

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni



Obor: Chirurgie

Prognostický význam sledování hladiny markerů u poškození CNS u nemocných po poranění

Podtitul: Prognostický význam sledování proteinu S100B u
dětí po poranění CNS

Autoreferát dizertační práce

MUDr. Helena Homolková

Praha 2012

Dizertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního doktorandského studia na Neurochirurgickém oddělení FN Plzeň.

Uchazeč: MUDr. Helena Homolková
Klinika dětské chirurgie a traumatologie
3. lékařské fakulty UK
a Fakultní Thomayerovy nemocnice
Václavská 800
Praha 4 - Krč

Školitel: MUDr. Milan Choc, CSc.
Neurochirurgické oddělení Fakultní nemocnice
Plzeň a lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni

Oponenti:

Stanovisko k dizertační práci vypracovalo vedení
Neurochirurgického oddělení Fakultní nemocnice Plzeň a Lékařské
fakulty Univerzity Karlovy v Plzni

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disertační práce se koná dne
před komisí pro obhajobu dizertačních prací v oboru.
Místo obhajoby: Šafránkův pavilon, posluchárna A, Alej Svobody
31, Plzeň

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

Univerzita Karlova, Lékařská Fakulta v Plzni

dizertační práce

**Prognostický význam sledování hladiny markerů u
poškození CNS u nemocných po poranění**

Podtitul: Prognostický význam sledování proteinu S100B u
děti po poranění CNS

autor: MUDr. Helena Homolková

Klinika dětské chirurgie a traumatologie 3. lékařské fakulty Univerzity
Karlovy a Fakultní Thomayerovy nemocnice Praha

školitel: MUDr. Milan Choc, CSc.

Neurochirurgické oddělení Fakultní nemocnice Plzeň a lékařské fakulty
Univerzity Karlovy v Plzni

Praha 2004-2012

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

(zkratky jsou řazeny abecedně)

AVM – arteriovenózní malformace

BG – bazální ganglia

CNS – centrální nervová soustava

CBF – cerebral blood flow

CBFV – cerebral blood flow velocity

CPP – cerebral perfusion pressure

DAI – diffuse axonal injury (difúzní axonální poranění)

EVD – extraventricular drainage (zevní komorová drenáž)

F – frontální

GCS – Glasgow Coma Scale

GOS – Glasgow Outcome Scale

ICH – intracerebral haemorrhage (intracerebrální krvácení)

ICP – intracranial pressure

ICU – intensive care unit

JIRP – jednotka intenzivní a resuscitační péče

LPK – levá postranní komora

MAP – middle arterial pressure

MTBI – mild traumatic brain injury (lehké poranění mozku)

NSE – nespecifická enolaza

NT – Neurotrend

O – okcipitální

SAK – subarachnoidální krvácení

TAI – traumatic axonal injury

TBI – traumatic brain injury

Obsah:

- 1 Úvod
- 1.1 Dokumenty dětské traumatologie v ČR
- 2 Dílčí cíle práce
- 3 Studie věnující se využití proteinu S100B u poranění CNS
- 4 Primární a sekundární poranění mozku
- 5 Protein S100B
 - 5.1. Úloha proteinu S100B v metabolismu
 - 5.2 Využití proteinu S100B v klinické praxi
 - 5.3 Metody stanovení
- 6 Metodika a materiál
 - 6.1 Metodika
 - 6.2 Materiál
- 7 Statistické zpracování závislosti mezi hladinou S100B proteinu a GSC a GOS
- 8 Diskuze
- 9 Závěr
- 10 Summary
- 11 Seznam literatury

1 Úvod

Traumatická poranění hlavy a mozku u dětí a dospívajících jsou způsobena různými mechanismy - od pádů, kolizí nemotorových a motorových vozidel až po zneužívání dětí či střelná poranění. Dopravní nehody jsou nejčastější příčinou vzniku závažného traumatického poranění mozku (TBI). Úrazy hlavy tak patří k hlavním příčinám dětské úmrtnosti i nemocnosti ve všech průmyslově vyspělých zemích. Této problematice je věnována zvýšená pozornost nejenom vzhledem k jejich narůstajícímu počtu, ale i závažným následkům těchto poranění. Nejohroženější skupinou jsou právě děti a dospívající, u nichž jsou úrazy na prvním místě v příčinách úmrtí a na druhém místě v příčinách nemocnosti. Více než 300 dětí v České republice každoročně na následky úrazu umírá, téměř 3000 dětí je postiženo trvalými následky.

Nejúčinnější obranou před úrazy u dětí je účinná prevence. V České republice běží preventivní program Úraz není náhoda – projekt VZP a partnerů, který navazuje na předchozí projekt Dětsví bez úrazů. Je financován z Fondu prevence VZP, která na něj vyčlenila 15 mil Kč. Došlo tak ke snížení úrazovosti u dětí, nicméně zatím se nevyrovnáme státům s nejnižší úrazovou mortalitou (Švédsko, UK). Do centra pozornosti se musí dostat všechny věkové skupiny dětí, všechna prostředí, ve kterých se pohybují, všechny činnosti, které mohou způsobit úraz a zajišťování bezpečnosti výrobků určených pro děti (16). Prevence úrazu je také jedním z hlavních cílů programu WHO „Zdraví 21“, cíl č. 9 „Snížení výskytu poranění způsobených násilím a úrazy“ – do roku 2020 zajistit, aby počty zranění, postižení a úmrtí, která jsou důsledkem nehod a násilných činů, trvale a výrazně poklesly.

Z amerických statistik vyplývá, že při použití bezpečnostních pásů dochází k polovičnímu počtu úmrtí, poranění účastníků nehody jsou méně závažná, s kratší hospitalizací i kratším pobytem na intenzivní péči (20). Další údaje statistik uvádějí, že pouze 1 % dětí přijatých pro poranění hlavy v souvislosti s jízdou na kole mělo cyklistickou přilbu. Téměř polovina všech úrazů u dětí do 15 let vzniká v souvislosti s pohybem v dopravním prostředí. Dopravní nehody jsou v ČR nejčastější příčinou dětských úrazových úmrtí. Každoročně v důsledku dopravní nehody zahyne přibližně 40 dětí a více než 4000 dětí utrpí v souvislosti s dopravní nehodou vážné zranění (8).

Péče o dětské traumatologické pacienty v České republice nebyla do roku 2001 centralizovaná. Poraněné dítě bylo rychlou záchrannou službou převezeno do nejbližšího zdravotnického zařízení, kde bylo zajištěno a léčeno dle možností pracoviště. Zřídka bylo převezeno na pracoviště vyššího typu. Chyběla koncepce oboru, standardy péče a chyběla představa o materiálovém a erudičním zajištění. Léčba tak nebyla komplexní a stála

nemálo prostředků. Struktura dětských traumacenter byla dána v roce 2001 věstníkem ministerstva zdravotnictví a v roce 2002 doplněna. V současné době je na území České republiky síť osmi dětských traumacenter. Výhodou těchto center je specializovaná péče a koncentrace pacientů. Dětská traumacentra poskytují vysoce specializovanou léčbu v plném rozsahu. Je tak zajištěna péče i o nejzávažněji poraněné pacienty. Transport zraněných se děje primárně do traumacentra. Narozdíl od center pro dospělé musí dětské traumacentrum být schopno ošetřit děti ve všech věkových kategoriích, tedy i novorozence a kojence, závažná sdružená poranění menších dětí, poranění růstové ploténky kosti, vzácné dětské zlomeniny a mnohotné zlomeniny. Péče o děti s traumatem je podle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví ČR diferencovaná. Standardní péče je pro drobné a nezávažné úrazy poskytována nadále dle spádu. Středně závažné úrazy jsou řešeny na úrazových pracovištích s dostatečnou erudicí a personálním a materiálovým zajištěním. Vysoce specializovaná centra dětské traumatologie dle metodického pokynu MZd ČR poskytují komplexní ošetření v celé šíři oboru a mají povinnost převzít pacienta z nižšího typu pracoviště. V dětském traumacentru je poskytována multidisciplinární péče. Centrum je součástí velké (fakultní) nemocnice, má základnu na lůžkovém oddělení dětského chirurgického typu, je horizontální strukturou, prolínající nemocnicí.

1.1 Dokumenty dětské traumatologie v ČR

Koncepce dětské traumatologie (1995)

Audit Centra dětské traumatologie (1999)

Standardy léčby (2000) (dětských zlomenin, orgánového traumatu)

Provozní řád Centra dětské traumatologie

Věstník MZd ČR 2001: Metodické opatření ustanovující síť traumacenter v ČR a jejich spádové území

Věstník MZd ČR 2002: rozšíření CDT o centra v Plzni a Českých Budějovicích

Standard ošetřování závažně poraněných dětí

Funkce dětského traumacentra:

Diagnosticko-léčebná péče

Konziliární služba

Organizace péče o poraněné ve spádu
Pedagogická činnost na všech úrovních
Sběr statistických údajů
Vědecko-výzkumná práce
Účast na prevenci úrazů

2 Dílčí cíle práce

1. hodnocení vztahu hladiny sérového proteinu S100B a GCS po primárním poranění mozku
2. hodnocení vztahu proteinu S100B k predikci rozvoje sekundárního poranění mozku
3. hodnocení vztahu proteinu S100B k predikci mortality a morbiditu u dětí s úrazem CNS
4. hodnocení vztahu hladiny sérového proteinu S100B a Glasgow Outcome scale
5. praktické využití v klinické praxi

3 Studie věnující se využití proteinu S100B u poranění CNS

Většina klinických studií, které hledají souvislost mezi sérovou hladinou proteinu S100B a traumatickým poraněním mozku u dětí, jsou založeny na malých souborech pacientů. Statistická data z nich získaná proto nejsou zcela validní. Jen málo studií je založeno na souboru více než 100 pacientů.

Geyer et al (15) publikoval prospektivní studii 148 dětí s lehkým poraněním mozku (MTBI). Sledoval sérové hladiny proteinu S100B a neuron-specifické enolasy. Vzorky byly odebírány do 6 hodin po úrazu. Celý soubor rozdělil na dvě skupiny. První skupina byly nemocní s lehkým poraněním mozku. Kritéria byla GCS 13-15 a klinické známky lehkého poranění mozku. Druhá skupina nemocných byly děti s kontuzí hlavy, GCS 15 a bez klinických známek lehkého poranění mozku. Autoři zjistili vliv věku nemocných a délky doby odběru krve od úrazu na výslednou hladinu zkoumaného biomarkeru. Hladiny zkoumaných markerů se v obou skupinách významněji nelišily. Nenašel ani rozdíl v hladinách zkoumaných markerů mezi nemocnými s GCS 15 a 14. Závěr z této studie je nízká senzitivita proteinu S100B pro lehká poranění mozku.

V prospektivní studii Castellani (12) et al zkoumal na souboru 109 dětí s lehkým poraněním mozku závislost hladiny proteinu S100B a nálezu na CT. Kritéria byla děti s GCS 13 - 15, s klinickými známkami lehkého poranění CNS. Během hospitalizace u nich bylo provedeno CT CNS a vzorky krve byly odebrány během 6 hodin po úrazu. Castellani touto studií našel statisticky významnou závislost mezi sérovou hladinou proteinu S100B a těmi nemocnými, kteří měli patologický nálezu na CT a těmi, kteří měli CT s normálním nálezem. Nenašel statisticky významnou závislost mezi jednotlivými skupinami GCS, tedy GCS 13,14,15. Všechny děti s normální hodnotou proteinu S100B v séru měli i negativní nálezu na CT ve smyslu pouřazových patologií.. Tento výsledek lze využít při plánování rutinního provádění CT CNS u dětí s lehkým poraněním mozku. Na druhou stranu je třeba si uvědomit, že hladina proteinu S100B může být vyšší i u úrazů jiných částí těla či orgánů.

Akhtar et al (1) hodnotil význam sérové hladiny proteinu S100B u 17 dětí s lehkým traumatickým poraněním mozku. Všechny děti měly negativní CT nálezu, dále byly sledovány MRI CNS. Ve studii chybí údaj o vstupním GCS. Výsledek studie ukázal, že dle sérová hladiny proteinu S100B nebyli neidentifikováni ti nemocní s pozitivním nálezem na CT. Navíc, děti s dalším poraněním jiné části těla měly vyšší hladinu proteinu S100B než děti s izolovaným traumatem CNS. Berger et al (5) publikoval soubor 12 dětí s podezřením na úraz hlavy, GCS 15 při příjmu a normálním nálezem na CT a žádnými klinickými známkami MTBI. Z celkového počtu dětí u 67% byla zvýšená hladina proteinu S100B. Autoři uzavřeli svá pozorování konstatováním, že protein S100B je více senzitivní než CT nebo vyšetření MRI. Vyšší hladina proteinu S100B může odrážet poškození CNS, které není detekovatelné pomocí zobrazovacích vyšetření. Studie Geyera, Bergera a Akhtara (15,5,1) ukázaly nízkou senzitivitu proteinu S100B u dětí s lehkým poraněním CNS. To znamená, že protein S100B není vhodným markerem k detekci nitrolební úrazové patologie. Castellaniho (12) studie potvrdila 100% senzitivitu pro ty nemocné, kteří neměli žádný patologický nálezu na CT. Ze studie tedy vyplývá využití hladiny proteinu S100B u nemocných dětí s lehkým úrazem hlavy při rozhodování, zda provést zobrazovací vyšetření CNS.

Ve své práci jsem se zaměřila nikoliv na detekci poranění CNS pomocí proteinu S100B, ale na predikci výsledků našich léčebných a diagnostických postupů u dětí s poraněním CNS, vedoucích k minimalizaci rozvoje sekundárního poranění CNS.

4 Primární a sekundární poranění mozku

Pacient je na prvním místě ohrožen primárním poraněním CNS, ze kterého může při nedostatečné nebo chybně vedené léčbě rezultovat sekundární poranění CNS. Primární poranění mozku způsobuje přímo působící síla nárazu, dochází k deformaci mozkové tkáně s okamžitou klinickou odezvou (14). Primárním infarktem je nejen trauma jako takové, ale i spontánně vzniklá ischemie, hemoragie, zánět či metabolické postižení CNS. Primární poranění postihuje většinou všechny struktury mozkové tkáně, tedy neurony, gliové buňky a cévní endotel. V místě primárního infarktu dojde k poruše autoregulace průtoku krve mozkovou tkání (CBF – cerebral blood flow). Při postižení cévního endotelu kapilár dojde k porušení hematoencefalické bariéry, a následně dojde k extravazaci – přestupu tekutiny do intersticia. Vzniká tak vazogenní edém.

Sekundární poranění vzniká jako důsledek primárního poranění, spuštěním autodestrukčních mechanismů (27). Vznik primárního poranění nelze terapeuticky ovlivnit. Naproti tomu sekundární poranění mozku se rozvíjí za určitou dobu po primárním poranění, lze jej predikovat a jeho rozvoj terapeuticky ovlivnit. Navíc, příčiny a závislosti rozvoje sekundárního poranění mozku jsou dostatečně známé. V ideálním případě by k rozvoji sekundárního poranění mozku nemělo vůbec dojít. Klinické projevy a následky primárního poranění jsou zesilovány rozvojem sekundárního poranění. Primární poranění má okamžitou klinickou odezvu ve stavu vědomí nebo míře neurologického postižení. Jakákoliv další změna ve stavu vědomí nebo neurologického stavu je tedy zapříčiněna sekundárním poraněním. Sekundární poranění mozku je charakterizováno kaskádou biochemických, molekulárních a buněčných dějů. Zahrnuje jak endogenní vývoj poranění mozkové tkáně, tak i efekt sekundárního extracerebrálního infarktu, jako je hypotenze a hypoxie (10). Změny na molekulární a buněčné úrovni se rozvíjejí v řádech minut a hodin. Proto byly publikovány různé standardy (guidelines) pro péči o pacienta s poraněním CNS. Důležité je rozpoznat, kdy je pacient rozvojem sekundárního poranění mozku ohrožen. Primární poranění mechanickým působením na mozkovou tkáň naruší funkci buňky se zachováním integrity buněčné membrány a intracelulárních systémů. Při sekundárním infarktu dojde k dominantnímu postižení buněčné membrány a energetického metabolismu buňky, vedoucí k selhání aktivních transportních mechanismů a k otoku buňky – vzniká cytotoxický edém. Následkem postižení energetického metabolismu buňky je depolarizace buněčné membrány. Depolarizace spouští dvě kaskády dějů. První spočívá v uvolnění excitačních mediátorů – glutamátu a aspartátu (28). Druhá kaskáda začíná vzestupem intracelulární hladiny kalcia uvolněním ze zásob v buňce a influxem kalcia otevřenými Ca^{2+} kanály (21). Tyto děje vedou

k ireverzibilnímu poškození buněk. Příčiny sekundárního poranění mozku lze rozdělit na extrakraniální a intrakraniální.

Extrakraniální příčiny sekundárního poranění mozku jsou hypoxie, hypotenze, hyponatrémie, hypoglykémie a hypertermie. Intrakraniální příčiny sekundárního poranění mozku jsou nitrolební krvácení extradurální, subdurální intracerebrální, subarachnoidální, intraventriculární, venózní kongesce, edém (vazogenní, cytotoxický a intersticiální), infekce. Mechanizmy, kterými se sekundární poranění mozku děje, lze rozdělit do čtyř kategorií.

Kategorie mechanismů sekundárního poranění:

- I. kategorie:** ischemie, excitotoxicita a energetické selhání vedoucí ke kaskádě buněčné smrti.
- II. kategorie:** hemodynamické zduření mozkové tkáně (cerebral swelling).
- III. kategorie:** axonální poranění
- IV. kategorie:** zánět a regenerace.

V každé kategorii je skupina mediátorů sekundárního poranění, endogenní neuroprotektce, reparace a regenerace (19).

Z výše uvedeného vyplývá nutnost rychle terapeuticky ovlivnit dobu po primárním poranění CNS. Optimální by bylo nalezení takového biomarkeru, jehož stanovení a správná interpretace dynamiky hladiny umožní rozpoznat rizikové dětské pacienty pro sekundární poranění CNS a podle toho pak cílit vyšetřovací metody a léčbu. Biomarkery, u kterých je zkoumána možnost využití jako prediktorů tíže poranění CNS jsou protein S100B, NSE (nespecifická enolaza - neurony), GFAP (glial fibrilary acidic protein – atroglie), Tau protein – stabilita axonálních a dendritických mikrotubulů, NMDA receptory – oligodendrocyty, astrocyty. Rovněž se zkoumá využití Apolipoproteinu E jako prediktoru následků poranění CNS (9).

Požadavky na optimální biomarker jsou: vysoká specifita i senzitivita pro mozkovou tkáň, měl by být okamžitě detekovatelný v séru po poranění CNS, jeho vyšší hladina v séru by měla odpovídat závažnosti poranění CNS, měl by mít nízkou rozdílnost hladin podle pohlaví a věku a možnost být spolehlivě detekován. Protein S100B vstupuje do séra buď přímo porušenou hematoencefalickou bariérou nebo cestou cirkulace mozkomíšního moku. Je metabolizován v ledvinách a z těla vyloučen močí. Má vysokou specifitu i senzitivitu. Je měřitelný v séru a zůstává i po odběru dlouho stabilní, aniž by bylo nutno jej centrifugovat nebo zmrazit. Vyšetření sérové hladiny proteinu S100B je hrazeno zdravotními pojišťovnami.

5 Protein S100B

Kalcium působí jako messenger regulující celou řadu buněčných procesů. Jeho signalizační síť je složena z mnoha molekulárních součástí včetně velké skupiny Ca-vázcích proteinů (17). Skupina proteinů S100 představuje největší podskupinu a v poslední době se k ní zaměřuje stále větší pozornost pro svoji buněčnou a tkáňovou specificitu. Jediným rysem těchto proteinů je lokalizace jeho členů v různých buněčných kompartmentech, ze kterých se mohou uvolnit podle aktivace Ca a přenést Ca signál interakcí s různými cíly, specifickými pro každý protein S100. Někteří členové skupiny S100 jsou dokonce uvolňováni z buněk užívajících extracelulární, cytokine-like činnosti částečně cestou povrchových receptorů RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) s parakrinním efektem, např. na neuronech, a tím podporují jejich přežití během vývoje a nebo po poranění.

Podskupina S100B protein je termolabilní kalcium-vázcí kyselý protein o molekulové hmotnosti 21000 (21 kDa, jako dimer). Vyskytuje se jako součást heterodimeru S100A1B (protein glie) nebo homodimeru S100BB. Vlastní podjednotka S100beta (S100B) je tvořena 91 aminokyselinami, strukturálně je podobná podjednotce S100alfa (S100A). Koncentrace podjednotky S100B v mozku (astroglie) je 30 - 100x vyšší než v ostatních tkáních. Alternativním názvem je „Astrocyte-derived growth factor“ a řadí se mezi cytokiny. S-100 protein byl poprvé popsán v centrálním nervovém systému. Vysoká hladina S100B (S100B, beta-beta dimer) se nachází v nervové tkáni v gliálních a Schwannových buňkách, adipocytech, pouze v gliálních buňkách je homodimer složený z alfa-podjednotek. 95% zdravých dospělých má hodnoty proteinu S100 v séru nižší než 0,1 µg/l (medián 0,04 µg/l). V dospělém věku nejsou známy věkové nebo pohlavní rozdíly hodnot. U pacientů s benigními tumory jsou koncentrace S100 jen mírně zvýšené, podobně jako u nemocných s malignitami. Medián hodnot S100 u nemocných s benigními nemocemi plic, gastrointestinálního (GIT) a urogenitálního traktu, stejně jako u pacientů s autoimunitními nemocemi, je blízký mediánu hodnot zdravých dospělých. Koncentrace jen výjimečně dosahuje výše 0,4 µg/l. Diagnostické potíže může způsobit závažná bakteriální infekce (např. u pacientů hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče). U některých nemocných se závažnými bakteriálními infekty může hodnota S100 dosáhnout i 2,0 µg/l. K mírné elevaci hodnot proteinu S100 dochází při jaterní cirhóze a ledvinné nedostatečnosti. S vysokými koncentracemi S100 se můžeme setkat při rozsáhlých srdečních infarktech. S výjimkou maligního melanomu nedochází u pacientů se solidními maligními tumory k výrazné elevaci koncentrace proteinu S100. Destrukce nervové tkáně a neurodegenerativní postižení mají za následek uvolnění proteinu S100 z astrocytárních gliových buněk a elevaci jeho

hladiny v likvoru. Pokud dojde zároveň k poškození hematoencefalické bariéry, pronikne protein S100 do systémové cirkulace a v krvi se zjistí zvýšené hodnoty proteinu S100. Zvýšené koncentrace S100 proteinu v séru se detekují u mozkových traumat, cerebrálních ischemií jakékoli etiologie, infekcí mozku, hypoxického poškození CNS po srdeční zástavě nebo kardiochirurgických operacích v mimotělním oběhu. Při akutním poškození mozku dojde ke zvýšení S100 v séru během několika málo hodin a maximálních koncentrací se dosáhne za jeden až tři dny. Při nekomplikovaném průběhu hojení dojde k návratu na fyziologické hodnoty během jednoho týdne. Dosažení maximálních hodnot S100 v séru je po ischemické cévní mozkové příhodě delší ve srovnání s hemorhagickou nebo hypoxickou lézí a traumaty mozku. Více studií prokázalo u pacientů s traumaty mozku, krvácením do mozku, ischemickým poškozením mozku těsnou korelaci mezi hodnotou S100 v séru a objektivním nálezem poškození mozku při vyšetření počítačovou tomografií (CT), klinickým stavem nemocných a krátko- i střednědobou prognózou schopnosti rehabilitace po příhodě. V séru pacientů s neurodegenerativními nemocmi, autoimunitními nebo psychiatrickými onemocněními nebyly pozorovány zvýšené koncentrace S100. Naproti tomu koncentrace S100 v likvoru byly opakovaně zvýšené ve studiích s pacienty trpících Alzheimerovou nemocí, Creutzfeldt-Jakobovou chorobou, při exacerbaci roztroušené sklerózy, u nemocných se syndromem Guillain-Barré, při bakteriálních infekcích CNS a u nemocných s některými psychiatrickými diagnózami. U takových nemocných se doporučuje stanovení proteinu S100 v séru a likvoru zároveň, abychom zachytili posun fyziologického poměru 18:1 (likvor : sérum) (30). Souhrnně lze říci, že co nejdřívejší stanovení proteinu S100 je doporučeno u všech akutních poškození CNS, a to i při negativním nálezu na CT hlavy, aby bylo možné co nejdříve zachytit poškození CNS. Opakované (sériové) měření se doporučuje pro kontrolu klinického vývoje a stanovení prognózy.

5.1. Úloha proteinu S100B v metabolismu

Biologická role není zcela objasněna. Je považován za cytokin produkovaný astrocyty, který ovlivňuje vývoj buněk centrálního nervového systému. Má neurotrofní efekt během vývoje i během regenerace nervů. Vzhledem ke schopnosti vázat kalcium se přepokládá jeho spoluúčast na tvorbě struktur mikrotubulů.

Pravděpodobnými funkcemi proteinu S100B mohou být

- řízení buněčného cyklu (účast v signální transdukcii při regulaci růstu a diferenciaci)
- řízení vyzářování mozku u savců

- podpora životnosti a morfologické diferenciacie neuronů, prodlužování neuritů
- regulace proliferace glie
- extracelulární mediátor diferenciacie neuronů

Destrukce nervové tkáně má za následek uvolnění proteinu S100 z astrocytárních gliových buněk a elevaci jeho hladiny v likvoru. Pokud dojde zároveň k poškození hematoencefalické bariéry, pronikne S100 do systémové cirkulace a v krvi se zjistí zvýšené hodnoty S100B. Vysoká vstupní sérová hladina proteinu S100B časně po úrazu odráží buněčné poškození a zvyšující se permeabilitu hematoencefalické bariéry (blood-brain barrier-BBB). Je tedy ukazatelem rizikových nemocných ohrožených rozvojem sekundárního poranění CNS (35). Naproti tomu dynamika kolísání hladin proteinu predikuje míru trvalého poškození CNS a trvalý neurodeficit. Míra trvajících postižení nekoreluje s tíží úrazu (34).

5.2 Využití proteinu S100B v klinické praxi

Zvýšené koncentrace S100 proteinu v séru se detekují u mozkových traumat, cerebrálních ischemií jakékoli etiologie, infekcí mozku, hypoxického poškození CNS po srdeční zástavě nebo kardiochirurgických operacích v mimotělním oběhu. Při akutním poškození mozku dojde ke zvýšení S100 v séru během několika málo hodin a maximálních koncentrací se dosáhne za jeden až tři dny. Při nekomplikovaném průběhu hojení dojde k návratu na fyziologické hodnoty během jednoho týdne. Dosažení maximálních hodnot S100 v séru je po ischemické cévní mozkové příhodě delší ve srovnání s hemorhagickou nebo hypoxickou lézí a traumaty mozku. Více studií prokázalo u pacientů s traumaty mozku, krvácením do mozku, ischemickým poškozením mozku těsnou korelaci mezi hodnotou S100 v séru a objektivním nálezem poškození mozku při vyšetření počítačovou tomografií (CT), klinickým stavem nemocných a krátko- i střednědobou prognózou schopnosti rehabilitace po příhodě. V séru pacientů s neurodegenerativními nemocemi, autoimunitními nebo psychiatrickými onemocněními nebyly pozorovány zvýšené koncentrace S100. Naproti tomu koncentrace S100 v likvoru byly opakovaně zvýšené ve studiích s pacienty trpících Alzheimerovou nemocí, Creutzfeldt-Jakobovou chorobou, při exacerbaci roztroušené sklerózy, u nemocných se syndromem Guillain-Barré, při bakteriálních infekcích CNS a u nemocných s některými psychiatrickými diagnózami. U takových nemocných se doporučuje stanovení proteinu S100 v séru a likvoru zároveň, abychom zachytili posun fyziologického poměru 18:1 (likvor : sérum) (30). Souhrnně lze říci, že co nejčasnější stanovení proteinu S100 je doporučené u všech akutních

poškození CNS, a to i při negativním nálezu na CT hlavy, aby bylo možné co nejdříve zachytit poškození CNS. Opakované (sériově) měření se doporučuje pro kontrolu klinického vývoje a stanovení prognózy.

S100B je jako možný marker poškození CNS následkem úrazu zkoumán již několik let u dospělých pacientů. Je jen málo prací na toto téma u pacientů dětských. U dospělé populace je normální hladina proteinu v séru konstantní ve všech věkových kategoriích. Naproti tomu u dětí jeho hladina kolísá, odráží se zde neurotropní vliv proteinu na vyvíjející se mozek.

Rozhodovací limit, tzv. cut-off hodnota proteinu S100B při použití analytického systému Elecsys Roche Diagnostics u dospělých osob, je 0,105 µg/l. U dětí jsou hladiny proteinu S100B vyšší a liší se podle věku (29). Normální hodnotu sérové hladiny proteinu S100B u dětí pro daný věk jsme použili výsledky z práce italských autorů Gazzolo et al (2003) (13). Ti ze vzorků krve 1000 zdravých dětí ve věkovém rozmezí 0 – 15 let sestavili křivku normálních sérových hladin proteinu S100B pro daný věk. První pokles hladiny je mezi 2. – 7. rokem věku, je následován vzestupem od 7. – 13. roku věku. Druhý pokles je mezi 14. – 15. rokem věku. Dívky mají vyšší hladinu než chlapci. Medián a rozsah hodnot S100B pro 0. - 1. rok věku je 0,95 µg /l (medián) a 0,44 – 2,55 µg/l (rozsah hodnot) jsou signifikantně vyšší, než medián a rozsah hodnot u dětí 2 - 7 letých, kde činí medián 0,73 µg/l a rozsah hodnot může být 0,44-1,06 µg/l. Nejvyšší individuální koncentrace S100B proteinu byly zjištěny u dětí v prvním roce života a mezi 9. a 10. rokem života (13) Od 16. roku věku se norma přibližuje dospělým. Fyziologické kolísání hladin podle věku je dáno jednou z funkcí proteinu S100B - řízení vyžívání mozku u savců.

5.3 Metody stanovení

Enzymatická imunoassay (EIA), radioimunoassay (RIA), imunoradiometrické stanovení (IRMA), luminiscenční metody (LIA), elektrochemiluminiscence (ECLIA). Většina komerčních souprav pro stanovení proteinu S100B používá mono- nebo polyklonální protilátky proti jeho beta-podjednotce a detekují tak izoformy S100A a S100B. Existují i metody, které umožňují detailní rozlišení jednotlivých podtypů S100.

6 Metodika a materiál

6.1 Metodika

Do souboru byli zahrnuti dětská pacientí s monotraumatem CNS, hospitalizováni na naší JIRP v letech 2004 - 2008. Věk nemocných dětí byl od 0 do 17 let.

Vstupními kritérii byl podepsaný informovaný souhlas zákonného zástupce dítěte a nemocní s prokázaným nebo předpokládaným monotraumatem CNS. Úrazem CNS byl každý úder do hlavy projevující se klinicky změnou v neurologickém stavu.

Ze souboru byli vyjmuti pacienti, jejichž zákonný zástupce nedal souhlas se zařazením do studie, polytraumatizovaní pacienti, nemocní s historií epileptických záchvatů posledních 10 dní před úrazem, děti s Downovým syndromem, opožděným vývojem nebo jakýmkoliv neurologickým onemocněním. Polytraumatizovaní pacienti byli vyloučeni pro možnost zkeslení sérové hladiny proteinu S100B o množství uvolněné z adipocytů. Nemocní s Downovým syndromem mají normálně zvýšenou hladinu proteinu S100B. Ze souboru byly vyloučeny také děti s frakturami dlouhých kostí nebo kontuzí hrudní stěny. Bylo publikováno několik studií ze kterých vyplývá, že kostní dřev je potencionálním extracerebrálním zdrojem proteinu S100B. Hladinu S100B zvyšují i popáleniny kůže (22).

K ohodnocení tíže primárního poranění CNS byla použita škála GCS pro děti od 5 do 17 let (tabulka 1) a pro děti od 0-4 let byla použita modifikovaná škála GCS pro děti mladší 4 let (tabulka 2).

Pro zhodnocení konečného klinického stavu pacienta jsme využili hodnotící škály GOS (tabulka 3).

Tabulka 1 - GCS pro nemocné starší 4 let

otevření očí	spontánní	4
	na oslovení	3
	ba bolest	2
verbální odpověď	neotevře	1
	orientovaná	5
	zmatená	4
	nepřiměřená	3
	nesrozumitelná	2
motorická odpověď	žádná	1
	vyhoví	6
	lokalizuje bolest	5
	odtáhne se	4
	flexe	3
	extenze	2
	žádná	1

Maximální GCS je 15, minimální hodnota jsou 3

Tabulka 2 - Modifikace verbální odpovědi GCS pro nemocné mladší 4 let

směje se, otáčí se za zvukem	5
utišitelný pláč nebo neadekvátní interakce	4
nekonstantně utišitelný pláč nebo sténání	3
neutišitelný pláč nebo neklid	2
žádná reakce	1

Tabulka 3 - GOS - Glasgow Outcome Scale

dobrá úzdava, minimální deficit	5
schopen vykonávat activity běžného života, schopen pracovat v chráněných podmínkách	4
nutnost pomoci v běžných denních aktivitách, závislý	3
vegetativní stav	2
smrt	1

Protokol monitorování pacienta

Mechanismus úrazu

GCS bezprostředně po úrazu, tj. ze záznamů záchranné služby nebo při příjmu

Neurologický status po úrazu – ze záznamů záchranné služby, od rodičů

Neurologický status při přijetí – pokud došlo ke změně

Nález na CT

NCH intervence – typ intervence

Sérové hladiny proteinu S100B odebírané vždy bezprostředně po přijetí na lůžko, tj. nultá hodina a dále 6., 12., 24., 36., 48. a 72. hodinu. K hodnocení byla odebírána srážlivá krev. Měření bylo provedeno metodou elektrochemiluminiscenčního imunostanovení ECLIA na přístroji Elecsys 2010 firmy Roche.

Grafy s naměřenými hodnotami při jednotlivých odběrech u všech dětí jsou k dispozici v dizertační práci.

Sendvičový princip testu:

Celková doba stanovení je 18 minut.

- 1. inkubace: 20 µl vzorku, biotinylovaná monoklonální protilátka proti S100 a monoklonální protilátka proti S100, značená rutheniovým komplexem a reagují za tvorby sendvičového komplexu.
- 2. inkubace: Po přidání mikročástic, potažených streptavidinem, se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem.

- Reakční směs je nasáta do měřící komůrky, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou odstraněny roztokem ProCell. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem.
- Výsledky jsou vyhodnoceny z kalibrační křivky, která je specificky vytvořena pro přístroj 2-bodovou kalibrací a master křivky, dodávané v čárovém kódu reagentie. GOS bylo hodnoceno 3 měsíce po úrazu.

6.2 Materiál

Soubor pacientů: Soubor představovalo celkem 39 nemocných dětí s úrazem hlavy ve věku od 0 (novorozenci) do 17 let. Průměrný věk byl 8,94 roku. Poměr pohlaví M : F byl v našem sledovaném souboru byl 31 : 8, tzn. téměř 4x více chlapců. Převaha chlapců nad děvčaty při úrazech odpovídá i dlouhodobým statistickým údajům. Vstupní GCS bylo od 3 do 14, průměrná hodnota vstupního GCS byla 7,538. Průměrná hodnota GOS byla 4,17.

Zastoupení jednotlivých poranění

(někteří nemocní měli současně více poranění):

komoce mozková (CT nebylo provedeno)	10
kontuze mozkového parenchymu, verifikovaná dle CT	20
zlomenina baze lební –dle CT a klinických známek likvorey	8
lacerace mozkového parenchymu	
– verifikovaná dle CT a nebo zjištěné během revize rány	4
nitrolební krvácení verifikované dle CT	
– epidurální	2
– subdurální	2
– subarachnoidální	2
– intracerebrální	
– parenchymové bez provalení do komorového systému	2
– intracerebrální s provalením do komorového systému	0
jen komorové krvácení	1

Mechanismus úrazu

autonehoda – spolujezdec	14
chodec sražený autem	10
sportovní aktivity (lyže, kolo, bobová dráha)	8
doma (pád z výšky)	3
kousnutí psem doma	2
škola (pád)	2

Typ neurochirurgické intervence

implantace čidla ICP	26x
Hemedex	2x
zevní komorová drenáž (EVD)	1x
kraniotomie s ošetřením zdroje krvácení, revize přední jámy lební, event. plastika tvrdé pleny bez intervence	7x 11x

Pro měření nitrolebního tlaku bylo použito čidlo ICP bolt kit Codmann s fixačním šroubem. Návrť byl standardně prováděn frontálně vpravo nebo vlevo ve střední pupilární čáře 2-3 cm před koronárním švem. Volba strany záležela na stavu krania, pokud to bylo možné, zaváděli jsme čidlo ICP rutinně zprava. Děti do jednoho roku věku nemají obvykle dostatečnou tloušťku kosti, aby šlo použít fixační šroub, proto u dětí do 1 roku věku jsme provedli návrť buď do čelního hrbolu s následnou aplikací fixačního šroubu a zavedení čidla, nebo jsme použili ICP basic kit Codmann (bez šroubu) ze standardního návrť frontálně. Následně jsme čidlo kalibrovali na nulu proti atmosférickému tlaku. Kalibrace byla standardně prováděna při ponoření čidla do stříkačky o obsahu 2 ml.

K měření tkáňové perfuze bylo použito čidlo Hemedex Codmann, zavedeno vždy dorzálně od čidla ICP, rovněž z návrť. Zevní komorová drenáž byla prováděna z návrť pomocí ručního trepanu frontálně vpravo, 2 cm od střední čáry a 2 cm před koronárním švem. Komorový katétr jsme použili Bactiseal Codmann. Katétr je sycený antibiotikem pro zabránění pooperačním infekčním komplikacím. Kraniotomie byla prováděna vysokootáčkovým kraniotomem, standardně, s pomocí 1 až 4 trepanačních návrťů tak, aby nedošlo ke zkreslení hladin proteinu nešetným chirurgickým zákrokem. Kost nebyla ponechána na svalové stopce, byla zcela vyjmuta. Plastiku tvrdé pleny jsme prováděli buď vlastním periostem nebo svailem, nebo jsme použili komerčně vyráběné náhražky tvrdé pleny. Nebyla nalezena studie, že by komerčně vyráběné náhražky tvrdé pleny měly vliv na hladinu proteinu S100B v séru, CSF nebo moči. Kostní ploténka, pokud byla vracena, byla fixována silonovými kostními stehy. V případě přední jámy lební byly použity dlahy Synthes, Bioplate.

7 Statistické zpracování závislosti mezi hladinou S100B proteinu a GSC a GOS

Statistickým zpracováním jsme se snažili ověřit, zda existuje závislost mezi vstupní hladinou proteinu S100B a GCS, GOS, dále závislost rychlosti poklesu hladiny proteinu S100b a GCS, GOS. Simple statistics ukazuje

průměrné hodnoty hladiny proteinu S100B v danou hodinu u celého souboru (-0-hod až -72-hod). V dalších řádcích ukazuje o kolik klesla hladina proteinu S100B vždy mezi dvěma měřeními odběry (cortdif6-0 až cortdif72-48). Na dalších dvou řádcích jsou průměrné hodnoty GCS, GOS a jejich absolutní a relativní změny (gdifabs, gdifrel). Pro zjištění závislosti byl použit Pearsonův korelační koeficient, který je mírou lineárních vazeb mezi dvojicí proměnných (je ovlivněn odlehlými hodnotami). První část tabulky ukazuje vztah hladiny proteinu S100B v určitou hodinu k GCS, GOS. v další části tabulky jsou provedeny výpočty, jak statisticky významný je pokles hladiny proteinu S100B vždy mezi dvěma odběry, to vše vztaženo k GCS a GOS. Z tohoto měření je vidět, že statisticky signifikantní (na 5% hladině významnosti) je vztah hladiny proteinu S100B odebraný nultou hodinou a vstupního GCS. Tedy, tíže vstupního postižení koreluje s vyšší hodnotou S100B. Z měření zároveň vyplývá, že není statisticky významná korelace mezi vstupní hladinou proteinu S100B a GOS, tedy tím, v jakém stavu byl nemocný propuštěn. Významná je korelace mezi hladinou proteinu S100B 72.hodinu s GOS. Na 5% hladině významnosti je rovněž korelace poklesu hladiny proteinu z 0. hodiny na 6. hodinu vzhledem ke GCS a poklesu hladiny proteinu z 0. na 72. hodinu vzhledem ke GCS. Zajímavá je i statisticky významná korelace poklesu hladiny od 24. do 72. hodiny ke GCS i GOS. To znamená, že samotná absolutní hodnota hladiny proteinu S100B nemá na výsledný GOS nemocného takový vliv, jako rychlost poklesu této hladiny, a to zejména od 24. hodiny. Ke GCS má statistický významnou vazbu pokles mezi 0 hodinou a všemi ostatními. Zkoumáním závislosti kvalitativních znaků Spearmanovým korelačním koeficientem vychází ve zkoumaných parametrech větší statisticky významná korelace rychlosti poklesu hladiny proteinu S100B s GOS na 5% hladině významnosti. Spearmanův korelační koeficient je to neparametrický test měření statistické závislosti mezi dvěma proměnnými veličinami. Je nezávislý na odlehlých hodnotách. Spearmanův korelační koeficient je použit, protože jak GCS tak GOS jsou diskrétní škály s uspořádáním. Výpočty jsou doplněny neparametrický koeficientem Kendall Tau b, který ukazuje, zda 2 měřené kvality jsou na sobě statisticky závislé, umožňuje další oslabení předpokladu uspořádání. Poslední použitá metoda pro měření závislosti mezi hladinou proteinu v jednotlivých časech a GCS a GOS je Fisherova logaritmická transformace. Její použití před výpočtem korelačního koeficientu je z důvodů evidentního porušení předpokladu normality rozdělení jak u měřených hladin proteinu, tak u obou škál. Z Fisherovy transformace Pearsonovy korelační statistiky opět vyplývá, že GCS je silně korelováno na 5% hladině významnosti s hladinou proteinu S100B 0. hodinu. Korelace této hladiny s GOS je na 5% hladině nevýznamná. podobně jako i u ostatních korelačních koeficientů, je i po provedení Fisherovy transformace statisticky významná korelace GOS

a poklesu hladiny proteinu S100B z 24.hodiny na 72. hodinu a ze 48. na 72. hodinu. Statistické výpočty a tabulky jsou v plném rozsahu dány jako příloha dizertační práce.

8 Diskuze

Existují různé studie, které se zabývaly stanovením hladin proteinu S100B u dospělých i dětí. Protože je k dispozici celá řada metod, lze tyto výsledky jen těžko porovnávat. Ke stanovení hladiny proteinu S100B se užívá chemiluminescence immunoassay, elektrochemiluminiscence, imunoradiometrická assay, ELISA, imunofluorimetrická assay. Studie zkoumaly hladinu S100B z séra, moku, moči, ale i MR spektroskopii (6,4,18,32). Naměřené hodnoty S100 ve vzorcích pacientů se mohou lišit v závislosti na použitém postupu stanovení. Na laboratorním nálezu musí být proto vždy uveden údaj, kterým testem bylo S100 stanoveno. Hodnoty S100, stanovené ve vzorku pacienta rozdílnými testy, nemohou být přímo mezi sebou porovnávány a mohly by způsobit chybnou medicínskou interpretaci. Jestliže dojde k změně v proceduře testu, kterým je stanoveno S100 používané k monitorování léčby, je nutné provést před změnou vzájemné porovnání výsledků obou testů. Další problém v jednoznačném vyjádření se k užitečnosti tohoto a jiných CNS biomarkerů u dětí je ten, že není stanovena normální hladina, jako u dospělých. U zdravých dospělých mezi 18 – 65 lety věku je medián sérové koncentrace proteinu S100B 0,052 μg , rozmezí od 0,023 do 0,097 μg a není rozdíl podle věku ani pohlaví. Doporučovaný cutoff pro zvýšenou hladinu S100B u dospělých je od 0,2 do 0,5 $\mu\text{g/l}$ (3). Vyšší práh by byl méně senzitivní, ale více specifický.

Stanovení normální hladiny u dětí je obtížné. Závisí na věku, přítomnosti traumat a některých onemocnění a záleží i na použité metodě detekce. Spinela et al. (33) zjistil na souboru 136 zdravých dětí, že medián hodnoty proteinu S100B v séru je 0,3 μg . Tuto hodnotu koreloval s věkem. Portella et al. (29) došel k přibližně stejnému mediánu. Berger et al. (6) zjistil na svém souboru pacientů medián 0,016 ng/ml (metoda ELISA). Castellani et al. (11) na souboru 394 dětí přijatých k elektivnímu chirurgickému výkonu, ne operaci CNS, měl horní hranici normy 0,16 $\mu\text{g/l}$ (metodou elektrochemiluminescence, Roche). V této studii chybí věková skupina do 3 let pro malý počet těchto nemocných. Asi největší studii provedl Gassolo et al. (13) na souboru 1004 zdravých dětí ve věku od 1 měsíce do 15 let. Jejich studie ukázala na rozdíly hodnot v závislosti na věku a pohlaví. Dívky měly signifikantně vyšší normohladiny proteinu S100B než chlapci. Nejvyšší hodnoty byly nalezeny u dětí v prvním roce života, druhé zvýšení bylo mezi 7 a 13 rokem věku a pak klesá.

Autoři Gassolo et al.(13) předpokládají, že vysoká hladina v prvním roce života je dána vývojem a dozráváním CNS, spolu s rozdílnou permeabilitou hematoencefalické bariéry. Vzestup mezi 7. a 13. rokem života přičítají neurotrofní úloze proteinu při akceleraci vývoje a růstu v této věkové skupině. Medián pro první rok života je podle této studie 0,81 -0,9 µg/l (M-F), pro věkovou skupinu 6 letých je medián 0,6 – 0,86 µg/l. Užitá metoda byla Sangtec Medical immunoluminometric assay. Hladina proteinu S100B v séru je vyšší rovněž u nemocných s poraněním jiných částí těla nebo orgánů. Proto u nemocných s lehkým poraněním mozku, zlomeninami dlouhých kostí nebo zhmožděním tukové tkáně je signifikantně vyšší hladina proteinu S100B (1, 2, 15, 31). Další úskalí použití hladiny proteinu S100B v hodnocení tíže poranění CNS je jeho extracerebrální produkce u nemocných s neurologickým onemocněním, předčasně narozených dětí, posthypoxických stavů, encefalopatií, Downovým syndromem, polytrauma, fraktury dlouhých kostí, kontuze hrudníku a u mnoha dalších onemocnění (26,24,25). Výsledek ovlivňuje také načasování odběru krve k vyšetření hladiny markeru. Pokud je doba mezi úrazem a odběrem krve k vyšetření dlouhá, dojde ke zkreslení výsledku vlivem krátkého poločasu proteinu S100B.(15,31)

Souvislost mezi hladinou S100B proteinu a tíží úrazu dle CT a neurolog. vyšetření a GCS byla již dostatečně prokázána u dospělých nemocných. U dětí je toto téma stále předmětem diskuzí. Podle studií Gejera (23) et al, Akhara (1) et al a Bergera (5) et al se ukazuje nízká specificita proteinu S100B k detekci nitrolebních patologií v souvislosti s úrazem. Castellani et al (12) zjistil vysokou senzitivitu pro detekci dětí s podezřením na lehké trauma CNS, které nemají nitrolební patologii v souvislosti s úrazem Jeho pozorování by v praxi mohlo zabránit provádění zbytečných CT vyšetření.

Touto prací jsem chtěla dát odpověď na otázku, zda má u dětské populace sledování tohoto proteinu význam. Díky velkému rozptylu hodnot sérové hladiny proteinu S100B u dětí v závislosti na věku a pohlaví není u této skupiny nemocných korelace mezi vstupní hladinou proteinu a GOS. Podle našich výsledků je podstatná rychlost poklesu hladiny proteinu S100B k normě, než její absolutní hodnota. Z grafů vyplývá závislost rychlosti poklesu hladin proteinu k normě na výsledném GOS. Děti s návratem hladiny proteinu k normě do 6 hodin po úraze, resp. přijetí na JIRP, měly všechny GOS 5. Děti, u nichž došlo k poklesu hladiny proteinu k normě po 72. hodinách, měly GOS 2 a 3.

Spinella et al.(33) sledoval hladiny proteinu u 27 dětí s TBI. Z tohoto počtu bylo 6 úmrtí. Tsz-Yan M. Lo et al (23) rozdělili soubor 28 dětí s TBI na ty s dobrým výsledkem – GOS 4-5 a ty se špatným výsledkem GOS 1-3. O úmrtí se jednoznačně nevyjadřuje, ale ve skupině GOS 1-3 byli 4 nemocní.

Náš soubor čítal 39 dětí ve věku 0 – 17 let. Výborný výsledek (GOS 4-5) byl u 33 zraněných již při překladu na neurologické oddělení z naší JIRP. Nebylo žádné úmrtí a ve skupině se špatným výsledkem (GOS 2-3) bylo 3 měsíce po úrazu 6 dětí. Druhé hodnocení GOS proběhlo po 6 měsících, kdy ve skupině GOS 4-5 bylo 36 dětí a ve skupině GOS 2-3 pouze 3 děti.

V našem souboru pacientů jsme prokázali na 5% hladině významnosti statisticky signifikantní závislost sérové hladiny proteinu S100B odebrané nultou hodinu a vstupního GCS. Protein S100B je vysoce specifický pro astroglia a do séra se uvolní jen při porušení hematoencefalické bariéry. Tento výsledek znamená, že vysoká vstupní poúrazová hladina proteinu S100B ukazuje na poškození úrazové poranění mozkové tkáně. Tedy, tíže vstupního postižení koreluje s vyšší hodnotou S100B. Podle studie Bloomfielda et al(7), je S100B vysoce senzitivní pro TBI a může spolehlivě predikovat poranění mozku u dospělých pacientů. Na druhou stranu si uvědomuje možnost zkeslení výsledku pro možnost zvýšené hladiny proteinu i při extracerebrálním poranění. Proto doporučuje porovnávání více markerů současně, v jeho případě GFAP a NSE s proteinem S100B.

Naše výsledky nepotvrzují práce Geyera et al (15), Akhara et al (1) a Bergera et al (5) , kteří na souborech dětských nemocných zjistili naopak nízkou senzitivitu proteinu S100B pro TBI. Tento rozpor si vysvětlujeme tak, že v našem souboru byly jak děti s MTBI, tak i těžkým kraniocerebrálním poraněním, kdežto výše uvedení autoři měli studie s dětmi pouze s MTBI, tedy GCS 13-15.

Naše výsledky potvrzují pozorování Castellaniho et al (12), že normální hladina proteinu S100B znamená normální nález na zobrazovacích vyšetřeních. Všichni naši nemocní s MTBI, kteří měli normální vstupní hladinu proteinu S100B měli také normální nález na CT.

Z našich měření zároveň vyplývá, že není statisticky významná korelace mezi vstupní hladinou proteinu S100B a GOS, tedy tím, v jakém stavu byl nemocný propuštěn. Vos et al (36) na souboru 79 dospělých nemocných s TBI dospěl k závěru, že u zemřelých nemocných byla 2,1 krát vyšší vstupní hladina proteinu S100B při cut off 1,13 µg/l. Podle jeho pozorování je protein S100B nejsilnější prediktor nepříznivého výsledku se 100% diskriminací.

V našem souboru 39 poraněných dětí nikdo nezemřel a nepříznivý výsledek byl zaznamenán u 6 dětí 3 měsíce po úrazu. Půl roku po úrazu byly v této skupině už jen 3 děti. Zbylé 3 děti se dostaly do skupiny GOS 4-5. Z našich výsledků vyplývá statisticky významná závislost mezi hladinou proteinu S100B odebranou 72. hodinu po úrazu a GOS. To znamená, že dlouhodobě přetrvávající vysoká hladina proteinu S100B predikuje výsledek léčby. Toto naše zjištění koresponduje s prací Bloomfielda et al (7), který považuje protein S100B za užitečný marker sledování účinnosti a efektivity léčby a predikuje sekundární poranění CNS.

Statisticky významná, podle našich zjištění, je závislost velikosti rozdílu hladin proteinu S100B mezi nultou a šestou hodinou s GCS. Tedy, jak rychle klesala hladina proteinu S100B od úrazu do 6. hodiny. Nemocní s pozvolným poklesem hladiny S100B byli ti s jednoznačně horším GCS. Podle našich výsledků je zajímavý vztah poklesu hladiny proteinu S100B mezi 24. a 72. hodinou vzhledem k tíži vstupního poranění i výsledného klinického stavu 3 měsíce po úrazu. To znamená, že samotná absolutní hodnota hladiny proteinu S100B nemá na výsledný GOS nemocného takový vliv, jako rychlost poklesu této hladiny, a to zejména od 24. hodiny. Podle statistického zpracování výsledků našich pacientů je zřejmé, že pomalý pokles hladiny proteinu S100B nebo jeho elevace během léčby je prediktivním faktorem pro rozvoj sekundárního poranění CNS.

Z našich výsledků vyplývá, že zvýšená hodnota hladiny proteinu S100B nemá význam na indikaci vstupního CT vyšetření. Indikace k vstupnímu CT je dána již klinickým stavem pacienta a mechanismem a okolnostmi úrazu. Určitý význam má elevace hladiny proteinu u plně monitorovaného pacienta v průběhu hospitalizace. Zde může být indikací ke kontrolnímu CT vyšetření. Naproti tomu Castellani et al (12) ve své prospektivní studii na souboru 109 dětí s lehkým poraněním mozku zjistil závislost hladiny proteinu S100B a nulového nálezu na CT. U dětí s GCS 13 – 15 a klinickými známkami lehkého poranění mozku odebral krev do 6 hodin po úrazu. Během hospitalizace u nich bylo provedeno CT CNS. Castellani touto studií našel statisticky významnou závislost mezi sérovou hladinou proteinu S100B a těmi nemocnými, kteří měli patologický nález na CT a těmi, kteří měli CT s normálním nálezem. Všechny děti s normální hodnotou proteinu S100B v séru měli i negativní nález na CT. Podle této studie tedy nízká, respektive normální hodnota proteinu S100B indikuje neprovádět u takového pacienta vstupní CT vyšetření.

Jaké je praktické využití proteinu S100B v klinické praxi? Přetrvávající zvýšená hladina proteinu může být důležitá pro rozhodování o akceleraci terapie ve smyslu invazivní monitoraci pacienta nebo usnadní rozhodování o eventuální tracheostomii u ventilovaných nemocných. Z uvedeného vyplývá, že největší úlohu v úzdavě nemocného dítěte s TBI hraje zkušený dětský neurointenzivista a včasné indikovaná NCH intervence, která je provedena s maximální možnou šetrností s ohledem na vyvíjející se dětský mozek. Pro větší ilustraci jsou nyní uvedeny dvě kazuistiky nemocných dětí s traumatem mozku, hospitalizovaných na naší JIRP.

Kasuistika 1

3 měsíční kojeneček po pádu z výšky 1 metru na podlahu byl po úrazu při vědomí, plakal. Rodiče se rozhodli nenavštívit zdravotnické zařízení, dítě observovali doma. Po 5 hodinách po úrazu byl neprobuditelný. Odjeli v místě bydliště (mimo Prahu) na dětské oddělení. Odtud byl pak

transportován RZP na naši JIRP. Při přijetí měl GCS 3, oboustrannou mydriasiu. Bylo provedeno vstupní CT CNS s nálezem rozsáhlého intracerebrálního hematomu v kontuzně změněné mozkové tkáni o průměru 60 mm, tlak střední čáry o 20 mm. Byl ihned indikován k revizi a odsátí hematomu a kontuzně změněné mozkové tkáně. Vzhledem k rozsahu krvácení jsme se domnívali, že se jedná o krvácení např. z kavernomu nebo AVM, akcentované úrazem CNS. Histologické vyšetření potvrdilo, že se jedná pouze o prokrvácenou, kontuzně změněnou mozkovou tkáň, cévní malformace nebyla ve vzorcích nalezena. Vstupní hladina proteinu S100B byla 0,457 µg/l, po operaci, tedy 6. hodinu po přijetí, byla hladina proteinu 0,603 µg/l. V dalším odběru hladina proteinu S100B nadále stoupala, překročili jsme tedy ke kontrolnímu CT, které ukázalo povšechný edém CNS. Byla provedena dekompresivní kraniektomie, zavedena trachostomie s předpokladem nutnosti dlouhodobé ventilace. V posledním odběru proteinu S100B, tedy 72. hodinu po přijetí, byla hladina 1,63 µg/l, tedy třikrát vyšší, než vstupní hodnota. Po 3 týdnech hospitalizace, z toho 2 týdny na UPV, bylo GOS 2 a nyní po 5 letech je GOS stále 2. Neuspokojivý výsledek byl dán 1. rozsahem devastace mozkové tkáně kontuzí a krvácením a 2. časovou prodlevou, než byla dítěti poskytnuta adekvátní léčba. Prodleva byla způsobena vyčkáváním rodičů, kteří nechápali závažnost poranění a zbytečně odkládali návštěvu lékaře. Další důvod neuspokojivého výsledku může být ten, že u dětí do 4 let věku je prokazatelně větší zánětlivá odpověď organismu na trauma (vysoká hladina zánětlivých markerů v mozkomíšním moku) a signifikantně vyšší morbidita i mortalita po poranění CNS.

Kasuistika 2

16 letý nemocný byl převezen na naši JIRP po autonehodě (chodec). Na místě byl zaintubován RZP, tedy jako vstupní GCS jsme brali hodnotu 3, jiný údaj nebyl k dispozici. Po přijetí na naše oddělení jsme provedli CT CNS s nálezem frontobasálního poranění – kontuze mozkové tkáně, pneumocefalus, tedy i lacerace pleny. Vstupní hodnota proteinu S100B byla 0,507 µg/l. Na základě CT vyšetření byla indikována revize přední jámy lebni s odkladem 48 hodin po stabilizaci stavu. Ihned po CT vyšetření jsme zavedli čidlo na měření nitrolebního tlaku. Pro přetrvávání vysoké hladiny proteinu S100B i v následujících 3 odběrech bylo indikováno kontrolní CT s odstupem 12 hodin od úrazu. ICP byl kolísavý, ale dobře reagoval na konzervativní terapii. Na kontrolním CT byla progresivní velikosti kontuze, mírně stlačené frontální rohy obou postranních komor a přibýlo pneumocefalu. Rozhodli jsme se tedy pro časnější revizi s masivní antiedematózní terapií. Po revizi lacerované mozkové tkáně a ošetření drobných zdrojů krvácení byla provedena plastika tvrdé pleny. Protože se mozková tkáň nechovala expanzivně, byla navracena i kostní ploténka. V dalším vývoji pak došlo k poklesu hladiny proteinu S100B, chlapec se

dobře uzdravoval a 14. den byl přeložen na oddělení dětské neurologie Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou k rehabilitaci. GOS při překladu na neurologii bylo 3, nyní 3 roky po úrazu je GOS 4, Karnofského škála 80. V tomto případě, kdy došlo k evidentní progresi nálezů na CT ještě bez patrné odezvy v hodnotě ICP, mělo přetrvávání vyšší hladiny proteinu S100B přínos pro gradaci léčebného postupu - urychlení operační revize přední jámy lební, což zabránilo rozvoji sekundárního poranění mozku, ke kterému by mohlo dojít po vyčerpání compliance intrakraniálního prostoru.

9 Závěr

Hodnocení vztahu sérové hladiny proteinu S100B a GCS po primárním poranění CNS:

- Vstupní hladina proteinu S100B koreluje s tíží poranění CNS.
- Normální hladina proteinu S100B znamená negativní CT ve smyslu úrazových změn.
- Rychlost poklesu hladiny proteinu S100B mezi nulou a 6. hodinou koreluje s tíží primárního poranění mozku (GCS)
- Vstupní hodnota proteinu S100B nekoreluje s GOS.
- Lze tedy říci, že vysoká vstupní hladina proteinu S100B znamená poranění CNS, ale nemá prediktivní význam na úzdravu nemocného, tedy GOS.

Hodnocení vztahu sérové hladiny proteinu S100B k predikci rozvoje sekundárního poranění mozku:

Rychlost poklesu hladiny proteinu S100B měřené 24. a 72 . hodinu koreluje s GOS. Podle statistického zpracování výsledků našich pacientů je zřejmé, že pomalý pokles hladiny proteinu S100B nebo jeho elevace během léčby je prediktivním faktorem pro rozvoj sekundárního poranění CNS.

Hodnocení vztahu sérové hladiny proteinu S100B k predikci mortality a morbidity u dětí s poraněním CNS:

V našem souboru 39 nemocných dětí nebylo zanaménáno žádné úmrtí. Dvě děti s GOS 2 mají velmi vážné následky poranění CNS, obě jsou nesoběstačné a do budoucna nelze předpokládat významné zlepšení. Obě tyto děti měly vysoké vstupní hladiny proteinu S100B. U prvního nemocného došlo k nárůstu hladiny proteinu S100B mezi jednotlivými měřeními až do 48. hodiny, pak došlo k poklesu mezi 48. a 72. hodinou, ale konečná hladina proteinu S100B byla třikrát vyšší, než vstupní hodnota hladiny proteinu S100B. Viz Kasuistika 1.

Hodnocení vztahu sérové hladiny proteinu S100B a Glasgow Outcome Scale:

Vysoká vstupní hladina proteinu S100B nekoreluje s výsledným GOS, ale důležitá je rychlost poklesu hladiny proteinu S100B k normálním hodnotám.

Praktické využití v klinické praxi:

Vyšší vstupní hladina proteinu S100B predikuje poranění mozkové tkáně dříve, než se toto poranění odrazí v klinickém obrazu pacienta a na zobrazovacích vyšetřeních. I přes dobrý klinický stav pacienta jsme tak nabádáni k ostražitosti, abychom nepodcenili tíži poranění. Nízká vstupní hladina proteinu S100 znamená negativní nález na CT. Přetrvávající zvýšená hladina proteinu S100B může být důležitá pro rozhodování o změně léčby - chirurgické revizi CNS, invazivní monitoraci pacienta nebo usnadní rozhodování o eventuální tracheostomii u ventilovaných nemocných. Rychlost poklesu hladiny proteinu S100B může sloužit ke kontrole efektivity a účinnosti léčby. Viz Kasuistika 2.

10 Summary

Introduction:

Cranio-cerebral injury is the leading cause of morbidity and mortality in children. This consideration creates a need for a specific biomarker which facilitates targeted treatment and provides a method of predicting outcomes. The S100B protein was first described in the central nervous system. High levels of S100B (S-100 B, beta-beta dimer) are found in central nervous tissue glial cells (primarily astrocytes) and in peripheral cells such as Schwann cells and adipocytes. However, only in glial cells do we find that the protein homodimer consists of alpha subunits. In 95% of healthy adults, S100B serum levels are lower than 0.1 µg/l (median 0.04). In adulthood, there are no age and gender differences in S100B levels; however, in children, S100B levels vary with age, which reflects its neurotrophic role. Destruction of nerve tissue and neurodegenerative disabilities results in elevated levels S100B protein in the CSF (cerebrospinal fluid) in response to its release from astrocytes. If the blood-brain barrier is also damaged, S100B can pass into the systemic circulation and elevated S100B levels can be detected in the blood. Elevated S100B serum concentrations have been associated with brain trauma, cerebral ischemia of any etiology, brain infection, and hypoxic damage to the CNS. In uncomplicated recoveries, S100B levels return to normal values within a week. High initial S100B serum levels shortly after injury, reflects cell damage and increased permeability of the blood-brain barrier (BBB). It is, therefore, an indicator of high-risk patients who are likely to develop secondary injuries to the CNS

(central nervous system). While absolute levels suggest high-risk patients, protein level fluctuations seem to be an indicator of severity of permanent damage to the CNS and permanent neuronal deficits. It is important to note that the extent of permanent damage does not correlate with the severity of injury.

Methods and material:

Patients with isolated trauma to the CNS, hospitalized in our ICU (intensive care unit) from 2004 – 2008 were included in our study. The age of affected children ranged from 0-17 years, with an average age of 8.94 years. The male:female ratio was 31:8. The average value of the GCS on admission was 7.538 and the average GOS was 4.17. Coagulable blood was drawn to determine S100B protein serum levels. The blood draw protocol was that the first sample was obtained immediately after admission to the bed ward (hour zero) and then at hour 6, 12, 24, 36, 48, and 72. Measurements were performed using the ECLIA immunoassay method and a Roche Elecsys 2010 apparatus. We also performed a GCS evaluation on admission or got the result from the emergency department, and we performed a GOS at the time of transfer to the pediatric neurology department. An additional GOS evaluation was performed 6 months after the injury. The average initial S100B protein level was 1.878 $\mu\text{g/l}$, with a maximum of 13.15 $\mu\text{g/l}$ and a minimum of 0.061 $\mu\text{g/l}$. The average S100B protein level at discharge was 0.222 $\mu\text{g/l}$, with a maximum of 2.01 $\mu\text{g/l}$ and a minimum of 0.012 $\mu\text{g/l}$. Inclusion criteria were: parental consent and an isolated traumatic brain injury. Exclusion criteria – no parental consent, patients with polytrauma, patients with a history of epileptic seizures during the 10 days prior to injury, children with Down syndrome, retarded development or any neurological disease. Patients with polytrauma were excluded because of the possibility of increased S100B serum levels due to S100B released from adipocytes, as well as issues described below. Down syndrome patients normally show elevated S100B levels, which was why they were excluded. Children with burns, fractures of long bones or chest wall contusions were also excluded from the group. Several studies have been published showing that bone marrow is a potential extracerebral source of S100B protein and S100B protein levels have also been shown to increase in response to burn injury. CT finding and neurosurgical interventions, if needed, were recorded for each patient. GOS was evaluated at the time of transfer to the department of pediatric neurology, which was generally 10-15 days after injury. The S100B protein cut-off value obtained when using the Elecsys Roche Diagnostics analytic system in adults is 0.105 $\mu\text{g/l}$. In children, S100B protein levels are higher and vary with age, additionally, girls have higher levels than boys. The median and range of S100B protein levels for 0-1 year of age is 0.95 $\mu\text{g/l}$ (median) and 0.44 – 2.55 $\mu\text{g/l}$, which is

significantly higher than the median and range for children aged 2-7 years (0.73 µg/l, 0.44 –1.06 µg/l, respectively). The highest individual concentrations of S100B protein were detected in children during their first year of life and between 9 and 10 years of age. From 16 years of age, S100B values approach those of adults. Physiological fluctuation of levels with age is due to one of the functions of the S100B protein, i.e. controlling maturation of the mammalian brain.

Results:

By means of statistical analysis, we attempted to test whether there was a relation between the S100B protein levels and GCS and GOS. We also looked for a potential relationship between the rate of S100B protein decrease, at a specific times, and GCS, and GOS. Simple statistics show the average levels of S100B protein at a given hour for the whole group. They also show by what amount the S100B level decreased between two measured blood samples. To determine the relationship, the Pearson's correlation coefficient was used, which is a measure of linear relationships between a paired variables (it is affected by outlying values). It showed a relationship between S100B levels, at a specific hour, and GCS and GOS; it also showed how statistically significant the decreases were in S100B protein levels, between two blood samples, all in relation to GCS and GOS.

This measurement shows that the relationship of S100B protein level taken at hour zero and GCS on admission was statistically significant (at the 5% level of significance). That is, the severity of initial impairment correlates with higher S100B levels. The measurement also indicates that there is no statistically significant correlation between the initial S100B protein level and GOS, i.e. the patient's condition at discharge. The correlation between S100B protein level at hour 72 and GOS was found to be significant. Also the correlation of protein level decrease from hour 0 to hour 6, in relation to GCS, as well as the protein level decrease from hour 0 to hour 72, in relation to GCS, was significance ($p = 0.05$). A statistically significant correlation of protein level decrease from hour 24 to hour 72, in relation to GCS and GOS, was also interesting. This means that the absolute value of the S100B protein level relative to the GOS of the patient was less meaningful compared to the rate of decrease of S100B levels, especially starting from hour 24. The decrease between hour 0 and all the other time-points also shows a statistically significant relation to the GCS.

Discussion:

There have been various studies investigating S100B levels in adults and children. Because of the various methods employed, the results are difficult to compare. S100B levels can be determined using chemiluminescence immunoassay, electro-chemiluminescence, immunoradiometric assay,

ELISA, and immunofluorometric assay. The studies examined the levels of S100B in the serum, CSF, urine, but also using MR spectroscopy. S100B values measured in patient samples can vary depending on the determination method used. Therefore, laboratory findings must always include information regarding which test was used for S100B determination. The S100B values determined from a patient's sample using different tests cannot be directly compared with each other and doing so could cause an incorrect medical interpretation. If the test procedure employed to determine S100B levels, and which serves for treatment monitoring, is changed, it is necessary to compare the results of both test options before the change is made. Another problem of affecting the usefulness of this and other CNS biomarkers in children is that, in contrast to adults, there is no established normal level. In healthy adults between 18-65 years of age, the median S100B serum concentration is 0.052 μg , ranging from 0.023 to 0.097 μg , with no age or gender differences. The recommended cutoff for S100B level elevation in adults ranges from 0.2 to 0.5 μg . The higher threshold would be less sensitive but more specific. Determination of normal levels in children is difficult. Spinela et al. determined, in a group of 136 healthy children, that the median serum level of S100B was 0.3 μg . This value correlated with age. Portella et al. arrived at approximately the same median. Berger et al. (2007) determined in their patient cohort a median of 0.016 ng/ml (ELISA method). On a set of 394 children admitted for elective surgery (extracerebral surgery), Castellani et al. (2008) found an upper normal limit of 0.16 $\mu\text{g/l}$ (electro-chemiluminescence method, Roche). In this study, age ≤ 3 years was missing because of a small number of patients. The largest study was probably the one conducted by Gassolo et al. (2003) on a set of 1004 healthy children aged 1 month to 15 years. Their study showed age and gender differences and normal levels of S100B were significantly higher in girls than in boys. The highest values were found in children in the first year of life, another increase was observed between the ages of 7 and 13 years and from 13 years on the values decreased. The authors assume that the high level observed during the first year of life was due to CNS development and maturation together with different permeability characteristics relative to the blood-brain barrier. The increase between 7 and 13 years of age can be attributed to the neurotrophic role of the protein in the acceleration of development and growth in this age group. The median for the first year of life, according to this study, was 0.81 – 0.9 $\mu\text{g/l}$ (M-F); for a group of 6 year olds, the median was 0.6 – 0.86 $\mu\text{g/l}$. The method used was Sangtec Medical immunoluminometric assay. A final caveat regarding the use of S100B levels in the evaluation of CNS injury severity is its extracerebral production in patients with neurological disease, premature babies, post-hypoxic conditions, encephalopathy, Down syndrome, multiple trauma, fractures of long bones, chest contusion and many other diseases and conditions.

Conclusions:

The relationship between S100B protein levels and the severity of injury and GCS has already been thoroughly documented. The objective of this study was to answer the question whether monitoring S100B in the pediatric population would have any clinical value. Due to great variability (age and gender) of S100B protein serum levels in children, we were unable to find a correlation between initial protein levels and GOS in our study group. Our results indicate that the speed with which S100B protein level decrease toward normal values is more meaningful than absolute S100B values. Children in whom protein levels returned to normal within 6 hours after injury all achieved a GOS score of 5. Children in whom protein levels decreased to normal after hour 72 achieved GOS scores of 2 or 3. Spinella et al. monitored S100B levels in 27 children with TBI (traumatic brain injury). 6 of these children died. Lo et al. divided a group of 28 children with TBI into those with a good GOS scores (4 or 5) and those with a poor GOS scores (1, 2 or 3). Deaths are not clearly mentioned, however, the poor GOS group consisted of 4 patients. Our sample included 39 children aged 0-17 years. Excellent GOS (4 or 5) had been achieved in 33 patients by the time of transfer to the neurological department of our ICU. There were no deaths and only 6 children were in the poor GOS group (2 or 3). At the second GOS evaluation, which took place after 6 months, there were 36 patients in the excellent GOS group and only 3 children in the poor GOS group. Our results and comparison with other works show that elevated S100B levels are not an indication for a CT scan on admission. The exact clinical condition of the patient and the mechanism and circumstances of the injury represent the best indication for a CT examination on admission. However, the elevation of S100B levels has certain significance in a fully monitored patient during hospitalization. In this case, it may be an indication for a follow-up CT scan. What is the therapeutic significance of elevated S100B levels? Persistent elevated S100B levels may be important for decision-making regarding invasive monitoring of the patient or may facilitate the decision about an eventual tracheostomy in ventilated patients. These facts indicate that an experienced pediatric intensive care physician and a timely neurosurgical intervention performed with the maximum possible gentleness with regard to the child's developing brain play the crucial role in the recovery of child with a TBI.

11 Seznam literatury

1. Akhtar JI, Spear RM, Senac MO, Peterson BM, Diaz SM:
Detection of traumatic brain injury with magnetic resonance
imaging and S-100B protein in children, despite normal computed
tomography of the brain. *Pediatr Crit Care Med* 4:322–326, 2003

2. Anderson RE, Hansson LO, Nilsson O, Dijlai-Merzoug R, Settergren G: High serum S100B levels for trauma patients without head injuries. *Neurosurgery* 48:1255–1260, 2001
3. Berger RP The use of serum biomarkers to predict outcome after traumatic brain injury in adults and children *J Head Trauma Rehabil* 2006, 21(4):315-333
4. Berger RP, Kochanek PM, Urinary S100B concentrations are increased after brain injury in children: a preliminary study.2006 *Pediatr Crit Care Med* 7(6):557-561
5. Berger RP, Adelson PD, Pierce MC, Dulani T, Cassidy LD, Kochanek PM: Serum neuron-specific enolase, S100B, and myelin basic protein concentrations after inflicted and noninflicted traumatic brain injury in children. *J Neurosurg* 103:(1 Suppl) 61–68, 2005
6. Berger RP, Beers SR, Richichi R, Wiesman D, Adelson PD. Serum biomarker concentration and outcomes after pediatric traumatic brain injury. 2007 *J Neurotrauma* 24(12):1793-1801
7. Bloomfield SM, McKinney J, Smith L, Brisman J. Reliability of S100B in predicting severity of central nervous system injury. *Neurocrit Care*. 2007;6(2):121-38.
8. Brichtová E.: Kraniocerebrální poranění v dětském věku, Triton, Praha, 2008
9. Brichtová E., Kozák L., Apolipoprotein E genotype and traumatic brain injury in children - Association with neurological outcome, *Child's Nervous System*, 2008, 24: p. 349- 356 DOI 10.1007/s00381-007-0459-6
10. Busl K.M, Greer D.M. Hypoxic-ischemic brain injury: pathophysiology, neuropathology and mechanisms. *NeuroRehabilitation* 2010 Jan;26(1):5-13. Review.
11. Castellani C, Stojakovic T, Cichocki M, Scharnagl H, Erwa W, Gutmann A, Weinberg AM (2008) Reference ranges for neuroprotein S100B: from infants to adolescents. *Clin Chem Lab Med* 46(9):1296-1299
12. Castellani C, Bimbashi P, Rutenstock E, Sacherer P, Stojakovic T, Weinberg AM: Neuroprotein S-100B—a useful parameter in paediatric patients with mild traumatic brain injury?. *Acta Paediatr* 98:1607–1612, 2009
13. Gazzolo D, Fabrizio M, Bruschetini M, Marchese N, Lituania M, Mangraviti S, Pedrazzi E, Bruschetini P. Pediatric Concentrations of S100B Protein in Blood: Age- and Sex-related Changes. *Clinical Chemistry* 49, No. 6, 2003
14. Gennarelli TA. Mechanisms of brain injury *J Emerg Med* 1993; 11(Suppl 1): 5-11

15. Geyer C, Ulrich A, Gräfe G, Stach B, Till H: Diagnostic value of S100B and neuron-specific enolase in mild pediatric traumatic brain injury. Clinical article. *J Neurosurg Pediatr* 4:339–344, 2009
16. Grivna, M.; Celko, A. M.; Benešová, V. Perspektiva v prevenci dětských úrazů České republice. *Ceskoslovenská Pediatrie*, 2006, roč. 61, c. 6, s. 374-378
17. Claus W. Heizmann, Günter Fritz, Beat W. Schäfer. S100 proteins:structure,Functions and pathology, *Frontiers in Bioscience* 7,d1356-1368, May 1,2001)
18. Kleindienst A, Toliaş CM, Corwin FD, Muller C, Marmarou A, Fatouros P, Bullock MR 2005 Assessment of cerebral S100B levels by proton magnetic resonance spectroscopy after lateral fluid-percussion injury in the rat. *J Neurosurg* 102(6):1115-1121
19. Kochanek PM, Robert S.B. Clark, Randall A.R, Andelson PD, Bell MJ, Whalen MJ, Robertson CL, Satchell MA, Seidberg NA, Marion DW, Jenkins LW. Biochemical, cellular, and molecular mechanisms in the evolution of secondary damage after severe traumatic brain injury in infants and children: Lessons learned from the bedside. *Crit Care Med* 2000 vol 1, No 1, 4- 16
20. Langlois JA, Rutland-Brown W, Thomas KE. Traumatic brain injury in the United States. In: CDC, ed. *National Center for Injury Prevention and Control*, 2006
21. LaPlaca MC, Prado GR, Cullen D, Simon CM. Plasma membrane damage as a marker of neuronal injury. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2009;2009:1113-6.
22. Lindberg L,Olsson AK, Anderson K, et al: Serum S100 protein levels after pediatric cardiac operations: A possible new marker for postperfusion cerebral injury *J Thorac Cardiovasc Surg*1998; 116:281-285
23. Lo TY, Jones PA, Minns RA: Pediatric brain trauma outcome prediction using paired serum levels of inflammatory mediators and brain – specific proteins(2009) *J Neurotrauma* 26: 1479-1487
24. Maschmann J, Erb MA, Heinemann MK, et al : Evaluation of protein S-100 serum concentration in healthy newborn and seven newborns with perinatal acidosis. *Acta Pediatr* 2000; 89:533-535
25. Nagdyman N, Komen W, Ko H et al: Early biochemical indicators of hypoxic-ischemic encephalopathy after birth asphyxia. *Pediatr Res* 2001; 49:502-506
26. Nigaard O, Langbakk B, Romner B: Age and sex related changes of S-100B protein concentrations in cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurological disorder. *Clin Chem* 1997;43: 541-543

27. Nortje J, Menon D.K. Traumatic brain injury: physiology, mechanisms and outcome. *Opin Neurol* 2004 Dec;17(6):711-8
28. Pohl D, Ishmaru MJ, Bittigau P, Stadhaus D, Hubner C, Olney JW, Turski L, Ikonomidou C. NMDA antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1999;96:2508–2513.
29. Portela V C, Tort ABL, Schaf DV, Ribeiro L, Nora DB, Wulz R, et al., The serum S100B concentration is age dependent. *Clin Chem* 2002;48:950-952
30. Routsis C, Stamataki E, Nanas S, Psachoulia C, Stathopoulos A, Koroneos A, Zervou M, Jullien G, Roussos C. Increased levels of serum S100B protein in critically ill patients without brain injury. *2006 Shock* 26(1):20-24
31. Ruppel RA, Kochanek PM, Adelson PD et al: Endothelin -1 is increased in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in children. *Crit Care Med* 1999;27:A76
32. Shore PM, Berger RP, Varma S, Janesco KL, Wisniewski SR, Clark RS, Adelson PD, Thomas NJ, Lai YC, Bayir H, Kochanek PM (2007) Cerebrospinal fluid biomarkers versus glasgow coma scale and glasgow outcome scale in pediatric traumatic brain injury: the role of young age and inflicted injury. *J Neurotrauma* 24(1):75-86
33. Spinella PC, Dominguez T, Drott HR, Huh J, McCormick L, Rajendra A, Argon J, McIntosh Tracy, Helfaer M. S-100 β protein-serum levels in healthy children and its association with outcome in pediatric traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2003 Vol.31, No 3 939 – 945
34. Thornhill S, Taesdale GM, Murray GD, et al. Disability in young people and adults one year after head injury: prospective cohort study. *BMJ* 2000; 320:1631-5)
35. W J Townsend, M J Guy, M A Pani, B Martin, D W Yates. Head injury outcome prediction in the emergency department: a role for protein S-100B?, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 73:542-546
36. Vos PE, Jacobs B, Andriessen TM, Lamers KJ, Borm GF, Beems T, Edwards M, Rosmalen CF, Vissers JL. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology* 2010;75:1786-93

