



Univerzita Karlova v Praze

1.lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce

**Příspěvek k problematice bronchopulmonální
dysplázie**

MUDr. Magdalena Zimová-Herknerová

Praha 2008

Poděkování

Autorka děkuje především svému školiteli, prof.MUDr.Richardu Plavkovi, CSc., za „aktivní vstupenku“ do světa neonatologického výzkumu 21.století.

Můj velký dík rovněž patří prof. MUDr. Stanislavu Trojanovi, DrSc a doc. MUDr. Jaromíru Myslivečkovi, PhD z Fyziologického ústavu 1. lékařské fakulty UK za pomoc a rady s experimentální částí této disertace. Za cenné podněty děkuji prof. Male R. Chinoy, PhD, Lung Development Research Program, Pennsylvania State University a prof. Davidu Warburtonovi, PhD, Developmental Biology Program, Saban Research Institute, Children's Hospital Los Angeles.

Děkuji i celému týmu Neonatologického oddělení Gynekologicko-porodnické kliniky, vedoucím lékařům: MUDr. Pavlu Kopeckému, MUDr. Václavu Sebroňovi, MUDr. Miloši Zapadlovi, MUDr. Blance Zlatohlávkové a lékařům Jednotky intenzivní neonatologické péče: MUDr. Mileně Dokoupilové, MUDr. Libuši Pazderové, MUDr. Josefu Rufferovi, MUDr. Petru Švihovcovi,

Za velkou pomoc při statistickém zpracování výsledků děkuji RNDr.Vlastislavu Janušovi. Za dokonalou korekturu celé práce děkuji Mgr. Olze Štajnrtové.

Dále děkuji svým rodičům a manželovi za podporu a pomoc.

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof.MUDr.Stanislav Trojan, DrSc.
Školící pracoviště: Neonatologické oddělení Gynekologicko-
porodnické kliniky VFN.
Fyziologický ústav 1.LF UK

Autorka: MUDr.Magdalena Zimová-Herknerová,
E-mail:MagdalenaH@centrum.cz
Tel:606481280

Školitel: prof.MUDr.Richard Plavka, CSc.

Oponenti:
Doc. MUDr. Zdeněk KOKŠTEJN, CSc,
Dětská klinika FN Hradec Králové

Doc. MUDr. Jiří Kobr, PhD
Přednosta Dětské kliniky FN Plzeň

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.
kde

.....
S dizertací je možno se seznámit na děkanátě
1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

Obsah:

Použité zkratky	5
I. Úvod	6
II Experimentální a klinicko výzkumná část	8
Hypotézy a cíle práce	8
IIA Srovnání vlivu 40% a 80% hyperoxie na rozvoj plicního poškození. Vliv aplikace kyseliny retinové na zmírnění tohoto poškození (<i>animální experiment</i>).	9
1 Vliv aplikace vitamínu A na zmírnění hyperoxického plicního poškození	9
1.1 Materiál a metodika	9
1.2 Výsledky	10
1.3 Diskuse	11
1.4 Závěry	12
2 Vliv hyperoxie na expresi proinflamačních markerů v plicí novorozené myši	13
2.1 Materiál a metodika	13
2.2 Výsledky	13
2.3 Diskuse	14
2.4 Závěry	15
IIB Anemometrické měření dechových objemů během vysokofrekvenční oscilační ventilace (klinická studie)	16
1 Pacienti a metodika	16
2 Výsledky	17
3 Diskuse	18
4 Závěry	19
III Shrnutí	20
IV Summary	21
V Seznam publikací a grantů	22
VI Literatura	24

POUŽITÉ ZKRATKY

- A-aDO₂ – alveoloarteriální index
ANOVA – analýza variance
ARDS – syndrom dechové tísně se složkou plicní hypertenze
BPD – bronchopulmonální dysplázie
CDP – kontinuální distenční tlak
CLD – chronické plicní onemocnění
CV – konvenční ventilace
FiO₂ – frakce vdechovaného kyslíku
HFOV – vysokofrekvenční oscilační ventilace
IL-1 α – interleukin-1 α
MAS – syndrom aspirace mekonia
MIP-1 α – zánětlivý protein makrofágů-1 α
PaCO₂ – parciální tlak oxidu uhličitého
PCR – polymerázová řetězová reakce
RA – kyselina retinová
RDS – syndrom respirační tísně
RT PCR – reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce
TGF- β – transformující růstový faktor- β
TNF- α – tumor nekrotizující faktor- α
UPV – umělá plicní ventilace
V/Q – ventilačně-perfúzní poměr
VILI – ventilátorem indukované plicní poškození
V_{TE} – expirační dechový objem
W/D – poměr hmotnosti nativních a vysušených plic

I ÚVOD

Chronické plicní onemocnění (CLD) novorozenců bylo poprvé popsáno v roce 1967 Northwayem a spol. a nazvané jako bronchopulmonální dysplázie (BPD) [1]. Ačkoliv má dnes toto onemocnění již zcela jiný patofyziologický a klinický obraz, zůstává BPD i v 21. století jedním z nejvýznamnějších onemocnění především extrémně nezralých novorozenců [2]. Charakteristickým rysem „nové“ BPD je porucha alveolarizace tj. menší počet alveolů [3].

Klinická definice BPD používá kritérium závislosti na léčbě kyslíkem či na jiné ventilační podpoře v definovaných časových obdobích novorozence jako je 28. den života a 36. postmenstruační týden. Walshová a spol. v roce 2006 udávala incidenci BPD₃₆ tj. BPD v 36. postmenstruačním týdnu, přibližně 30 % ve skupině novorozenců s porodní hmotností <1000g. Zároveň uvedla, že 97 % pacientů s diagnózou BPD tvoří novorozenci s porodní hmotností <1250g [4]. V České republice výskyt BPD₃₆ spolu s poklesem mortality u NENPH kulminoval v roce 2001 (39 %) a posléze začal klesat (2002–2003, 31 %; 2005–2006, 21 %) [2].

Bronchopulmonální dysplázie je výsledkem dynamického procesu zahrnujícího různě časované interakce negativních faktorů s postnatálně se vyvíjející nezralou plicí na rozhraní kanalikulárního a sakulárního vývojového stadia [5]. Nejdůležitější příčiny vzniku BPD jsou: nezralost, zánětlivý proces, kyslík a umělá plicní ventilace (UPV), která vyvolává ventilátorem indukované plicní poškození (VILI).

V současné době existují četné více či méně prokázané terapeutické možnosti, které mohou příznivě zasahovat do patofyziologického děje rozvoje bronchopulmonální dysplázie.. Experimentální a klinický výzkum v rámci postgraduálního studia se omezil na dvě intervence, které mohou pozitivně ovlivnit postnatální vývoj silně nezralých plic.

Kyselina retinová (RA) má pozitivní účinky na rozvoj plicního poškození a alveolarizaci v hyperoxickém prostředí, ale mechanismy tohoto účinku jsou dosud poznány velmi málo [6, 7]. Experimenty v literatuře, zabývající se touto problematikou, zkoumají vliv vitamínu A při expozici vysoké hyperoxii. V kapitole IIA srovnáváme hyperoxické poškození plic a expresi RA-senzitivního genu VEGF-A u novorozenech myši vystavených 40% nebo 80% hyperoxii po sedm dní.

Předmětem zájmu hyperoxických experimentů posledního desetiletí jsou především celulární změny, které jsou klíčové v patogenezi kyslíkové toxicity, například změny v produkci cytokinů [8]. Vliv 40% nebo 80%

hyperoxie po dobu 72 hodin na expresi proinflamačních markerů mapuje druhý animální experiment v kapitole IIA.

Klíčem ke snížení VILI v průběhu UPV je především správně vedená strategie optimálního plicního objemu [2]. Správná volba ventilačního módu může usnadňovat lepší vedení této strategie. Výhody módu vysokofrekvenční ventilace podporované animálními studii z 90.let minulého století nebyly přesvědčivě potvrzeny v humánních studiích [9]. Optimální vedení HFOV v klinické praxi je ale obtížnější a hůře monitorované než během konvenční ventilace. Kontinuální monitorace dechových objemů by mohla napomáhat k určení míry ventilace během HFOV. Jednou z možností je využití anemometru, který může poskytovat kontinuální numerickou informaci o dechovém objemu a tak nepřímou informaci o aktuální míře ventilace [10]. V našem klinickém výzkumu (viz kapitola IIB) jsme se zabývali otázkami, jejichž zodpovězení by mohlo usnadnit klinické využití této metody a interpretaci získávaných hodnot dechového objemu v průběhu HFOV.

II EXPERIMENTÁLNÍ A KLINICKO VÝZKUMNÁ ČÁST

HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Hypotéza A. **Poškození plic novorozené myši je přímo závislé na stupni hyperoxie. Aplikace kyseliny retinové (RA) může zmírňovat rozsah plicního poškození vyvolaného hyperoxií.**

- Srovnat vliv 40% a 80% sedmidenní hyperoxie na míru plicního poškození a možnosti jeho zmírnění aplikací kyseliny retinové
- Analyzovat expresi RA senzitivního genu VEGF-A v hyperoxických a kontrolních podmínkách.
- Srovnat vliv 40% a 80% hyperoxie působící po dobu 72 hodin na míru plicního poškození.
- Analyzovat expresi genů proinflamačních mediátorů IL-1 α , TNF- α , MIP-1 α v podmínkách 40% nebo 80% hyperoxie působící po dobu 72 hodin.

Hypotéza B **Anemometricky měřené expirační dechové objemy (V_{TE}) během vysokofrekvenční oscilační ventilace (HFOV) poskytují objektivní validní numerické hodnoty, které mohou usnadnit optimalizaci ventilační strategie na tomto typu umělé plicní ventilace.**

- Anemometrické stanovení normokapnických, hypokapnických a hyperkapnických V_{TE} během HFOV.
- Zjistit, ve kterých situacích hodnoty V_{TE} překračují hodnotu mrtvého dýchacího prostoru.
- Stanovení vztahů mezi V_{TE} a dalšími repiračními parametry při HFOV.
- Určení koeficientů významných proměnných (nastavené ventilační parametry) ke stanovení rovnice predikce kapnie pacienta ventilovaného metodou HFOV.

IIA SROVNÁNÍ Vlivu 40% A 80% HYPEROXIE NA ROZVOJ PLICNÍHO POŠKOZENÍ

Neonatální expozice vysokým koncentracím kyslíku poškozuje vývoj plic novorozenců savců. Méně je známo o vlivu mírnější hyperoxie, tj. do 60 % koncentrace inhalovaného plynu na rozvoj poškození plic. Ačkoliv nelze výsledky z animálních experimentů absolutně přenášet do klinické praxe, mohly by experimentální data získaná z takovýchto pokusů být užitečným teoretickým podkladem pro respirační péči o novorozence.

1 Vliv aplikace kyseliny retinové na zmírnění hyperoxického plicního poškození

V této práci srovnáváme hyperoxické poškození plic u novorozenců myši vystavených 40% nebo 80% hyperoxii po sedm dní. Polovině myši byla aplikována kyselina retinová. Sledovali jsme expresi RA-senzitivního genu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru A (VEGF-A). VEGF superrodina růstových faktorů hraje esenciální úlohu jak ve fyziologické, tak v patologické angiogenezi [11]. Hyperoxické plicní poškození snižuje expresi genů VEGF [12].

1.1 Materiál a metodika

Zvířata, protokol expozice hyperoxii a aplikace kyseliny retinové

Novorozené myši kmene BALB/c byly rozdělena do 6 skupin: 1) Skupina mláďat na vzduchu bez aplikace vitamínu A (21); 2) Skupina mláďat na vzduchu s aplikací vitamínu A (21A); 3) Skupina mláďat vystavená 40% hyperoxii bez aplikace vitamínu A (40); 4) Skupina mláďat vystavená 40% hyperoxii s aplikací vitamínu A (40A); 5) Skupina mláďat vystavená 80% hyperoxii bez aplikace vitamínu A (80); 6) Skupina mláďat vystavená 80% hyperoxii s aplikací vitamínu A (80A). Axetocal inj. ® (Biotika, kyselina retinová) byl aplikován intraperitoneálně v dávce 500mg/kg jedenkrát za 24h od třetího do sedmého dne mláďatům v následujících skupinách: 21A, 40A, 80A [7].

Stanovení poměru hmotnosti nativních plic a plic po vysušení (W/D poměr) a histologie plic

Plice byly vyňaty a zváženy k určení nativní hmotnosti plic. Po 48 hodinách sušení při 60 °C nedocházelo již ke změně hmotnosti plicní tkáně. Tato hmotnost byla určena jako hmotnost vysušených plic. Byly vytvořeny 5 µm silné řezy plicní tkáně a obarveny hematoxylinem a eosinem [13].

Semikvantitativní stanovení genové exprese VEGF-A pomocí reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce (RT PCR)

RT PCR reakce se skládala ze 3 kroků: 1) Izolace RNA, 2) Syntéza cDNA, 3) PCR amplifikace. Byla stanovena exprese referenčního genu pro enzym glukóza-3-fosfát-dehydrogenázu, G3PDH pro vyloučení falešné negativity vzorku.

Statistická analýza dat

Data v textu, tabulkách i grafech jsou uvedena jako průměry se směrodatnými odchylkami. K porovnání šesti experimentálních skupin byla použita dvoufaktorová ANOVA. Modifikovaný t-test dle Bonferroniho byl použit při mnohonásobných porovnáních.

1.2 Výsledky

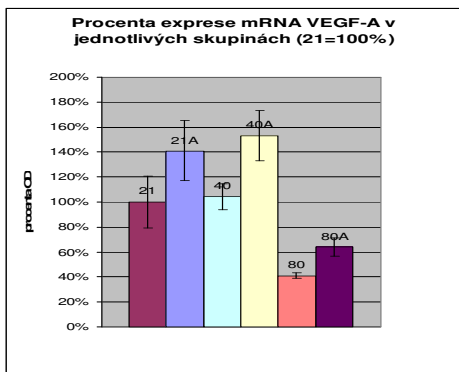
Tab. 1: Tělesná hmotnost (TH), nativní hmotnost plic (HP), poměr hmotnosti nativních a vysušených plic (W/D), optická densita (OD) genové exprese VEGF-A a poměr VEGF-A/G3PDH

Skupina	21	21A	40	40A	80	80A
Počet	10	10	10	10	10	10
TH(g)	4.65±0.15	4.57±0.2	4.7±0.18	4.6±0.21	3.67±0.3*♣	3.98±0.15*
HP(mg)	61.72±1.8	63.71±2.6	70.3±2.7	65.6±1.78	93.6±1.45	79.9±0.8
W/D	3.88±0.09	3.93±0.11	4.12±0.1*♣	3.91±0.04	4.6±0.09*	4.37±0.2*
VEGF-A (OD)	244±58.4	319±40*	238±24♣	349±32.4*	94±12.4	138±22.7
VEGF-A/ G3PDH	0.48	0.64	0.47	0.7	0.2	0.3

*p<0.0071 mnohonásobným porovnáním s kontrolní skupinou 21; ♣ p<0.0071 mnohonásobným porovnáním se skupinou vystavenou stejně vysoké hyperoxii a léčenou vitaminem A.

Histologický nálezn plic u skupiny 40 zahrnoval zesílení alveolární stěny a interalveolárních sept a mírný edém v porovnání se skupinami 21, 21A a 40A, které měly normální obraz. Skupina 80 vykazuje nejvíce odchylek: rozšíření terminálních sakulů, ztlustění jejich stěny, sníženou sekundární septaci, přítomnost buněk zánětu v alveolech, edém, tvorbu hyalinních membrán. Skupina 80A má přiměřenou formaci sekundárních sept. Vykazuje ale zánětlivou reakci v alveolech a intersticiální edém.

Expresí genu VEGF-A skupiny 80A tvořila 64 % kontrolní skupiny. Předpokládaný pokles exprese genu VEGF-A u skupiny vystavené 80 činil 41% kontrolní skupiny (viz obr. 1). Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi skupinami 80 a 80A, ačkoliv se obě tyto skupiny lišily od ostatních skupin. Nalezli jsme statisticky významný rozdíl mezi skupinami 21 versus 21A a 40 versus 40A.



Obr. 1: Procenta exprese RNA VEGF-A ve všech experimentálních skupinách

Poměr genové exprese VEGF-A u normoxické skupiny bez aplikace vitamínu A (21, kontrolní skupina) k expresi kontrolního genu G3PDH je definován jako 100 % a ostatní skupiny jsou prezentovány jako procentuální podíl k této kontrolní skupině.

1. 3 Diskuse

Skupina 80 vážila na konci experimentu průměrně o 20 % méně než kontrolní skupina na vzduchu. Hmotnostní rozdíl u skupiny 80A činil 13 % proti kontrolní normoxické skupině. Skupiny 80 a 80A se statisticky významně liší mezi sebou a obě se rovněž liší od skupiny 21 ($p < 0.0071$). Důvodem může být aktivace signální cesty transformujícího růstového faktoru (TGF- β) [15]. TGF β signální cesta inhibuje růst buněk v mnoha tkáních včetně plicní tkáně. RA antagonizuje působení TGF β redukcí exprese jejich receptorů na buňkách vystavených hyperoxii [16]. Nicméně skupina 80A měla statisticky významně nižší hmotnost než skupina 21. Můžeme spekulovat o tom, zda by se protektivní působení RA na zachování růstu projevilo při delší expozici hyperoxii.

Naše výsledky, že 40% hyperoxie neovlivnila růst jsou v souladu se závěry Daugera a spol., který rovněž při expozici 65% hyperoxii neprokázal žádné signifikantní změny růstu [14]. K aktivaci TGF- β signální cesty může být pravděpodobně potřeba určitá prahová hodnota stupně hyperoxie či jiné noxy.

Skupiny 80 a 80A se mezi sebou statisticky významně neliší v poměru W/D. Můžeme spekulovat o tom, zda by se protektivní působení vitamínu A projevilo v reparační fázi po expozici hyperoxii. Expozice 40% hyperoxie po sedm dní působí také určitý stupeň edématozního plicního poškození dle výsledků W/D poměru. Tyto výsledky jsou ve shodě s prací Buchera a spol., který našel u 40% hyperoxie také mírné známky edému [17]. Byl nalezen statisticky významný rozdíl W/D poměru mezi skupinami 40 a 40A. Tento rozdíl je v souladu s histologickým rozdílem skupin 40 a 40A.

Porovnáním skupin 80 a 80A mezi sebou je možné vyslovit domněnku, že vitamín A mohl přispět k zachování přiměřenou sekundární septaci. Rozdíl histopatologického nálezu mezi skupinami 40 a 40A je v souladu s výsledky W/D poměru.

Skupina 80A měla expresi genu VEGF-A o 20 % vyšší než skupina 80, ale tento rozdíl nebyl signifikantní. Naše výsledky ve skupinách 40A a 21A ale potvrzují, že VEGF-A gen je RA-senzitivní gen, což je v souladu se současnými publikacemi na toto téma [18, 19].

1.4. Závěry

- 1. 80% hyperoxie, na rozdíl od 40% hyperoxie, způsobuje růstovou retardaci, snižuje sekundární septaci sakulů a způsobuje pokles exprese genu VEGF-A.**
- 2. Dle výsledků W/D poměru a histologie působí 80% a pravděpodobně i 40% hyperoxie jistou míru edématozního plicního poškození.**
- 3. Aplikace kyseliny retinové signifikantně omezuje růstovou retardaci v prostředí 80% hyperoxie.**
- 4. Kyselina retinová by mohla dle našich histologických výsledků přispívat k zachování přiměřené sekundární septace sakulů.**
- 5. Na základě výsledků W/D a histologie bychom mohli uvažovat o antiedématozním působení kyseliny retinové v podmínkách mírné 40% hyperoxie.**
- 6. Exprese RA-senzitivního genu VEGF-A byla signifikantně významně zvýšena v podmínkách normoxie a 40% hyperoxie. Aplikace kyseliny retinové moderuje pokles exprese genu pro VEGF-A při expozici 80% hyperoxii, tento rozdíl ale není signifikantní.**

2 Vliv hyperoxie na expresi proinflamačních markerů v plicích novorozené myši

Prozánětlivé cytokiny a chemokiny jsou klíčové ve vývoji BPD; startují invazi leukocytů, uvolnění proteolytických enzymů, další tvorbu ROS a způsobují tak autoinflamační odpověď plicní tkáně, která vede k jejímu poškození. V tomto experimentu jsme stanovovali expresi genů těchto tří proinflamačních markerů: cytokinů TNF- α , IL-1 α a chemokinů MIP-1 α .

2.1 Materiál a metodika

Zvířata a protokol expozice hyperoxii

Novorozené myši kmene BALB/c byly rozděleny do 4 skupin: 1) 21%O₂ 72hod (kontrolní skupina); 2) 40% O₂ 72 hod (skupina 40); 3) 80% O₂ 72hod (skupina 80); 4) 80% O₂ 72hod+ 24hod 21%O₂ (skupina 80+24hod).

Stanovení poměru hmotnosti nativních plic a plic po vysušení (W/D-poměr)

W/D poměr byl stanoven stejným způsobem jako je popsáno v předchozím experimentu.

Semikvantitativní stanovení exprese genů proinflamačních markerů pomocí reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce (RT PCR)

Expresie genů byla určena stejnou metodou RT PCR jako je popsáno v předchozí kapitole.

Statistická analýza dat

Data jsou zobrazena jako průměry a jejich směrodatné odchylky. K porovnání čtyř experimentálních skupin byla použita jednofaktorová ANOVA. Bonferroniho modifikace t-testu byla provedena k mnohonásobným porovnáním.

2.2 Výsledky

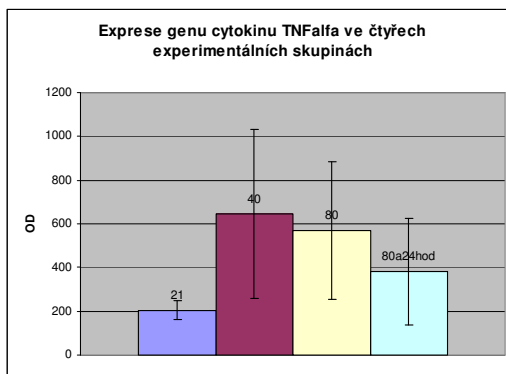
Tab. 2: Nativní hmotnost plic (HP) a poměr W/D u všech skupin na konci experimentu

Skupina	21	40	80	80+24hod
Počet	8	6	7	5
HP(mg)	27.5±0.37	29.8±0.36	41.6±0.51*	51.6±0.3*
W/D	3.58±0.13	3.73±0.07	4.1±0.18*	4.11±0.08*

Data jsou uvedena jako průměry±směrodatná odchylka. *p<0.016 mnohonásobným porovnáním s kontrolní skupinou 21.

Analýza ANOVA našla významný rozdíl denzitometrických jednotek exprese genu TNF- α čtyř experimentálních skupin, $F= 3,21$; $F_{crit}=3,04$; $p=0,04$; $v_1=3$; $v_2=22$.

Průměry exprese genu cytokinu TNF- α skupin 40 a 80 jsou významně odlišné od skupiny 21 pomocí mnohonásobného porovnání dle Bonferroniho (viz obr 2). Průměry exprese genů IL-1 α a MIP-1 α se od sebe dle ANOVA analýzy statisticky významně neliší.



Obr. 2: **Expresse genu cytokinu TNF- α**

Průměry a směrodatné odchylky optických denzit čtyř experimentálních skupin Bonferroniho mnohonásobným porovnáním se statisticky významně liší skupiny 40 a 80 od kontrolní normoxické skupiny ($p<0.016$).

2.3 Diskuse

Podle našich výsledků 40% hyperoxie nevyvolává po 72hod expozice zvýšení poměru W/D. Skupina 40 se statisticky významně neliší od skupiny 21. Podle předpokladů skupiny 80 a 80+24hod mají statisticky významně vyšší W/D poměr. Metoda stanovení W/D poměru spolu s malým počtem prezentovaných měření ale nestačí ke zobecnění těchto výsledků.

Zaznamenali jsme statisticky významné zvýšení exprese genu proinflamačního cytokinu TNF- α ve skupině 40 i 80. Interpretaci nálezů z experimentů s mírnou hyperoxií do 50% je ale potřeba brát s ohledem na možnost, že tyto výsledky mohly být způsobeny i jinak než chemickou kyslíkovou toxicitou [17, 20]. Detekované změny na úrovni exprese genů také nemusí být funkčně signifikantní. Nicméně pokud by zvýšení exprese genu TNF- α při expozici 40% hyperoxii bylo opakovaně prokázáno dostatečným počtem měření, je možné předpokládat zánětlivou odpověď plicní tkáně i při mírné hyperoxii. Vzhledem ke kontroverznímu významu zvýšení produkce TNF- α se může jednat i o obrannou či adaptační reakci

organismu, jak by lépe prokázal experiment dlouhodobější expozice 40% hyperoxii [21].

Nedetekovali jsme statisticky významný nárůst exprese genu IL-1 α u hyperoxických skupin. Je možné, že trvání našeho experimentu nebylo dostatečné k záznamu statisticky významného zvýšení.

Zvýšení genové exprese MIP-1 α proti kontrole činilo ve výsledcích pokusu Warnerové a spol. 300%-400% [13]. Naše data exprese genu proinflamačního chemokinu MIP-1 α mají nejvyšší hodnoty ve skupině 80+24hod, neliší se ale mezi jednotlivými skupinami, což může být způsobeno malým počtem měření nebo metodickou chybou.

2.4 Závěry

1. Dle výsledků tohoto skromného experimentu expozice 80% hyperoxii působící 72hod, na rozdíl od stejně dlouhé expozice 40% hyperoxii, vyvolává edematozní poškození detekované zvýšením W/D poměru.
2. Aktivace zánětlivé odpovědi v podobě **signifikantního zvýšení exprese genu proinflamačního cytokinu TNF- α byla zaznamenána při expozici 40% i 80% hyperoxii.**

IIB ANEMOMETRICKÉ MĚŘENÍ DECHOVÝCH OBJEMŮ BĚHEM VYSOKOFREKVENČNÍ OSCILAČNÍ VENTILACE

Monitorování správně vedené strategie optimálního plicního objemu je během HFOV omezené v porovnání se současnými možnostmi monitorování dynamických plicních funkcí a kapnometrie v průběhu konvenční ventilace. Fredberg a spol. definoval ventilaci, t.j. eliminaci CO₂ během HFOV následující rovnicí: $V_{CO_2} = f^x \times V_T^y$, kde f je frekvence, $x=0,5-1$, $y=1,5-2,2$ [22]. Koeficient y je vyšší než x, a proto -jak je dokumentováno i na modelech in vitro- představuje V_T výraznější determinantu ovlivňující ventilaci než frekvence (f). Scalfaro a spol. na modelu plíce prokázal, že anemometr je schopen měření dechových objemů během HFOV při frekvencích 8-13Hz, tedy v rozmezí, které je nutné pro využití v klinické praxi s požadovanou přesností [10].

1 Pacienti a metodika

Pacienti byli léčeni na jednotce intenzivní péče Perinatologického centra Gynekologicko-porodnické kliniky VFN. K získání arteriální tenze krevních plynů a k měření krevního tlaku během HFOV byla provedena kanylace umbilikální nebo periferní arterie. Všichni pacienti byli ventilováni HFOV ventilátorem Sensormedics 3 100A. Hlavním principem terapie vysokofrekvenční oscilační ventilace byla vysokoobjemová strategie s dosažením optimální inflace plíce.

Dechové objemy byly měřeny neonatálním respiračním monitorem SLE 2100 VPM, který pracuje pomocí sensoru-anemometru se žhavým dvojitým vláknem. Na displeji se zobrazují pouze expirační dechové objemy (V_{TE}). Arteriální odběr ke stanovení arteriální tenze oxidu uhličitého (kapnie, PaCO₂) byl prováděn po dvacetiminutové stabilizaci hodnot na displeji monitoru V_{TE}.

Extratorakální mrtvý prostor byl stanoven jako součet vnitřního objemu tracheální kanyly s adaptérem a senzorem anemometru. Bylo naměřeno rozpětí extratorakálního mrtvého prostoru v rozmezí 2.8–3.2ml v závislosti na průměru endotracheální kanyly.

Byla zaznamenána základní data o pacientech: gestační stáří při narození, porodní hmotnost, čas narození a průměr endotracheální kanyly. Registrovali jsme čas, pH, arteriální tenzi krevních plynů (PaO₂ a PaCO₂) a ventilační režim včetně dechových objemů, na kterém byly tyto hodnoty vnitřního prostředí dosaženy, tj. V_{TE}, CDP, amplitudu, frekvenci a FiO₂. Normokapnický interval PaCO₂ byl definován v rozmezí 35–50 mmHg.

Naměřené V_{TE} byly porovnány ve dvou FiO_2 intervalech (0.21–0.35 vs. 0.36 až 1.0).

Statistické hodnocení bylo provedeno dvouvýběrovým t-testem, testem dle Wilcoxon a testem dle Kruskala a Wallise. Byla provedena lineární regrese mezi hodnotami p_aCO_2 jako závisle proměnnou a V_{TE} jako nezávisle proměnnou a dále mezi V_{TE} jako závisle proměnnou a CDP, FiO_2 , frekvencí, amplitudou a alveolo-arteriálním indexem ($A-aDO_2$) jako nezávisle proměnnými. Koeficienty matematického vztahu k predikci kapnie byly vypočteny násobnou lineární regresí. Byla stanovena pozitivní prediktivní hodnota naměřených a vypočtených hodnot v definovaných pásmech kapnie. ANOVA a Mann-Whitney U test byly použity ke stanovení statistické významnosti.

2 Výsledky

Bylo zpracováno 214 měření V_{TE} , vzájemných kapnií a ventilačních parametrů od 28 pacientů, Medián porodní hmotnosti pacientů byl 852g (rozmezí: 435g–3450g) a medián gestačního stáří při narození byl 27.2 týdne (rozmezí: 23.3–41.0). Nejčastější diagnózou byl RDS (54 %), další diagnózy pacientů byly RDS s plicní hypoplázií (14 %), kongenitální fluidotorax (7 %), pneumonie (7 %), RDS a pneumotorax (7 %), ARDS (7 %), MAS (4 %), Bylo zaznamenáno 118 (55 %) normokapnických měření, 42 (20 %) hypokapnických měření a 54 (25 %) hyperkapnických měření s mediánem V_{TE} 1.67 ml/kg (95 %CI:1.55–1.79), 1.94 ml/kg (95 %CI:1.74–2.14) a 1.54 ml/kg (95 % CI 1.42–1.66),

Tab. 3: Charakteristika expiračních dechových objemů vzhledem k vzájemným FiO_2

	FiO_2 0,21-0,35	FiO_2 0,36-1,0
V_{TE} (ml/kg)	1.61(1.52;1.7) *	2.06(1.93;2.19)
Počet normomokapnických V_{TE}	95/155 (61 %) ♥	23/59 (39%)
Počet normokapnických $V_{TE}>2,0$ ml/kg	16/95 (17 %) ♣	14/23 (60 %)

V_{TE} jsou udávány v mediánu (5%:95% interval spolehlivosti); * $p<0.002$; ♥ $p<0.01$; ♣ $p<0.02$. Je patrný statisticky významně vyšší počet normokapnických V_{TE} a jejich nižší medián ve skupině s FiO_2 0.21–0.35 v porovnání se skupinou s FiO_2 0.36–1.0

Lineární regresní analýza všech měření prokázala statisticky signifikantní negativní korelaci mezi V_{TE} a $PaCO_2$, Vysoce statisticky signifikantní pozitivní korelace byla nalezena mezi hodnotami V_{TE} jako závisle proměnnou a CDP, FiO_2 a $A-aDO_2$ jako nezávisle proměnnými, Frekvence a amplituda nekorelovaly s V_{TE} ani s $PaCO_2$.

Matematický vztah pro predikci kapnie má následující tvar:

$$PaCO_2 = -5,6 * V_{TE} - 0,2 * CDP + 6,2 * FiO_2 + 49,2.$$

Vypočtené hodnoty kapnie v intervalu 35–47 správně predikovaly kapnii v 60% případů. Kalkulace hodnot kapnie >47 byla úspěšná v 81 % případů. Tato matematická rovnice má ale bohužel velmi malou pozitivní prediktivní hodnotu v pásmu hypokapnie.

3 Diskuse

Medián anemometricky naměřených expiračních dechových objemů, prezentovaných v této práci, je v pásmu normokapnie 1.67ml/kg (rozptyl 1.11–5.72ml/kg), Široký rozptyl těchto normokapnických hodnot je pravděpodobně způsoben různou tíží a charakterem pneumopatií (homogenních i nehomogenních), neadekvátní plicní inflací a různým ventilačně-perfúzním poměrem během měření, Medián pneumotachograficky naměřených V_T novorozenců s RDS pro pásmo normokapnie byl dle Dimitrioua a spol., 2.4ml/kg (rozptyl 1.0–3.6ml/kg) [23], Pacienti studie Dimitrioua a spol., byli léčeni metodou HFOV jako rescue terapií po selhání konvenční ventilace, Je tedy možné předpokládat závažnější respirační selhání pacientů Dimitrioua a spol. s nutností použití vyšších hodnot dechových objemů během HFOV.

Hodnoty $FiO_2 > 0.35$ nutné k dosažení normoxémie pacienta spolu s vyššími hodnotami alveoloarteriálního indexu ($A-aDO_2 > 200$) jsou nepřímým ukazatelem heterogenní inflace plice s kolapsem některých alveolů a V/Q nepochybně. Vzájemné hodnoty V_{TE} při současném $FiO_2 > 0.35$ mají signifikantně vyšší medián a větší rozptyl hodnot V_{TE} , které překračují arbitrážní hodnotu mrtvého dýchacího prostoru v porovnání se skupinou V_{TE} s vzájemným $FiO_2 \leq 0.35$. Ve specifických situacích, kdy je nutné k dosažení normoxémie pacienta použít $FiO_2 > 0.35$ a k normokapnické ventilaci hodnot $V_{TE} > 3.0$ ml/kg, je pravděpodobně část alveolů ventilována přímo způsobem obdobným konvenční ventilaci.

Signifikantní negativní korelace mezi V_{TE} a $PaCO_2$ dokládá klíčový význam dechového objemu pro ventilaci pacienta v souladu s Fredbergovou rovnicí pro eliminaci CO_2 během HFOV [22]. Signifikantní pozitivní korelace mezi normokapnickými V_{TE} a CDP, FiO_2 a $A-aDO_2$ v naší studii je výsledkem

kontinuálního ladění amplitudy kudržení normokapnie při měnícím se charakteru plicního onemocnění a změnách oxygenace. Vyšší dechové objemy jsou nutné k dosažení normokapnických hodnot PaCO_2 při vyšším CDP k rozpětí a udržení optimální inflace plíce s nízkou compliance.

Ačkoliv je pozitivní prediktivní hodnota matematického vztahu pro výpočet kapnie pro normokapnické a hyperkapnické V_{TE} relativně nízká (60 % a 81 %) a hypokapnické V_{TE} jsou dokonce neprediktabilní, může být hodnota vypočteného p_aCO_2 užitečná v iniciálním nastavení ventilačních parametrů a následném ladění ventilačního režimu.

4 Závěry

1. Anemometrické měření dechových objemů během HFOV **poskytuje kontinuální objektivní neinvazivní kvantitativní informaci o ventilaci pacienta.**
2. Anemometricky měřené expirační dechové objemy během HFOV **mohou usnadnit vedení ventilační strategie a takto získaná informace je jedním ze základních stavebních kamenů klinického managementu HFOV.**

III SOUHRN

Bronchopulmonální dysplázie (BPD) přispívá výrazně k morbiditě dětí s porodní hmotností <1000g. Experimentální a klinický výzkum v rámci postgraduálního studia se omezil na dvě intervence, které mohou pozitivně ovlivnit postnatální vývoj silně nezralých plic.

V animálním experimentu jsme testovali schopnost kyseliny retinové (RA) omezit rozvoj plicního poškození po sedmi dnech expozice 40% nebo 80% hyperoxii. RA signifikantně omezuje hyperoxickou růstovou retardaci, ke které došlo při expozici 80% hyperoxii. Histopatologické změny plicní tkáně byly zmírněny aplikací kyseliny retinové ve skupinách 40A i 80A. Aplikace RA moderuje pokles exprese genu pro VEGF-A při expozici 80% hyperoxii, tento rozdíl ale není signifikantní. Ve druhém animálním experimentu jsme zaznamenali signifikantní nárůst exprese genu proinflamačního cytokinu TNF- α ve skupině vystavené 40% i 80% hyperoxii po dobu 72hod.

Mechanická ventilace je jedním z rizikových faktorů vzniku BPD. Klinický management strategie optimálního plicního objemu je obtížnější během ventilačního módu HFOV než během konvenční ventilace. Monitorace dechových objemů by mohla napomáhat v kontinuálním monitorování míry ventilace během HFOV. Prezentujeme data anemometricky měřených expiračních dechových objemů (V_{TE}) během HFOV, jejich porovnání vzhledem k hodnotě mrtvého dýchacího prostoru a vztah k ostatním respiračním parametrům. 214 vzájemných měření PaCO₂, V_{TE} , FiO₂, CDP, frekvence a amplitudy bylo získáno od 28 pacientů. Anemometrická měření V_{TE} během HFOV mohou poskytovat validní informace o ventilaci pacienta a mohou usnadnit vedení ventilační strategie na tomto typu umělé plicní ventilace.

V SUMMARY

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) contributes to significant morbidity of infants with birth weight < 1000g. Experimental and clinical research of dissertation thesis has focused on two interventions which might have positive influence on the postnatal development of the immature lung.

In animal experiment, we tested the capability of retinoic acid (RA) to attenuate hyperoxic lung injury after seven days exposure to 40% or 80% hyperoxia. RA significantly attenuates the 80% hyperoxic growth retardation. The histological changes were attenuated in the lungs of 40A and 80A groups. The expression of the VEGF-A gene was not significantly influenced by RA in 80% hyperoxia. In another experiment, we detected significant increase of the expression of the gene of proinflammatory cytokine TNF- α after 72 hours exposure both to 40% and 80% hyperoxia.

Mechanical ventilation still remains one of the risk factors of BPD. The management of optimal lung volume strategy is more difficult during HFOV than conventional ventilation. Efficacy and safety of HFOV is hampered by a lack of reliable bedside in-line monitoring of the patient. We determined the values of expiratory tidal volume measured by hot-wire anemometer and assessed the relationship among V_{TE} and other respiratory parameters. We evaluated how often V_{TE} exceeds the value of the dead space during HFOV. 214 simultaneous measurements of PaCO₂, V_{TE} , FiO₂, CDP, frequency and amplitude were obtained from 28 patients. The V_{TE} measurement by heated double wire anemometer sensor is feasible, provides useful real time information about tidal volume changes and may improve clinical management of HFOV.

VI SEZNAM PUBLIKACÍ A GRANTŮ AUTORKY

1 Seznam publikací, které jsou podkladem disertace

V impaktovaných časopisech:

1. **Zimová-Herknerová M, Mysliveček J, Potměšil P:** Retinoic Acid Attenuates the Mild Hyperoxic Lung Injury in Newborn Mice. **Physiological Research** 57:33-40, 2008. *Impact Factor 2,08 (2006).*
2. **Zimová-Herknerová M, Plavka R.** Expired Tidal Volumes Measured by Hot-Wire Anemometer During High-Frequency Oscillation in Preterm Infants. **Pediatric Pulmonology** 41:428-433 (2006). *Impact Factor 1,965 (2006).*
3. **Zimová M., Plavka R.:** Tidal volumes on HFOV. Proc. of abstracts., International congress on perinatology, Prague 2000. Poster prezentovaný na mezinárodním kongresu: Neonatal Developmental Medicine, Prague, November 5-7, 2000.
4. **Zimová-Herknerová M., Boubelík M.:** Vliv hyperoxie na expresi proinflamačních cytokinů v plicí novorozené myši. Poster prezentovaný na Neonatologických dnech 11.-13.9. 2002 v Olomouci.
5. **Zimová-Herknerová M, Plavka R.** Anemometrické měření dechových objemů během vysokofrekvenční oscilační ventilace. XXII. Neonatologické dny, České Budějovice, 9.-11.listopadu 2005. **Neonatologické listy 11/2005, abstrakta:27.** P 35.
6. **Burkertová J, Herknerová M, Pazderová L, Plavka R.:** Selective HFOV for Primary Atelectasis of Right Hypoplastic Lung Caused by Vascular Anomaly II. International Meeting on Neonatology „ Better Practices in Neonatology“, Lisboa, Portugal, November 16-18, 2006.. **Acta Pediatr Port 2006: 37(5)S8,** OP 19.
7. **Zimová-Herknerová M, Plavka R.:** Metody monitorace dechových objemů během vysokofrekvenční oscilační ventilace. **Neonatologické listy, 13/2007, číslo 2: 8-10.**

2 Disertační práce vznikla v rámci řešení těchto grantových projektů:

1. Grant GA UK, registrační číslo 006/2001/C/1.LF:
Hyperoxie v patogenezi bronchopulmonální dysplázie
Doba řešení: 2001–2003.
Spoluřešitelé: Prof. MUDr. Stanislav Trojan, DrSc., MUDr. Jaromír Mysliveček, PhD, Hana Sýkorová, Jana Šmalcová.
2. Grant IGA MZ ČR, registrační číslo NR 8298–3:
Anemometrické měření dechových objemů během vysokofrekvenční oscilační ventilace
Doba řešení: 2005–2007.
Spoluřešitelé: Doc. MUDr. Richard Plavka, CSc., MUDr. Libuše Pazderová, MUDr. Pavel Kopecký, MUDr. Miloš Zapadlo, CSc.

3 Seznam ostatních publikací:

1. **Zimová M., Plavka R.:** Mechanismy poškození a možnosti léčby hypoxicko-ischemické encefalopatie na prahu 21. století. Neonatologické listy 4, 1998, str. 28–31.
2. **Plavka R., Zimová M.:** Posthypoxická hypotermie-renaissance léčebné metody. Neonatologické listy 4, 1998, str. 33-35.
3. **Zlatohlávková B., Černá M., Zimová M.:** Fetomaternální transfúze jako příčina asfyxie novorozence. Neonatologické listy 5, 1999-Poster prezentovaný na Neonatologických dnech 15.-17. 9. 1999 v Olomouci.

VII Literatura

1. Northway W. H., Rosan R. C., Porter D. Y.: Pulmonary disease following respiratory therapy of hyaline membrane disease bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 1967; 276: 357–368.
2. Plavka R.: Paradigma „nové“ bronchopulmonální dysplázie. *Neonatologické listy*. 2006 (12);1: 3 až 7.
3. Hussain N. A., Siddiqui N. H., Stocker J. R.: Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol* 1998; 29: 710–717.
4. Walsh M. C., Szeffler S., Davis J., Allen M., Van Marter L., Axman S., Blackmon L., Jobe A. H.: Summary Proceedings From the Bronchopulmonary Dysplasia Group. *Pediatrics* 117; 2006 (3): 52–56.
5. Jobe A. H.: Lung Growth and Development after Very Preterm Birth. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1529–1536.
6. Massaro D., Massaro G., De Carlo G.: Retinoids, Alveolus Formation, and Alveolar Defficiency-Clinical Implications. *Am J Respir Cm J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 271–274, 2003.
7. Veness-Meehan K. A., Pierce R. A., Moats-Staats B. M., Stilles A. D.: Retinoic Acid Attenuates O₂ –Induced Inhibition of Lung Septation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L971–980.
8. Perkowski S., Sun J., Singhal S., Santiago J., Leikauf G. D., Albelda S. M.: Gene Expression Profilig of the Early Pulmonary Response to Hyperoxia in Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28: 682–696
9. Bollen C. W., Uiterwaal C. S., van Vught A. J.: Cummulative meta-analysis of high-frequency versus conventional ventilation in premature neonates. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 1150–1155
10. Scalfaro P, Pillow J J, Sly P D, Cotting J. Reliable Tidal Volume Estimates at the Airway Opening with an Infant Monitor during High-Frequency Oscillatory Ventilation. *Crit Care Med* 2001; 29 (10): 1925–1930.
11. Chinoy M. R., Graybill M. M., Miller S. A., Lang C. M., Kauffman G. L.: Angiopoietin-1 and VEGF in vascular development and angiogenesis in hypoplastic lungs. *Am J Physiol* 2002; 283: L60–L66.
12. Maniscalco W. M., Watkins R. H., D'Angio C. T., Ryan R. M.: Hyperoxic Injury Decreases Alveolar Epithelial Cell Epression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Neonatal Rabbit Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 16: 557–567.

13. Warner B. B., Stuart L. A., Papes R.A., Wispe J.R.: Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 1998; 275 (Lung Cell Mol Physiol 19): L110-L117.
14. Dager S., Ferkdadji L., Saumon G., Vardon G., Peuchmaur M., Gaultier C., Gallego J.: Neonatal Exposure to 65% Oxygen Dually Impairs Lung Architecture and Breathing Pattern in Adult Mice. *Chest* 2003; 123: 530–538.
15. Alexandre-Alcázar M, Kwapiszewska G, Reiss I, Amarie O, Marsh L, Sevilla-Perez J, Wygrecka M, Bastian E, Kobrich S, Hesle M, Schermuly R, Seeger W, Eickelberg O, Morty R: Hyperoxia modulates TGF- β /BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L537–L549.
16. Chinoy M. R.: Lung growth and development. *Front Biosci* 2003; 8: 392–415.
17. Bucher JR, Roberts RJ: The Development of the Newborn Rat Lung in Hyperoxia: A Dose-Response Study of Lung Growth, Maturation, and Changes in Antioxidant Enzyme Activities. *Pediatr Res* 1981 Jul; 15 (7): 999–1008.
18. Bland R.D., Albertine K. H., Pierce R. A., Starcher B. C., Carlton D. P.: Impaired alveolar development and abnormal lung elastin in preterm lambs with chronic lung injury: potential benefits of retinol treatment. *Biol Neonate* 2003; 84: 101–102.
19. Bland R. D., Ling C. Y., Albertine K. H., Carlton D. P., MacRitchie A. N, Day R. W., Dahl M.: Pulmonary vascular dysfunction in preterm lambd with chronic lung disease. *Am J Physiol* 2003; 285: L 76–L85.
20. Clark J. M., Lambertsen C. J.: Pulmonary oxygen toxicity: A Review. *Pharmacological Reviews* 1971; 23 (2):48.
21. Pryhuber G. S., O'Brien D. ., Baggs R., Phipps R., Huyck H., Sanz I., Nahm M. H.: Ablation of tumor necrosis factor receptor type I (p55) Alters Oxygen-Induced Lung Injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278: L1082–L1090.
22. Fredberg JJ, Glass GM, Bonton BR et al. Factors influencing mechanical performance of neonatal high-frequency ventilators. *J Appl Physiol* 1987; 62: 2485–2492.
23. Dimitriou G, Greenough A, Kavvadia V, Laubscher B, Miller AD. Volume delivery during high frequency oscillation. *Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal. Ed.*, 78, 1998, s. 148–150.