocyty ($r=0,5$), viz **Obr. 10**. Pro oba sledované alarminy zamítáme nulovou hypotézu a přijímáme alternativní hypotézu.



Obr. 10. Signifikantní pozitivní korelace mezi hladinou alarminů (proteiny S100A8 a S100A12) a hladinami vybraných biomarkerů zánětu: počet leukocytů (Leukocytes), CRP a IL-6 (převzato Maca et al., abstrakt ISICEM, 2018). Parametr r označuje Pearsonův korelační koeficient.

7. DISKUZE

Alarminy jsou významnou součástí aktivace imunitního systému v situaci neinfekčního (sterilního) poškození a účastní se i signalizace při infekčních onemocněních. Jejich primárním úkolem je upozornit na potenciální, nebo již existující, nebezpečí poškození tkání a aktivaci imunitního systému zajistit vznik zánětlivé reakce ve funkční kooperaci s ostatními obrannými mechanismy, například neuro-humorálními systémy. Role alarminů se uplatňuje jako součást složitého komplexu fyziologicko-patofyziologických procesů vedoucích k opětovnému nastolení homeostázy odstraněním patologického stavu a tím k zajištění optimální funkce organismu a jeho přežití.

V rámci naší studie byla vyšetřována dynamika sérových hladin vybraných alarminů v souvislosti s velkým chirurgickým výkonem. Základní tezí byl fakt, že chirurgický výkon vyvolá řadou mechanismů (lokální mechanická traumatizace, krvácení spojené s ischemií tkání, ischemicko/reperfúzní poškození, více viz níže) zpočátku obvykle lokalizovaný sterilní zánět, který má, pokud dojde k jeho dysregulaci a následné systémové dekompartmentizaci, potenciál vyvolat závažný systémový zánětlivý stav negativně ovlivňující funkci vzdálených orgánů a celkový klinický výsledek. Tato dysregulace může být, mimo jiné, způsobena protrahovaným anebo nadměrným působením signálů nebezpečí - alarminů. Alarminy mají pravděpodobně schopnost vyvolat ZO buď přímo, nebo jako chaperony po vazbě na signály provázející infekční komplikace, kdy potencují imunoaktivační efekt některých mikrobiálních antigenů, například endotoxinu.

Extenzivní chirurgický zákrok je vzhledem ke své invazivitě a místní traumatizaci rizikový pro vznik významné lokální a systémové zánětlivé reakce (*Marik PE et al., 2012*). Resekční výkony na GIT jsou považovány za extenzivní chirurgický zásah s významnou

lokální traumatizací a dá se tedy přepokládat, že u nich dochází k vyplavení signálů sterilního poškození, alarminů. Z tohoto důvodu bylo primárním cílem naší práce zjistit roli některých vybraných alarminů v patogenezi ZO na různé typy chirurgického abdominálního traumatu. Sekundární cíle pak sledovaly hodnocení vztahu alarminů k důležitým klinickým výsledkům a zjištění vlivu některých měřitelných charakteristik chirurgického výkonu (například DV, KZ, apod.), vlivu lokalizace resekce a typu chirurgické operativy, a ve snaze o homogenizaci studijní skupiny pak provést post hoc analýzu podskupiny kolorektálních resekce. Výběr sledovaných alarminů byl proveden na podkladě jejich známých funkcí za fyziologického i patologického stavu, které jsou dále rozvedeny.

High mobility group box 1 (HMGB1) se za fyziologických podmínek nachází v úzkém vztahu k buněčnému jádru a podílí se především na replikaci, transkripci a reparaci jaderné DNA. HMGB1 má po vyplavení do systémové cirkulace především prozánětlivý efekt, kdy významně zvyšuje a zesiluje jejich cytokinovou produkci imunitních buněk, především pak v kombinaci s některými mikrobiálními působky (*Lotze MT et al., 2005; Cohen MJ et al., 2009*). Zodpovědným mechanismem je pravděpodobně aditivní funkce HMGB1 jako chaperonu při rozpoznávání některých bakteriálních produktů, které jsou na něj přímo navázány, např. endotoxin. HMGB1 se podílí i na expresi různých adhezivních molekul na povrchu endoteliálních buněk (ICAM-1 a VCAM-1) a hraje roli ve tkáňové reparaci. Intravenózní podání HGMB1 vedlo k prozánětlivé odpovědi s tkáňovou akumulací neutrofilních granulocytů, která byla spojena se zvýšením produkce cytokinů (IL-1 β a TNF- α) a vyplavením chemokinů pro neutrofilní granulocyty (MIP-2), (*Lotze MT et al., 2007*). HMGB1 je rozpoznáván TLR 2, TLR 4 a RAGE (*Yanai Ban T et al., 2012*).

Proteiny teplotního šoku (HSPs), jmenovitě HSP70, se vyskytují převážně v endoplazmatickém retikulu. HSP70 je produkován vlivem buněčného stresu, a to jak při mechanickém, tak zejména při termickém poškození, což odráží i jeho název (*Hartl FU et al.,*

2002). Jejich vlastní cytokinová funkce je malá a hlavní funkcí je zprostředkovávat a facilitovat interakci mezi PAMPs a imunokompetentními buňkami (*Tsan MF, 2011*). HSP se váží a jsou rozpoznávány prostřednictvím TLR 2 a TLR 4.

S100A proteiny představují skupinu molekul strukturálně podobných kalmodulinu charakterizovaných přítomností kalcium vázajícího řetězce, tzv. EF-hand motiv. Někteří zástupci této rodiny, zejména subtyp A (A8, A9, A12), jsou považovány za alarminy pro jejich schopnost interakce s TLR 4 a RAGE (*Heizmann CW et al., 2002; Foell D et al., 2007*). Exprese proteinů S100A je zvýšena v zánětem postižených tkáních. Hlavním extracelulárním efektem je pravděpodobně prozánětlivý stav aktivující endoteliální buňky. Dochází tak například ke zvýšení vaskulární permeability a zvýšení exprese membránových adhezivních molekul. Dále může dojít potenciací exprese NF- κ B ke zvýšení produkce cytokinů, stimulace tkáňové migrace granulocytů a monocytů, a k negativnímu ovlivnění koagulace ve smyslu protrombotické reakce (*Vogl T et al. 1999; Pietzch J et al., 2009*). Sérové koncentrace některých S100A proteinů korelují se stupněm zánětu u různých chronických zánětlivých onemocnění (*Foell D et al., 2004; Foell D et al., 2007; Meijer B et al. 2012*). V naší studii jsme měli možnost vyšetřovat hladiny S100A5, S100A6, S100A8, S100A9, S100A11 a S100A12. Ovšem signifikantní výsledky se týkaly jen S100A8 (calgranulin A) a S100A12 (calgranulin C).

V současné době je možné stanovit sérovou hladinu celé řady alarminů. Většina z nich byla extenzivně zkoumána v posledních desetiletích, a to jak z pohledu patofyziologie různých onemocnění, tak i jako potenciální klinické biomarkery a cíle terapeutických intervencí. Hlavní pozornost byla věnována především HMGB1.

Specifikem skupiny alarminů je jejich značná heterogenita z hlediska primární buněčné lokalizace, vlastní molekulární struktury, ale také přirozené fyziologické funkce.

Jsou popsány cytoplazmatické alarminy (např. proteiny S100A, HSPs), proteiny nacházející se v jádře buněk (HMGB1) a mitochondriální molekuly (mtDNA, fMLP). Funkci „alarmu“ pro imunocyty mohou plnit také produkty intermediárního metabolismu vznikající při degradaci živin (např. extracelulární molekuly ATP, ecATP) nebo také molekuly extracelulární (intersticiální) matrix, především proteoglykany po své modifikaci nebo fragmentaci způsobené inzultem, kdy vznikají tzv. matrikiny.

Pro alarminy je typické, že se za normálního stavu se nachází pouze v buňkách a mimo buňku se prakticky nevyskytují. Jejich detekce v séru je tedy známkou různých patologických stavů, např. chronického zánětlivého stavu (*Foell D et al., 2004*), probíhajícího nádorového onemocnění (*Chen H et al., 2014*), potraumatického stavu (*Marik PE, 2012*), apod. V rámci akutních zánětlivých stavů neinfekční nebo infekční etiologie, například SIRS, sepse a těžké infekce, jejich role prozatím extenzivně zkoumána nebyla.

Problémem nadále zůstávají nejasnosti stran uvolňování alarminů z buněk. Původní představa, že alarminy se uvolňují jen z buňky poškozené nebo nekrotické, byla poupravena vzhledem k tomu, že některé alarminy mohou být také aktivně secernovány buňkami po jejich aktivaci (např. aktivované granulocyty aktivně produkují HMGB1), (*Gardella S et al., 2002*). Dalším problémem jsou nejasnosti stran extracelulární funkce alarminů. Bylo prokázáno, že vysoce purifikované preparáty HMGB1 a HSPs vykazují v podstatě jen minimální biologickou aktivitu (*Tsan MF, 2011*) a fungují pravděpodobně především jako kofaktory nebo chaperony pro jiné molekuly převážně mikrobiálního původu, např. endotoxin. To značně narušuje celý koncept jejich samostatného významu pro stimulaci imunitního systému. Někteří autoři dokonce poukazují na možnost aktivní sekrece některých „typických“ alarminů (monomeru S100A12 nebo heterodimeru S100A8/9) po stimulaci infekčním agens v rámci bakteriální infekce (prozatím nepublikovaná data, osobní komunikace, Holub 2015).

Rozsáhlý chirurgický výkon je obvykle definován jako zákrok s očekávanou dobou trvání delší než dvě hodiny nebo očekávanou KZ více než 500 ml (*Davies SJ, 2013*). Tato definice je poměrně nespecifická a dává možnost zařadit do této skupiny celé spektrum výkonů, které mohou na jednu stranu vést pouze k mírnému lokálnímu zánětu, ale také mohou být zdrojem akutního neinfekčního lokálního nebo systémového zánětu, popř. až ve formě závažné systémové imunoregulační dysbalance (*Marik PE, 2012; Khuri SF et al., 2005; Dobson GP, 2015*). Systémová dekompartmentizace hrozí především v případě nadhraniční intenzity chirurgického inzultu, jeho protrahovaného působení, nebo kombinace těchto faktorů. Vlastní chirurgický zákrok totiž vede v mnoha případech nejen k žádoucímu a očekávanému odstranění patologického stavu (např. k resekci abscesu, odstranění primárního, popřípadě sekundárního nádorového ložiska, k sutuře krvácející cévy či přemostění aterosklerotického plátu), ale je rovněž často provázen kolaterálním poškozením okolní zdravé tkáně. Mezi základní mechanismy chirurgického traumatu lze zařadit: 1) lokální mechanické (fyzikální) a termální poškození tkání a 2) lokální krvácení provázené tkáňovou ischemií s následným ischemicko-reperfúzním poškozením (*Fukatsu K et al., 2006; Grootjans J et al., 2010; Arslan F et al., 2010*).

Jednoznačná doporučení pro aplikaci poznatků týkajících se sérových hladin jednotlivých alarminů v humánní medicíně prozatím chybí. Je jen několik skupin chirurgických výkonů, u nichž byl v humánní medicíně zkoumán vztah alarminů a vlastního chirurgického traumatu. Z klinických studií dominuje problematika kardiochirurgické operativy. Interpretace výsledků ovšem není jednoznačná. Demidov a kol., ve své již relativně starší práci, zkoumal vztah hladiny HSP70, konkrétně jeho podjednotky inducibilní HSP72 a konstitutivní heat-shock cognate protein 73 (HSC73) v krvi z pravé srdeční síně a v periferních leukocytech, a poškození myokardu u skupiny 51 pacientů po kardiopulmonálním

bypassu. Elevace hladin HSP72 byla pozorována u 40 % subjektů. Vyšší hladiny HSP72 indukované po provedení bypassu byly nalezeny u pacientů s anamnézou koronárního onemocnění (stenokardie, infarkt myokardu) trvajícího déle než jeden rok oproti pacientům s příznaky trvající kratší dobu. Pacienti, kteří měli vyšší předoperační hladinu HSP72, měli po výkonu nižší známky postoperačního poškození myokardu v podobě nižších hladin aspartát aminotransferázy (AST), laktát dehydrogenázy (LDH) a kreatinkinázy (CK) spolu s její myokardiálně specifickou subfrakcí, CK-MB. HCS73 nekorelovala s markery operačního stresu. Autoři uzavírají, že vyšší hladiny HSP72 hrají protektivní roli v prekonduci myokardu před operačním výkonem, zatímco elevace konstitutivního HCS73 v pooperačním období může hrát roli v příznivém ovlivnění restituce myokardu po chirurgickém stresu (*Demidov ON et al., 1999*). To by mohlo svědčit o odlišné roli HSP70 ve srovnání s např. HMGB1 a proteiny S100A. Vyšší hladiny HSP70 odrážejí podle autorů spíše lepší schopnost tkání se bránit chirurgickému traumatu, v tomto případě více ischemii, než odrážet míru vlastního poškození. McGrath a kol. se ve své práci zabývají dynamikou hladiny HSP72 v bioptickém materiálu myokardu u 12 pacientů před a po kardiokirurgickém bypassu. Autoři popisují vyšší hladiny HSP72 v humánním myokardu ve srovnání s jinými druhy savců, ale nenachází signifikantní zvýšení hladin HSP72 po výkonu. Závěrem jejich práce je, že vyšší hladiny HSP72 mohou souviset s mírou závažnosti předchozího kardiálního onemocnění anebo medikací, i když nejsou přítomny rozdíly v perioperační dynamice hladin HSP72 (*McGrath LB et al., 1995*). Tato skutečnost by HSP72 diskvalifikovala jako potenciální marker poškození. Na druhou stranu, Taggart a kol. prokázal v Tru-Cut biopsii myokardu u skupiny 4 subjektů několikanásobné zvýšení hladin HSP72/HSC73 po krátkodobém normotermickém ischemicko-reperfúzním traumatu myokardu, zatímco u protražovaném hypotermickém inzultu hladiny zůstaly bez významné elevace (*Taggart DP et al., 1997*). Přestože se tato práce nezabývá cytoprotektivitou HSP70, opět svědčí pro možnou roli tohoto alarminu jako

ukazatele míry chirurgického traumatu. Při interpretaci výsledků uvedených studií je ovšem třeba brát v úvahu významné riziko zkreslení u takto malých vzorků zařazených subjektů.

Další skupinou chirurgických zákroků, kde byla zkoumána role alarminů, je ischemicko-reperfúzní trauma po hepatobiliární operativě, konkrétně po transplantaci jater. Ilmakunas a kol. prokázal na malém vzorku 20 subjektů, že po zrušení uzávěru portální žíly u graftu dochází k významnému vzestupu hladin HMGB1 v kavální krvi ve srovnání s hladinami v portální žíle. Vyšší hladiny HMGB1 poté přetrvávaly a byly nezávislé na hladinách IL-6 a TNF- α . Hladiny dále korelovaly s mírou postoperační steatózy jater a elevací alanin aminotransferázy (ALT), což dle autorů naznačuje roli HMGB1 jako markeru hepatálního poškození při transplantaci jater (*Ilmakunnas M et al., 2008*).

Náš výzkum se zabýval rolí alarminů v gastrointestinální chirurgii. Výsledky ukazují, že u naprosté většiny chirurgických pacientů, kteří podstoupili resekční výkon v oblasti GIT, se v průběhu prvních tří pooperačních dní rozvine systémová zánětlivá odpověď (u 93 %). Vzhledem ke standardně používané perioperační antibiotické profylaxi (tzv. opravě v „chráněném koagulu“) lze na tuto imunitní reakci nahlížet jako na relativně sterilní zánět, kdy se na jeho iniciaci podílejí predominantně alarminy vyplavené ze tkání poškozených při vlastním resekčním výkonu.

Reálná incidence SIRS u pacientů hospitalizovaných na JIP není přesně známá. Kritéria SIRS splnilo až 68 % pacientů přijatých do terciálních zdravotnických zařízení (*Rangel-Fausto MS et al., 1995*). Prevalence SIRS je odhadována až na 93 % u pacientů na chirurgicky zaměřených JIP (*Pittet D et al., 1995*). Dále bylo prezentováno, že z pacientů přijatých přes urgentní příjem s diagnózou SIRS mělo prokázanou infekci 62 %. To znamená, že 38 % případů SIRS bylo neinfekčních. Na druhou stranu ve stejné práci až 38 % pacientů s prokázanou infekcí nesplnilo kritéria SIRS.

V případě SIRS dochází k aktivaci celého spektra buněk. Jedná se o imunocyty (tkáňové M ϕ , krevní monocyty, granulocyty, lymfocyty), žírné buňky, krevní destičky, endoteliální buňky, buňky hladkého svalu, fibroblasty, a další, které jsou schopny produkovat velké množství zánětlivých mediátorů. Po aktivaci jsou nejprve produkovány tzv. cytokiny časně fáze (tzv. proximální cytokiny) jako TNF- α) a IL-1 β , které spouštějí některé další důležité procesy (kaskády). Je aktivována funkce NF- κ B, který vede k produkci mediátorové RNA (mRNA) a následné produkci dalších, převážně prozánětlivých, mediátorů. Mezi nejdůležitější (neprozkoumanější) patří IL-6, IL-8, and IFN- γ .

Proximální cytokiny TNF- α and IL-1 β jsou uvolňovány ve velkém množství již v průběhu 1 hodiny po inzultu a mají jak lokální, tak systémové účinky. Experimentálně bylo prokázáno, že po podání TNF- α a IL-1 β samostatně, nebyl jejich hemodynamický účinek výrazný. Pokud byly ovšem tyto látky podány zároveň, vedlo to k závažné hypotenzi a také k těžkému plicnímu poškození (<http://emedicine.medscape.com/article/168943-overview>). TNF- α a IL-1 β jsou zodpovědné i za zvýšení tělesné teploty a za humorální stresovou odpověď (noradrenalin, vazopressin, aktivace systému renin-angiotensin-aldosteron). Ostatní cytokiny, zejména IL-6, stimulují produkci reaktantů akutní fáze, například CRP a prokalcitoninu. Prozánětlivé cytokiny mají, jak přímý vliv na tkáňové struktury, tak i funkci v přenosu signálu (sekundární mediátory) vedoucímu k aktivaci komplementu a koagulace, produkci oxidu dusnatého (NO), aktivaci destiček a zvýšené produkci eikosanoidů (prostanoidy a leukotrieny). V rámci aktivace komplementové kaskády se vytvářejí různé biologicky aktivní proteiny. K nejzkoumanějším patří tzv. anafylatoxiny (C3a, C5a), které mají permisivní vliv na produkci jiných cytokinů, hrají roli v chemotaxi, způsobují vazodilataci a zvýšenou vaskulární permeabilitu. Eikosanidy jsou látky s velice krátkým poločasem rozpadu (minuty) a mají z hlediska vztahu k zánětu převážně prozánětlivý efekt, dokáží prohloubit poškození endotelu a tím usnadnit rozvoj orgánových dysfunkcí. V rámci

průběhu SIRS je také velice významný vztah mezi zánětem a koagulací. IL-1 β and TNF- α přímo poškozují povrch buněk endotelu. Endoteliální buňky a leukocyty exprimují tkáňový faktor, který iniciuje produkci trombinu. Trombin aktivuje trombocyty a vede k tvorbě fibrinu (prokoagulační stav), zároveň má i prozánětlivé vlastnosti. Časné cytokiny (IL-1 β a TNF- α) zároveň ovlivňují i fibrinolýzu (snižují degradaci fibrinu) zvýšenou produkcí aktivátoru inhibitoru plazminogenu (PAI-1). IL-6 zvyšuje produkci trombocytů a fibrinogenu. V rámci prozánětlivého stavu je zároveň snížena aktivita přirozených inhibitorů koagulace jako jsou antitrombin, inhibitor tkáňového faktoru (TFPI) a aktivovaný protein C (aPC). Aktivace koagulace se může, rozvojem povšechné mikrovaskulární trombózy a konsumpční koagulopatie, aktivací komplementu a přímým vlivem na ZO, podílet na vzniku a rozvoji orgánových dysfunkcí (MODS).

Dominantními prvky v rámci těžkého SIRS jsou tedy patologická ZO a porucha hemostázy. V situaci, kdy je intenzita SIRS nadměrná nebo protrahovaná, může dojít k rozvoji orgánových dysfunkcí. Postiženými orgány bývají plíce, ledviny, GIT, kardiovaskulární systém (myokard), CNS apod. Aby se zabránilo detrimetálnímu působení nebalancovaného SIRS, organismus obvykle reaguje kompenzačními protizánětlivým mechanismem CARS. CARS je možno zjednodušeně charakterizovat jako snahu systému (organismu) o udržení kompartmentizace zánětu lokálně ve tkáních nebo jako snahu o regulaci zánětu již dekompartmentizovaného systémově. Vyznačuje se lokální a systémovou produkcí cytokinů s protizánětlivou aktivitou (IL-4 a IL-10) což vede k poklesu produkce TNF- α , IL-1 β , IL-6 a IL-8. Zároveň jsou produkovány i antagonisté proximálních cytokinů (anti-TNF- α a receptorový antagonist IL-1 β), které svou vazbou na cílový cytokin snižují jeho efekt nebo blokují jeho receptor. Schopnost organismu dosáhnout dynamické rovnováhy mezi SIRS a CARS je určujícím faktorem ovlivňujícím pacientovu prognózu. Je možné, že nešetrný zevní zásah v podobě podávání protizánětlivé medikace ve snaze o redukcii

negativního efektu SIRS na orgánové systémy, vede k narušení vytvářející se rovnováhy s přirozenou pro a anitinfamatorní odpovědi. Může tak dojít k rozvoji nežádoucí protražované imunosuprese, která následně může vést k sekundárním infekčním komplikacím. Tím se uzavírá bludný kruh dysregulace imunitní odpovědi na inzult. Dle prvních představ CARS následoval až s určitým zpožděním po rozvoji SIRS, novější přístup ovšem poukazuje na přítomnost některých markerů přítomnosti CARS již bezprostředně po začátku projevů SIRS, a navíc jistě existuje i významná interorgánová variabilita v míře SIRS a CARS. Výsledný poměr mezi prozánětlivými a protizánětlivými procesy na systémové úrovni je nazýván jako syndrom smíšené antagonistické odpovědi (MARS). Pokud jsou oba druhy systémové odpovědi nadměrné a/nebo protražované, a také pokud nejsou adekvátně navzájem synchronizované, může poté dojít k již zmíněné dysregulaci celkové ZO vedoucí k MODS. Stojí za zmínku, že vysoký výskyt SIRS v naší práci ukazuje na zvýšené riziko dysregulace ZO po MAS.

V naší práci jsme dále u skupiny operovaných pacientů zjistili signifikantně vyšší sérové hladiny všech alarminů, kromě HMGB1. Tento nález naznačuje roli alaminů v patogenezi pooperační ZO. Zároveň je pravděpodobné, že dynamika hladin některých alarminů by mohla přímo odrážet míru chirurgického poškození, které je zdrojem systémové ZO. Předpoklad, že hladiny alarminů vysoce významně korelují s hladinami klasických biomarkerů, jsme v naší práci nepotvrdili. Klasické biomarkery zánětu, např. CRP a IL-6 odráží různé typy poškození, například akutní infekční onemocnění a také sterilní trauma. Je tedy očekávatelné, že vyplavení alarminů při extenzivním chirurgickém poškození bude následováno příslušnou změnou sérových hladin těchto biomarkerů. Alarminy je v tomto kontextu možno považovat za signály první fáze, které následně vyvolají aktivaci imunitního systému produkci zánětlivých biomarkerů (*Jain et al., 2011; Tanaka et al., 2014*). Naše

výsledky potvrdily jen malou až středně významnou pozitivní korelaci mezi hladinou některých alarminů a biomarkerů. Ze všech sledovaných alarminů především protein S100A8 vykázal konzistentní středně významnou pozitivní korelaci s CRP a IL-6. Vysvětlením pro relativně nízkou úroveň korelace mezi alarminy a biomarkery by mohlo být to, že na patogenezí prozánětlivého stavu se podílí ve větší míře jiné než námi vyšetřované alarminy, např. mitochondriální alarminy (mtDNA, fMLP). Dalším možným vysvětlením je načasování intervalů krevních odběrů, které nemusí adekvátně odrážet dynamiku sérových hladin alarminů. Nicméně naše výsledky naznačují, že se protein S100A8 pravděpodobně podílí na ovlivnění sérových hladin některých biomarkerů zánětu.

Ze všech sledovaných alarminů pouze sérové hladina HMGB1 vykázala významný vztah k některým parametrům chirurgického zákroku. Šlo o délku DV, KZ a objem IT. To by mohlo naznačovat význam HMGB1 pro posuzování rozsahu chirurgického poškození i přesto, že rozdíl v hladinách HMGB1 mezi studijní a kontrolní skupinou nebyl statisticky významný. V časném stádiu po inzultu je HMGB1 predominantně pasivně vyplavován z nekrotických buněk (*Scaffidi P et al., 2002*), ale později dochází k jeho aktivní sekreci aktivovanými imunocyty v rámci odpovědi na IL-1 β , TNF- α , INF- γ a PAMPs (*Gardella S et al., 2002*). HMGB1 se tedy účastní komplexní signalizace úzce související s rozvojem SIRS, popř. sepse, pravděpodobně ovlivněním produkce IL-6 (*Manganelli V et al., 2010*). Zvýšení hladin HMGB1 bylo nalezeno při několika neinfekčních patologických stavech, např. při ischemicko-reperfúzním poškození ledvin a jater (*Tsung A et al., 2005; Kruger B et al., 2009*), po operacích jícnu (*Suda K et al., 2006*) a při hemoragickém šoku (*Ombrellino M et al., 1999*). Navíc, HMGB1 hraje také významnou roli při popáleninovém traumatu (*Lantos J et al., 2010*) a u traumaticko/chirurgického poškození (*Suda K et al., 2006; Abraham E et al., 2009; Peltz et al., 2009*). Naše výsledky potvrzují roli HMGB1 jako mediátoru chirurgického poškození v časném pooperačním období.

Ve studii jsme dále prokázali signifikantní rozdíl mezi hladinou alarminů S100A8 a S100A12 při operacích horního GIT (resekční výkony na jícnu a žaludku) a ostatními lokalizacemi operačního výkonu (střední – tenké střevo, a dolní GIT – kolorektální resekce). Vyšší hladiny těchto alarminů v horním GIT oproti ostatním etážím mohou být vysvětleny například vyšší radikalitou chirurgických zákroků na horním GIT a/nebo zvýšenou expresí těchto alarminů ve tkáních horního GIT. Průkaz této skutečnosti je otázkou dalšího výzkumu.

Studie hodnotící roli alarminů (především HMGB1) v experimentálních a klinických podmínkách často považují HMGB1 za relevantní biomarker klinického výsledku (*Tong HS et al., 2011; Zhu XD et al. 2012; Pilzweger C et al., 2014*). Nicméně jiní autoři predikční schopnost HMGB1 zpochybňují, zejména ve vztahu k sepsi (*Karlsson S et al., 2008*). Naše výsledky ukázaly poměrně konzistentní korelaci mezi HMGB1 a některými charakteristikami chirurgického zákroku. Protein S100A8 (a méně významně i S100A12) vykázal signifikantní pozitivní korelaci s délkou pobytu na JIP (ICU-LOS) a mortalitou (28denní a nemocniční). Hladiny S100A8 a S100A12 vyšetřené časně po chirurgickém zákroku na GIT lze tedy považovat za slibný marker predikující klinický výsledek pacientů. Z důvodu pilotního charakteru naší studie nelze tyto výsledky srovnat jinými podobně tematicky zaměřenými pracemi.

Laparoskopické výkony jsou v posledních desetiletích preferovány oproti klasické otevřené chirurgii (laparotomii), především pro jejich menší invazivitu (menší chirurgický řez), nižší pooperační bolest, snížené riziko infekčních komplikací, rychlejší obnovu mobility pacienta a lepší dlouhodobý klinický výsledek (*Conzo G et al., 2016; Conzo G et al, 2014*).

Laparoskopie patří mezi standardní postupy při kolorektální chirurgii pro snížené náklady a lepší krátkodobé klinické výsledky (kratší délka hospitalizace v nemocnici a snížený počet komplikací) ve srovnání s otevřenou chirurgií (*Zhuang C et al., 2015*). Laparoskopie má ovšem také řadu nevýhod, jako například potřeba větší zkušenosti chirurga, omezený rozsah

pohybu nástrojů, snížená možnost odhadu hloubky, absence taktilních vjemů při manipulaci v operačním poli při použití nástrojů s nižší šetrností vůči tkáním ve srovnání s rukou chirurga, a dále delší doba operace a anestezie.

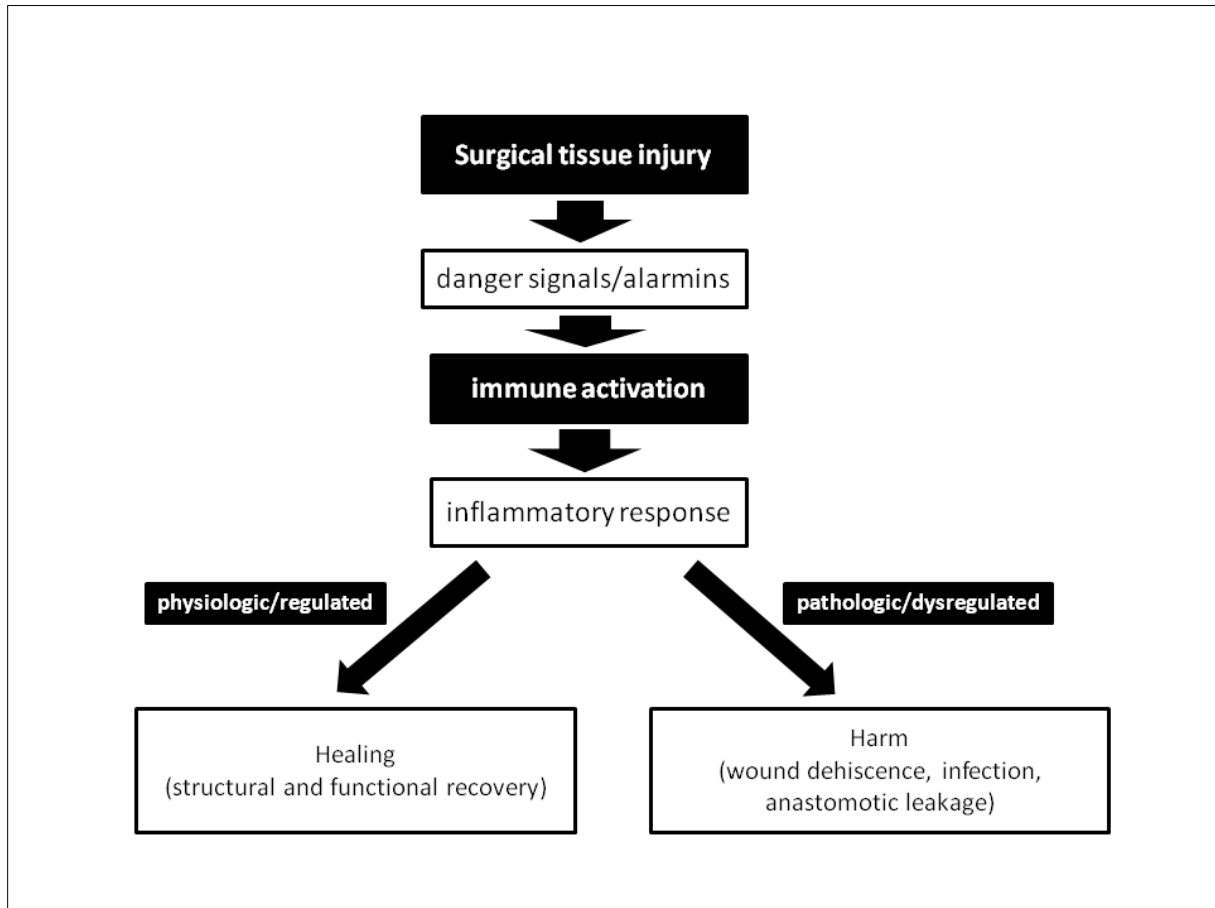
Žádná studie doposud nehodnotila invazivitu různých chirurgických procedur pomocí sérových hladiny alarminů. Naše výsledky neprokázaly signifikantní rozdíl v hladině vybraných alarminů mezi skupinou pacientů po laparoskopii a skupinou po otevřeném chirurgickém zákroku bez ohledu na gastrointestinální lokalizaci (*Maca J et al., Therap Clin Risk Manag., 2018*). To naznačuje obdobnou míru chirurgické traumatizace u obou typů procedur z pohledu dynamiky hladin vybraných alarminů. Na druhou stranu jsme prokázali signifikantně vyšší hladinu IL-6 druhý a třetí den v laparoskopické skupině, což přesto naznačuje vyšší ZO na tento typ operativy. Je pravděpodobně, že na vyšší ZO v laparoskopické skupině se může podílet jiná skupina alarminů, než která byla v rámci naší práce vyšetřována. Ramanathan a kol. popsal signifikantně vyšší hladinu CRP u pacientů po extenzivní otevřené resekci tlustého střeva ve srovnání s laparoskopickým přístupem. Ve srovnání s našimi výsledky autoři nepopsali některé základní charakteristiky studijní skupiny, například váhu nebo index tělesné hmotnosti (BMI) a chirurgické charakteristiky, například DV, KZ a použití VT. Naše výsledky naopak neprokázaly významný rozdíl v hladinách CRP mezi oběma typy chirurgických procedur ve srovnatelné podskupině kolorektálních resekcí během obdobné doby pooperační observace. Odlišné výsledky mohou být vysvětleny menším počtem pacientů zařazených do naší studie anebo potenciálními rozdíly v základních a chirurgických charakteristikách mezi oběma studii. Fretland a kol. zkoumal oba typy chirurgického zákroku (laparoskopie/laparotomie) z pohledu změny hladin biomarkerů po resekcích jaterních metastáz kolorektálního karcinomu. Autoři prokázali vyšší hladiny HMGB1, IL-6, CRP, volné DNA a makrofágového zánětového proteinu (MIP)-1 β po otevřených chirurgických zákrocích (*Fretland A et al, 2015*). Tyto výsledky jsou jen v

částečné shodě s našimi výsledky, protože jsme nenalezli významný rozdíl mezi sérovými hladinami HMGB1 a CRP. Uvedená odlišnost může být vysvětlena například rozdílným typem orgánových resekcí. Nicméně, naše výsledky také prokázaly významný rozdíl v hladinách IL-6 v laparoskopické skupině, což naznačuje vyšší úroveň ZO navzdory faktu, že hladiny alarminů se mezi skupinami nelišily.

Signifikantně vyšší hladiny některých alarminů (S100A8, S100A12) jsme zjistili u podskupiny pacientů, kteří podstoupili laparoskopický výkon pro nádorové onemocnění. To na jednu stranu potvrzuje roli proteinu S100A v rámci patogeneze nádorových onemocnění (*Chen H et al., 2014*), ale na druhou stranu by to mohlo odrážet významnější systémové vyplavení uvedených alarminů po protražovaném laparoskopickém výkonu. Navíc jsme zjistili signifikantně vyšší hladiny IL-6 v laparoskopické skupině, což také naznačuje větší zánětlivou reakci pravděpodobně z důvodu delší DV, vyšší KZ i IT.

V další fázi naší práce jsme se, v rámci snahy o maximální možnou homogenizaci studijního souboru, zaměřili na nejvíce zastoupenou podskupinu v našem souboru, pacienty s kolorektálními resekcemi, a srovnali ji s kontrolní skupinou pacientů bez chirurgické intervence (*Maca et al., ISICEM, 2018*). Nalezli jsme signifikantně vyšší hladiny proteinu S100A8 a S100A12 v chirurgické skupině, což naznačuje jejich potenciální roli jako součást časné ZO na extenzivní kolorektální chirurgický inzult. Následné zvýšení sérových hladin příslušných zánětlivých biomarkerů jako je počet leukocytů, CRP, a IL-6, může svědčit o roli vyšetřovaných alarminů při produkci zmíněných biomarkerů. Pokladem pro toto tvrzení je naše zjištění středně vysoké pozitivní korelace mezi zmíněnými proteiny S100A a uvedenými rutinními biomarkery. Celkově jsou tyto výsledky ve shodě s navrženou sekvencí iniciace sterilní ZO: tkáňové poškození – signály nebezpečí (alarminy) – aktivace vrozené, popřípadě adaptivní imunity – ZO, viz **Obr. 11**. Cílem této sekvence je iniciace hojení a reparace

poškození, ovšem při dysregulaci ZO může vést ke komplikacím a tkáňové dysfunkci (Tanaka T et al., 2014).



Obr. 11. Zjednodušené schéma aktivace imunitního systému po chirurgickém traumatu (převzato z Maca J et al., ISICEM, 2018).

Chirurgická intervence vyvolá tkáňové poškození (surgical tissue injury) následované vyplavením signálů nebezpečí (danger signals/alarmins) z postižených tkání. Ty pak aktivují vrozenou a adaptivní imunitní (immune activation) odpověď vedoucí k ZO (inflammatory response). Tento sterilní zánět za normálních okolností vede ke strukturální a funkční reparaaci příslušné tkáně (healing). V případě, že dojde k dysregulaci imunitní odpovědi, může stav vést ke vzniku různých komplikací (harm) negativně ovlivňujících klinický výsledek pacienta.

Naše výsledky naznačují, že vybrané alarmíny mohou sloužit jako časné biomarkery tkáňového poškození se slušnou prediktivní hodnotou stran míry potenciálně škodlivé ZO, a

také, že měření sérových hladin vybraných alarminů může být užitečné v predikci pooperačních komplikací negativně ovlivňujících klinický výsledek pacientů (*Maca J et al., J Invest Surg, 2017*).

U našeho pilotního výzkumu je možné identifikovat několik limitací. Jde především o 1) relativně nízký počet pacientů a 2) nerovnoměrnou distribuci věku a pohlaví mezi Ch a NCh-skupinou, což by mohlo být zdrojem potenciálního zkreslení výsledků statistické analýzy, např. při rozdílné imunoreaktivitě starších pacientů, nebo rozdílné dynamice uvolňování alarminů ze tkání apod. Ke zjištění velikosti rizika zkreslení výsledků jsme použili multivariantní analýzu, která zahrnuje věk a pohlaví jako kontrolní proměnné. Rozdíly v hladinách alarminů zůstaly přesto významné. Další limitací studie je 3) neznalost předoperační hladiny alarminů, která ztěžuje posouzení vlivu primárního chirurgického onemocnění a 4) fakt, že zvolené intervaly krevních odběrů nemusejí adekvátně odrážet dynamiku hladin vyšetřovaných biomarkerů.

Naše práce podporuje intraoperační používání tzv. “fyziologické” chirurgie a zdůrazňuje její výhody. Jde o úsilí o maximální možnou redukci intraoperačního chirurgického stresu použitím co nejméně invazivních technik, menší incise, snížení mechanické deformace a traumatizace tkání, které ve svém výsledku vedou k nižší imunitní, neuro-humorální, metabolické odpovědi, menší pooperační bolesti a rychlejší strukturálnímu a funkčnímu zotavení pacienta.

Co nejlepší pochopení fyziologických a patofyziologických mechanismů ZO následující po chirurgickém poškození tkání by mohlo vést k časné identifikaci rizikových faktorů pro vznik pooperačních komplikací. Jde především o zjevné (například arteriální hypotenze) nebo skrytě probíhající (například protrahované lokální krvácení, ischemicko-reperfúzní poškození) patologické procesy, které mohou, ve svém důsledku vést k poruše

orgánových funkcí jako následku generalizované mikrocirkulační hypoperfúze. Rychlým a razantním preventivním, popřípadě terapeutickým, zásahem by pak bylo možné docílit adekvátního a časného návratu tkáňové homeostázy, a tím následně zajištění rychlé a efektivní funkční a strukturální reparace poškozených tkání.

8. ZÁVĚR

Problematika imunitní odpovědi na sterilní zánět vyvolaný chirurgickým traumatem je prozatím málo zkoumané téma. Alarminy primárně fungují jako signály nebezpečí především poškození buněk, a mají schopnost aktivace imunitní ZO. Vlastní imunitní reakce je navíc ovlivněna řadou dalších individuálních faktorů pacienta jako jsou genetické pozadí, komorbidity, aktuální imunologický stav, věk apod. Naše výsledky naznačují, že sérové hladiny vybraných alarminů mohou časně odrážet míru chirurgického traumatu (HMGB1) a také hrát prognostickou roli v predikci klinických důsledků chirurgického zákroku (proteiny S100A8 a S100A12). Je velice pravděpodobné, že se některé z námi sledovaných alarminů podílí nejen na normální, fyziologické, lokální zánětlivé reakci na chirurgické poškození, ale i na dysregulované systémové zánětlivé reakci. Tento fakt může přispět k pochopení některých patofyziologických mechanismů vedoucích k rozvoji pooperačních komplikací zhoršujících prognózu pacienta.

Náš výzkum v oblasti rozsáhlých abdominálních chirurgických výkonů lze chápat jako jeden z kroků na cestě k identifikaci role alarminů v rámci složitých obranných reakcí na různé typy buněčného a tkáňového poškození.

9. SOUHRN

ZO je základní reakcí na poškození buněk a tkání. Jejím cílem je zvrát patologického procesu a zachování strukturální a funkční integrity živého organismu. Nadhraniční nebo protrahované působení inzultu může vést k dysregulaci zánětu až na systémovou úroveň. Za významný inzult lze považovat i rozsáhlý chirurgický výkon, např. resekční výkon na GIT, tzv. major abdominal surgery (MAS). Signálem pro aktivaci ZO mohou být alarminy, což jsou intracelulární molekuly, které v situaci, kdy je buňka poškozena, jsou uvolňovány do extracelulárního prostoru, kde mají bioaktivní efekt. Alarminy tedy mohou odrážet míru chirurgického poškození. **Cíle práce:** Primárním cílem práce bylo zjistit roli vybraných alarminů při stimulaci ZO při MAS. Sekundárními cíle práce byly: 1) zjistit schopnost vybrané skupiny alarminů predikovat klinický výsledek, 2) stanovit vztah hladiny alarminů a lokalizace chirurgické resekce, 3) stanovení korelace mezi hladinami alarminů a některými charakteristikami chirurgického výkonu, např. délka výkonu, krevní ztráty a intraoperační tekutinová nálož, 4) srovnat efekt laparoskopie a otevřené chirurgické operativy na hladiny alarminů a 5) ověřit předchozí výsledky stanovením role alarminů v podskupině pacientů podstupujících kolorektální chirurgii. **Materiál a metodika:** Subjekty byly zařazovány po dobu 12 měsíců do nechirurgické (NCh); (n=35) a chirurgické (Ch) skupiny (n=82). U subjektů studie byly stanoveny sérové hladiny alarminů (S100A8 a 12, high mobility group box – HMGB1, protein teplotního šoku 70 - HSP70) a rutinních biomarkerů zánětu (C-reaktivní protein – CRP, interleukin 6 – IL-6, albumin). Pro analýzu srovnání typu chirurgického výkonu byla Ch-skupina rozdělena na podskupinu laparoskopickou a na skupinu laparotomickou. Pro post hoc analýzu byla vybrána podskupina pacientů podstupujících kolorektální resekce. **Výsledky:** Kromě HMGB1 byly hladiny všech alarminů

signifikantně vyšší v Ch-skupině ve srovnání s NCh-skupinou. V Ch-skupině byla zjištěna významná pozitivní korelace mezi S100A8 a IL-6 i CRP. Hladina S100A8 byla významně vyšší u zákroků na horním GIT. HMGB1 pozitivně koreloval s délkou operace, krevní ztrátou a perioperačním příjmem tekutin. Koncentrace S100A8 a S100A12 významně korelovaly s délkou hospitalizace na JIP, 28denní a hospitalizační mortalitou. Hladiny vybraných alarminů se nelišily mezi laparoskopickou a laparotomickou podskupinou. V laparoskopické podskupině pacientů s nádorovým onemocněním byly nalezeny signifikantně vyšší hladiny proteinů S100A8 a S100A12, a rovněž IL-6. Hladiny proteinů S100A8 a S100A12 byly významně vyšší v podskupině pacientů s kolorektální resekci oproti podskupině bez chirurgického výkonu. V podskupině kolorektálních resekcí byla nalezena středně silná pozitivní korelace mezi hladinou vybraných proteinů S100A a sledovanými biomarkery zánětu (počet leukocytů, CRP, a IL-6). **Závěr:** MAS vede ke zvýšení sérové hladiny alarminů. Z vybraných alarminů hraje pravděpodobně dominantní roli při patogenezi systémového zánětu zejména protein S100A8 a protein S100A12, zatímco HMGB1 nejlépe z vybraných alarminů odráží míru sterilního chirurgického traumatu. Celkově je patrné, že alarminy jsou součástí fyziologické ZO na sterilní trauma a uplatňují se zřejmě také v rozvoji patologické ZO, která se podílí na lokálním orgánovém poškození anebo vede k dysregulaci a systémové dekompartimentizaci zánětu se všemi patofyziologickými důsledky.

10. SUMMARY

Inflammatory response (IR) is a fundamental reaction to the cell and tissue injury. It is aimed at correcting the pathologic condition and maintaining the structural and functional integrity of the organism. The insult with too extensive or prolonged effect can lead to dysregulation of IR to the systemic level. Major abdominal surgery (MAS) can be considered as a potentially significant insult. Alarmins are endogenous, intracellular proteins that are passively or actively released upon the cell injury to extracellular space where they express their bioactive effect. Alarmins has therefore potential reflect the degree of surgical injury

Purpose: The main goal of the study was elucidating the role of selected alarmins in inflammatory response after MAS. The secondary aims were: 1) determining the relationship between alarmins and outcome prediction, 2) to determine relationship of alarmins and place of surgical intervention, 3) to determine correlation between alarmins and some of the surgery characteristics, e.g. length of surgery, blood loss, and intraoperative fluid load, 4) compare injury caused by laparoscopy and open surgery reflected by alarmins, and 5) to confirm previous results by determining the role of alarmins in surgical injury in subgroup of patients undergoing colorectal resections.

Methods: For 12 months, study subjects were enrolled in non-surgical (NS-) group (n=35) and surgical (S-) group (n=82). Serum levels of alarmins (S100A8 and 12, high mobility group box - HMGB1, and heat shock protein 70 - HSP70) and routine biomarkers (CRP, IL-6, and albumin) were analyzed. To compare types of surgery the S-group was divided into laparoscopy and open surgery subgroups. For post hoc analysis was chosen subgroup of colorectal resections.

Results: Except for HMGB1, the levels of all alarmins were higher in the S-group compared to the NS-group. In the S-group, positive

correlations were found between S100A8 and some of the biomarkers (IL-6 and CRP). Additionally, the S100A8 level was significantly higher in patients who underwent upper GIT surgery. Significant positive correlations were found for HMGB1 with the length of surgery, blood loss and intraoperative fluid intake. Serum levels of S100A8 had positive correlations with intensive care unit length of stay (ICU-LOS), 28-day and in-hospital mortality. Serum levels of S100A12 demonstrated significant, positive correlations with ICU-LOS, 28-day mortality, and in-hospital mortality. The levels of selected alarmins did not differ between laparoscopy and open surgery subgroup. We found significantly higher levels of protein S100A8 and S100A12, and IL-6 in laparoscopy subgroup with malignancy. Proteins S100A8 and S100A12 were significantly higher in colorectal resection subgroup compared to non-surgical subgroup. We found moderate positive correlation between proteins S100A and selected biomarkers of inflammation (WBC, CRP, and IL-6) in colorectal resections subgroup. **Conclusion:** MAS (also colorectal resections) elicits significant elevation of alarmins serum levels. Protein S100A8 seems to play dominant role in generation of systemic inflammation. Moreover, the HMGB1 levels reflect the degree of surgical injury. Generally, alarmins are part of physiologic IR to sterile injury and their role is probably also in development of deleterious IR which leads to local organ dysfunction and/or dysregulation and systemic decompartmentization of inflammation with all pathological consequences.

11. SEZNAM ZKRATEK

AGE	advanced glycation endproducts
APACHE II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II
aPC	activated protein C
ASA	American Society of Anesthesiologists
ATP	adenosin trifosfát
BMI	body mass index
CARS	compensatory antiinflammatory response syndrome
CLRs	C-type lectine receptors
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
CRP	C-reaktivní protein
ČSIM	Česká společnost intenzivní medicíny
DAMPs	damage/danger-associated molecular patterns
DC	dendritic cells
DF	dechová frekvence
dsRNA	double stranded RNA
DV	délka výkonu
EBR	erythrocyte concentrate without buffy coat
ecATP	extracellular adenosine triphosphate
EK	etická komise
ERAS	Enhanced Recovery After Surgery
FFP	fresh frozen plasma
fMLP	formylated Met-Leu-Phe

GIT	gastrointestinální trakt
HIV-1	human immunodeficiency virus 1
HMGB1	high mobility group box 1
HSP	heat-shock protein
CH	chirurgická
ICAM-1	intercellular adhesive molecule 1
ICU	intensive care unit
ICU-LOS	intensive care unit length of stay
IFN	interferon
IL	interleukin
IRFs	interferon regulatory factors
IT	intraoperační příjem tekutin
I κ B	inhibitor kappa B
JIP	jednotka intenzivní péče
KARIM	Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny
KZ	krevní ztráty
LOS	length of stay
LPS	lipopolysacharid
LRR	leucine-rich repeat
M ϕ	makrofágy
MAMPs	microbe-associated molecular patterns
MAPK	mitogen-activated proteinkinase
MARS	mixed antagonist response syndrome
MAS	major abdominal surgery
MIP	macrophage-inflammatory protein

mtDNA	mitochondrial deoxyribonucleic acid
MyD88	myeloid differentiation primary response 88
NETs	neutrophil extracellular traps
NF- κ B	nuclear factor – kappa B
NCH	nechirurgická
NK	natural killers
NLRs	NOD-like receptory
PaCO ₂	parciální tlak oxidu uhličitého
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PAMPs	pathogen-associated molecular pattern
PRRs	pattern recognition receptors
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
RAMPs	resolution-associated molecular patterns
RLRs	RIG-1 like receptors
RM ANOVA	repeated measures ANOVA
RNS	reaktivní dusíkové sloučeniny
ROS	reaktivní kyslíkové sloučeniny
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SD	standard deviation
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
ssRNA	single stranded RNA
TF	tepová frekvence
TIR	Toll/IL-1 receptor
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLR	toll-like receptor

TNF- α	tumor necrosis factor alpha
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TT	tělesná teplota
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VT	vazoaktivní terapie
ZO	zánětlivá odpověď

12. LITERATURA

1. Abraham E. Unraveling the role of high mobility group box protein 1 in severe trauma. *Crit Care*. 2009;13:1004.
2. Arslan F, Keogh B, McGuirk P, Parker AE. TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:704202.
3. Barie PS, Hydo LJ. Epidemiology of multiple organ dysfunction syndrome in critical surgical illness. *Surg Infect (Larchmt)*. 2000;1:173-85.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*. 1992;20: 864-74.
5. Caderwood SK, Mambula SS, Gray PJ Jr. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1113:28-39.
6. Chen H, Xu C, Jin Q, et al. S100 protein family in human cancer. *Am J Cancer Res*. 2014;4(2):89-115.
7. Cohen MJ, Brohi K, Calfee CS, Rahn P, Chesebro BB, Christiaans SC, Carles M, Howard M, Pittet JF. Early release of high mobility group box nuclear protein 1 after severe trauma in humans: role of injury severity and tissue hypoperfusion. *Crit Care*. 2009;13:R174.
8. Cole AM, Kim YH, Tahk S, et al. Calcitermin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretions. *FEBS Lett* 2001; 504:5-10.
9. Conzo G, Pasquali D, Gambardella C, et al. Long-term outcomes of laparoscopic adrenalectomy for Cushing disease. *Int J Surg*. 2014;12(Suppl 1):107-11.

10. Conzo G, Tartaglia E, Gambardella C, et al. Minimally invasive approach for adrenal lesions: Systematic review of laparoscopic versus retroperitoneoscopic adrenalectomy and assessment of risk factors for complications. *Int J Surg*. 2016;28(Suppl 1):118-23.
11. Davies SJ, Francis J, Dilley J, Wilson RJT, Howell SJ, Allgar V. Measuring outcomes after major abdominal surgery during hospitalization: reliability and validity of the Postoperative Morbidity Survey. *Perioper Med (London, England)*. 2013;2:1.
12. Demidov ON, Tyrenko VV, Svistov AS, et al. Heat shock proteins in cardiosurgery patients. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;16:444–9.
13. Dobson GP. Addressing the Global Burden of Trauma in Major Surgery. *Front Surg*. 2015;2:43.
14. dos Santos CC, Slutsky AS. Mechanotransduction, ventilator-induced lung injury and multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*. 2000;26:38-42.
15. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*. 2007;81:28-37.
16. Foell D, Frosch M, Sorg C, Roth J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta*. 2004;344:37-51.
17. Foell, D, Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis Rheum*. 2004;50:3762–71.
18. Fretland A, Sokolov A, Postriganova N, et al. Inflammatory Response After Laparoscopic Versus Open Resection of Colorectal Liver Metastases. Data From the Oslo-CoMet Trial. *Med (Baltimore)*. 2015;94:e1786.
19. Frosch M, Metze D, Foell D, Vogl T, Sorg C, Sunderkötter C, Roth J. Early activation of cutaneous vessels and epithelial cells is characteristic of acute systemic onset juvenile idiopathic arthritis. *Exp Dermatol*. 2005;14:259-65.

20. Fukatsu K, Sakamoto S, Hara E, Ueno C, Maeshima Y, Matsumoto I, Mochizuki H, Hiraide H. Gut ischemia-reperfusion affects gut mucosal immunity: a possible mechanism for infectious complications after severe surgical insults. *Crit Care Med.* 2006;34:182-7.
21. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, et al. The nuclear HMGB1 is secreted by monocytes via non-classical vesicle mediated secretory pathway. *EMBO Rep.* 2002;3:995-1001.
22. Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JP, Matthijsen RA, de Bruïne AP, van Bijnen AA, van Dam RM, Dejong CH, Buurman WA. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. *Am J Pathol.* 2010;176:2283-91.
23. Grotz MR, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. Intestinal cytokine response after gut ischemia: role of gut barrier failure. *Ann Surg.* 1999 Apr; 229(4):478-86.
24. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 2002;295:1852-8.
25. Heizmann CW, Fritz G, Schafer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci.* 2002;7:1356-68.
26. Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999; 97: 889-901.
27. Hsu K, Champaiboon C, Guenther BD, et al. Anti-infective protective properties of S100 calgranulins. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* 2009; 8: 290-305.
28. Huang C, Shen J, Zhang J, et al. Clinical comparison of laparoscopy vs open surgery in a radical operation for rectal cancer: A retrospective case-control study. *World J Gastroenterol.* 2015;21:13532-41.
29. Chen H, Xu C, Jin Q, Liu Z. S100 protein family in human cancer. *Am J Cancer Res.* 2014;4:89-115.

30. Ilmakunnas M, Tukiainen EM, Rouhiainen A, et al. High mobility group box 1 protein as a marker of hepatocellular injury in human liver transplantation. *Liver Transpl* 2008;14:1517-25.
31. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3:118–27.
32. Jakobson T, Karjagin J, Vipp L, Padar M, Parik AH, Starkopf L, Kern H, Tammik O, Starkopf J. Postoperative complications and mortality after major gastrointestinal surgery. *Medicina (Kaunas).* 2014; 50:111-7.
33. Jhanji S, Thomas B, Ely A, Watson D, Hinds CJ, Pearse RM: Mortality and utilisation of critical care resources amongst high-risk surgical patients in a large NHS trust. *Anaesthesia* 2008; 63:695-700.
34. Kaczmarek A, Vendenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: The release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 2013; 38:209-23
35. Karlsson S, Pettilä V, Tenhunen J, Laru-Sompa R, Hynninen M, Ruokonen E. HMGB1 as a predictor of organ dysfunction and outcome in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2008;34:1046-53.
36. Khuri SF, Henderson WG, DePalma RG, Mosca C, Healey NA, Kumbhani DJ; Participants in the VA National Surgical Quality Improvement Program. Determinants of long-term survival after major surgery and the adverse effect of postoperative complications. *Ann Surg.* 2005;242:326-41.
37. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985;10:818–29.
38. Kruger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:3390–5.

39. Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, Vandenabeele P. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol* 2001 Apr; 32 (4): 157-64.
40. Lantos J, Foldi V, Roth E, Weber G, Bogar L, Csontos C. Burn trauma induces early HMGB1 release in patients: Its correlation with cytokines. *Shock*. 2010;33:562–7.
41. Lee MY, Griendling KK. Redox Signaling, Vascular Function, and Hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10: 1045–1059.
42. Lotze MT, Deisseroth A, and Rubartelli A. FOCiS on damage associated molecular pattern molecules. *Clin Immunol*. 2007;124:1-4.
43. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:331-42.
44. Maca J, Holub M, Bursa F, Ihnat P, Svagera Z, Burda M, and Sevcik P. Alarmins as biomarkers of gastrointestinal surgical injury – a pilot study. *APMIS*. 2018; 126(2):152-9. DOI: 10.1111/apm.12798
45. Máca J, Burša F, Ševčík P, Sklienka P, Burda M, and Holub M. Alarmins and clinical outcomes after major abdominal surgery – A prospective study. *J Invest Surg*. 2017;30:152-61.
46. Maca J, Peteja M, Reimer P, Jor O, Šeděnková V, Panáčková L, Ihnat P, Burda M, and Sevcik P. Surgical injury: comparing open surgery and laparoscopy by markers of tissue damage. *Ther Clin Risk Manag*. 2018; přijato k publikování
47. Manganelli V, Signore M, Pacini I, Misasi R, Tellan G, Garofalo T, et al. Increased HMGB1 expression and release by mononuclear cells following surgical/anesthesia trauma. *Crit Care*. 2010;14:R197.
48. Marik PE, Flemmer M. The immune response to surgery and trauma: implications for treatment. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;73:801-8.

49. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296:301-5.
50. McGrath LB, Locke M, Cane M, et al. Heat shock protein (HSP72) expression in patients undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;109:370–6.
51. Meijer B, Geary RB, and Day AS. The role of S100A12 as a systemic marker of inflammation. *Int J Inflamm*. 2012;2012:907078.
52. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1965; 19:739-44.
53. Moroz OV, Antson AA, Grist SJ, *et al*. Structure of the human S100A12-copper complex: implications for host-parasite defence. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; 59: 859-67
54. Nedjadi T, Kitteringham N, Campbell F, Jenkins RE, Park BK, Navarro P, et al. S100A6 binds to annexin 2 in pancreatic cancer cells and promotes pancreatic cancer cell motility. *Br J Cancer*. 2009;101:1145-54.
55. NeSmith EG, Weinrich SP, Andrews JO, Medeiros RS, Hawkins ML, Weinrich M. Systemic inflammatory response syndrome score and race as predictors of length of stay in the intensive care unit. *Am J Crit Care*. 2009;18:339-46.
56. Ombrellino M, Wang H, Ajemian MS, Talhouk A, Scher LA, Friedman SG et al. Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet*. 1999;354:1446–47.
57. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: Chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(4 SPEC. ISS.):359-65.
58. Pearse RM, Harrison DA, James P, Watson D, Hinds C, Rhodes A, Grounds RM, Bennett ED: Identification and characterisation of the high-risk surgical population in the United Kingdom. *Crit Care* 2006, 10:R81.

59. Pechkovsky DV, Zalutskaya OM, Ivanov GI, Misuno NI. Calprotectin (MRP8/14 protein complex) release during mycobacterial infection *in vitro* and *in vivo*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000;29:27–33.
60. Peltz ED, Moore EE, Eckels PC, Damle SS, Tsuruta Y, Johnson JL, et al. HMGB1 is markedly elevated within 6 hours of mechanical trauma in humans. *Shock.* 2009;32:17-22.
61. Pietzch J, Hoppmann S. Human S100A12: a novel key player in inflammation? *Amino Acids.* 2009;36:381-89.
62. Pilzweger C, Holdenrieder S, Circulating HMGB1 and RAGE as Clinical Biomarkers in Malignant and Autoimmune Diseases, *Diagnostics.* 2015;5:219-53.
63. Pittet D, Rangel-Frausto S, Li N, et al: Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med* 1995;21:302-9.
64. Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Ann Intensive Care.* 2012;2:27.
65. Ramanathan ML, MacKay G, Platt J, et al. The impact of open versus laparoscopic resection for colon cancer on C-reactive protein concentrations as a predictor of postoperative infective complications. *Ann Surg Oncol.* 2015;22:938-43.
66. Rangel-Fausto MS, Pittet D, Costigan M. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA.* 1995;273:117-23.
67. Ryckman C, Robichaud GA, Roy J, Cantin R, Tremblay MJ, Tessier PA. HIV-1 transcription and virus production are both accentuated by the proinflammatory myeloid-related proteins in human CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol.* 2002;169:3307–13.

68. Robinson MJ, Tessier P, Poulson R, Hogg N. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparin sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277:3658-65.
69. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002;418:191-95.
70. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:469-78.
71. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, and Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:367-88.
72. Shrikrishna G, Freeze HH Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia.* 2009;11:615-28.
73. Steenhagen E. Enhanced Recovery After Surgery: It's Time to Change Practice! *Nutr Clin Pract.* 2016;31:18-29.
74. Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, Saikawa Y, Ueda M, Abraham E, et al. Serum concentrations of high-mobility group box chromosomal protein 1 before and after exposure to the surgical stress of thoracic esophagectomy: a predictor of clinical course after surgery? *Dis Esophagus.* 2006;19:5-9.
75. Taggart DP, Bakkenist CJ, Biddolph SC, et al. Induction of myocardial heat shock protein 70 during cardiac surgery. *J Pathol* 1997;182:362–6.
76. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6:a016295.
77. Tong HS, Tang YQ, Chen Y, Qiu JM, Wen Q, Su L. Early elevated HMGB1 level predicting the outcome in exertional heatstroke. *J Trauma.* 2011;71:808-14.
78. Tsan MF. Heat shock proteins and high mobility group box 1 protein lack cytokine function. *J Leukoc Biol.* 2011;89:847-53.

79. Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med.* 2005;201:1135–43.
80. Urban CF, Ermert D, Schmidt M, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 2009;5:e1000639.
81. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996;22:707-10.
82. Vogl T, Pröpper C, Hartmann M, Strey A, Strupat K, van den Bos C, Sorg C, Roth J. S100A12 is expressed exclusively by granulocytes and acts independently from MRP8 and MRP14. *J Biol Chem.* 1999; 274:25291-96.
83. Yanai H, Ban T, and Taniguchi T. High-mobility group box family of proteins: ligand and sensor for innate immunity. *Trends Immunol.* 2012; 33:633-40.
84. Yang Z, Tao T, Raftery MJ, Youssef P, Di Girolamo N, Geczy CL. Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 986-94.
85. Zhu XD, Chen JS, Zhou F, Liu QC, Chen G, Zhang JM. Relationship between plasma high mobility group box-1 protein levels and clinical outcomes of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation.* 2012;9:194.
86. Zwadlo G, Brügger J, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. Two calcium-binding proteins associated with specific stages of myeloid cell differentiation are expressed by subsets of macrophages in inflammatory tissues. *Clin Exp Immunol.* 1988;723:510-5.

13. SEZNAM OBRAZOVÝCH PŘÍLOH

TABULKY

Tab. 1. Typy buněčných reakcí po stimulaci (*podle Krysko DV et al., 2001*).

Tab. 2. Charakteristiky syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS)

Tab. 3. Popis typu chirurgických intervencí.

Tab. 4. Základní charakteristiky Ch-skupiny a NCh-skupiny (*převzato z publikace Maca J et al., APMIS, 2018*).

Tab. 5. Klinické, chirurgické charakteristiky a charakteristiky klinického výsledku (Ch-skupina), (*převzato z publikace Maca J et al., APMIS, 2018*).

Tab. 6. Sérové hladiny alarminů a biomarkerů (*převzato z publikace Maca J et al., APMIS, 2018*).

Tab. 7. Seróvé hladiny vybraných alarminů (S100A8, S100A12, HSP70 a HMGB1) a biomarkerů (počet leukocytů, CRP a IL-6) v skupině otevřené chirurgie (laparotomie) a laparoskopie pro Den 1, 2 a 3. (*převzato z publikace Maca J., et al, J Inst Surg., 2017*).

OBRÁZKY

Obr. 1. Schéma rozvoje sepse SIRS a MODS na podkladě infekční a neinfekční etiologie.

Obr. 2. Schematické znázornění molekuly proteinu S100A.

Obr. 3. CONSORT flow diagram (*převzato z publikace Maca J et al., APMIS, 2018*).

Obr. 4. Schéma odběrů krevních vzorků (*převzato z publikace Maca J et al., APMIS, 2018*).

Obr. 5. Hladiny alarminů v CH-skupině a NCH-skupině (*převzato z publikace Maca J. et al, APMIS, 2018*).

Obr. 6. Nejvýznamnější korelace mezi S100A8 a biomarkery C-reaktivní protein (CRP), interleukin 6 (IL-6), (*převzato z publikace Maca J. et al, APMIS, 2018*).

Obr. 7. Vztah proteinu S100A8 a S100A12 k místu chirurgické resekce pro Den 1, 2 a 3 (*převzato z publikace Maca J et al., APMIS, 2018*)

Obr. 8. Významné rozdíly mezi laparoskopickou a laparotomickou podskupinou podstupující chirurgický zákrok pro maligní onemocnění. (*převzato z publikace Maca J., et al, J Inst Surg., 2017*).

Obr. 9. Srovnání hladin alarminů protein S100A8 a S100A12 mezi skupinou s kolorektální resekci a kontrolní skupinou bez chirurgického výkonu (*převzato Maca et al., abstrakt ISICEM, 2018*).

Obr. 10. Signifikantní pozitivní korelace mezi hladinou alarminů (proteiny S100A8 a S100A12) a hladinami vybraných biomarkerů zánětu: počet leukocytů (leukocytes), C-reaktivní protein (CRP) a interleukin 6 (IL-6), (*převzato z Maca J et al., ISICEM, 2018*).

Obr. 11. Zjednodušené schéma aktivace imunitního systému po chirurgickém traumatu.

14. PŘÍLOHY

Příloha 1 - originální práce

Maca J, Holub M, Bursa F, Ihnat P, Svagera Z, Burda M, and Sevcik P. Alarmins as biomarkers of gastrointestinal surgical injury – a pilot study. *APMIS*. 2018;126:152-59.

(Impakt factor [IF] **1,795**)

Příloha 2 - originální práce

Máca J, Burša F, Ševčík P, Sklienka P, Burda M, and Holub M. Alarmins and clinical outcomes after major abdominal surgery – A prospective study, *J Invest Surg*. 2017;30:152-

61. (IF **1,532**)

Příloha 3 - originální práce

Maca J, Peteja M, Reimer P, Jor O, Šeděnková V, Panáčková L, Inhat P, Burda M, and Sevcik P. Surgical injury: comparing open surgery and laparoscopy by markers of tissue damage.

Ther Clin Risk Manag. 2018. (IF **2,200**). Přijato k publikování 2018.

Souhrnný impakt faktor originálních publikací je 5,527

Příloha 4 - abstrakt

Maca J, Ihnat P, Peteja M, Jor O, Reimer P, Burda M, and Sevcik P. Injury caused by colorectal surgery: the role of proteins S100A

Přijato k aktivní prezentaci v rámci kongresu ISICEM 2018, Brusel

Abstrakt bude publikován jako suplementum v časopise Critical Care (**IF za 5 let 5,926; IF za 2 roky 5,358**).

Příloha 5 - poster

Maca J, Ilnat P, Peteja M, Jor O, Reimer P, Burda M, and Sevcik P. Injury caused by colorectal surgery: the role of proteins S100A

Poster byl aktivně prezentován v rámci kongresu International Symposium of Intensive Care and Emergency Medicine (ISICEM), Brusel, 20. 3. 2018

PŘÍLOHA 1

PŘÍLOHA 2

PŘÍLOHA 3

Surgical injury: comparing open surgery and laparoscopy by markers of tissue damage.

Short title: *Alarmins and type of abdominal surgery*

Jan Maca¹, Matus Peteja², Petr Reimer¹, Ondrej Jor¹, Vera Sedenkova¹, Lucie Panackova¹, Peter Inhat², Michal Burda³, and Pavel Sevcik¹

¹Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Ostrava, Czech Republic

²The Clinic of Surgery, University Hospital Ostrava, Czech Republic

³Institute for Research and Applications of Fuzzy Modeling, Centre of Excellence IT4Innovations, University of Ostrava, Czech Republic

Corresponding address

Jan Máca, MD

Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Ostrava

17. listopadu 1790

708 52 Ostrava-Poruba, Czech Republic

E-mail: jan.maca@fno.cz

Fax number: +420 59737 2762, Phone number: +420 59737 2713

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JM: study design, data acquisition, analysis, and interpretation, and writing the manuscript;

MP: data interpretation and writing the manuscript; PR: writing the manuscript and data

interpretation; OJ: study design and data acquisition; PI: data acquisition and interpretation

and writing the manuscript; MB: data analysis; and PS: data interpretation and writing the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

ABSTRACT

Background: Major abdominal surgery (MAS) is high-risk intervention accompanied usually by tissue injury leading to a release of signaling danger molecules, called alarmins. The present study evaluates the surgical injury caused by two fundamental types of gastrointestinal surgical procedures (open surgery and laparoscopy) in relation to the inflammation elicited by alarmins.

Methods: Patients undergoing MAS were divided into a mixed laparoscopy group (LPS) and open surgery group (LPT). Serum levels of alarmins (S100A8, S100A12, HMGB1, and HSP70) and biomarkers (leukocytes, CRP, IL-6) were analyzed between the groups. The secondary objectives were to compare LPT and LPS cancer subgroups and their relationship between procedure and outcome (length of stay in the intensive care unit [ICU-LOS] and hospital [H-LOS]).

Results: A total of 82 patients were analyzed. No significant difference was found in alarmins levels between the mixed LPS and LPT groups. IL-6 was higher in the LPS group on day 2 ($p=0.03$) and day 3 ($p=0.04$). Significantly higher S100A8 protein levels were measured on day 1 ($p=0.02$) and day 2 ($p=0.01$), and higher S100A12 protein levels on day 2 ($p=0.03$) in the LPS cancer subgroup. ICU-LOS and H-LOS were longer in the LPS cancer subgroup.

Conclusion: The degree of surgical injury elicited by open MAS as reflected by alarmins is similar to laparoscopic procedures. Nevertheless, an early biomarker of inflammation (IL-6) was higher in the laparoscopy group, suggesting a greater inflammatory response. Moreover, the levels of S100A8 and S100A12 were higher with a longer ICU-LOS and H-LOS in the LPS cancer subgroup.

Key words: open surgery; laparoscopy; gastrointestinal surgery; alarmins; surgical injury

BRIEF SUMMARY

Both open surgery and laparoscopy can cause significant damage to the tissues. This study compares the degree of injury caused by these two main types of surgical procedures as reflected by alarmins (danger signals and markers of tissue damage) and selected inflammatory biomarkers.

INTRODUCTION

The increasing number of major non-cardiac surgical interventions is considered a global challenge in health care.¹ Extensive surgical intervention is associated with direct mechanical tissue injury, local hemorrhage, and ischemia, followed by hypoxemic cellular stress and ischemia-reperfusion injury² leading to innate and adaptive immunity activation on the local and systemic level.³ The dysregulation of the host response increases the number of infectious complications, impairs wound healing, and adversely affects other clinical outcomes, including hospital stay, mortality, and long-term cognitive functions.³⁻⁵ The degree of postoperative inflammatory response can be estimated by several clinical parameters (e.g. heart rate, respiratory rate, and body temperature) and laboratory markers, including white blood cell (WBC) count, C-reactive protein (CRP), and interleukin 6 (IL-6).⁶⁻⁸ Clinical signs are unreliable and their sensitivity and specificity are low. WBC and CRP measurements are routine in clinical practice, but their kinetics are slow with low ability to differentiate sterile

and infectious insults.⁹ IL-6 can be detected early, but its measurement is not widespread and thus it cannot be considered a routine biomarker.¹⁰

Alarmins are a group of intracellular molecules immediately released or actively secreted after mechanical cell injury, infection, or inflammation. In extracellular space, they exhibit cytokine-like functions, initiating an inflammatory and reparative response.¹¹ Thus, they represent first line signal molecules that potentially reflect the degree of tissue injury.

Laparoscopic surgical procedures (LPSs) have several advantages over open surgery, including less invasiveness (ie smaller incision) resulting in less postsurgical pain, reduced risk of infectious contamination, and faster functional recovery.¹² LPSs are the standard of care in colorectal surgery due to cost-effectiveness and better outcomes (ie hospital stay, number of complications) compared to open surgical procedures.¹³ However, LPSs also have some disadvantages, such as the need for greater surgeon experience, limited range of motion, poor depth assessment, absence of tactile sensation, use of tools that are less subtle in interactions with tissues compared to the hands of a surgeon, longer duration of surgery and general anesthesia.¹²

The role of alarmins in evaluating the degree of injury in relation to the type of procedure (LPS or open surgery [LPT]) in major abdominal surgery (MAS) has not yet been studied. The primary objective of the analysis was to compare the serum levels of alarmins and biomarkers between LPS and LPT in order to determine which of the procedures is more harmful. The secondary objectives were to compare alarmins and biomarker levels in cancer subgroups and the relationship between the type of procedure and selected outcomes, specifically intensive care unit length of stay (ICU-LOS) and hospital length of stay (H-LOS).

METHODS

Study design and patients

The prospective single-center study was conducted between June 2013 and June 2014. The study was approved by the Medical Ethics Committee of the University Hospital of Ostrava, Czech Republic (reference number: 435/2013). The committee waived the need for informed consent prior to surgery due to the non-interventional observational nature of the study. The CONSORT flow diagram of patient selection is given in *Fig. 1*. The inclusion criteria were as follows: more than 18 years of age, absence of sepsis at the time of admission, elective MAS. After surgery, the patients were admitted to the intensive care unit (ICU) of the Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Ostrava, Czech Republic. Exclusion criteria were pregnancy or life expectancy less than 24 hours. Major surgery was defined as a procedure expected to last more than 2 hours and/or an anticipated blood loss of more than 500 ml.¹⁴ General treatment, including hemodynamic optimization, use of anti-infectives, analgesia, and other measures of standard supportive care, was provided by certified intensive care physicians according to the recommendations of the Czech Society of Intensive Care Medicine (CSICM)¹⁵ and the Society of Critical Care Medicine (SCCM).¹⁶ The whole group of patients was divided according to the type of the procedure into LPS and LPT group. Then, in order to obtain more homogenous cohort, we selected patients undergoing surgery for cancer divided into LPS cancer and LPT cancer subgroup.

Study protocol and measurements

Baseline, clinical, surgical, and outcome characteristics were obtained upon ICU admission (day 0). The American Society of Anesthesiologists (ASA) physical status classification before surgery was recorded. The severity of the condition was estimated using the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) on the first postoperative day (POD 1), and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) on POD 1-3. The presence of

systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis at any time during the first 3 consecutive days after surgery was recorded according to the standard definitions valid at the time of the study.¹⁷ Outcome variables, such as postsurgical complications defined according to Clavien Dindo Classification, ICU-LOS, H-LOS, 30-day mortality, and in-hospital mortality, are given in *Table 1*.

Blood samples for the analysis of serum levels of biomarkers (WBC, CRP, IL-6) and alarmins (S100A8, S100A12, HMGB1, HSP70 proteins) were collected from the central venous catheter at 6:00 a.m. on POD 1-3. The blood samples were allowed to clot for 30 min and the supernatant subsequently centrifuged at 3,500 rpm (2,500 g) for 10 minutes at 4°C. Serum concentrations of CRP (AU 5420, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) and IL-6 (Immulite 2000, DPC, Los Angeles, USA) were assayed immediately. The inter-assay coefficients of variation were 4.8 and 6.7%, for CRP and IL-6, respectively. Blood samples for the analysis of alarmins were centrifuged (2500g) at 4°C for 6 minutes and then frozen and stored at -80°C until further analyses. The concentrations of S100A8 and HMGB1 were determined quantitatively by sandwich ELISA or in-house assays (Biovendor-Laboratorni medicina, Brno, Czech Republic). The concentrations of proteins S100A12 and HSP70 were determined by commercially available colorimetric sandwich ELISA kits (Biovendor-Laboratorni medicina, Czech Republic, and StressMarq, Canada). The analyses of S100A8, S100A12, HMGB1, and HSP70 had inter-assay coefficients of variation of 5.6%, 6.9%, 10.9%, and 11.3%, respectively. The total WBC count was determined in a local laboratory immediately after sampling.

Statistical analysis

R software (version 3.3.1) was used for this post-hoc analysis (co-author MB) and to create the figures and tables. Numerical data are characterized as median and inter-quartile range.

Categorical data are described as absolute and relative (%) frequency. To assess significant differences between groups, two-sample Wilcoxon's test or Fisher's exact test was performed (for numerical and categorical data, respectively). The level of significance was defined as 0.05.

RESULTS

The final statistical analysis utilized data obtained from a total of 82 patients divided into the LPT (n=31) and LPS (n=51) groups according to the type of surgery. Almost all patients (93%, n=76) exhibited SIRS at some point during the first 3 days after admission. Only a small number developed sepsis (7%, n=6). The number of complications after surgery defined according to Clavien Dindo Classification did not differ between the groups. The description of surgical interventions according to the place of resection (upper, middle, lower GIT) and type of surgery (LPS, LPT), including number of subjects is presented in *Table 2*.

Baseline characteristics did not differ between the LPS and LPT groups. Comparing clinical and surgical characteristics, we found significantly longer surgery time ($p<0.001$), greater blood loss ($p=0.04$), and higher amounts of intraoperatively administered fluids ($p=0.03$) in the LPS group (sum of all laparoscopy subjects). Followed clinical outcomes, such as complications after surgery, ICU-LOS, H-LOS, in-hospital mortality, and 30-day mortality, did not differ between the two groups. The serum levels of alarmins (S100A8, S100A12, HMGB1, and HSP70) and biomarkers (WBC, CRP, and IL-6) in the LPS and LPT groups are given in *Table 3*. We found no significant difference in serum alarmins levels between the

two groups. We observed significantly higher levels of IL-6 on day 2 ($p=0.03$) and day 3 ($p=0.04$) in the LPS group.

Concerning the cancer subgroups, we found no differences in baseline characteristics between LPS and LPT. However, we observed significantly longer surgery time ($p<0.001$), greater blood loss ($p<0.001$), higher amounts of intraoperatively administered fluids ($p<0.01$), and higher amounts of administered fresh frozen plasma ($p=0.02$) in the LPS cancer subgroup. In addition, ICU-LOS and H-LOS were significantly longer in the LPS cancer subgroup ($p<0.01$ for both). Number of complications, in-hospital mortality, and 30-day mortality did not differ between subgroups.

We found significantly higher levels of S100A8 protein on day 1 ($p=0.02$) and day 2 ($p=0.01$), and S100A12 protein on day 2 ($p=0.03$) in the LPS cancer subgroup (*Fig. 2*). We also observed significantly higher levels of IL-6 ($p<0.01$, for all three days) in the LPS cancer subgroup (*Fig 3*).

DISCUSSION

Despite the benefits of solving the causal disease, elective major surgery causes iatrogenic trauma, eliciting a marked sterile immune response.³ The physiological host response leads to wound healing and structural and functional restitution of a tissue. On the other hand, dysregulation of sterile inflammation can participate in the development of postoperative complications and adversely affect patient outcomes. In the present study, we showed that the majority of subjects exhibited SIRS at some point during the first 3 consecutive days after

elective MAS. This immune response to surgery and postoperative complications maybe influenced not only by injury caused by a surgeon, but also by the presence of bacteria and/or bacterial products in the intestinal contents,with contamination of the surgical wound, blood, etc. In our study, all subjects received routine antibiotic prophylaxis (β -lactam and metronidazole). Due to the low incidence of early postoperative sepsis (7%), we consider the anti-infectiveprophylaxis to be effective in decreasing the risk of infectious complications.

Our selection of the particular set of alarmins was based on their already known roles in inflammatory diseases.¹⁸⁻²⁰S100A proteins are responsible for regulating the intracellular metabolism of calcium (Ca^{2+}) and calcium-dependent signaling. The expression of S100A proteins is enhanced in inflamed tissues, where they activate endothelial and immune cells and facilitate the formation of local prothrombotic activity.²¹ HMGB1 binds to DNA and influences many nuclear processes (ie activation of nuclear factor kappa B [NF- κ B], repair of DNA);it is released from injured cells and activates immunocytes. Heat shock proteins, including HSP70, bind to nascent polypeptide chains and facilitate their proper folding, working as chaperones for other danger signals and protecting cells against unfavorable conditions, primarily thermal stress.²² In preliminary data collection, we observed significantly higher levels of S100A8, S100A12, and HSP70 in surgical patients compared to healthy subjects²³. This suggests that alarmins participate in physiological responses to surgical injury. Biomarkers, such as WBC count, CRP, IL-6, and albumin, reflect various types of injury, including infectious diseases, sterile trauma damage, and major surgery.^{8, 24, 25}

Laparoscopic procedures in gastrointestinal surgery are usually preferred to open surgery especially due to the less invasivity (smaller incision)²⁶, less postsurgical pain, reduced risk of infectious complication,faster functional recovery, and better outcomes.^{12,27}. To date, no study

has evaluated the invasiveness of surgical procedures during MAS in relation to serum alarmin levels. We found no significant difference in alarmins levels between the LPS and LPT groups including all surgical diagnoses. Therefore overall degree of tissue injury reflected by alarmins seems to be similar in both types of surgical procedures.

Significantly higher levels of some alarmins (S100A8, S100A12) we measured in the LPS cancer subgroup. This confirms a higher expression of S100A proteins in cancer,²⁸ as reflected by their more pronounced systemic release after laparoscopic surgery for cancer.

Ramanathan et al described significantly higher CRP levels in patients undergoing extensive open resection of the large intestine compared to laparoscopic procedures. CRP had no discriminative value related to postoperative infective complications. However, the authors did not describe some of the baseline (ie weight, body mass index) and surgical characteristics (ie duration of surgery, blood loss, use of vasopressors).²¹ In contradiction, we observed no differences in CRP levels between the colorectal resection subgroups during similar postoperative periods. Moreover, we found significantly higher levels of IL-6 in the LPS cancer subgroup suggesting a greater inflammatory host response to laparoscopy probably reflecting the longer surgery time and higher blood loss requiring higher amount of intraoperatively administered fluids^{29,30}. The different findings for CRP values maybe explained by statistical error related to fewer subjects enrolled in our study and potentially different baseline and surgical characteristics between the studies. Fretland et al studied the influence of the type of surgery (LPS/LPT) on changes in biomarker levels after liver resection for colorectal liver metastases. The authors found higher levels of HMGB1, IL-6, CRP, cell-free DNA, and macrophage inflammatory protein 1 β in the open surgery group.³¹ This is again only in partial agreement with our study, because we found no difference in HMGB1 and CRP levels. These results maybe explained by differences in organ-specific

resections. However, we observed a significant difference in IL-6 laparoscopy group, suggesting a greater inflammatory response despite the levels of selected alarmins being similar. We suggest that a different set of alarmins other than those presently selected might be responsible for the observed inflammatory response.

We found significantly reduced ICU-LOS and H-LOS in the LPT cancer subgroup. These findings partially contradict the results reported by Zhuang et al, who described reduced H-LOS in cancer patients who underwent LPSs³² even in the setting of suboptimal use of the enhanced recovery after surgery (ERAS) protocol. Interestingly, we did not observe any significant differences in ICU-LOS and H-LOS between the LPS and LPT groups for all subjects undergoing MAS. We assume that this was due to the heterogeneity of the intervention used in different gastrointestinal sites, variability in the type and extensiveness of surgical diagnosis.

The present study has several limitations. The first limitation is that it was designed as post-hoc analysis. Second, the small numbers of subjects. Third, the intervals at which we sampled blood may not reflect exactly the dynamics of the blood concentration of alarmins. Fourth, a different set of alarmins may be responsible for the observed immune response, such as mitochondrial alarmins (mtDNA, N-formyl-Met-Leu-Phe); thus, the physiological role of our selected set of alarmins in the development of inflammatory response could only be minor. Fifth, the various degree and type of cancer as well as position of GIT resection are potential sources of further bias.

CONCLUSION

The degree of surgical injury elicited by open MAS as reflected by alarmins was similar to laparoscopic procedures. However, the laparoscopic surgery, especially for gastrointestinal cancer, seems to be injurious than open procedures reflecting the longer surgery time and higher blood loss of the procedures. This is suggested by higher levels of biomarkers (IL-6), but also alarmins (S100A8 and S100A12), the markers of cellular damage more accurately estimating the degree of surgical injury.

ACKNOWLEDGEMENTS

Michal Burda was supported by the NPU II project LQ1602 “IT4Innovations excellence in science” provided by the MŠMT. The corresponding author would like to acknowledge Dr. Zdenek Svagera, Ph.D., Head of Biochemistry, University Hospital of Ostrava, Czech Republic, and colleagues Vera Sedenkova, M.D., and Lucie Panackova, M.D., for their invaluable support of the study efforts.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors report no proprietary or commercial interest in any product mentioned or concept discussed in this article.

REFERENCES

1. Jakobson T, Karjagin J, Vipp L, et al. Postoperative complications and mortality after major gastrointestinal surgery. *Medicina (Kaunas)*. Lithuanian University of Health Sciences; 2014;50(2):111–7.

2. Weigand K, Brost S, Steinebrunner N, et al. Ischemia/Reperfusion Injury in Liver Surgery and Transplantation: Pathophysiology. *HPB Surg.* 2012;2012:176723.
3. Marik PE, Flemmer M. The immune response to surgery and trauma: Implications for treatment. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;73(4):801–8.
4. NeSmith EG, Weinrich SP, Andrews JO, et al. Systemic inflammatory response syndrome score and race as predictors of length of stay in the intensive care unit. *Am J Crit Care.* 2009;18(4):339–346.
5. Eriksson LI, Kramer JH, Leung JM, et al. Perioperative Cognitive Decline in the Aging Population. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(9):885–93.
6. Lamm G, Auer J, Weber T, et al. Postoperative White blood cell count predicts atrial fibrillation after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2006;20(1):51–6.
7. Nuremberg GH, Care I, Nuremberg GH, et al. C-reactive protein and the acute phase reaction in geriatric patients. 2015;48(7):595–600.
8. Okeny PK, Ongom P, Kituuka O. Serum interleukin-6 level as an early marker of injury severity in trauma patients in an urban low-income setting : a cross-sectional study. *BMC Emerg Med.*2015;15:1–7.
9. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(1):118–27.
10. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295.
11. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):1–5.
12. High Quality Obstetrical & Gynecological Care, 2011-2015,
<http://www.joanssomersmd.com/health/surgeries.php>

13. Huang C, Shen J, Zhang J, et al. Clinical comparison of laparoscopy vs open surgery in a radical operation for rectal cancer : A retrospective case- control study. 2015;21:13532–13541.
14. Davies SJ, Francis J, Dilley J, et al. Measuring outcomes after major abdominal surgery during hospitalization: reliability and validity of the Postoperative Morbidity Survey. *Perioper Med (London, England)*. 2013;2(1):1.
15. Czech Society of Intensive Care Medicine guidelines, 2014,
<http://www.csim.cz/dokumenty/#categories:path=doporucene-postupy>
16. Society of Critical Care Medicine guidelines, 2016,
<http://www.sccm.org/Research/Guidelines/Pages/Guidelines.aspx>
17. Bone R, Balk R, Cerra F, et al. ACCP/SCCM consensus conference for Sepsis and Organ Failure and. *Chest*. 1992;101(6):1644–55.
18. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, et al. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):28–37.
19. Lotze M, Tracey K. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4):331–42.
20. Hartl F, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*. 2002;295(5561):1852-8.
21. Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*. 2002;7:d1356–1368.
22. Tsan M-F, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol*. 2009;85(6):905–10.

23. Maca J, Holub M, Bursa F, Ihnat P, Svagera Z, Burda M, and Sevcik P. Alarmins as biomarkers of gastrointestinal surgical injury – a pilot study. *APMIS*. 2018; 126(2):152-159. DOI: 10.1111/apm.12798
24. Ramanathan ML, MacKay G, Platt J, et al. The impact of open versus laparoscopic resection for colon cancer on C-reactive protein concentrations as a predictor of postoperative infective complications. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(3):938–43.
25. Deirmengian GK, Zmistowski B, Jacovides C, et al. Leukocytosis Is Common After Total Hip and Knee Arthroplasty. 2011; 469(11):3031–6.
26. Conzo G, Tartaglia E, Gambardella C, et al. Minimally invasive approach for adrenal lesions: Systematic review of laparoscopic versus retroperitoneoscopic adrenalectomy and assessment of risk factors for complications. *Int J Surg*. 2016;28(Suppl 1):S118-23.
27. Conzo G, Pasquali D, Gambardella C, et al. Long-term outcomes of laparoscopic adrenalectomy for Cushing disease. *Int J Surg*. 2014;12(Suppl 1):S107-11
28. Chen H, Xu C, Jin Q, et al. S100 protein family in human cancer. *Am J Cancer Res*. 2014;4(2):89–115.
29. Barbaros U, Asoglu O, Seven R, et al. The comparison of laparoscopic and open ventral hernia repairs : a prospective randomized study. *Hernia*. 2007; 11(11):51–6.
30. Castro PM, Rabelato JT, Monteiro GG, et al. Laparoscopy versus laparotomy in the repair of ventral hernias: systematic review and meta-analysis. *Arg Gastroenterol*. 2014;51(3):205–11.
31. Fretland A, Sokolov A, Postriganova N, et al. Inflammatory Response After Laparoscopic Versus Open Resection of Colorectal Liver Metastases. Data From the Oslo-CoMet Trial. *Med (Baltimore)*. 2015;94(42):e1786.

32. Zhuang CL, Huang DD, Chen FF, et al. Laparoscopic versus open colorectal surgery within enhanced recovery after surgery programs: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Surg Endosc.* 2015;29(9):2091–100.

PŘÍLOHA 4

Injury caused by colorectal surgery: the role of proteins S100A

Jan Maca^{1,2}, Peter Ihnat³, Matus Peteja³, Ondrej Jor^{1,2}, Petr Reimer^{1,2}, Michal Burda⁴, and Pavel Sevcik^{1,2}

¹ Department of Intensive Care Medicine and Forensic Studies, Faculty of Medicine University of Ostrava, Czech Republic

² Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Ostrava, Czech Republic

³ Department of Surgery, University Hospital Ostrava, Czech Republic

⁴ Institute for Research and Applications of Fuzzy Modeling, Centre of Excellence University of Ostrava, IT4Innovations, University of Ostrava, Czech Republic

ABSTRACT

Background/Purpose

Biomarkers reflecting the extent of surgical tissue trauma should be investigated in an effort to predict and prevent postoperative complications. The aim of the present study was to investigate blood concentrations of selected alarmins in patients after colorectal surgery in comparison to healthy individuals. The secondary aim was to analyze the relationship between alarmins and inflammatory biomarkers during early postoperative period.

Methods

The prospective, single-center, observational study consisted of non-surgical (NS) group (n=35) and surgical (S) group (n=38) undergoing colorectal surgery. Serum levels of selected

alarmins (S100A8 and S100A12) and inflammatory biomarkers (leukocytes; C-reactive protein, CRP; interleukin-6, IL-6) were analyzed.

Results

Proteins S100A8 and S100A12 had significantly higher serum values in the S-group during all three days after the surgery. The multidimensional model taking into account age, sex, weight, group and days revealed significant differences between study groups for both proteins S100A8 and S100A12 ($p < 0.001$, $p = 0.001$, respectively). Biomarkers (leukocytes, CRP, and IL-6) showed significant differences between study subgroups ($p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p < 0.001$, respectively). In S-group, moderate positive correlations were found between S100A8 and all biomarkers: leukocytes ($r = 0.6$), CRP ($r = 0.5$), and IL-6 ($r = 0.6$). S100A12 had moderate positive correlation with leukocytes ($r = 0.5$). Levels of S100A8 also positively correlated with intensive care unit and hospital length of stay ($r = 0.6$, $r = 0.5$, respectively).

Conclusions

Protein S100A8 might be considered as early biomarker of first wave of immune activation elicited by surgical injury after colorectal surgery. The increase of the alarmins is reflected by the elevation of routine inflammatory biomarkers.

Key words: alarmins, biomarkers, colorectal surgery, proteins S100A, surgical injury

PŘÍLOHA 5

Injury caused by colorectal surgery: the role of proteins S100A

Jan Maca^{1,2}, Peter Ihnat, Matus Peteja, Ondrej Jor, Petr Reimer, Michal Burda, and Pavel Sevcik

¹ Department of Intensive Care Medicine and Forensic Studies, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic

² Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital of Ostrava, Czech Republic

jan.maca@fno.cz

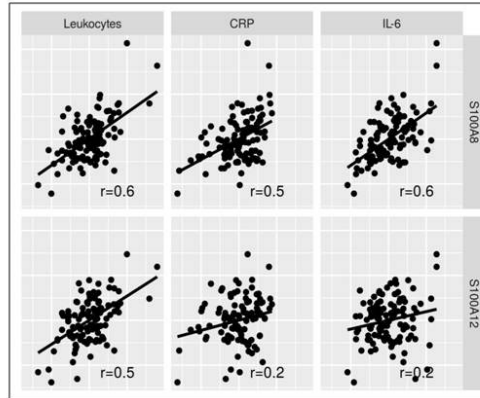
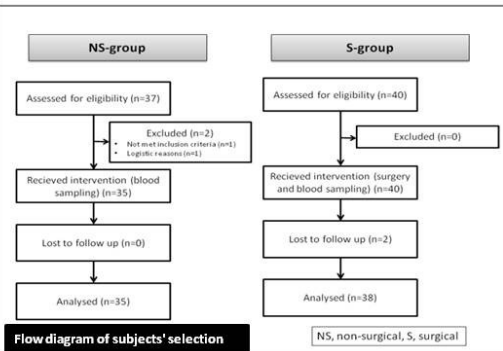
Background/Purpose

Biomarkers reflecting the extent of surgical tissue trauma should be investigated in an effort to predict and prevent postoperative complications. The aim of the present study was to investigate blood concentrations of selected alarmins in patients after colorectal surgery in comparison to healthy individuals. The secondary aim was to analyze the relationship between alarmins and inflammatory biomarkers during early postoperative period.

Methods

The prospective, single-center, observational study consisted of non-surgical (NS) group (n=35) and surgical (S) group (n=38) undergoing colorectal surgery. Serum levels of selected alarmins (S100A8 and S100A12) and inflammatory biomarkers (leukocytes; C-reactive protein, CRP; interleukin-6, IL-6) were analyzed.

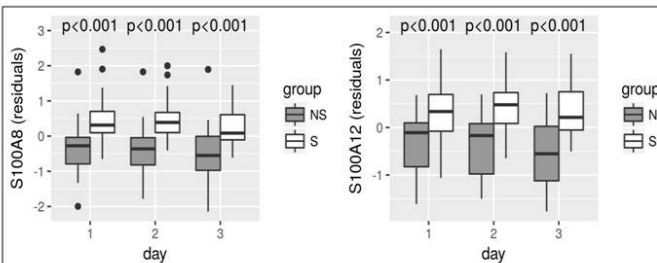
Simplified scheme of inflammatory response to surgical injury



The correlations between alarmins [S100A8 and S100A12] and inflammatory biomarkers [leukocytes, CRP, IL-6]

Results

Proteins S100A8 and S100A12 had significantly higher serum values in the S-group during all three days after the surgery. The multidimensional model taking into account age, sex, weight, group and days revealed significant differences between study groups for both proteins S100A8 and S100A12 ($p < 0.001$, $p < 0.001$, respectively). Biomarkers (leukocytes, CRP, and IL-6) showed significant differences between study subgroups ($p < 0.001$, $p < 0.001$, and $p < 0.001$, respectively). In S-group, moderate positive correlations were found between S100A8 and all biomarkers: leukocytes ($r = 0.6$), CRP ($r = 0.5$), and IL-6 ($r = 0.6$). S100A12 had moderate positive correlation with leukocytes ($r = 0.5$). Levels of S100A8 also positively correlated with intensive care unit and hospital length of stay ($r = 0.6$, $r = 0.5$, respectively).



The comparison of serum levels of the alarmins for POD 1, 2, and 3, separately; POD, postoperative day

Conclusions

Protein S100A8 might be considered as early biomarker of first wave of immune activation elicited by surgical injury after colorectal surgery. The increase of the alarmins is reflected by the elevation of routine inflammatory biomarkers.

Literature

- Jakobson T, Karjagin J, Vipp L, et al. Postoperative complications and mortality after major gastrointestinal surgery. *Medicina (Kaunas)* 2014; 50(2):111-7.
- Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes inflammatory response syndrome. *Ann Intensive Care* 2012;2(1):27.
- Marik PE, Flemmer M. The immune response to surgery and trauma: implications for treatment. *J Trauma Acute Care Surg* 2012;73(4):801-8.
- Becher RD, Hoth JJ, Miller PR, Meredith JW, Chang MC. Systemic inflammation worsens outcomes in emergency surgical patients. *J Trauma Acute Care Surg* 2012;72(5):1140-9.
- Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007;81(1):28-37.