

**UNIVERZITA KARLOVA**

**2. lékařská fakulta**

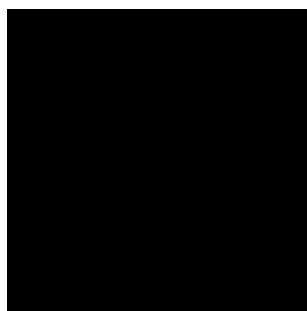
**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**2018**

**MUDr. Evžen Beitl**

**Univerzita Karlova  
2. lékařská fakulta**

Studijní program: experimentální chirurgie



**MUDr. Evžen Beitl**

Oxid dusnatý – marker závažnosti poškození organismu  
při polytraumatu

Nitric oxide as an indicator for severity of injury in polytrauma

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Jiří Hoch, CSc.

**Praha, 2018**

Srdečně děkuji mému školiteli prof. MUDr. Jiřímu Hochovi, CSc., přednostovi Chirurgické kliniky 2.LF UK a FN Motol za podporu a pomoc při postgraduálním studiu a při tvorbě této práce. Veliký dík patří prof. RNDr. Václavu Hamplovi, DrSc., přednostovi Ústavu fyziologie 2.LF UK, za pomoc v otázkách fyziologie a patofyziologie a při publikaci odborných článků. V neposlední řadě děkuji spoluautorce výzkumné práce MUDr. Aleně Baňasové, Ph.D. za spolupráci při vlastním výzkumu i při publikační činnosti a RNDr. Daně Mikové za pomoc v oblasti laboratorních vyšetření.

**Prohlášení:**

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

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

V Praze, 28.5.2018

Evžen Beitl

# Obsah

Předmluva.....	6
Seznam zkratk použitých v textu.....	7
I. Teoretická část.....	9
I. 1. Úvod.....	9
I. 1. 1. Polytrauma .....	10
I. 1. 2. Oxid dusnatý (NO).....	22
II. Hypotézy a cíle práce .....	27
II. 1. Hypotéza a cíle práce klinické části.....	27
II. 2. Hypotéza a cíle práce experimentální části .....	27
III. Klinická část .....	28
III. 1. Úvod.....	28
III. 2. Soubor a metody.....	29
III. 2. 1. Soubor .....	29
III. 2. 2. Stanovení koncentrací oxidu dusnatého (NO) .....	31
III. 2. 3. Statistické zhodnocení.....	32
III. 3. Výsledky.....	32
III. 4. Diskuze.....	41
III. 5. Závěr klinické části .....	45
IV. Experimentální část .....	46
IV. 1. Úvod .....	46
IV. 2. Soubor a metody.....	47
IV. 2. 1. Soubor.....	47
IV. 2. 2. Stanovení koncentrací oxidu dusnatého (NO).....	48
IV. 2. 3. Statistické zhodnocení .....	48
IV. 3. Výsledky .....	49
IV. 4. Diskuze .....	51
IV. 5. Závěr experimentální části.....	54
V. Závěr .....	55
Literatura .....	56
Příloha 1 .....	68
Příloha 2 .....	72

# Předmluva

Práce byla inspirována častou nejistotou klinika, který je postaven před stresující úkol zdárně řešit polytraumatizovaného pacienta, který se nezdá nacházet na rozhraní mezi životem a smrtí. Často i velmi erudovaný lékař s dlouholetou zkušeností s těžkými stavy je překvapen možnou diskrepancí mezi zdánlivě příznivým iniciálním stavem pacienta a následně těžkým až fatálním průběhem. Při rozhodování o řešení polytraumatizovaného pacienta má zkušenost členů traumatému samozřejmě největší hodnotu. Jsou však brány v úvahu i markery tkáňového poškození, které zatím nemají dostatečně časnou výpovědní hodnotu ani prognostický charakter. Skórovací systémy jsou v těchto urgentních situacích méně vhodné, navíc jejich správné vyhodnocení je v dynamickém procesu změn po polytraumatu téměř nemožné.

Snažili jsme se proto nalézt marker, který by měl velmi časnou výpovědní a pokud možno i prognostickou hodnotu. Velmi slibným se jeví oxid dusnatý, jenž je velmi reaktivní molekulou, produkovanou při dějích s výraznou inflamatorní a vazoaktivní složkou. Je známo, že se jeho produkce významně zvyšuje u rozsáhlých poranění.

Práce má za cíl prokázat elevaci koncentrace oxidu dusnatého u souboru polytraumatizovaných pacientů v komparaci se souborem zdravých jedinců, dále prokázat dynamiku změn i v laboratorních podmínkách u vytvořeného zvířecího modelu polytraumatu. Výsledky by mohly sloužit k posouzení vhodnosti použití změn koncentrace NO v roli časného ukazatele závažnosti poškození organismu, i s ohledem na eventuelní preventivní terapeutická opatření.

Předpokládáme, že změny sérové koncentrace oxidu dusnatého a jejich dynamika by mohly velmi časně po vzniku rozsáhlého poranění představovat marker závažnosti poranění s významnou prognostickou hodnotou.

## Seznam zkratk použitých v textu

ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADH	antidiuretický hormon
AIS	položka k výpočtu klasifikace ISS (abbreviated injury scale)
ARDS	syndrom akutní dechové tísně (adult or acute respiratory distress syndrome)
ATLS	system péče o závažně poraněné pacienty (advanced trauma life support)
BW	tělesná hmotnost (body weight)
CARS	kompensatorní syndrom protizánětlivé odpovědi (compensatory anti-inflammatory response syndrome)
CNS	centrální nervový systém
CVP	centrální žilní tlak (central venous pressure)
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace (disseminated intravascular coagulation)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
e-NOS	endoteliální izoforma syntázy oxidu dusnatého
FAD	flavinadenindinukleotid
GH	růstový hormon (growth hormone)
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
IFN	interferon
IL	interleukin
i-NOS	inducibilní izoforma syntázy oxidu dusnatého
INR	international normalized ratio, mezinárodní normalizovaný poměr Quickova času

ISS	system klasifikace polytraumat (injury severity score)
LPS	lipopolysacharid
MAP	střední arteriální tlak (mean arterial pressure)
MARS	syndrom kombinované odpovědi (mixed antagonistic response syndrome)
MODS	syndrom multiorgánové dysfunkce (multiple organ dysfunction syndrome)
MOF	syndrom multiorgánového selhání (multiple organ failure syndrome)
NAC	N-acetylcystein
NISS	novelizovaná klasifikace ISS (new injury severity score)
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
Nox	produkty oxidu dusnatého
OONO-	peroxynitrit
RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku (reactive oxygen and nitrogen species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SBP	systemový krevní tlak (systemic blood pressure)
SEM	standartní chyba
SIRS	syndrom generalizované zánětlivé odpovědi (systemic inflammatory response syndrome)
TNF	tumor nekrotizující faktor
VEGF	vaskulární endotelový růstový fraktor (vascular endothelial growth factor)



# I. Teoretická část

## I. 1. Úvod

Polytraumatizovaný pacient je jedinec s poraněním dvou a více orgánů či orgánových soustav, přičemž poranění alespoň jednoho z nich vede bez urgentního ošetření k letálnímu konci. Těžce poraněný pacient je limitován rozsahem případného poranění mozku, vždy je však ohrožen rozvojem šokového stavu, který může velmi rychle vést k úmrtí. I při zvládnutí šoku je zraněný v časném období ohrožen vznikem systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) s možností následného multiorgánového selhání (MOF, MODS).

Pro hodnocení závažnosti polytraumatu jsou používány četné klasifikace, z jejichž řady je zatím nejvhodnější a nejužívanější ISS (Injury Severity Score) (Baker *et al.*, 1974), resp. NISS (New Injury Severity Score) (Stevenson *et al.*, 2001). I tento systém je však zatížen subjektivní chybou hodnotitele a relativně malou prognostickou hodnotou. Často je pozorována diskrepance mezi vcelku uspokojivým vstupním klinickým stavem pacienta a následným těžkým průběhem. Velkým přínosem pro klinické lékaře by proto bylo nalezení markeru, který by odrážel v nejčasnějším období po traumatu závažnost poranění a byl varovným signálem potenciálního komplikovaného průběhu.

Z pokusů na zvířatech je známo, že tkáňové poranění je spojeno se zvýšenou produkcí rozličných mediátorů, m.j. s hyperprodukcí oxidu dusnatého (NO), který je v řadě reakcí výkonnou molekulou. Zdrojem hyperprodukce NO je zvýšení exprese inducibilní NO-syntázy (iNOS) v mastocytech, hepatocytech a buňkách hladkého svalstva cévní stěny. U polytraumatu

dochází jistě k aktivaci prakticky všech řídicích systémů organismu. S ohledem na iniciaci šokových mechanismů předpokládáme v časném období mohutnou reakci především oběhového systému s nutným vyplavováním NO následkem aktivace i-NOS. Předpokládali jsme proto, že by právě oxid dusnatý (NO) mohl být vhodným časným markerem závažnosti poškození organismu při polytraumatu.

V první části práce jsme vyšetřovali soubor polytraumatizovaných pacientů, u kterých jsme porovnávali koncentrace NOx oproti skupině zdravých dobrovolníků. Byli jsme si vědomi heterogenity jedinců i porovnávaných souborů z hlediska rozmanitosti typu výživy a tudíž i přítomnosti dusíkatých látek ze stravy, různých komorbidit u poraněných. Nicméně v reálných podmínkách nelze tyto vlivy eliminovat.

Ve druhé části jsme se pokusili na zvířecím modelu simulovat situaci polytraumatu u lidí a objasnit některé překvapivé jevy, nalezené u lidských pacientů.

## **I. 1. 1. Polytrauma**

Termín polytrauma má již z historie řadu definic, které více či méně vystihují tento závažný stav.

Z klinického hlediska je asi nejužitečnější definice, podle níž je pojmem *polytrauma* označováno současné poranění nejméně dvou orgánů či orgánových soustav, přičemž poranění alespoň jednoho z nich nebo jejich kombinace bezprostředně ohrožují základní životní funkce. Jde tedy o stav, který vede bez urgentní odborné lékařské pomoci k letálnímu konci.

Pro naplnění pojmu polytrauma je nutné, aby postižení jednotlivých systémů bylo opravdu závažné, často spojené s významným krvácením či devastací tkání. Pro kombinaci poranění, která nenaplní charakteristiku polytraumatu, je používán termín *sdržené poranění*. Pod

pojmem sdružené poranění v klinické praxi nejčastěji rozumíme vícečetné poranění kostěného skeletu.

Některé definice mají teoretičtější charakter, zohledňují tkáňové poškození a navíc následné patofyziologické změny, zahrnované po pojem syndrom systémové zánětlivé odpovědi (Systemic Inflammatory Response Syndrome- SIRS) a hodí se spíše ke klasifikaci ex post. Např. Greenspan s ohledem na klasifikační systém ISS (Injury Severiny Score) definovali v roce 1985 polytrauma jako syndrom kombinovaného poranění s hodnotami ISS většími než 17 a s následujícím SIRS po dobu trvání nejméně jednoho dne, vedoucího k dysfunkci či selhání orgánů nebo orgánové soustavy, které nebyly přímo úrazem zasaženy (Greenspan *et al.*, 1985).

S přibývajícím poznatky na poli fyziologie a patofyziologie se poněkud mění pohled na polytrauma, od původního chápání jako urgentního stavu směrem k syndromu, který vyžaduje nejen urgentní zásah, ale následně rozsáhlou intenzivní péči. Toto pojetí jde ruku v ruce s přežíváním poraněných, kteří se pohybují na samé hranici slučitelnosti se životem. Právě u nich se nejvíce projevují nejrůznější komplikace, které jsou klinickým vyjádřením SIRS a jeho projevů.

Primární poškození organismu a následné škody z rozvoje SIRS vystihuje tzv. Teorie dvojího úderu (Two-hit theory) (Rotstein 2003). Podle ní hraje velkou roli v úmrtnosti po polytraumatu nejen primární inzult s přímým poškozením tkání a orgánů, ale i následný rozvoj komplikací na podkladě rozvoje syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS). Tyto komplikace mohou být umocněny nedostatečnou nebo neadekvátní intenzivní péčí (acidosa, hypotermie...), infekcí, pokračující nekrotizací tkání, neadekvátně rozsáhlými operačními výkony v časném období apod. Do této skupiny komplikací patří i tzv. kompartmentové syndromy v různých lokalitách. Mozkové kontuze či nitrolební krvácení jsou vždy provázeny perifokálním edémem, po vyplavení zánětlivých mediátorů se však může projevit cerebrální compartment-syndrom na podkladě generalizovaného edému CNS. V oblasti plic je po

primárním poranění velmi známou manifestací ARDS. Primární poranění nitrobřišních orgánů je spojeno často s masivním krvácením a šokovým stavem, avšak i při jeho zvládnutí je třeba počítat s možností rozvoje břišního compartment syndromu na pokladě recidivy krvácení (selhání hemostázy, koagulopatie...) (Pleva *et al.*, 2004), krvácení do retroperitonea nebo paralytického stavu střev. Po primárním poranění končetin, často ve spojení se zlomeninami dlouhých kostí, hrozí končetinový compartment-syndrom s následnou ischemií a nervovou lézí, nejvíce se vyskytující v oblasti bérců.

### **I. 1. 1. 1. Traumatický šok**

Polytraumatizovaný pacient je bezprostředně po úrazu limitován rozsahem a závažností poranění centrální nervového systému (CNS), které může být samo o sobě determinujícím faktorem přežití. Těžce poraněný pacient je v akutní fázi po poranění prakticky vždy ohrožen rozvojem traumatického šoku. Prognóza záleží na rozsahu poranění, rychlosti a kvalitě přednemocniční a nemocniční péče. Zkvalitnění ošetření na úrovni rychlé záchranné služby vede k možnosti dosažení nemocniční péče i u velmi vážně traumatizovaných pacientů, kteří měli dříve jednoznačně infaustní prognózu. Pro přežití pacientů na nemocniční úrovni je kromě hrazení ztrát a intenzivní péče včetně podpory oběhu limitující především zvládnutí excesivního krvácení (zlomeniny pánve, dlouhých kostí, poranění aorty, dutých žil, resp. jiných velkých cév, lacerace nitrohručních a nitrobršních orgánů). Bohužel, i po úspěšném zvládnutí hemoragického stavu může dojít k letálnímu konci na podkladě syndromu systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) s jeho projevy jako jsou koagulopatie, zejména disseminovaná intravaskulární koagulace (DIC), syndrom akutní respirační tísně (ARDS) a následného syndromu multiorgánové dysfunkce (MODS), popřípadě multiorgánového selhání (MOF).

### **I. 1. 1. 2. Traumatický šok a jeho komplikace**

Různý stupeň rozvoje traumatického šoku provází prakticky každé polytrauma. Traumatický šok nese hlavní znaky hypovolemického šoku. Kromě rozsahu krevních ztrát vedoucích k hypovolemii se na rozvoji šokového stavu podílí i bolest, strach a devastace tkání s vyplavováním vazoaktivních mediátorů. Z patofyziologického hlediska platí pro traumatický šok stejná obecná charakteristika jako pro jiné druhy šoku. Jde o akutní oběhové selhání s neadekvátní distribucí a perfúzí ve vztahu k metabolickým požadavkům tkání, vedoucí ke generalizované buněčné hypoxii. Jedná se o rychle vzniklý nepoměr mezi množstvím cirkulující tekutiny a aktuální kapacitou krevního řečiště. Následně dochází ke snížení průtoku

krve orgány a tudíž k poruše transportu kyslíku a živin k cílovým buňkám. Zprvu jde o účelnou kompenzační reakci, kdy organismus reaguje na relativní či absolutní nedostatek obíhající krve změnami v makro- i mikrocirkulaci s centralizací oběhu. Cílem je zabezpečení efektivního prokrvení alespoň mozku a srdce jako nejkritičtějších (a zároveň nejzranitelnějších) orgánů. Při přetrvávání či prohloubení vyvolávací příčiny dojde k překonání mezí tolerance a původně účelná reakce se stane patologickou. Výsledným stavem jsou projevy hypoxie cílových orgánů a tkání, acidóza a terminální zhroucení oběhu. Na poškození buněk a tkání se podílí i tzv. „sludge fenomén“. Alterace mikrooběhu ve fázi hypotense a centralizace odběru v kombinaci se změnou propustnosti kapilár (capillary leakage) následkem účinků NO a cytokínů vede k sekundární hypovolemii a hemokoncentraci a ke tvorbě erytrocytárních aglutinátů (červený sludge) a trombocytárních agregátů (bílý sludge) (Bateman *et al.*, 2003). Na základě tohoto fenomenu vzniká obstrukce v mikrocirkulaci s poruchou transkapilární výměny. Buněčná hypoxie spolu s hromaděním katabolitů vede ke skryté acidose, která je spoluodpovědná za finální buněčné poškození. Velmi často se masivní krevní ztráta prohlubuje rozvojem disseminované intravaskulární koagulopatie (DIC). Zhroucení koagulační kaskády vede k difuznímu krvácení, zařazovaného pod pojem „Život ohrožující krvácení – ŽOK“ (Kvasnicka *et al.*, 2013)

Fyziologické a patofyziologické změny jsou provázány reakcí řady systémů, z nichž velmi časně reaguje neurohumorální soustava. Bezprostřední roli v oblasti oběhových změn hrají pochopitelně katecholaminy, zejména adrenalin, který stimuluje srdeční výdej zvýšením myokardiální kontraktility, zvyšuje srdeční frekvenci i srdeční preload. Jinak je ovšem krevní tlak zvyšován i nárůstem periferní vaskulární rezistence na úrovni arteriol, čímž dochází k centralizaci oběhu s tendencí zajištění perfúze srdce a mozku, za cenu snížení průtoku splachnickou oblastí, ledvinami a svaly (Rensing *et Bauer*, 2001). Při hypoperfúzi ledvin je juxtaglomerulárním aparátem uvolňován renin s výslednou produkcí angiotenzinu II, který má

jednak výrazné vazokonstrikční účinky a současně stimuluje sekreci aldosteronu v kůře nadledvin. Neuroendokrinní reakce je představována především zvýšeným uvolňováním adrenokortikotropního hormonu (ACTH), růstového hormonu (GH) a antidiuretického hormonu (ADH). V plazmě je proto zvýšen kortizol. V časném posttraumatickém období bývá zachycována hyperglykémie, jejíž původ je multifaktoriální. Vlivem stressu dochází k supresi inzulínu účinkem katecholaminů (stimulace  $\alpha$ -receptorů, naopak se stimulací  $\beta$ -receptorů zvyšuje uvolňování glukagonu, zodpovědného za jaterní glykogenolýzu a glukoneogenezi (Hill et Hill, 1998). Bývá pozorována i stressová inzulínová resistance (Singer *et al.*, 2004). Navíc různé cytokíny (TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ ) zvyšují expresi glukozového transportního mechanismu (insulin-like activity). Intracelulární glukosa je oxidována na pyruvát a finálně redukována na laktát (stressová laktátová acidóza).

Časný nárůst koncentrace laktátu v séru bývá uváděn jako potenciální marker špatných výsledků u závažně poraněných pacientů (Abramson *et al.*, 1993).

### **I. 1. 1. 3. SIRS**

Při přežití prvních několika hodin poúrazového období může dojít, resp. do jisté míry vždy dochází, k rozvoji aseptické zánětlivé reakce (označované jako „hyperinflammation, SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome). Klinicky má řadu podob, resp. projevů v různých tělesných soustavách, ale obecně platí, že musí být splněna alespoň 2 ze čtyř kritérií: 1) akce srdeční nad 90/min., 2) dechová frekvence nad 20 dechů/minutu, resp. hyperventilace s poklesem PaCO<sub>2</sub> pod 32 mmHg, 3) tělesná teplota nad 38 °C nebo pod 36 °C a 4) počet leukocytů v periferním krevním obraze nad 12 000 nebo pod 4 000/mm<sup>3</sup> či více jak 10 % juvenilních elementů. Syndrom hyperinflamace vzniká mobilizací a aktivací neutrofilů, makrofágů, trombocytů a buněk endoplazmatického retikula. Tyto elementy tvoří komplexní síť v aktivaci obranné reakce. Nadměrná zánětlivá reakce vede k manifestaci SIRS. Dochází

k vyplavení cytokinů (TNF-alfa, interleukiny IL 1, IL 6 a IL8), metabolitů kyseliny arachidonové – prostaglandinů a leukotrienů, které mají různé vazoaktivní účinky a vliv na permeabilitu cévní stěny. Ve zvýšené míře jsou produkovány reaktivní formy kyslíku (ROS) (Benkusky *et al.*, 1999) a dusíku (Feihl *et al.*, 2001).

Významnou úlohu v rozvoji SIRS hrají polymorfonekleární leukocyty. Na jednu stranu se účastní v roli fagocytů na časně úklidové reakci, na stranu druhou indukují sekundární poškození buněk, tkání a orgánů při degranulaci s uvolněním extracelulárních proteáz a podílem na tvorbě volných kyslíkových radikálů (ROS – Reactive Oxygen Radicals), které jsou odpovědné za tzv. oxidativní stress. Volné kyslíkaté radikály indukují lipidovou peroxidaci, desintegraci buněčné membrány a poškození DNA buněk endotelových i parenchymových (Nathens *et al.*, 2002).

Cytokíny jsou polypeptidy s různou rychlostí nástupu. Hyperakutní cytokiny (TNF-alfa, IL-1 beta) mají efekt již do 2 hodin, existují i tzv. subakutní sekundární cytokiny jako IL-6, IL-8, IL-12 a IL-18. Cytokiny aktivují mobilizaci a fagocytární aktivitu polymorfonukleárů a stimulují je k produkci a uvolnění proteáz a volných kyslíkových radikálů za vzniku tzv. oxidativního stressu. Některé cytokiny se podílejí na redukci apoptozy neutrofilů a na akumulaci neutrofilů v oblasti tkáňových nekrotických ložisek (Biffi *et al.*, 1996).

Mechanické a hypoxické poškození buněk vede k uvolňování intracelulárních kalciových iontů s následnou aktivací fosfolipázy A2 a fosfolipázy C, které uvolňují z buněčných membrán kyselinu arachidonovou, nutnou k syntéze prostaglandinů a leukotrienů, které mají kromě stimulačního efektu na polymorfonukleáry vliv na permeabilitu a motilitu cév a na agregaci trombocytů (Rose et Marzi, 1996).



## **CARS (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome)**

V živých systémech se projevuje snaha a udržení rovnováhy kompenzováním extrémů. V krizové situaci, kdy jsou vyplavovány prozánětlivé cytokiny a rozvíjí se SIRS, reaguje organismus kompenzatorním vyplavováním protizánětlivých cytokinů (IL-4, IL-10, IL-13), růstového faktoru beta (TGF- $\beta$ ) (Collighan *et al.*, 2004) nebo cytokinů se zřejmě duálním, pro- i protizánětlivým efektem (IL-6).

Při převážení protizánětlivé odpovědi dochází zřejmě k projevům immunosuprese s následným rizikem infekce a septických komplikací. Někteří autoři (Bone 1996) v úmyslu postižení dynamicity dějů zavedli k pojmu SIRS, který chápou jako složku prozánětlivou, i pojem **CARS**, jako kompenzatorní protizánětlivou součást dějů. Ideálem je z tohoto hlediska vyvážená odpověď, pro kterou je zaveden pojem **MARS** (Mixed Antagonist Response Syndrome) (Bone 1996).

SIRS s přítomností ověřeného mikrobiálního agens odpovídá pojmu *sepsis*.

**I. 1. 1. 3. 1. Diseminovaná intravaskulární koagulopatie (DIC – Disseminated Intravascular Coagulation)** je projevem SIRS v oblasti krevního, respektive koagulačního systému. Jedná se o anomální spuštění procesu intravazální koagulace s tvorbou mikrotrombů. Dochází k poškození mikrooběhu v jednotlivých orgánech s následným hypoxickým tkáňovým poškozením, ke konzumpci koagulačních faktorů a dysfunkci trombocytů s následným neztišitelným krvácením (Gando *et al.*, 2002). Krvácení je v další fázi potencováno proteolytickou aktivitou plasminového systému, kdy dochází k rozpuštění trombů (Idell 2003). Stejně jako komplementová kaskáda a kallikrein-kininový systém je i plazmatická koagulační kaskáda aktivována prozánětlivými cytokiny nebo toxiny (např. LPS-endotoxin).

**I. 1. 1. 3. 2 Syndrom reperfuze** popisuje stav po obnovení průtoku krve orgány po příznivém ovlivnění šokového stavu. Je příkladem sekundárního SIRS. Po návratu prokrvení dochází k vyplavování katabolitů a buněčného detritu z původně ischemické oblasti zpět do oběhu s

rizikem rozvoje či prohloubení SIRS. Na buněčné a subcelulární úrovni dochází v postischemické fázi vlivem xantin-oxidázy k degradaci hypoxantinu na xantin a konečně na kyselinu močovou za tvorby superoxidu z kyslíku (Nemeth et Boda, 2001). Superoxidový anion je dále redukován na peroxid vodíku a hydroxylový iont enzymem dismutázou superoxidu. Tyto volné kyslíkové radikály vedou k lipidové peroxidaci, lézi buněčných membrán a devastaci DNA s následnou apoptosou a nekrosou endotelií, parenchymových i imunitních buněk (Kong *et al.*, 1998).

### **I. 1. 1. 3. 3. ARDS**

Častou komplikací šoku u polytraumat je rozvoj *syndromu akutní respirační tísně* (ARDS – Acute (or Adult) Respiratory Distress Syndrome). Je projevem SIRS v respiračním systému. Může se jednat jak o primární ARDS při plicní kontúzi či při aspiraci žaludečního obsahu nebo krve nebo nadýchání toxických plynů a par, tak o sekundární projev zprostředkovaný mediátory. Projevuje se intersticiálním i alveolárním edémem, provázeným zhoršením respiračních funkcí s poruchou oxygenace a významnými lokálními dysbalancemi mezi ventilací a perfuzí. ARDS má specifický obraz při rtg vyšetření – difuzní vločkovité zastření (obraz sněhové bouře).

Všechny jmenované syndromy se u polytraumat vyskytují, vzájemně se prolínají a ovlivňují prognózu poranění. Jejich nástup se může s ohledem na závažnost poškození organismu a adekvátnost léčby projevit v různých časových intervalech po poranění.

### **I. 1. 1. 4. MODS, MOF**

Výše uvedené stavy mohou v nepříznivém případě přejít do *syndromu multiorgánové dysfunkce* (MODS – Multiple Organ Dysfunction Syndrome), tedy do stavu, kdy orgány či systémy nejsou schopny zajistit homeostázu bez terapeutického zásahu. Poruchy na sobě závislých soustav mohou vyústit do *multiorgánového selhání* (MOF – Multiorgan Failure).

MODS je výsledkem porušení rovnováhy mezi pro- a protizánětlivými faktory, jsou vyčerpány zásoby přirozených antioxidantů a inhibitorů proteáz. Jsou přítomny jevy jako buněčná apoptóza a nekróza, kapilární únik při poruše cévní permeability aj. (Bone 1992). Setkáváme se s dělením MODS na primární, čili časný a sekundární- pozdní. (Ciesla *et al.*, 2004). Příkladem primárního MODS může být primární ARDS následkem plicní kontúze nebo primární úrazový mozkový edém. Sekundární MODS se může projevovat vlivem změn při SIRS na primárně nepoškozených orgánech (ARDS po poranění ostatních soustav).

### I. 1. 1. 5. Skórování polytraumat

Skórovací systémy umožňují klasifikaci poranění z hlediska rozsahu, závažnosti, naléhavosti intervence i prognózy. Umožňuje srovnání výsledků jak v rámci jednoho pracoviště, tak i pracovišť ostatních. Skóre má jistou vypovídající hodnotu v otázkách slučitelnosti úrazu se životem, mortalitou i morbiditou.

Skórovacích systémů existuje více, avšak pro potřeby traumatologie se jako nejvýhodnější jeví **system ISS** (*Injury Severity Score*). Jeho podkladem je **klasifikace AIS** (*Abbreviated Injury Scale*), která hodnotí závažnost poranění v dílčích orgánových systémech (hlava a krk, obličej, hrudník a plíce, břicho, páteř a mícha, končetiny, pánev a acetabulum, kůže) ve škále 1–6 dle závažnosti. Vlastní hodnota ISS skóre se vypočítá jako součet druhých mocnin AIS ve třech nejvíce postižených oblastech.

*Příklad výpočtu:*

- |   |                                |           |                |
|---|--------------------------------|-----------|----------------|
| • | <i>Sériová zlomenina žeber</i> | $AIS = 3$ | $AIS^2 = 9$    |
| • | <i>Lacerace sleziny</i>        | $AIS = 4$ | $AIS^2 = 16$   |
| • | <i>Zlomenina femuru</i>        | $AIS = 3$ | $AIS^2 = 9$    |
| • | <i>ISS</i>                     |           | <i>34 bodů</i> |

Pro naplnění pojmu polytrauma by měl úraz dosahovat hodnoty ISS 16 a více. Jako velmi závažné polytrauma se hodnotí stav s ISS nad 25 bodů. V posledních letech došlo ve vztahu k této klasifikaci k rozdělení polytraumat na lehčí (ISS 16-25) a těžká (ISS 25 a více).

I tato klasifikace má však svá úskalí. Promítá se zde subjektivní úsudek hodnotitele, který může způsobit velký rozptyl výsledku. Dále pro jednu diagnostickou jednotku systém přiřazuje konkrétní počet bodů, ale tato jednotka může představovat interval od poměrně nezávažné léze až po prakticky smrtelné poškození. Další problém je v čase klasifikace. V časně fázi je obtížné klasifikaci správně stanovit s ohledem na dynamičnost změn u polytraumatu, v pozdějším období již prakticky nemá varovnou či prognostickou hodnotu.

#### **I.1.1.6. Léčení polytraumat**

Polytraumatizovaný pacient je bezprostředně ohrožen na životě. Rychlost a efektivita léčení je určující pro přežití a rozsah trvalého poškození. Již v rámci rychlé záchranné služby je nutné stanovení základních priorit s příslušnými opatřeními. V současné době je postupováno podle mezinárodních principů ATLS (Advanced Trauma Life Support). Nejvyšší důležitost má kontrola a zajištění průchodnosti dýchacích cest, dále adekvátní ventilace a oxygenace, kontrola a zajištění oběhu, provizorní řešení závažného krvácení, stabilizace zlomenin a vždy stabilizace krční páteře do vyloučení poranění. Kruciólní je zajištění vstupů do žilního systému s adekvátní náhradou ztracených tekutin formou krystaloidů a koloidů, adekvátní analgezie a zajištění normotermie, resp. boj s hypotermií.

Na nemocniční úrovni je pokračováno v intenzivní, případně resuscitační péči o polytraumatizovaného pacienta včetně operačních výkonů. K život zachraňujícím chirurgickým výkonům patří: drenáž pneumotoraxu či rozsáhlého hemothoraxu, evakuace srdeční tamponády, řešení epidurálního hematomu, chirurgická kontrola masivního krvácení

v oblasti hrudníku, břicha, retroperitonea a krvácení při zlomeninách pánve a ošetření traumatických amputací (Collicott et Hughes, 1980).

U těžce poraněných pacientů, kteří jsou ohroženi vlastním traumatem a navíc hypotermií a acidózou s následnými potenciálními poruchami srdeční činnosti a zejména poruchou koagulace je jednoznačně preferován etapový operační přístup– tzv. **damage control**. (Pape *et al.*, 2008). Tento postup je odpovědí na realitu velmi špatných výsledků při eskalaci operačních výkonů ve fázi dekompenzace oběhu, vnitřního prostředí či při hypotermii, resp. jejich kombinace.

Při tomto způsobu chirurgického ošetření je snahou v co nejkratším možném čase vyřešit masivní krvácení z jakékoliv lokalizace včetně dutinových poranění. I zde bývá dáвана přednost časově nejúspěšnějším a přitom nejefektivnějším výkonům včetně tamponování rouškami (packing). Dále je nutné stabilizovat pánev a zlomeniny dlouhých kostí a rozvinout tak prevenci proti pokračujícímu krvácení a rozvoji SIRS a MODS. K zajištění zlomenin se užívá dočasných stabilizačních výkonů. V této fázi mají své místo zevní fixátory u zlomenin dlouhých kostí a pánve (Pleva *et al.*, 2004), někdy postačí dočasně i klasická sádrová fixace (zlomeniny horní končetiny či bérce apod.). Tamponáda rouškami (packing) je často vhodná u nitrobršních či retroperitoneálních poranění, zejména při hrozící poruše koagulační kaskády. Definitivní výkony bývají odsunuty na období, kdy je již dosaženo oběhové stability, normotermie, normokoagulace a homeostázy vnitřního prostředí (tzv. second look...) (Waydhas *et al.*, 1996).

V dalším období se průběh ošetření řídí rozsahem postižení, stavem organismu před úrazem a efektivitou léčby. Mohou se vyskytovat komplikace celkového stavu jako SIRS, DIC a MODS, může dojít i ke komplikacím místním v podobě krvácení, ischémie, lokálních zánětlivých komplikací apod.

## I. 1. 2. Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý (NO) je nestabilní radikál, který se in vivo vyskytuje přednostně v plynné formě. Jedná se o velmi účinnou endogenní vazodilatační molekulu (Furchgott 1993). NO hraje významnou úlohu v regulaci tonu cév systémového řečiště (Furchgott et Zawadzki, 1980; Ignarro *et al.*, 1987; Moncada et Higgs, 1993; Palmer *et al.*, 1988). S ohledem na to, že se jedná o pouze dvouatomovou chemickou látku, není schopen uložit specifickou informaci do své struktury, proto může informaci cílovým receptorům sdělovat pouze změnami své koncentrace. Dokáže volně přestupovat přes membrány a volně difundovat do buněk v okolí vzniku. Nemůže však být v pravém slova smyslu transportován krví, neboť je velmi rychle vychytáván železem oxyhemoglobinu. Pro jeho velmi krátký poločas (cca 1 s) je jeho produkce 10–40x větší, než je třeba k aktivaci guanylátcyklázy a k vazodilatačnímu efektu. Většinu NO inaktivují erytrocyty, resp. oxyhemoglobin. Poločas kolem jedné sekundy je velmi krátký, avšak pro funkci hladké svaloviny cév dostatečný.

Kromě regulace cévního tonu se účastní též mnoha dalších důležitých fyziologických a patofyziologických procesů, zahrnujících např. modulaci zánětlivé odpovědi, neurotransmisi, hormonální sekreci či apoptózu (Bredt *et al.*, 1990; Bredt et Snyder, 1994 ; Furchgott et Zawadzki, 1980 ; Ignarro *et al.*, 1987 ; Moncada *et al.*, 1991 ; Moncada *et al.*, 1989 ; Palmer *et al.*, 1988). Významnou roli má v imunitních procesech (Clancy *et al.*, 1998). NO rovněž inhibuje adhezi a agregaci trombocytů, tlumí aktivitu leukocytů a má antiproliferativní účinky (Moncada 1994).

Oxid dusnatý se dále podílí na inhibici neutrofilů, na inhibici aktivace a agregace destiček a v neposlední řadě oslabuje proliferaci buněk hladkých svalů (Adnot *et al.*, 1995)

### 1. 2. 1. Syntéza NO

Oxid dusnatý je velmi jednoduchá molekula, přesto je v živém systému syntetizován poměrně složitým enzymovým mechanismem. NO vzniká oxidací terminálního guanidinového dusíku aminokyseliny L-argininu molekulárním kyslíkem přes hydroxy-L-arginin za vzniku L-citrulinu (Leone *et al.*, 1991; Moncada *et al.*, 1989; Moncada *et al.*, 1993; Palmer et Moncada, 1989; Palmer *et al.*, 1988). K syntéze NO je třeba čtyř kofaktorů: hemu, FAD, FMN a tetrahydrobiopterinu. Nutná je přítomnost dvou kosubstrátů: O<sub>2</sub> a NADPH. Reakci katalyzuje enzym NO syntáza (NOS) (Knowles 1997; Knowles 1996; Leone *et al.*, 1991; Palmer et Moncada, 1989; Stuehr 1999). Existují tři izoformy NO syntázy: nNOS (NOS I), iNOS (NOS II) a eNOS (NOS III). Označení nNOS, eNOS odráží oblast jejich hlavní produkce, resp. jejich místo objevení ve tkáních (nNOS – neurální, eNOS – endoteliální). Obě tyto izoformy jsou konstitutivní, tedy s relativně konstantní produkcí. Isoforma iNOS (inducibilní) je rychle reagující enzym, odpovědný za rychlou a mohutnou produkci NO.

Endoteliální NOS (eNOS, NOS III) je důležitá v regulaci cévního tonu. Je trvale exprimována. Tvoří menší množství oxidu dusnatého, které je přesně regulováno hlavně intracelulární koncentrací Ca<sup>2+</sup> (Knowles et Moncada, 1994; Nathan et Xie, 1994)

Neurální NOS (nNOS, NOS I) patří též ke konstitutivním formám, byla prokázána ve specifických neuronech centrální i periferní nervové soustavy. Její aktivita je řízena změnami neuronální aktivity a řadou fyzikálních stimulů, např. hypoxií, změnami osmotického tlaku apod. Třebaže konstitutivně exprimované izoformy (nNOS, eNOS) byly poprvé popsány v neuronech a endoteliích, jsou přítomny i v mnoha jiných buněčných typech (Moncada et Higgs 1993). Jejich aktivita je regulována hladinou vápníku a kalmodulinu (Knowles et Moncada, 1994; Nathan et Xie, 1994). V bazálních podmínkách nNOS a eNOS uvolňují relativně malé množství NO v odpovědi na podněty různých agonistů, jakými jsou např.

acetylcholin v cévním endotelu, glutamát v mozkové tkáni nebo kolagén aktivující trombocyty. NO produkovaný těmito izoformami NOS plní roli signální molekuly.

Inducibilní izoforma (iNOS) je kalcium a kalmodulin-independentní. Je exprimována makrofágy a jinými buňkami (např. chondrocyty, neutrofilů, hepatocyty a hladkými svalovými buňkami) (Gaston *et al.*, 1994) po stimulaci zánětlivými cytokiny (např. IL-1, TNF, IFN) a bakteriálním endotoxinem (LPS). V tomto případě produkuje inducibilní NOS signifikantně větší množství NO než produkují konstitutivní izoformy. NO působí ve vyšších koncentracích i jako cytotoxická molekula v boji proti mikroorganismům a nádorovým buňkám (Clancy *et al.*, 1998; Hickey *et al.*, 1997) Indukce iNOS mRNA a nárůst produkce NO byly rovněž pozorovány in vitro po stimulaci cytokiny a LPS a to jak v endoteliích (Geiger *et al.*, 1997), tak i v hladkých svalových buňkách a. pulmonalis (Nakayama *et al.*, 1992).

### 1. 2. 2. Reakce NO s radikály

NO je nestabilní radikál (tj. má nepárový elektron). Při svých obvykle poměrně nízkých koncentracích in vivo reaguje relativně pomalu s většinou biomolekul a je naopak dosti rychle inaktivová železem hemoglobinu, za vzniku methemoglobinu a nitrátu.

Reakcí NO se sulfhydrylovými skupinami (-SH) glutathionu, cysteinu a albuminu jsou vytvářeny o něco stálější nitrosothioly s biologickým poločasem v řádu desítek minut. Nitrosothioly představují zřejmě transportní formu NO s možností předání biologicky aktivního NO jiným molekulám.

Z patofyziologického hlediska je významná extrémně rychlá reakce NO se superoxidem ( $O_2^-$ ), při které vzniká toxický peroxyinitrit ( $OONO^-$ ) (Butler *et al.*, 1995; Vinten-Johansen 2000). Peroxyinitrit, který není radikál, má nicméně velmi výrazné oxidativní cytotoxické působení. Za fyziologických podmínek ho vzniká jen malé množství a oxidativní poškození je minimalizováno endogenními antioxidačními mechanismy. Peroxyinitrit je mnohem



reaktivnější než jeho mateřské molekuly (Beckman *et al.*, 1996). Jedná se o molekulu s krátkým poločasem, nicméně plně dostatečným k překonání buněčné membrány a k následné interakci s nejdůležitějšími biomolekulami. Toxicita peroxynitritu spočívá v oxidaci SH-skupin bílkovin, atomů železa a síry v biologických molekulách a v peroxidaci lipidů. Může rovněž indukovat poškození DNA a apoptózu (Patel *et al.*, 1999).

Zvýšené množství peroxynitritu též nepříznivě ovlivňuje funkci cévního endotelu, který se za fyziologických podmínek podílí na udržování cévního tonu, na rovnováze mezi prokoagulačními a antikoagulačními faktory. Má vliv na regulaci adheze leukocytů a na migraci leukocytů do tkání. Peroxynitrit ovlivňuje aktivaci syntézy IL-8, který je hlavním chemoatraktantem lidských leukocytů (Jozsef *et al.*, 2002; Khreiss *et al.*, 2002). Peroxynitrit též pozitivně ovlivňuje  $\beta$ 2-integrin na povrchu leukocytů (Zouki *et al.*, 2001) a tím se podílí na zvýšené interakci leukocytů s endotelem.

### **1. 2. 3. N- acetylcystein (NAC)**

V našem experimentu byl použit NAC v roli antioxidantu. N- acetylcystein je významným zdrojem cysteinu pro syntézu redukovaného glutathionu (GSH), který se významně podílí na korektním redoxním prostředí buňky. Tento mechanismus je zřejmě stěžejní pro antioxidační působnost. Jeho efekt byl hojně studován u plicních afekcí, kde byly prokazovány evidentně příznivé účinky při oxidativním stressu. (Behr *et al.*, 1997; Bernard 1990; Lachmanova *et al.*, 2005). N-acetylcystein je jinak velmi bezpečná látka s širokým toxicko-terapeutickým oknem, což bylo prokázáno např. u pacientů s jaterním selháním po předávkování paracetamolem (Walsh et Lee, 1999). Tento stav je charakterizován těžkou deplecí redukovaného glutathionu (GSH) v hepatocytech, kde hraje hlavní roli při detoxikačním procesu. Způsob působení NAC zahrnuje jeho difúzi přes buněčnou membránu a po deacetylaci buněčnými acetylázami následnou intracelulární akumulaci cysteinu (Raftos *et al.*, 2007). V

experimentech byl též prokázán příznivý vliv u septických stavů. V této situaci NAC brání aktivaci neutrofilních leukocytů a makrofágů (Kharazmi *et al.*, 1988), zmírňuje adhezi leukocytů na endoteliálním povrchu a omezuje kapilární únik (Schmidt *et al.*, 1997). NAC brání uvolňování TNF alfa a IL-8, Tento efekt by mohl probíhat cestou modulace genové exprese těchto mediátorů na transkripční úrovni (Patterson *et al.*, 1993).

## **II. Hypotézy a cíle práce**

### **II. 1. Hypotéza a cíle práce klinické části**

Hypotéza – změny koncentrace NO, resp. jeho oxidačních produktů, odrážejí časně závažnost poškození organismu při polytraumatu. S mírou závažnosti polytraumatu vzrůstají koncentrace NOx.

Cílem práce bylo potvrdit oxid dusnatý v roli časného markeru závažnosti poškození tkání při polytraumatu s časnou prognostickou hodnotou, tzn. prokázat elevaci koncentrací oxidu dusnatého u souborů polytraumatizovaných pacientů s různým klinickým stupněm závažnosti poranění v komparaci se souborem nezávažně poraněných a s kontrolní skupinou zdravých jedinců.

### **II. 2. Hypotéza a cíle práce experimentální části**

Hypotéza: NO není u nejtěžších polytraumat elevován díky reakci se superoxidem za vzniku toxického peroxinitritu, který není detekovatelný chemoluminiscenční metodou.

Cílem práce bylo prokázat dynamiku změn koncentrací NOx v laboratorních podmínkách u vytvořeného zvířecího modelu polytraumatu a prokázat či vyvrátit hypotézu o absenci elevace NO, resp. NOx u nejzávažnějších polytraumat. Experimentální část navázala na překvapivý nález klinické části, kdy jsme u nejtěžších forem polytraumatu neprokázali očekávanou největší elevaci NOx, ale naopak nebyla zaznamenána odchylka od hodnot kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků.

## III. Klinická část

### III. 1. Úvod

Jak již bylo řečeno, polytrauma je definováno jako kombinace poranění dvou a více tělesných systémů, které bez promptního terapeutického zásahu vede k fatálnímu konci.

Pro hodnocení závažnosti poranění bylo vypracováno velké množství klasifikačních systémů, z nichž se pro klinickou praxi jeví jako nejpoužitelnější klasifikace ISS, resp. nověji NISS (New ISS). I ten je však zatížen velkou nepřesností z důvodů individuálního pohledu hodnotitele. Klasifikační systémy včetně ISS nejsou zcela vhodné pro okamžité zhodnocení stavu, který navíc v časně fázi u polytraumatu prodělává mnoho dynamických změn. Často se setkáváme s diskrepancí mezi iniciálně uspokojivým stavem a následným těžkým až fatálním průběhem. Z toho důvodu jsou hledány vhodné markery, které by postihly závažnost poranění a, pokud možno, měly i prognostický charakter.

Tkáňové poškození je provázeno produkcí řady mediátorů. Mezi nimi má velký význam nadprodukce oxidu dusnatého (NO), který má roli signální i efektorové molekuly v řadě biologických procesů (Gross et Wolin, 1995; Hampl *et al.*, 2006). Nárůst produkce NO díky aktivaci izoformy iNOS v mastocytech, hepatocytech a buňkách hladké svaloviny cév je typický pro tkáňové trauma. Z těchto důvodů jsme předpokládali, že změny sérové koncentrace NO a jeho oxidačních produktů NO<sub>x</sub> (NO je velmi rychle v krvi oxidován) mohou v časném období po utrpeném polytraumatu představovat užitečný marker závažnosti poranění pacienta

s prognostickou hodnotou. Testovali jsme proto hypotézu o symetrické elevaci koncentrací NOx s mírou závažnosti polytraumatu u souboru pacientů. Vyšetřovali jsme též vztah mezi dynamikou sérových koncentrací NO a výsledným efektem z hlediska přežití.

## **III. 2. Soubor a metody**

### **III. 2. 1. Soubor**

Bylo vyšetřeno celkem 108 pacientů za období 30 měsíců. Z tohoto souboru splňovalo 93 pacientů kritéria polytraumatu. Jednalo se o pacienty se závažným krvácením, vzniklým na podkladě poranění nitrohruďných a nitrobřišních orgánů, zlomenin pánve a dlouhých kostí a jejich vzájemných kombinací. Byli klasifikováni pomocí metody ISS a rozděleni dle ISS a vývoje klinického stavu do čtyř základních skupin:

1. Pacienti s lehčím průběhem (ISS 16–25), tzv. skupina lehkých polytraumat, n=30
2. Pacienti se závažným průběhem (ISS>25), tzv. skupina těžkých polytraumat, n=40
3. Pacienti s kritickým průběhem s proběhlou resuscitací, tzv. skupina kritičtí, n=12
4. Pacienti zemřelí do 48 hod. po přijetí, tzv. skupina zemřelí, n=11

Zbývajících 15 pacientů nesplnilo kritéria pro zařazení do skupiny polytraumatu, byli na základě hodnocení ISS a klinického průběhu zařazeni do samostatné skupiny, označené jako nezávažně poranění.

Kontrolní skupina byla tvořena dvaceti dobrovolníky. Charakteristika vyšetřovaných skupin – viz tabulka 1.

**Tabulka 1. Charakteristika vyšetřovaných skupin**

Skupina	n	věk	% žen
nezávažně poranění	15	42±4	20
lehká polytraumata	30	39±3	17
těžká polytraumata	40	38±2	12
kritičtí	12	39±5	25
zemřelí	11	44±7	36
kontroly	20	34±3	67

Všichni pacienti byli léčeni lege artis, srovnatelným způsobem. U všech sledovaných jsme měřili CVP a MAP. Byl proveden odběr krve ke stanovení koncentrace NO, koagulačních parametrů, hemoglobinu, laktátemie a glykémie. Odběry byly prováděny při příjmu pacienta, dále v intervalech za 12, 24 a 48 hodin po přijetí.

### III. 2. 2. Stanovení koncentrací oxidu dusnatého (NO)

NO je extrémně reaktivní molekula, která ve vodním prostředí, tedy i v krvi, reaguje s kyslíkem za vzniku nitritů ( $\text{NO}_2^-$ ) a nitrátů ( $\text{NO}_3^-$ ). Koncentrace NO v séru byla tudíž stanovena jako suma NO, nitritů a nitrátů ( $\text{NO}_x$ ). Vzorokly byly vystaveny silně redukčnímu prostředí (kyselina chlorovodíková s chloridem vanaditým), čímž došlo ke kompletní konverzi nitritů a nitrátů na NO a ten pak byl strháván z kapalně do plynné fáze proudem inertního plynu a následně detekován chemiluminiscenční metodou (CLD 77 AM, ECO PHYSICS Switzerland) (Dillon *et al.*, 1996) (Hampl *et al.*, 1996). Při ní NO reaguje s ozónem, produkovaným v přístroji elektrickým výbojem, za vzniku  $\text{NO}_2$ , z něhož část je v excitovaném stavu. Při spontánním přechodu z excitovaného do základního stavu se uvolňuje foton. Intenzita takto emitovaného světla, které je přímo úměrně původnímu množství NO ve vzorku, se detekuje fotonásobičem. Vzhledem k tomu, že kalibrace přístroje se provádí plynným standardem NO, jsou výsledky uvedeny jako koncentrace NO v plynné fázi vstupující do přístroje (ppb, *parts per billion*, počet molekul NO na miliardu ostatních plynných molekul).

Vzorokly krve byly po odběru centrifugovány a sérum bylo zmrazeno na  $-60\text{ }^\circ\text{C}$ . Doba zpracování byla maximálně do 2 týdnů po odběru. Při vlastním měření jsme do reakční komory chemické aparatury aplikovali 7 ml 0,1M chloridu vanaditého v 2M kyselině chlorovodíkové. Pro přítomnost proteinů ve vzorku jsme přidali 300  $\mu\text{l}$  protipěněního roztoku. Aparatura, respektive reakční směs, byla zahřána na  $90\text{ }^\circ\text{C}$  a probublávána heliem. Přes pryžovou zátku bylo do reakční směsi vstříknuto 100  $\mu\text{l}$  vzorku (respektive 0,25 $\mu\text{l}$ ). Vznikající oxid dusnatý byl strháván heliem a přes chladič (kondenzace par kyseliny chlorovodíkové) a nádobku s roztokem hydroxidu sodného, který neutralizace zbytku par kyseliny chlorovodíkové, byl nasáván do analyzátoru. Zde reagoval s ozonem za vzniku oxidu dusičitého v excitovaném stavu.  $\text{NO}_2$  se vracel samovolně do základního stavu a zároveň vyzářil kvantum energie hv. Tato energie se v multiplikátoru znásobila a analyzátor z ní vypočítal koncentraci NO

v jednotkách ppb. (parts per billion oxidu dusnatého v plynném stavu). (Sievers analyzátor z plochy pod křivkou a kalibrační křivky vypočte koncentraci vzorku v  $\mu\text{M}$ ). Jedné molekule oxidu dusnatého, respektive dusičitého, odpovídá jedno kvantum energie. Tímto způsobem bylo možno stanovit celkový obsah NO, vzniklého ze všech dusičnanů, dusitanů i nitrothiolů ve vzorku.

Koncentraci NO-metabolitů v době přijetí ve všech vyšetřovaných skupinách jsme srovnávali s hladinami NO-metabolitů ve skupině zdravých dobrovolníků. U všech polytraumatizovaných jsme zaznamenávali změnu koncentrace NO-metabolitů ve výše stanovených časových intervalech.

Stejné hodnocení jsme provedli i u ostatních sledovaných parametrů (CVP, MAP, INR, Hb, glykémie a laktátemie).

### **III. 2. 3. Statistické zhodnocení**

Statistické zhodnocení výsledků bylo provedeno jednofaktorovou analýzou rozptylu (one-factor ANOVA), následovanou v případě potřeby Fisherovým post hoc testem. Při  $p < 0,05$  byl rozdíl považován za statisticky významný. Výsledky byly prezentovány jako průměr se střední chybou průměru ( $\pm$  SEM).

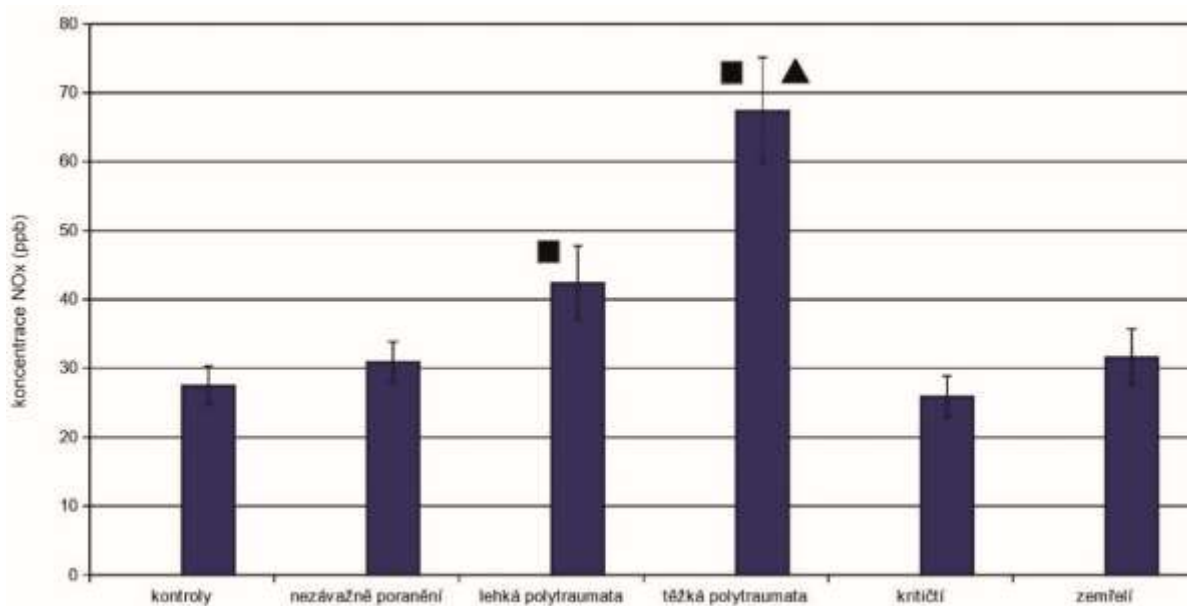
### **III. 3. Výsledky**

U skupiny nevýznamně poraněných nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl koncentrace NO-metabolitů při příjmu ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků ( $30,9 \pm 2,9$  vs.  $27,5 \pm 2,8$  ppb). U skupiny polytraumatizovaných s lehčím průběhem, tzv. lehká



polytraumata byla koncentrace NO-metabolitů při příjmu signifikantně vyšší než u skupiny zdravých dobrovolníků ( $42,4 \pm 5,4$  vs.  $27,5 \pm 2,8$ ).

U skupiny polytraumatizovaných pacientů se závažným průběhem (těžká polytraumata) byla koncentrace NO- metabolitů při příjmu prakticky 2x vyšší než koncentrace NO- metabolitů v séru zdravých dobrovolníků ( $67,9 \pm 7,7$  vs.  $27,5 \pm 2,8$ ppb). Hladiny NOx ve skupině těžkých polytraumat byly signifikantně vyšší než ve skupině, klasifikované jako lehká polytraumata. Překvapivě jsme nezaznamenali signifikantní rozdíl mezi skupinou kritických pacientů oproti kontrolní skupině ( $25,9 \pm 3,0$  vs  $27,5 \pm 2,8$  ppb). Stejný závěr platí pro skupinu zemřelých ( $31,6 \pm 4,1$  vs  $27,5 \pm 2,8$  ppb) (Graf1).



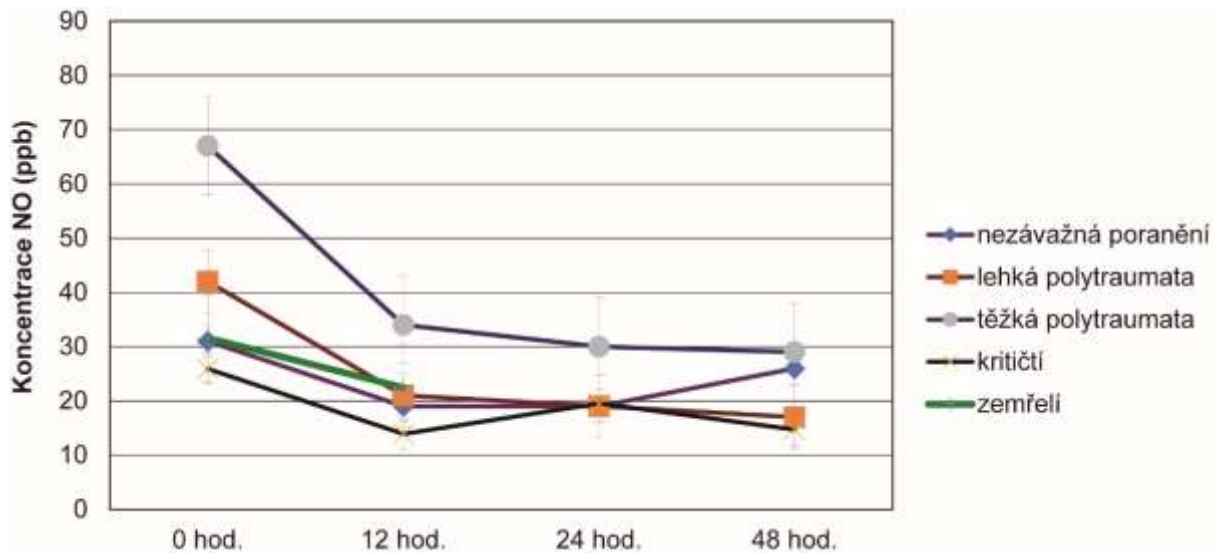
**Graf 1: Srovnání skupin poraněných dle vstupní koncentrace NOx.** Lehké a zvláště těžké polytrauma způsobuje signifikantní elevaci sérové koncentrace NOx. Koncentrace NOx zůstává v normě u pacientů, kteří prodělali kritický průběh s kardiopulmonální resuscitací nebo zemřeli v časném období do 48 hodin po přijetí.

Kontroly – zdraví dobrovolníci, nezávažně poranění- pacienti s ISS<16, lehká polytraumata- pacienti s lehčím průběhem (ISS mezi 16- 25), těžká polytraumata - pacienti s těžkým průběhem (ISS > 25), kritičtí- pacienti s kritickým průběhem, vyžadující kardiopulmonální resuscitaci nebo vysokoobjemovou substituci, zemřelí – pacienti zemřelí do 48 hodin po přijetí.

■ P<0,05 vs. kontroly

▲ P<0,05 lehká vs. těžká polytraumata

U všech skupin s s elevovanými sérovými koncentracemi NOx v čase přijetí dosáhly hodnoty NOx normálu (tzn. nebyly zachyceny statisticky významné rozdíly oproti kontrolní skupině) při měření ve 12. hodině po přijetí. Do 12 hodin po přijetí tedy vymizely i ty rozdíly mezi skupinami, které byly při přijetí statisticky významné. (Graf 2)

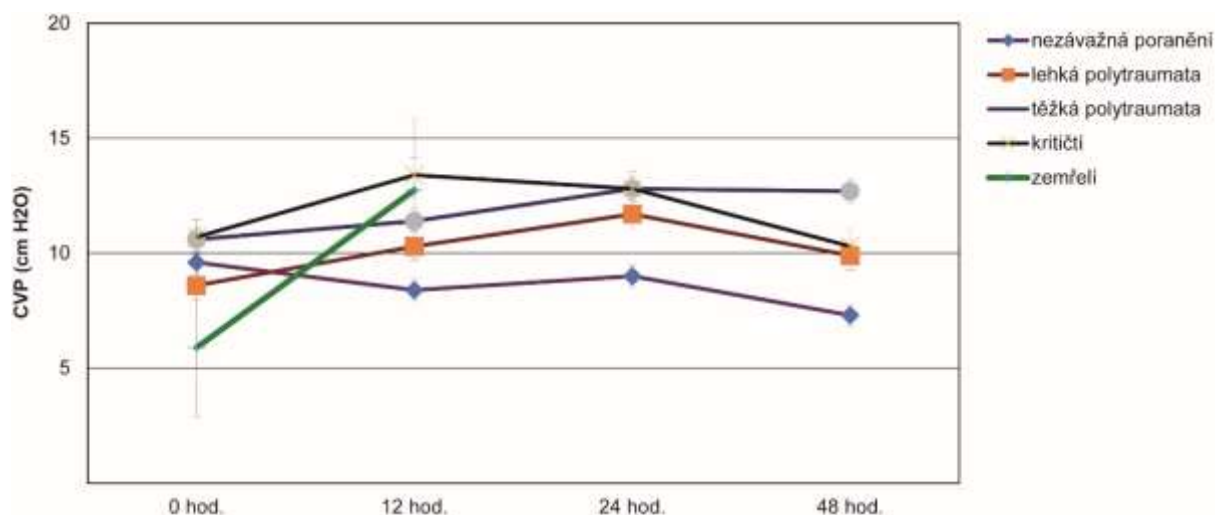


**Graf 2: Časový průběh koncentrace NO.** Koncentrace sérového NO<sub>x</sub> se normalizuje do 12 hodin ve všech skupinách poraněných.

Legenda jako u grafu 1. Statistické rozdíly mezi skupinami v čase 0 jsou patrné na grafu 1.

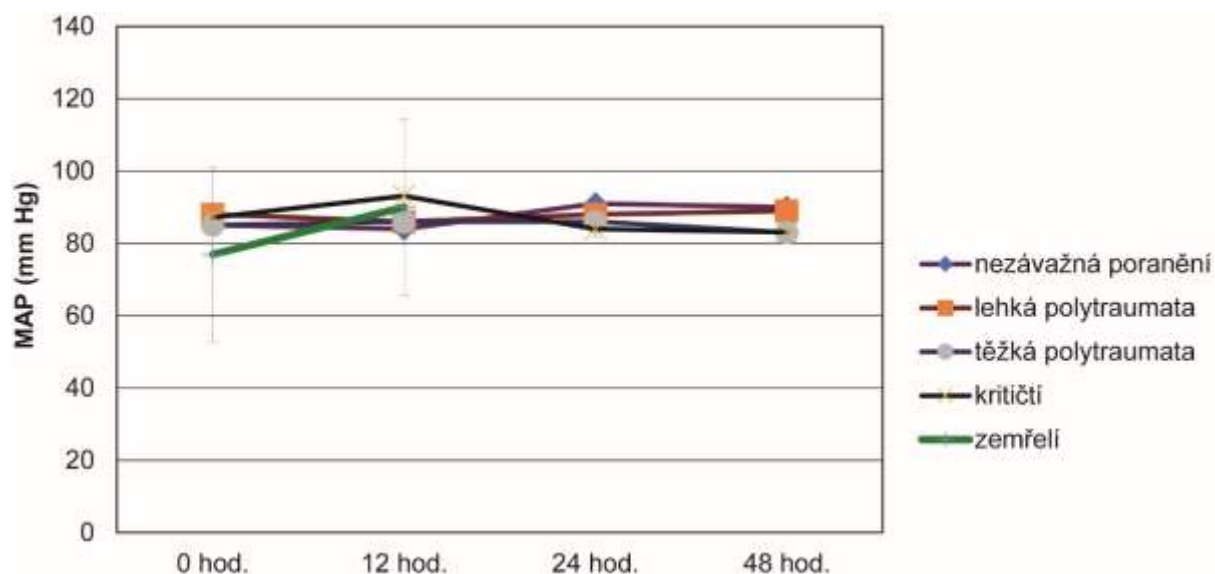
V ostatních intervalových měřeních již není statisticky významný rozdíl mezi skupinami.

Během studie jsme nenalezli zásadnější rozdíly v hodnotách centrálního žilního tlaku (CVP) (Graf 3) a středního arteriálního tlaku (MAP) (Graf 4). Vývoj hodnot v čase u obou parametrů spíše dokumentoval adekvátnost terapeutických opatření k udržení oběhové stability.



**Graf 3: Časový průběh hodnot centrálního venózního tlaku (CVP).** Hodnoty CVP nevykazovaly žádné specifické závislosti s ohledem na závažnost poranění.

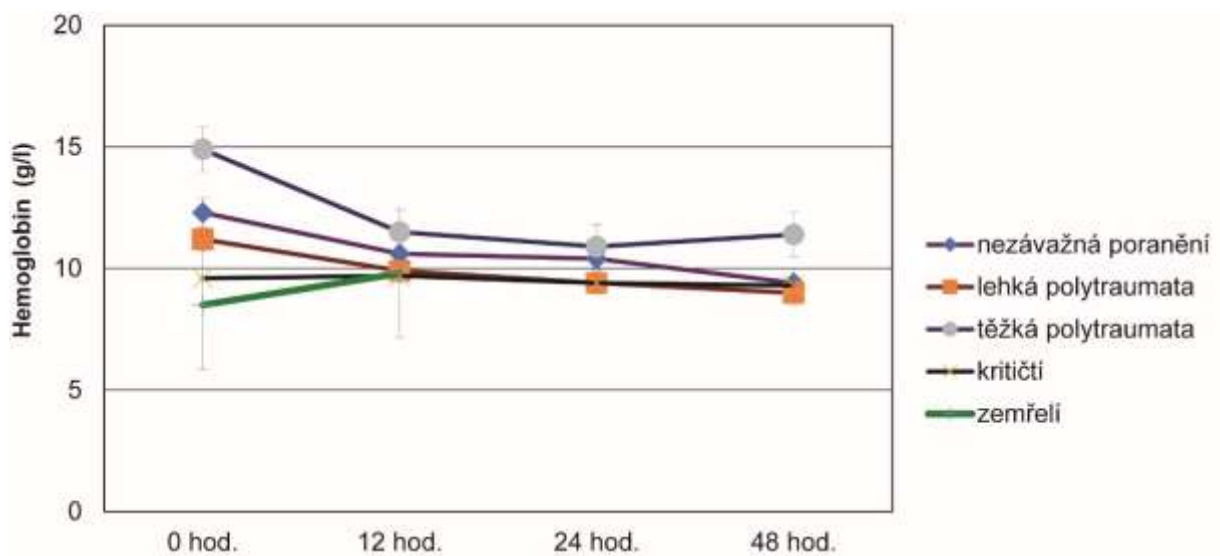
Legenda jako u grafu 1. Vstupní hypotenze se vyskytovala u časně zemřelých, ale nikoliv u kritických a těžkých polytraumat.



**Graf 4: Časový průběh středního arteriálního tlaku (MAP).** Hodnoty MAP opět nevykazovaly žádné specifické závislosti s ohledem na závažnost poranění, v časovém průběhu spíše dokumentovaly adekvátnost volumové terapie k udržení oběhové stability.

Legenda jako u grafu 1.

Hodnoty hemoglobinu poskytovaly obdobnou informaci. Je známo, že i masivní krvácení má zprvu velmi malý odraz v hodnotách vyšetřovaného krevního obrazu díky symetrické ztrátě plazmy a buněčné frakce. Tento fakt byl zřejmě důvodem, proč byly pozorovány malé odchylky ve vstupních vyšetřeních. Během následujících časových intervalů hodnoty Hb spíše reflektovaly substituci krevními náhradami. Hodnoty Hb se pohybovaly v rozptylu 8,5 – 10,8g/dl (Graf 5).

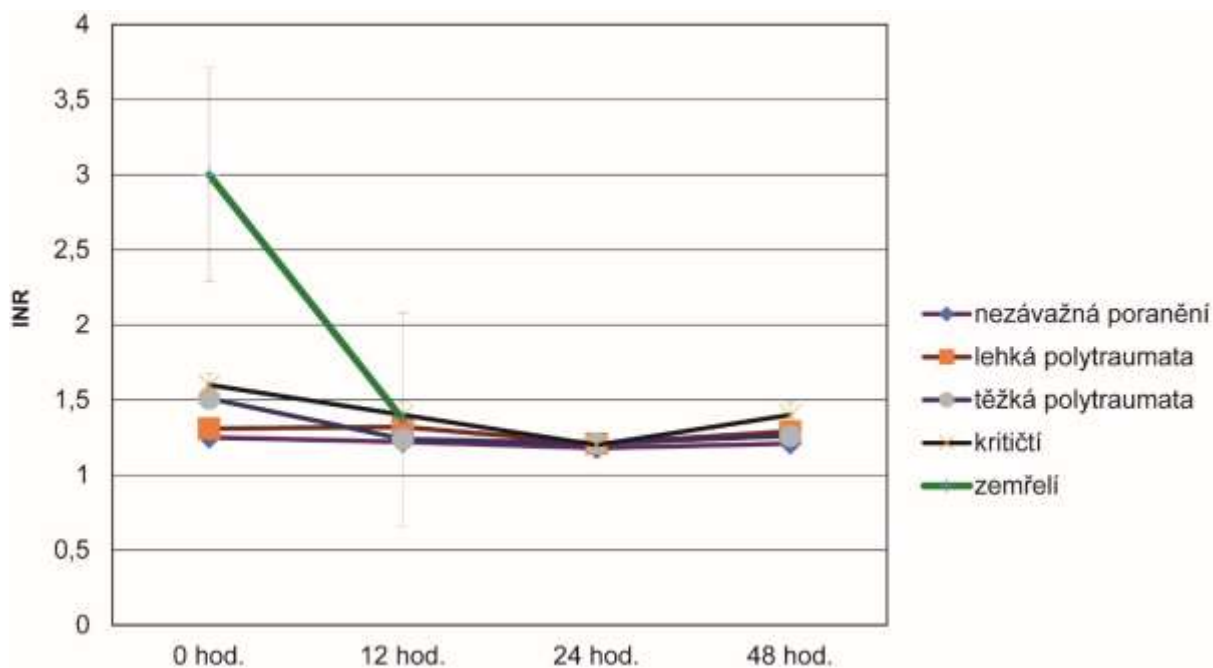


**Graf 5: Časový průběh hodnot hemoglobinu.** Hodnoty koncentrace hemoglobinu též nevykazovaly žádné specifické závislosti s ohledem na závažnost poranění.

Legenda jako u grafu 1. Vstupní anémie se vyskytovala u časně zemřelých a kritických, nikoliv u těžkých polytraumat, kde hodnoty hemoglobinu vzbuzovaly spíše dojem hemokoncentrace.

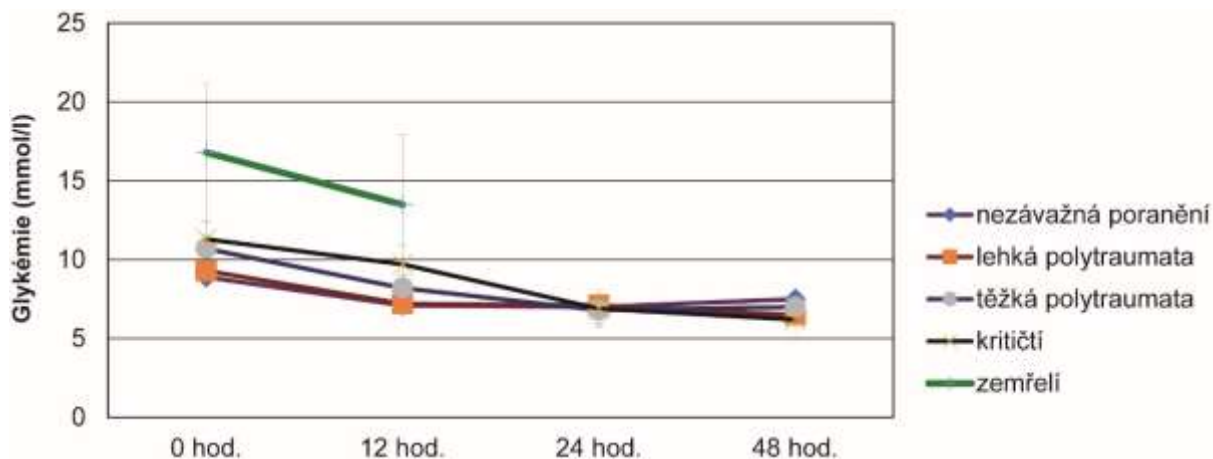
INR (international normalized ratio, mezinárodní normalizovaný poměr) je způsob vyjádření Quickova testu, tj. testu vnější a společné cesty koagulace, při němž je zjišťována rychlost přeměny protrombinu na trombin v důsledku působení tkáňového tromboplastinu. INR je poměr naměřeného času pacienta a normální hodnoty kontrolní plazmy). Vyšetření INR jako ukazatele vstupní úrovně koagulace nepřineslo žádné překvapení kromě výrazně patologických

vstupních hodnot ve skupině časně zemřelých. Hodnoty INR se pohybovaly kolem 3,0 u skupiny časně zemřelých a 1,8 u skupiny kriticky poraněných. U všech ostatních skupin s poraněním byly hodnoty INR na horní hranici normy (za normální je považováno rozmezí 0,9–1,3) (Graf 6).



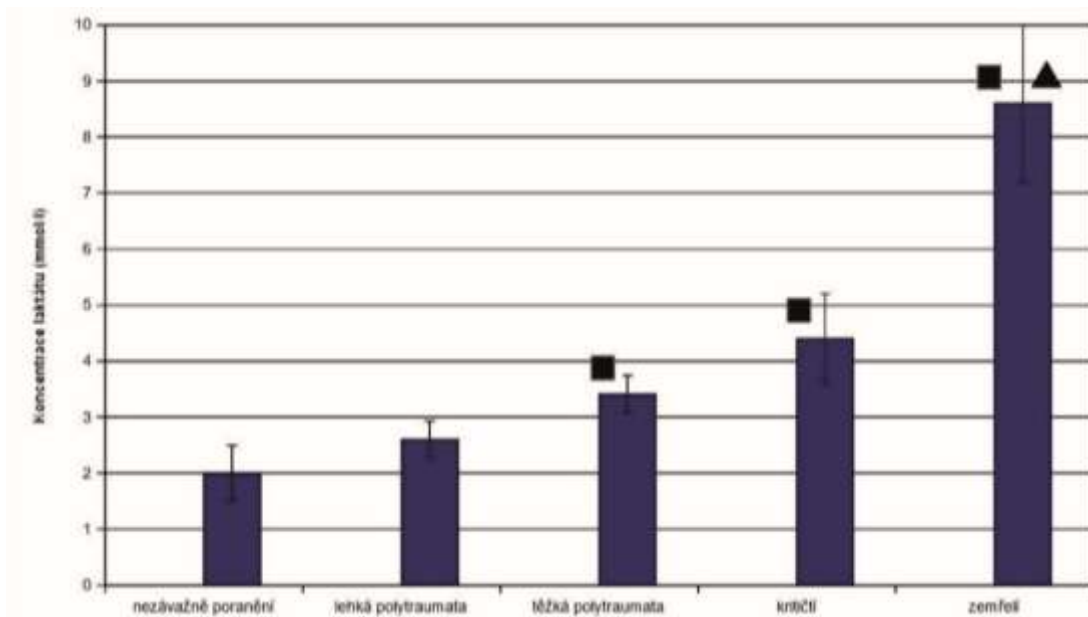
**Graf 6: Časový průběh INR.** Vstupní hodnoty INR byly zvýšeny výrazně u kritických, excesivně u časně zemřelých. U ostatních skupin se pohybovaly na horní hranici normálních hodnot. V dalším průběhu došlo vlivem terapie k tendenci k normalizaci hodnot.

Sérové hladiny glykemie byly dle očekávání elevovány nad normu ve všech skupinách poraněných, velmi výrazně ve skupině zemřelých (Graf 7).



**Graf 7: Časový průběh hodnot glykémie.** Vstupní hodnoty glykémie byly elevovány ve všech skupinách zraněných, excesivně pak ve skupině zemřelých. V dalším časovém průběhu je patrný vliv terapeutické kompenzace s trendem k normalizaci hodnot.

Sérové koncentrace laktátu v čase přijetí vykazovaly podobný trend jako koncentrace NOx, kromě zásadního rozdílu nálezu zvýšených hodnot u skupiny kriticky poraněných a nejvyšších hodnot u skupiny zemřelých. Iniciální hodnoty laktátu v séru u skupiny pacientů s těžkým poraněním byly více jak 2x vyšší než u kontrolní skupiny (normální hodnoty 0,6-2,4 mmol /l). U skupiny kriticky poraněných s letálním průběhem byly zachyceny koncentrace šestinásobné oproti kontrolní skupině. (Graf 8). Koncentrace sérového laktátu poklesly během prvního dne po poranění ve všech skupinách. (Graf 9).

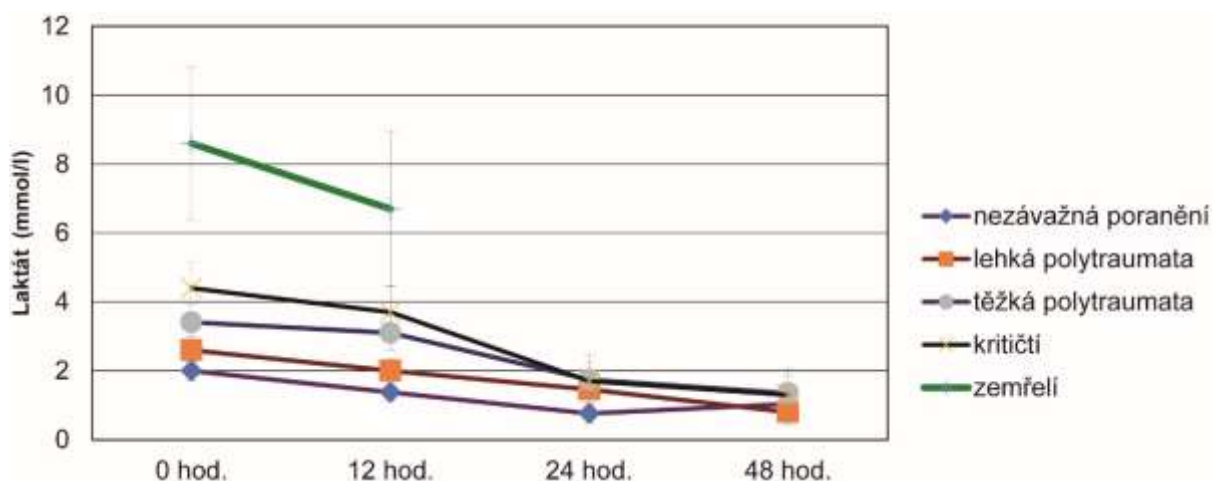


**Graf 8: Srovnání skupin poraněných dle vstupní koncentrace laktátu.** Sérové hladiny laktátu při přijetí vzrůstají proporcionálně s tíží polytraumatu.

Legenda jako u grafu 1.

■  $P < 0,05$  vs. nevýznamně poranění

▲  $P < 0,05$  vs. všechny skupiny



**Graf 9: Časový průběh hodnot laktátu.** Pokles sérového laktátu ve všech skupinách poraněných pacientů během prvního dne po poranění, ve skupině zemřelých zůstává v oblasti vysokých hodnot.

\* zemřelí vs. kritičtí, P- Value = 0,0236



### III. 4. Diskuze

Hypotézu, že sérová hladina NO<sub>x</sub> u polytraumatizovaných pacientů v době přijetí koreluje s prognózou následného průběhu, potvrdila naše data pouze částečně. Hladina NO<sub>x</sub> se zvyšovala u polytraumatizovaných až do kategorie těžkého polytraumatu, oproti tomu zůstávala překvapivě v normálních hodnotách u kriticky poraněných s resuscitací v časném průběhu a u pacientů zemřelých do 48 hodin po přijetí. Tento posledně jmenovaný aspekt je poměrně obtížné vysvětlit ve světle znalostí o chování NO při tkáňovém poškození. Hypoteticky by mohlo jít o vážný energetický deficit u těžkého šoku, který by vedl k relativní inaktivitě NO syntetázy. Další možností by byla inaktivace NO v prudké reakci s kyslíkatými radikály za vzniku peroxynitritu, který není detekovatelný chemiluminiscenční metodou. Tato varianta byla předmětem našeho dalšího výzkumu a zpracována v experimentální části.

Rapidní pokles hodnot koncentrace NO<sub>x</sub> v intervalu 0-12 hodin ve všech přeživších skupinách, kde byly koncentrace při příjmu pacientů elevovány, též není zcela jasný, ale podobná situace byla zachycena též u glykemie a zejména laktátu.

Zde je možno uvažovat s vysokou pravděpodobností o efektu terapie včetně objemové resuscitace. Tímto způsobem by bylo možno vysvětlit rozpor s publikovanými závěry Huanga a kolektivu (Huang *et al.*, 2003), kteří ve studii traumatického šoku u potkanů demonstrovali elevaci NO<sub>x</sub> s následujícím plateau do 24 hodin po traumatu, resp. po traumatu s resuscitací. Mezi modelovou situací a způsobem resuscitace u laboratorního zvířete a realitou traumatu s následnou intenzivní léčbou u lidí je však jistě rozdíl, který by tuto diskrepanci mohl vysvětlit.

U polytraumatu lze očekávat s ohledem na potenciální šokový stav hypotenzi a snížené hodnoty centrálního žilního tlaku (CVP). Pacienti z naší studie byli z místa nehody transportováni k přijetí rychlou záchrannou službou s adekvátní objemovou substitucí náhradními roztoky, proto hodnoty MAP i CVP nevykazovaly žádné specifické závislosti s

ohledem na závažnost poranění. V časovém průběhu spíše rovněž dokumentovaly adekvátnost volumové terapie k udržení oběhové stability, tentokrát v průběhu resuscitační, resp. intenzivní péče v nemocnici.

Ostatní měřené parametry, trendy glykemie, INR a zvláště laktátu nebyly bez zajímavosti.

U závažnějších traumat bývá pozorována hyperglykemie, která má multifaktoriální podklad. Spočívá v supresi sekrece insulinu katecholaminy prostřednictvím stimulace  $\alpha$ -receptorů a zároveň ve zvýšeném uvolňování glukagonu stimulací  $\beta$ -receptorů. V těchto situacích se uplatňuje i glykogenolýza a glukoneogeneza (Hill et Hill, 1998). Bývá pozorována i periferní inzulinová rezistence (Singer *et al.*, 2004). Některé cytokiny (TNF-  $\alpha$  a IL-1  $\beta$ ) stimulují glukózový transportní systém (inzulin-like aktivita). V souladu s výše uvedenými poznatky byly i v naší studii vstupní hodnoty glykemie elevovány ve všech skupinách zraněných, excesivně pak ve skupině zemřelých.

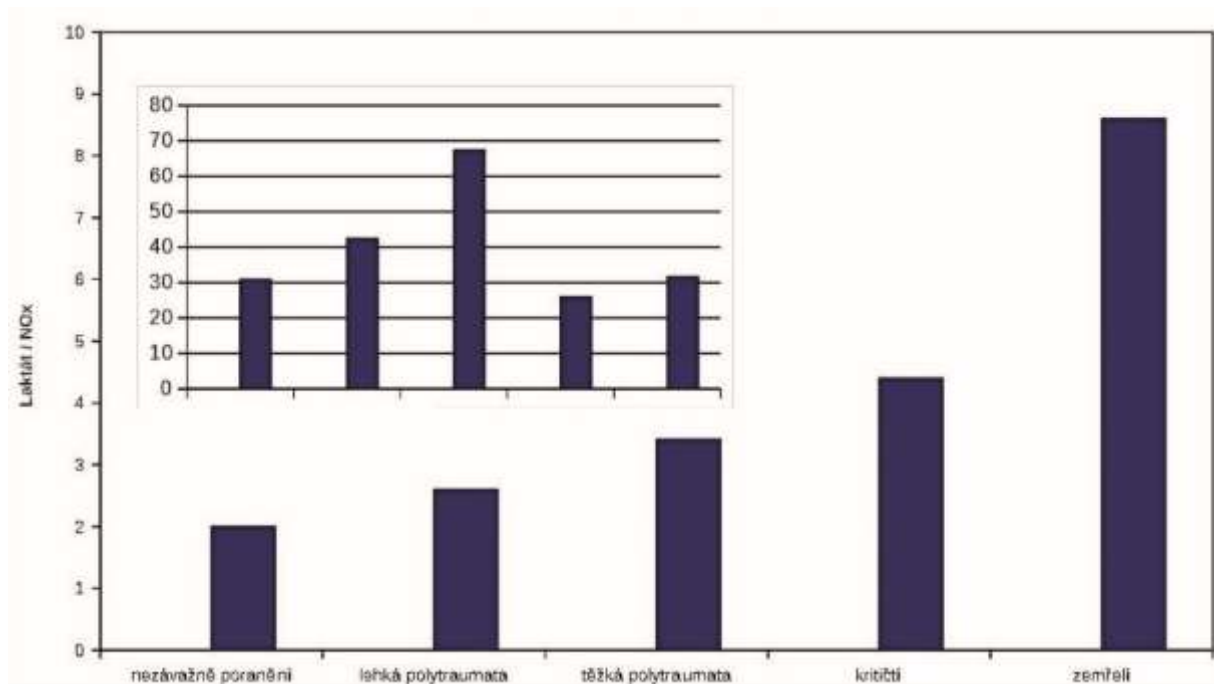
Vstupní hodnoty INR byly zvýšeny výrazně u kritických, excesivně u časně zemřelých. U ostatních skupin se pohybovaly na horní hranici normálních hodnot. V dalším průběhu došlo vlivem terapie k tendenci k normalizaci hodnot. Bohužel, glykemie ani INR nemohou sloužit jako ukazatel tkáňového poškození z důvodů možných poruch před úrazem (nutno znát anamnestická data o eventuálním diabetu v případě glykemie či o koagulopatiích, resp. užívání antikoagulační terapie v případě INR).

Nicméně naše výsledky v případě laktátu jsou slibné, neboť s tíží polytraumatu vzrůstala koncentrace laktátu. Sérová koncentrace laktátu může sloužit jako marker závažnosti polytraumatu s prediktivní hodnotou. Hodnoty laktátové clearance mohou předpovídat pravděpodobnost přežití. V Abramsonově studii (Abramson *et al.*, 1993) přežili všichni pacienti, u kterých došlo k normalizaci laktátu do 24 hodin. Jestliže došlo k normalizaci hladiny laktátu mezi 24. až 48. hodinou, bylo procento přežití 75 %. To znamená, že čas nutný k normalizaci hladiny laktátu je důležitým prognostickým faktorem pro přežití závažně poraněných pacientů.

Ve shodě s tímto postulátem ukazuje náš graf (Graf 9) přetrvávající vysoké hodnoty koncentrace laktátu též ve 12. hodině po přijetí u skupiny pacientů, kteří nepřežili 48 hodin po přijetí.

Výsledky naší práce připouštějí možnost interpretovat hodnoty sérové koncentrace NOx jako časný marker závažnosti poškození po polytraumatu s významnou prognostickou hodnotou. Vzestup koncentrace svědčí pro poměrně závažné poranění s možností četných komplikací. Na druhé straně, mírná nebo dokonce žádná elevace koncentrace NOx ihned v iniciálním vyšetření u pacienta v klinicky vážném stavu může poukazovat na vysoké riziko letálního průběhu.

Pro prognostické účely je ještě zajímavější možnost použití kombinace iniciálních sérových koncentrací NOx a laktátu (Graf 10). Shodná elevace NOx a laktátu upozorňuje na potenciálně závažný průběh. Kombinace nálezu prakticky normální hladiny NOx a excesivně vysoké hladiny laktátu u polytraumatizovaného pacienta poukazuje na možnost vysoce kritického až fatálního průběhu.



**Graf 10: Kombinace iniciálních sérových koncentrací NOx a laktátu.**

Byl zaznamenán obdobný nárůst koncentrací NOx i laktátu až do kategorie těžkých polytraumat, ve skupinách kritických a zemřelých se objevila zásadní diference mezi laktátem a NOx.

### III. 5. Závěr klinické části

- prokázali jsme nárůst koncentrace NO<sub>x</sub> v závislosti na závažnosti polytraumatu pouze do kategorie těžkých polytraumat. Překvapivě velmi nízké vstupní koncentrace NO<sub>x</sub> byly shledány u časně zemřelých a kriticky přežívajících (ISS>25, epizoda selhání vitálních funkcí...), tedy u kategorií s nejtěžším postižením.
- není jasná příčina rapidního časného poklesu koncentrace NO<sub>x</sub> ve všech skupinách polytraumatizovaných; podobná situace však byla zachycena i v případě laktátemie.
- prognostickou hodnotu má vztah vstupní koncentrace NO<sub>x</sub> a koncentrace laktátu. U těžce polytraumatizovaných byly nalezeny vysoké vstupní koncentrace NO<sub>x</sub> spolu s vysokými koncentracemi laktátu. Naproti tomu u skupiny časně zemřelých a hraničně přežívajících byly vysoké vstupní koncentrace laktátu doprovázeny nízkými koncentracemi NO<sub>x</sub>. Tato korelace by mohla sloužit jako selektivní prognostický a hlavně varovný marker. Zatímco u polytraumatizovaného pacienta dokumentují vysoké vstupní koncentrace laktátu a zároveň NO<sub>x</sub> těžký stav, pak nález vysoké vstupní koncentrace laktátu a nízké koncentrace NO<sub>x</sub> by mohl varovat před kritickým průběhem (Graf 10).

## IV. Experimentální část

### IV. 1. Úvod

Skutečnost, že jsme v práci u polytraumatizovaných pacientů našli částečný vztah mezi vzestupem koncentrací NOx při příjmu a závažností poranění, byla ve shodě s předpokládaným chováním NOx při tkáňovém poškození. Zcela neočekávaným byl však nález nevýznamné, respektive žádné elevace NOx u kriticky poraněných s proběhlou kardiopulmonální resuscitací a u časně zemřelých následkem poranění do 48 hodin po příjmu. Jejich sérové koncentrace NOx nebyly statisticky odlišné od hodnot kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků. Jedním z možných vysvětlení tohoto paradoxu by byla možnost prudké inaktivace NO při reakci se superoxidem, radikálem produkovaným ve velkém množství během časně fáze zánětlivé odpovědi na trauma (Aller *et al.*, 2004). Pokud by toto vysvětlení bylo validní, pak by se nízké hladiny NOx neměly projevit, pokud by bylo preventivně zabráněno reakci „superoxid – NO“ za vzniku peroxynitritu, například použitím účinných antioxidantů.

Abychom prověřili tuto hypotézu, použili jsme model polytraumatu u potkanů a měřili sérové koncentrace NOx s použitím a bez použití aplikovaného N-acetyl-L-cysteinu (NAC). NAC jakožto prekurzor glutathionu je znám jako významný ochránce organismu proti oxidativnímu stresu (Zhang *et al.*, 2011; Halliwell 2012; Koekkoek et van Zanten, 2016; Preiser 2012; Lachmanová *et al.*, 2005). Též ze studií o ischemicko-reperfúzním poškození je známo, že při těchto lézích dochází k významnému poklesu thiolových skupin a glutathionu. Preventivní podávání NAC v těchto případech způsobilo významný vzestup glutathionu (Bone 1996).

## IV. 2. Soubor a metody

### IV. 2. 1. Soubor

Byly použity 3 skupiny dospělých samců potkana kmene Wistar bez rozdílu hmotnosti mezi skupinami (BW 444-570 g). Pokus byl veden ve shodě s principy Etické komise instituce v souladu se standarty Evropské Unie.

Všechny procedury byly prováděny v hluboké celkové anestézii intraperitoneálně (IP) aplikovaným ketaminem (100mg/kg), spolu s xylazinem (16mg/kg).

V jedné skupině (CA, n=6) byly krevní vzorky pro stanovení koncentrace NOx (a hematokritu, hct) získávány cestou kanylace karotické arterie před a po založení experimentálního polytraumatu (měření pre-PT a post PT). Katetr byl využíván ke sledování systémového arteriálního tlaku (SBP). Ve druhé skupině byl proces identický, pouze byl intraperitoneálně aplikován vodný roztok NAC (400 mg/kg) (Akabay *et al.*, 1999) při zahájení anestézie (CA+NAC, n=6).

S ohledem na skutečnost, že sama kanylace karotické arterie s preparací tkání představuje jistý stupeň poranění tkání, byla vytvořena třetí skupina ke zhodnocení tohoto faktu. Krevní vzorky byly u této skupiny (LV, n=6) získány punkcí levé komory srdeční přes hrudní stěnu, rovněž v identické celkové anestézii.

Polytrauma bylo představováno bilaterální frakturou femurů a tibií (Ban *et al.*, 2008). Pro naplnění definice a přiblížení podmínkám u pacientů bylo rozšířeno o nastřížení pravého laloku jaterního při laparotomii. Krevní ztráta byla sledována poklesem krevního systolického tlaku. Vzorky krve pro vyšetření NOx v kategorii post PT byly odebírány v okamžiku poklesu hodnot tlaku na polovinu výchozích hodnoty.

## **IV. 2. 2. Stanovení koncentrací oxidu dusnatého (NO)**

Sérové koncentrace NO<sub>x</sub> byly vyšetřeny chemiluminiscenční metodou (analyzátor Sievers NOA 270) po horké kyselé redukci, jak bylo popsáno v klinické části, a vyjádřeny jako ppb oxidu dusnatého v plynné frakci.

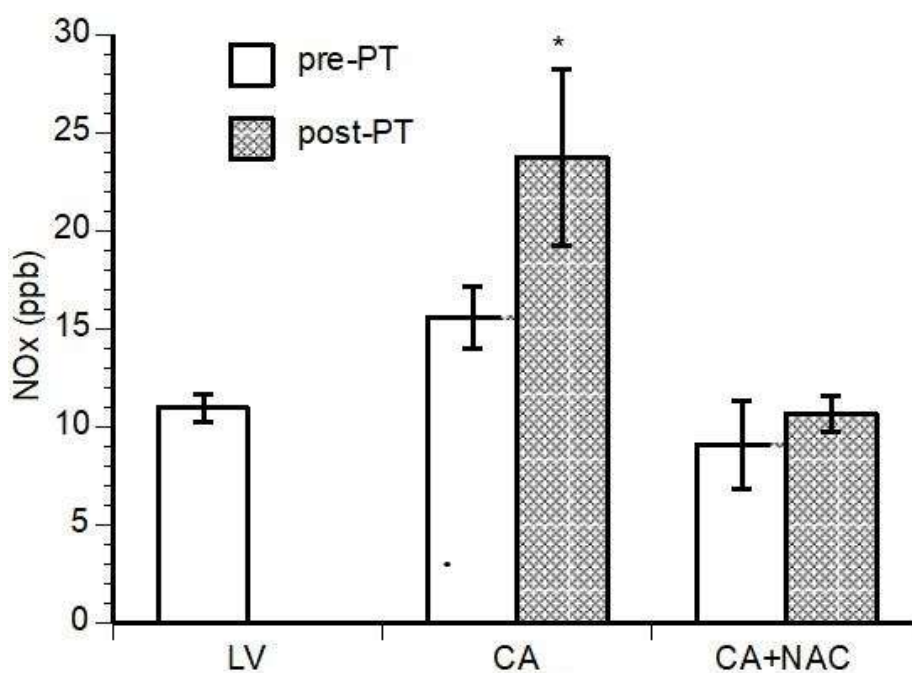
## **IV. 2. 3. Statistické zhodnocení**

Data byla statisticky zpracována za použití softwaru GraphPad Prism 6. Zhodnocení výsledků bylo provedeno analýzou rozptylu s Tukeyovým post hoc testem, popřípadě nepárovým testem. Při  $p < 0,05$  byl rozdíl považován za statisticky významný. Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty se střední chybou ( $\pm$  SEM).



### IV. 3. Výsledky

- Ve skupině LV (vzorky získané punkcí levé komory) byla zjištěna sérová koncentrace NO<sub>x</sub>  $11.0 \pm 0.7$  ppb. Kanylace karotické arterie představovala tendenci k nárůstu koncentrace NO<sub>x</sub> ( $15.6 \pm 1.6$  ve skupině CA pre-PT), avšak rozdíl nebyl statisticky signifikantní.
- Experimentální polytrauma podle očekávání vedlo k signifikantní elevaci hladiny NO<sub>x</sub> ( $23.8 \pm 4.5$ ); (Obr. 1). Aplikace NAC v okamžiku úvodu do anestézie měla za následek snížení koncentrace NO<sub>x</sub> v kategorii prePT ( $9.1 \pm 2.2$  ppb oproti  $15.6 \pm 1.6$  ve skupině bez NAC).
- NAC také zabránil vzestupu koncentrace NO<sub>x</sub> po polytraumatu. (Graf 11)
- Aplikace NAC neovlivnila ani systolický tlak krve ( $68.5 \pm 3.8$  mmHg ve skupině CA,  $73.5 \pm 5.0$  mmHg ve skupině CA+NAC), ani hematokrit ( $42.5 \pm 0.9$  % ve skupině CA,  $41.3 \pm 0.7$  ve skupině CA+NAC).



**Graf 11: N-acetyl-L-cystein (NAC) brání nárůstu sérové koncentrace NOx v podmínkách experimentálního polytraumatu**

LV = skupina, kde byly vzorky krve získány punkcí levé komory srdeční.

CA = skupina, kde byly vzorky krve získány při kanylaci karotické arterie

CA+NAC = skupina, kde byly vzorky krve získány při kanylaci karotické arterie po podání NAC.

pre-PT = měření získané před založením polytraumatu

post-PT = měření v čase, kdy sledovaný krevní tlak poklesl na 50 % výchozí hodnoty po založení experimentálního polytraumatu. \*P<0.05

## IV. 4. Diskuze

Hlavním nálezem naší studie je zjištění preventivního účinku NAC proti elevaci hladiny NOx v podmínkách experimentálního polytraumatu. Experiment na potkanech také potvrdil naše předchozí zjištění u lidských pacientů, že změny sérové koncentrace NOx by mohly být časným ukazatelem závažnosti klinického průběhu u polytraumatizovaných pacientů.

Naše pozorování, že proces preparace při kanylaci karotické arterie neovlivní signifikantně hladinu NOx, koresponduje s naším předchozím zjištěním u pacientů, že pouze závažnější, nikoliv nezávažné poranění ovlivní koncentraci sérové NOx. Z hlediska praktického využití je příhodné, že se NOx jeví jako selektivní marker pouze závažných, nikoliv drobnějších poranění. Tento fakt společně se signifikantní elevací koncentrace NOx po experimentálním polytraumatu potvrzují tuto selektivitu pro závažné tkáňové poškození.

Studie na potkanech nereflektuje naše klinické pozorování u pacientů, kdy sérová koncentrace NOx vzrůstala do kategorie těžkých polytraumat, zatímco u nekritičtějších zůstala v hodnotách, srovnatelných s hodnotami kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků.

Tato diskrepance není vysvětlitelná z našich dat, ale je možná vysvětlitelná rozdílností v metodologii. U pacientů měly hladiny NOx prediktivní hodnotu pouze v období příjmu pacienta do traumacentra, ale ne již později. Faktem je, že se naše experimentální zvířata dostala po polytraumatu do velmi vážného stavu, kdy krevní tlak v okamžiku měření NOx (post-PT měření) klesl na 50 % výchozích hodnoty. U experimentálních zvířat byly hodnoty po traumatu měřeny pouze v období těžkého stavu. K diskrepancím mohou přispět i rozdíly v přístupu stran terapie. Zatímco je pacientům již v režii záchranné služby často poskytnuta masivní tekutinová podpora, experimentální zvířata byla ponechána bez podpory. Na druhou stranu bylo experimentální polytrauma z etických důvodů založeno v hluboké celkové anestézii, zatímco

u pacientů vzniklo samozřejmě nativně, tudíž s masivní účastí bolesti a reakce centrálního nervového systému. Nelze tedy oba základní soubory plně ztotožnit.

Aplikace NAC působí kompletně preventivně proti elevaci hladiny sérových NOx po polytraumatu. Tento výsledek zcela jasně vyvrací hypotézu, že vysoká koncentrace superoxidu je odpovědná za redukcí koncentrace NOx, jakou jsme pozorovali u pacientů po extrémním polytraumatu. Pokud by měla být hypotéza pravdivá, pak by aplikace NAC spíše potencovala než redukovala hladinu NOx. Naše výsledky naznačují opačnou kauzalitu – reaktivní formy kyslíku jsou nezbytné pro elevaci NOx u polytraumatu. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je, že superoxid (nebo jiné reaktivní formy kyslíku), produkovaný během zánětlivé buněčné aktivace během polytraumatu indukuje masivní produkci NO. Produkce NO musí být skutečně vysoká, když se interakce se superoxidem k vyvážení tohoto efektu jeví jako insuficientní. Nejpravděpodobnějším zdrojem masivní produkce NO je inducibilní izoforma NO syntázy.

Mnohé buňky, které exprimují tento enzym, jsou sensitivní k oxidativnímu stresu (Preiser 2012). Oxidativní stres je definován jako nepoměr mezi vzrůstajícími hladinami reaktivních forem kyslíku (ROS) a nízkou aktivitou antioxidantních mechanismů. Vzrůstající oxidativní stres může indukovat poškození buněčných i tkáňových struktur. Nicméně ROS jsou nutné pro adekvátní buněčné funkce, včetně produkce energie v mitochondriích. Narůstající oxidativní stres se může projevovat za ještě fyziologických podmínek jako např. při stárnutí, ale i za závažných patologických stavů, včetně nádorového bujení, neurodegenerativních chorob, kardiovaskulárních nemocí, diabetu, zánětlivých chorob i intoxikací.

Důležitou praktickou otázkou je, zda naše závěry o roli NAC mohou mít praktické využití. Sérová koncentrace NOx může sloužit jednak jako marker závažnosti poranění, ale zároveň může hrát patogenetickou roli v konsekvencích patologických změn po polytraumatu. Pokud je to pravda, pak by mohla augmentace antioxidantovou obranou, např. pomocí NAC, látkou již v klinice užívanou, zlepšit prognózu pacientů s těžkým polytraumatem. To je jistě

možné, protože vysoká produkce silně reaktivního NO je odpovědná za poškození proteinů, lipidů i DNA. Zároveň by se jednalo i o využití primárního efektu antioxidantů, t.j. ovlivnění produkce toxických reaktivních forem kyslíku a zejména následného společného produktu – vysoce toxického peroxynitritu (Pacher *et al.*, 2007), jehož působením dochází k rozvoji vaskulární dysfunkce, klinicky se manifestující generalizovaným edémem, kapilárním únikem, poruchami buněčného metabolismu a buněčným edémem. Indukuje i peroxidaci lipidů buněčných membrán a poškození DNA s následnou apoptózou a nekrózou endoteliálních, parenchymových i imunitních buněk. Další výzkum v této oblasti je žádoucí.

## **IV. 5. Závěr experimentální části**

Hypotéza o absenci elevace NO<sub>x</sub> u nejtěžších forem polytraumatu díky eliminaci NO při prudké reakci se superoxidem nebyla potvrzena.

V podmínkách experimentálního polytraumatu u laboratorních potkanů jsme prokázali elevaci koncentrací NO<sub>x</sub> po významném tkáňovém poškození. Tuto elevaci je možno kompletně eliminovat reakcí s antioxidantně působícím NAC.

Tato skutečnost naznačuje postulát, že produkce reaktivních forem kyslíku je nezbytná pro nárůst koncentrace NO po polytraumatu.

## V. Závěr

V klinické části práce jsme potvrdili hypotézu, že změny koncentrace oxidu dusnatého splňují podmínky časného markeru poškození organismu při polytraumatu. Elevace hladin NO (resp. jeho metabolitů) stoupala s tíží poranění. U nejkritičtějších však zůstávala beze změn oproti nálezům u kontrolní skupiny zdravých jedinců. V těchto případech měla významnou výpovědní hodnotu kombinace nálezů NOx a laktátu. Zatímco u polytraumatizovaného pacienta dokumentují vysoké vstupní koncentrace laktátu a zároveň NOx těžký stav, pak nález vysoké vstupní koncentrace laktátu a nízké koncentrace NOx by měl varovat před kritickým průběhem. Ve snaze vysvětlit zvláštní chování NOx u nejtěžších stavů jsme testovali hypotézu o možné inaktivaci NO při prudké reakci NO se superoxidem ze vzniku toxického peroxyinitritu, který není detekovatelný chemoluminiscenční metodou. Tato hypotéza však nebyla potvrzena, naopak byla prokázána nutnost přítomnosti reaktivních kyslíkatých látek pro produkci NO.

N- acetylcystein, který je znám jako antioxidant a ochranná látka proti oxidativnímu stresu, potlačil zároveň produkci oxidu dusnatého, který je ve vysokých koncentracích odpovědný za poškození proteinů, lipidů i DNA.

Nabízí se úvaha o jeho klinickém použití i u polytraumatu při prevenci komplikací s cílem zlepšení prognózy.

# Literatura

ABRAMSON D, SCALEA TM, HITCHCOCK R, TROOSKIN SZ, HENRY SM, GREENSPAN J: Lactate clearance and survival following injury. J Trauma 1993 Oct;35(4):584-8; discussion 588-9,

ADNOT S, RAFFESTIN B, EDDAHIBI S: NO in the lung. Respir Physiol 1995 Aug;101(2):109-20,

AKBAY A, CINAR K, UZUNALIMOGLU O, ERANIL S, YURDAYDIN C, BOZKAYA H, BOZDAYI M: Serum cytotoxin and oxidant stress markers in N-acetylcysteine treated thioacetamide hepatotoxicity of rats. Human and Experimental Toxicology 18(11): 669-676, 1999.

ALLER MA, ARIAS JL, ARIAJ. Abnormal inflammatory response to trauma: the paradoxical meaning of the ischaemia-reperfusion phenomenon. Injury. 2004 Aug;35(8):835-6; author reply 836-7

BAKER S, O'NEILL B, HADDON W, LONG W: The injury severity score:a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. Journal of Trauma and Acute Care Surgery: March 1974 - Volume 14 - Issue 3 - ppg 187-196



BAN Y, SHEN H, LI TS: An experimental study of a rat model with MODS as a result of trauma induced infection. (In Chinese) *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 20: 41-44, 2008.

BATEMAN RM, SHARPE MD, ELLIS CG: Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care* 2003 Oct;7(5):359-73 doi: 101186/cc2353 Epub 2003 Jul 28,

BECKMAN JS, KOPPENOL WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*. 1996; 271: C1424–C1437.

BEHR J, MAIER K, DEGENKOLB B, KROMBACH F, VOGELMEIER C: Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 Dec;156(6):1897-901 doi: 101164/ajrccm15669706065,

BENKUSKY NA, LEWIS SJ, KOOY NW: Peroxynitrite-mediated attenuation of alpha- and beta-adrenoceptor agonist-induced vascular responses in vivo. *Eur J Pharmacol* 1999 Jan 8;364(2-3):151-8,

BERNARD GR: Potential of N-acetylcysteine as treatment for the adult respiratory distress syndrome. *Eur Respir J Suppl* 1990 Oct;11:496s-498s,

BIFFL WL, MOORE EE, MOORE FA, PETERSON VM: Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996 Nov;224(5):647-64,

BONE RC: Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996 Oct 15;125(8):680-7,

BONE RC: Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 1992 Dec 23-30;268(24):3452-5,

BRETT DS, HWANG PM, SNYDER SH: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990 Oct 25;347(6295):768-70 doi: 10.1038/347768a0,

BRETT DS, SNYDER SH: Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 1994 Aug;13(2):301-13,

BUTLER AR, FLITNEY FW, WILLIAMS DL: NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol Sci* 1995 Jan;16(1):18-22,

CIESLA DJ, MOORE EE, JOHNSON JL, SAUAIA A, COTHREN CC, MOORE JB, BURCH JM: Multiple organ dysfunction during resuscitation is not postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 2004 Jun;139(6):590-4; discussion 594-5 doi: 10.1001/archsurg.139.6.590,

CLANCY RM, AMIN AR, ABRAMSON SB: The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum* 1998 Jul;41(7):1141-51 doi: 10.1002/1529-0131(199807)41:7<1141::AID-ART2>3.0.CO;2-S,

COCHRANE CG: Immunologic tissue injury mediated by neutrophilic leukocytes. *Adv Immunol* 1968;9:97-162,

COLLICOTT PE, HUGHES I: Training in advanced trauma life support. *JAMA* 1980 Mar 21;243(11):1156-9,

COLLIGHAN N, GIANNOUDIS PV, KOURGERAKI O, PERRY SL, GUILLOU PJ, BELLAMY MC: Interleukin 13 and inflammatory markers in human sepsis. *Br J Surg* 2004 Jun;91(6):762-8 doi: 101002/bjs4521,

DILLON WC, HAMPL V, SHULTZ PJ, RUBINS JB, ARCHER SL: Origins of breath nitric oxide in humans. *Chest* 1996 Oct;110(4):930-8,

FEIHL F, WAEBER B, LIAUDET L: Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Ther* 2001 Sep;91(3):179-213,

FURCHGOTT RF: Introduction to EDRF research. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22 Suppl 7:S1-2,

FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980 Nov 27;288(5789):373-6,

GANDO S, KAMEUE T, MATSUDA N, HAYAKAWA M, ISHITANI T, MORIMOTO Y, KEMMOTSU O: Combined activation of coagulation and inflammation has an important role

in multiple organ dysfunction and poor outcome after severe trauma. *Thromb Haemost* 2002 Dec;88(6):943-9,

GASTON B, DRAZEN JM, LOSCALZO J, STAMLER JS: The biology of nitrogen oxides in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 Feb;149(2 Pt 1):538-51 doi: 101164/ajrccm14927508323,

GEIGER M, STONE A, MASON SN, OLDHAM KT, GUICE KS: Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol* 1997 Jul;273(1 Pt 1):L275-81 doi: 101152/ajplung19972731L275,

GREENSPAN L, MCLELLAN BA, GREIG H: Abbreviated Injury Scale and Injury Severity Score: a scoring chart. *J Trauma* 1985 Jan;25(1):60-4,

GROSS SS, WOLIN MS: Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995;57:737-69 doi: 101146/annurevph57030195003513,

HALLIWEL B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*. 2012 May;70(5):257-65. doi: 10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x.

HAMPL V, BIBOVA J, BANASOVA A, UHLIK J, MIKOVA D, HNILICKOVA O, LACHMANOVA V, HERGET J: Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 Jan;290(1):L11-20 doi: 101152/ajplung000232005 Epub 2005 Aug 19,

HICKEY MJ, SHARKEY KA, SIHOTA EG, REINHARDT PH, MACMICKING JD, NATHAN C, KUBES P: Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocyte-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J* 1997 Oct;11(12):955-64,

HILL AG, HILL GL: Metabolic response to severe injury. *Br J Surg* 1998 Jul;85(7):884-90  
doi: 101046/j1365-2168199800779x,

HUANG ZH, SUN YG, FENG HM, LEI HY, LIN HW, SONG HJ: [Therapeutic effect of L-arginine on traumatic shock in rats]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2003 Jan;23(1):46-9,

IDELL S: Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003 Apr;31(4 Suppl):S213-20 doi: 101097/01CCM000005784621303AB,

IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Dec;84(24):9265-9,

IGNARRO LJ, BYRNS RE, BUGA GM, WOOD KS: Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res* 1987 Dec;61(6):866-79,

JÓZSEF L, ZOUKI C, PETASIS NA, SERHAN CN, FILEP JG. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF- $\kappa$ B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 13266–13271.

KHARAZMI A, NIELSEN H, SCHIOTZ PO: N-acetylcysteine inhibits human neutrophil and monocyte chemotaxis and oxidative metabolism. *Int J Immunopharmacol* 1988, 10:39-46.

KNOWLES RG: Nitric oxide biochemistry. *Biochem Soc Trans* 1997 Aug;25(3):895-901,

KNOWLES RG: Nitric oxide synthases. *Biochem Soc Trans* 1996 Aug;24(3):875-8,

KNOWLES RG, MONCADA S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994 Mar 1;298 ( Pt 2):249-58,

KOEKKOEK WA, VAN ZANTEN AR. Antioxidant vitamins and trace elements in critical illness. *Nutr Clin Pract*. 2016 Aug;31(4):457-74. doi: 10.1177/0884533616653832. Epub 2016 Jun 16. Review.

KONG SE, BLENNERHASSETT LR, HEEL KA, MCCAULEY RD, HALL JC: Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg* 1998 Aug;68(8):554-61,

KVASNICKA J, BALIK M, BINDER T, BLATNY J, BLAHA J, CVACHOVEC K, CERNY V, DULICEK P, FEYEREISL J, HAJEK Z, JANKU P, MALY J, MECHUROVA A, PARIZEK A, PENKA M, PROCHAZKA M, ROZTOCIL A, REHACEK V, SEIDLOVA D, SEVCIK P, VALENTA J, VENTRUBA P: [Peripartal life-threatening hemorrhage - interdisciplinary consensus opinion]. *Vnitr Lek* 58(9): 661-664,

LACHMANOVA V, HNILICKOVA O, POVYSILOVA V, HAMPL V, HERGET J: N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci* 2005 May 27;77(2):175-82 doi: 101016/j.lfs.200411027 Epub 2005 Feb 1,

LEONE AM, PALMER RM, KNOWLES RG, FRANCIS PL, ASHTON DS, MONCADA S: Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* 1991 Dec 15;266(35):23790-5,

MONCADA S: Nitric oxide. *J Hypertens Suppl* 1994 Dec;12(10):S35-9,

MONCADA S, HIGGS A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993 Dec 30;329(27):2002-12 doi: 101056/NEJM199312303292706,

MONCADA S, MARTIN JF, HIGGS A: Symposium on regression of atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 1993 Jul;23(7):385-98

MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA: Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem Pharmacol* 1989 Jun 1;38(11):1709-15,

MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991 Jun;43(2):109-42,

NAKAYAMA DK, GELLER DA, LOWENSTEIN CJ, CHERN HD, DAVIES P, PITT BR, SIMMONS RL, BILLIAR TR: Cytokines and lipopolysaccharide induce nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992 Nov;7(5):471-6 doi: 101165/ajrcmb/75471,

NATHAN C, XIE QW: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994 May 13;269(19):13725-8,

NATHENS AB, NEFF MJ, JURKOVICH GJ, KLOTZ P, FARVER K, RUZINSKI JT, RADELLA F, GARCIA I, MAIER RV: Randomized, prospective trial of antioxidant supplementation in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 2002 Dec;236(6):814-22,

NEMETH I, BODA D: Xanthine oxidase activity and blood glutathione redox ratio in infants and children with septic shock syndrome. *Intensive Care Med* 2001 Jan;27(1):216-21,

PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87(1): 315-424, 2007.

PALMER RM, FERRIGE AG, MONCADA S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987 Jun 11-17;327(6122):524-6 doi: 101038/327524a0,

PALMER RM, MONCADA S: A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 Jan 16;158(1):348-52,



PALMER RM, REES DD, ASHTON DS, MONCADA S: L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 Jun 30;153(3):1251-6,

PAPE HC, GRIENSVEN MV, HILDEBRAND FF, TZIOUPIS CT, SOMMER KL, KRETTEK CC, GIANNOUDIS PV: Systemic inflammatory response after extremity or truncal fracture operations. *J Trauma* 2008 Dec;65(6):1379-84 doi: 101097/TA0b013e31818c8e8c,

PATEL RP, MCANDREW J, SELLAH H, WHITE CR, JO H, FREEMAN BA, DARLEY-USMAR VM: Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1999 May 5;1411(2-3):385-400,

PATTERSON RL, GALLEY HF, WEBSTER NR: The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor- $\kappa$ B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit Care Med* 2003, 31:2574-2578.

PLEVA L, SIR M, MAYZLIK J: Abdominal compartment syndrome in polytrauma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2004 Jul;148(1):81-4,

PREISER JC: Oxidative stress. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 36(2): 147-154, 2012.

RAFTOS JE, WHILLIER S, CHAPMAN BE, et al. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:1698–1706.

RENSING H, BAUER M: [Multiple organ failure. Mechanisms, clinical manifestations and treatment strategies]. *Anaesthesist* 2001 Nov;50(11):819-41,

ROSE S, MARZI I: [Pathophysiology of polytrauma]. *Zentralbl Chir* 1996;121(11):896-913,

ROTSTEIN OD: Modeling the two-hit hypothesis for evaluating strategies to prevent organ injury after shock/resuscitation. *J Trauma* 2003 May;54(5 Suppl):S203-6 doi: 101097/01TA00000645126294992,

SINGER M, DE SANTIS V, VITALE D, JEFFCOATE W: Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet* 2004 Aug 7-13;364(9433):545-8 doi: 101016/S0140-6736(04)16815-3,

SCHMIDT H, SCHMIDT W, MULLER T, BOHRER H, GEBHAR MM, MARTIN E: N-acetylcysteine attenuates endotoxin-induced leukocyte– endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Crit Care Med* 1997, 25:858-863.

STEVENSON M, SEGUI-GOMEZ M, LESCOHIER I, et al.: An overview of the injury severity score and the new injury severity score. *Injury Prevention* 2001;7:10-13.

STUEHR DJ: Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1999 May 5;1411(2-3):217-30,

VINTEN-JOHANSEN J. Physiological effects of peroxynitrite: potential products of the environment: *Circ Res.* 2000 Aug 4;87(3):170-2.

WALSH TS, LEE A: N-acetylcysteine administration in the critically ill. *Intensive Care Med* 1999, 25:432-434.

WAYDHAS C, NAST-KOLB D, TRUPKA A, ZETTL R, KICK M, WIESHOLLER J, SCHWEIBERER L, JOCHUM M: Posttraumatic inflammatory response, secondary operations, and late multiple organ failure. *J Trauma* 1996 Apr;40(4):624-30; discussion 630-1,

ZHANG M, ZHOU GJ, ZHAO S, YANG JX, LU X, GAN JX, XU SW. Delayed diagnosis of tooth aspiration in three multiple trauma patients with mechanical ventilation. *Crit Care.* 2011;15(3):424. doi: 10.1186/cc10148. Epub 2011 May 12.

ZOUKI C, JÓZSEF L, OUELLET S, PAQUETTE Y, FILEP JG. Peroxynitrite mediates cytokine-induced IL-8 gene expression and production by human leukocytes. *J Leuk Biol.* 2001; 69: 815–824.

## CLINICAL STUDY

## Nitric oxide as an indicator for severity of injury in polytrauma

Beitl E<sup>1</sup>, Banasova A<sup>2,3</sup>, Vlcek M<sup>1</sup>, Mikova D<sup>4</sup>, Hampl V<sup>4</sup>Motal University Hospital, 1st Orthopaedic Clinic, Prague, Czech Republic. [evzen.beitl@fmotol.cz](mailto:evzen.beitl@fmotol.cz)**ABSTRACT**

**BACKGROUND:** Patients with injuries to multiple organs or organ systems are in a serious risk of shock, multiorgan failure and death. Although there are scoring systems available to assess the extent of polytrauma and guide the prognosis, their usefulness is limited by their considerably subjective nature. As the production of nitric oxide (NO) by many cell types is elevated in tissue injury, we hypothesized that serum concentration of NO (and its oxidation products, NOx) represents a suitable marker of polytrauma correlating with prognosis. We wanted to prove that nitric oxide could serve as an indicator for severity of injury in polytrauma.

**METHODS:** We measured serum NOx and standard biochemical parameters in 93 patients with various degrees of polytrauma, 15 patients with minor injuries and 20 healthy volunteers.

**RESULTS:** On admission, serum NOx was higher in patients with moderate polytrauma than both in controls and patients with minor injury, and it was even higher in patients with severe polytrauma. Surprisingly, NOx on admission was normal in the group of patients that required cardiopulmonary resuscitation or died within 48 hours after admission. In the groups, where it was elevated on admission, serum NOx dropped to normal values within 12 hours. Blood lactate levels on admission were elevated in proportion to the severity of subsequent clinical course.

**CONCLUSION:** Elevated serum NOx and blood lactate in patients with polytrauma are markers of serious clinical course, while normal NOx combined with a very high lactate may signal a fatal prognosis (Fig. 4, Ref. 8). Text in PDF [www.ejis.sk](http://www.ejis.sk).

**KEY WORDS:** marker, systemic inflammatory response syndrome, shock, multiorgan failure.

**Abbreviations:** CVP – Central Venous Pressure, Hb – Haemoglobin, iNOS – Inducible Isoform of the NO Synthase Enzyme, ISS – Injury Severity Score, INR – International Normalized Ratio, MAP – Mean Arterial Pressure, NO – Nitric Oxide, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrates, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – Nitrites, NOx – oxidation products of Nitric Oxide, ppb – parts per billion, SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome

**Introduction**

Polytrauma is defined as the combination of injuries to two or more organs or organ systems, at least one of which is fatal without a prompt treatment. A severely injured patient is always at risk of developing shock, which can rapidly lead to death. Even if shock is adequately managed, polytraumatized patients remain at the risk for the development of a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) at the early stages, with the possibility of sub-

sequent multiorgan failure. A perilous manifestation of SIRS is coagulopathy, which consequently leads to diffuse hemorrhage. This hemorrhage is surgically untreatable and may hasten the patient back to the state of shock.

A number of classifications have been used to assess the severity of polytrauma, of which perhaps the most useful and established is the Injury Severity Score (ISS) (Baker et al, 1974, Copes et al, 1988). All the scoring methods, however, share the disadvantage of a significant subjective element of the judgment of the evaluating physician. As the result, a discrepancy between the apparently satisfactory initial clinical state of the patient and the subsequent severe course is a frequent experience. A great contribution for the clinician therefore would be a discovery of objective indicators that would correlate with the severity of injury, and would, to a certain extent, serve as a warning signal for a potentially complicated course.

Tissue injury is associated with an increased production of numerous mediators. Notable among them is the overproduction of nitric oxide (NO), which is the key signaling and effector molecule in a number of biological processes (Moncada et al, 1993, Hampl et al, 2006, Gross et al, 1995). An increased expression of the inducible isoform of the NO synthase enzyme (iNOS) in mast cells, hepatocytes, and vascular smooth muscle is responsible for the overproduction of nitric oxide in trauma. For these reasons we hypothesized that changes in serum concentration of NO and its oxidation products (NOx), because of the very fast oxidation

<sup>1</sup>Motal University Hospital, 1st Orthopaedic Clinic, Prague, Czech Republic. <sup>2</sup>Motal University Hospital, Department of Anaesthesiology and ICM, Prague, Czech Republic. <sup>3</sup>2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Department of Pathophysiology, Prague, Czech Republic, and <sup>4</sup>2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Department of Physiology, Prague, Czech Republic

**Address for correspondence:** E. Beitl, MD, Motal University Hospital, 1st Orthopaedic Clinic, V Uvalu 84, CZ-150 00 Prague, Czech Republic. **Acknowledgements:** This study was supported by GACR 13-01710S.

of NO in oxygenated blood) shortly after suffering a polytrauma may represent a useful marker for the severity of patient injury after polytrauma, with a prognostic value. Therefore, we investigated the relationship between NOx just after polytrauma and the patient outcome.

### Materials and methods

Totally, 108 patients were examined over the period of 30 months. Of this cohort, 93 patients fulfilled the criteria for polytrauma. They presented with major hemorrhage resulting from intrathoracic or intraabdominal organ injuries and from fractures of the pelvis and/or long bones.

The severity of patient injury was assessed according to the ISS scoring system. Based on their ISS score and the subsequent progression of clinical state, patients were divided into the four groups: 1. Patients with a mild course (ISS score between 16–25, i.e. minor polytrauma,  $n = 30$ ), 2. Patients with a severe course (ISS score > 25, i.e. those with severe polytrauma,  $n = 40$ ), 3. Patients with critical injuries necessitating cardiopulmonary resuscitation and/or high volume blood substitutions ( $n = 12$ ), 4. Non-surviving patients – those who died within 48 hours after admission to the critical care unit ( $n = 11$ ).

The remaining 15 patients not fulfilling the criteria of polytrauma were assigned to a separate group (“minimal injury”). Twenty healthy volunteers formed a control group.

Basic characteristic of the patients groups is in the Table 1.

All patients received the standard therapy as needed. Central venous pressure (CVP) and the mean arterial pressure (MAP) were followed in all subjects. Initial blood tests were taken to assess the serum concentration of NOx, coagulation parameters, hemoglobin, lactate levels, and glycaemia. Blood tests were performed during patient admission and at intervals of 12, 24, and 48 hours after admission.

As in an aqueous solutions (such as blood) NO quickly oxidizes to form nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ), the NO levels in serum were assessed by measuring the sum of NO,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  (NOx). This was done by exposing the samples to highly reducing environment (thus converting  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  to NO) and then detecting the resulting NO concentration by chemiluminescence analyzer (CLD 77 AM, ECO PHYSICS Switzerland) (Hampel et al, 1996). The blood samples were centrifuged and the incurred serum was stored at  $-60^\circ\text{C}$ . Serum samples were processed in less than 2 weeks. Each sample (100  $\mu\text{l}$ ) was thawed and injected into a purge vessel containing vanadium (III) chloride (7 ml 0.1

M  $\text{VCl}_3$  in 2 M HCl) at  $90^\circ\text{C}$ . The purge vessel was under constant bubbling with a stream of Helium that carried NO into the analyzer. To prevent damage to the chemiluminescence analyzer by the hydrochloric acid vapor, a gas bubbler filled with aqueous potassium hydroxide was installed between the purge vessel and the NO analyzer. Inside the reaction chamber of the NO analyzer NO reacts very quickly with ozone (produced in the analyzer by electric discharge). The NO, produced by this reaction is in the excited state. As its unstable electrons return to their original ground state, they dissipate energy in the form of photons. Light emission is linearly related to the NO content of the sample. NOx levels are expressed as parts per billion (ppb) of NO in the gaseous phase.

The results were analyzed statistically using the one-factor ANOVA followed by Fisher's post hoc test. The differences were considered significant when  $p < 0.05$ . The results are presented as the mean values with the standard errors of the mean.

### Results

There was no statistically significant difference in serum NOx concentration at the time of admission in the group of patients with minimal injury when compared to the control group of healthy volunteers ( $30.9 \pm 2.9$  vs  $27.5 \pm 2.8$  ppb) (Fig 1). In the group of polytrauma patients with moderate injuries, the serum NOx concentration on admission was significantly higher than in the group of healthy volunteers ( $42.4 \pm 5.4$  vs  $27.5 \pm 2.8$  ppb). In the group of polytrauma patients with severe injuries, the serum concentration of NOx at time of admission was doubled compared to healthy volunteers ( $67.9 \pm 7.7$  vs  $27.5 \pm 2.8$  ppb,  $p < 0.05$ ). NOx concentrations in the group with severe polytrauma were significantly higher than those in the group classified as moderate polytrauma.

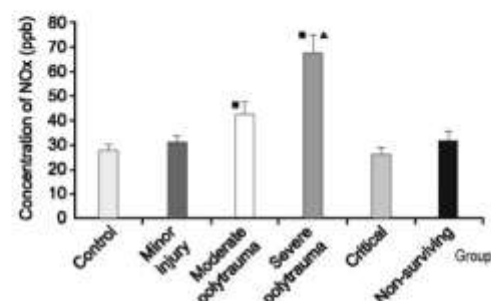


Fig. 1. Severe and moderate polytrauma significantly increases serum NOx concentration, while NOx is normal in patients that require cardiopulmonary resuscitation or die within 48 hours after admission. Control - healthy volunteers, minor injury - patients with ISS < 16, moderate polytrauma - patients with a mild course (ISS score of between 16–25), severe polytrauma - patients with a severe course (ISS score of > 25), critical - patients with critical injuries necessitating cardiopulmonary resuscitation and/or high volume blood substitutions, and non surviving v patients who died within 48 hours after admission. ■  $p < 0.05$  vs control group, ▲  $p < 0.05$  moderate vs severe group.

Tab. 1. Basic characteristic of the patients groups.

Group	n	Age	% females
minimal injury	15	42±4	20
moderate polytrauma	30	39±3	16.7
severe polytrauma	40	38±2	12
critical	12	39±5	25
non surviving	11	44±7	36
controls	20	34±3	67

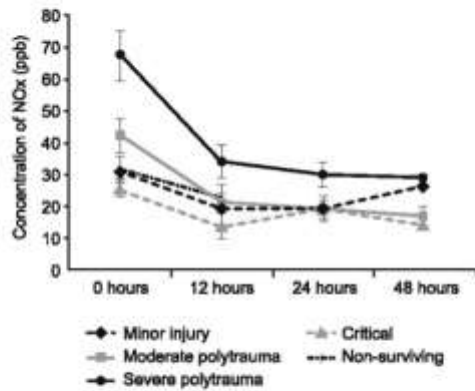


Fig. 2. Serum NOx normalizes within 12 hours after admission in all groups of injured patients. Legend as in Figure 1. The statistical differences among the groups at 0 hours are shown in Fig. 1. At the remaining time points, there were no statistically significant differences among the groups.

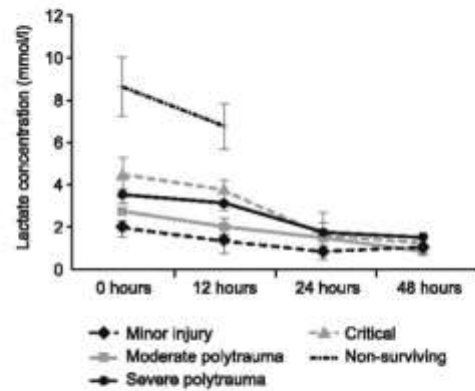


Fig. 4. The lactate concentrations decreased in all groups of injured patients during the first day after the injury. Non-surviving vs critical,  $p=0.0236$ . Legend as in Fig. 1.

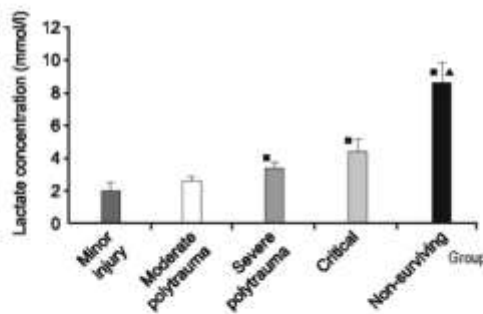


Fig. 3. Serum lactate levels on admission are increased in proportion to the severity of polytrauma. Legend as in Figure 1. ■  $p < 0.05$  vs minor injury, ▲  $p < 0.05$  vs all groups.

Surprisingly, on admission, there was no statistically significant difference in serum NOx concentrations between the group of patients with a critical course and the control group ( $25.9 \pm 3.0$  vs  $27.5 \pm 2.8$  ppb). The same was true for the group of patients who eventually died ( $31.6 \pm 4.1$  vs  $27.5 \pm 2.8$  ppb).

In all groups with elevated serum NOx concentrations on admission, the values reached normal (i.e. they were not statistically different from the control group) at the measurement 12 hours after admission. Thereafter, the NOx values remained essentially stable (Fig. 2). There were no significant differences among the groups after the initial measurement.

There were no notable differences in CVP and MAP during the study. Both parameters confirmed the adequacy of therapy and blood transfusions. The values of hemoglobin concentration (Hb) conveyed similar information. It is well known that even a massive

hemorrhage is initially only slightly reflected in blood cell count due to the symmetric loss of plasma and cellular elements. Probably due to this phenomenon, only slight differences in Hb were seen among the groups at the time of admission. During all subsequent time intervals, the Hb concentrations reflected the substitution of the patients with blood derivatives. It was maintained within the range of 8.5–10.8 g/dL.

The values of international normalized ratio (INR), that were measured to inform about the initial state of coagulation, brought no notable information apart from the fact that they were radically deviated from the norm (which is 0.9–1.3) in the groups of patients with critical injury and in those who died shortly after admission. The INR was 3.0 in the non-surviving group and 1.8 in the group with critical injuries.

Serum lactate concentration and glycaemia at the time of admission showed similar differences among the groups as seen with the serum NOx concentrations with one principal difference – the highest levels were found in the group of patients, who were critically injured and especially in those, who did not survive. The initial concentration of serum lactate in the group of patients with severe polytrauma was more than two-fold higher than in the control group, in the group of critically injured patients with lethal course, this concentration was six-fold that of the control group (Fig. 3). The lactate concentrations decreased in all groups of injured patients during the first day after the injury (Fig. 4).

## Discussion

Our working hypothesis that NOx serum levels on admission would correlate with prognosis of patients with polytrauma was only partially confirmed by our data. While serum NOx markedly increased with the severity of polytrauma up to the category of severe polytrauma, it was surprisingly normal in patients with the most critical and lethal course. This latter aspect of our results is

hard to explain on the basis of what is known about the biology of NO in tissue injury. Hypothetically, marked energy depletion in severe shock might lead to relative inactivity of NO synthase, but we have no solid data to support such an interpretation.

A rapid decline in the values for NOx concentration between time = 0 and time = 12 hours in all groups, where NOx was elevated at admission, is also not entirely clear, but a similar situation was also seen with values of both glycaemia and lactate. At least a partial effect of therapy (with improved blood/plasma volume) on this finding seems quite likely. This trend conflicts with the published results from Huang et al (2003). In the study of traumatic shock in rats they demonstrated an elevation in the concentration of NOx with a subsequent plateau within 24 hours after trauma, or rather, after resuscitation. Differences in plasma volume management between rats and human patients could be suspected as a potential explanation for this discrepancy.

Considering all other measured parameters, the trends of INR, glycaemia, and especially the lactate levels are not without interest. Unfortunately, INR and glycaemia cannot be used as markers due to the simple fact that important details of the relevant personal history in patients with polytrauma are often unavailable or misleading (elevated glycaemia in diabetic patients, or increased INR in patients on anticoagulants). However, our data on lactate concentration are promising because the groups of patients with more severe polytrauma had higher lactate levels. Thus, lactate concentration might serve as a marker of polytrauma severity and prognosis. The rate of lactate clearance was previously linked to survival (Abramson et al, 1993). In the study of Abramson et al (Abramson et al, 1993), all patients whose lactate level normalized in 24 hours survived. If lactate levels cleared to normal between 24 and 48 hours, the survival rate was 75 %. Therefore, the time needed to normalize serum lactate levels is an important prognostic factor for the survival in severely injured patients. In concordance with this finding, our Figure 4 shows that patients, who did not survive beyond 24 hours from admission had lactate levels at 12 hours after admission that were several times normal.

The data of this study lead to the possibility to interpret serum NOx values as an early marker of the severity of injury after poly-

trauma with a prognostic value. Its increase could attest for quite a severe injury with the possibility of a number of other complications. On the other hand, little or no increase in the concentration of NO metabolites upon an initial examination in a patient with a clinically obvious serious state may indicate a high mortality risk. Even more intriguing is the possibility to use the combination of the initial levels of serum NOx and lactate in prognosis. Elevated levels of NOx and lactate, with a high likelihood, may alert for a potentially critical course. The combined finding of nearly normal levels of NOx and an excessively high level of lactate in a polytraumatic patient should alert to the possibility of the most critical course.

## References

1. Baker SP, O'Neill B, Haddon Jr W, Long WB. The Injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma* 1974; 14 (3): 187–196.
2. Copes WS, Champion HR, Sacco WJ, Lawwick MM, Keast SL, Bain LW. The Injury Severity Score revisited. *J Trauma* 1988; 28 (1): 69–77.
3. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329 (27): 2002–2012.
4. Hampl V, Bibova J, Banasova A, Uhlík J, Mikova D, Hnilčíková O, Lachmanova V, Herget J. Pulmonary vascular iNOS induction participates in the onset of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: L11–L20.
5. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 737–769.
6. Hampl V, Walters C, Archer SL. Determination of Nitric Oxide by the Chemiluminescence Reaction with Ozone. in *Methods in Nitric Oxide Research*. John Wiley and Sons Ltd: 310–318, 1996.
7. Huang ZH, Sun YG, Feng HM, Lei HY, Liu HW, Song HJ. Therapeutic effect of L-arginine on traumatic shock in rats. *Di Yi An Yi Da Xue Xue Bao* 2003; 23 (1): 46–49.
8. Abramson D, Scales TM, Hitchcock R, Trooskin SZ, Henry SM, Greenspan J. Lactate clearance and survival following injury. *J Trauma* 1993; 35 (4): 584–588, discussion 588–589.

Received July 7, 2015.

Accepted September 20, 2015.

# Příloha 2

*Physiol. Res. 66 (Suppl. 4): S561-S565, 2017*

## Nitric Oxide Elevation in Polytrauma is Driven by Oxygen Radicals

E. BEITL<sup>1</sup>, A. BAŇASOVÁ<sup>2,3</sup>, D. MIKOVÁ<sup>2</sup>, V. HAMPL<sup>2</sup>

<sup>1</sup>First Orthopaedic Clinic, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic,

<sup>2</sup>Department of Physiology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech

Republic, <sup>3</sup>Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Received March 21, 2017

Accepted September 6, 2017

### Summary

A common problem in management of polytrauma – a simultaneous injury to more than one organ or organ system, at least one of them lethal without intervention – is a discrepancy between a relatively good initial state and a serious subsequent development. Since nitric oxide (NO) is produced in high quantities during tissue injury, we assumed that serum levels of NO (and its oxidation products, NOx) might serve as a prognostic marker of polytrauma severity. However, we found recently that NOx was increased in polytrauma, but not in the most severe cases. The present study was undertaken to test the hypothesis that serum NOx is reduced in severe polytrauma by concomitant overproduction of reactive oxygen species (ROS). Polytrauma was induced in rats under anesthesia by bilateral fracture of femurs and tibiae plus incision of the right liver lobe through laparotomy. Serum NOx was measured by chemiluminescence after hot acidic reduction. The role of ROS was assessed by treatment with an antioxidant, N-acetyl-L-cysteine (NAC). Experimental polytrauma elevated NOx from 11.0±0.7 to 23.8±4.5 ppb. This was completely prevented by NAC treatment (9.1±2.2 ppb). Serum NOx is elevated in severe polytrauma, and this is not reduced by ROS. On the contrary, ROS are necessary for the NOx elevation, probably because ROS produced by inflammatory cells activated by the polytrauma induce massive NO production.

### Key words

Nitric oxide • Polytrauma • Shock • N-acetyl-L-cysteine • Reactive oxygen species • Antioxidant

### Corresponding author

A. Baňasová, Department of Physiology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Pízeňská 221,

150 00 Prague 5, Czech Republic. E-mail: aena.banasova@lfmotol.cuni.cz

### Introduction

Polytrauma is defined as a simultaneous injury to more than one organ or organ systems, where at least one of those injuries is of such a degree or nature that, without urgent treatment, can cause death. Patients with polytrauma are at high risk of developing shock that can quickly lead to death. Even if shock is managed successfully, another serious risk is the development of systemic inflammatory response syndrome (SIRS), frequently followed by multiorgan failure (Keel *et al.* 2005). A common clinical problem in polytrauma is a discrepancy between a relatively satisfactory initial clinical state of the patient on one hand and a serious subsequent development on the other. Therefore, an early marker of the severity of polytrauma with a predictive value is desirable.

Nitric oxide (NO) is produced in high quantities during tissue injury (Pacher *et al.* 2007) and this overproduction contributes to the development of shock. It is thus reasonable to expect that plasma levels of stable NO forms on admission might represent such a marker. In aqueous milieu, NO is rapidly oxidized by oxygen to nitrites and, in the presence of heme proteins, to nitrates (Moncada *et al.* 1993). Therefore, sum of plasma concentrations of NO and its oxidation products, NOx, has to be used instead of just NO concentration (Archer *et al.* 1994, Archer *et al.* 1995).

In line with this reasoning, we found in a recent study that plasma NOx concentration on admission correlated positively with the severity of subsequent

PHYSIOLOGICAL RESEARCH • ISSN 0862-8408 (print) • ISSN 1802-9973 (online)

© 2017 Institute of Physiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

Fax +420 241 062 164, e-mail: phyres@fgs.cas.cz, www.biomed.cas.cz/physiolres



clinical course of patients with polytrauma (Beitl *et al.* 2016). Surprisingly, though, this was not true for the most critically ill patients – those who needed resuscitation or subsequently died. Their plasma NO<sub>x</sub> on admission was similarly low as in healthy controls (Beitl *et al.* 2016).

One possible explanation of this paradox could be a rapid inactivation of NO by its reaction with superoxide, a radical that is produced at a high rate during inflammatory response to tissue injury (Aller *et al.* 2004). If this explanation is valid, then the low plasma NO<sub>x</sub> in extreme polytrauma should not occur if the superoxide-NO interaction is prevented (e.g. by amplified superoxide scavenging).

To test this hypothesis, we utilized a rat model of polytrauma and measured plasma NO<sub>x</sub> with and without treatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC). NAC is a precursor of glutathione that, in turn, is one of the main defenses of the organism against oxidative stress (Halliwell 2012, Koekkoek *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2011). Our laboratory had previously used NAC to affect pathological processes in the lungs (Lachmanová *et al.* 2005).

## Methods

Three groups of adult male Wistar rats (body weight 444-570 g with no differences among the groups) were used with the permission of the Ethical Committee of our institution, in accordance with EU standards. All procedures were performed under deep anesthesia with IP ketamine (100 mg/kg) + xylazine (16 mg/kg). In one group (CA, n=6), blood samples for NO<sub>x</sub> (and hematocrit) determination were drawn from a cannulated carotid artery before and 12-20 min after inflicting experimental polytrauma (pre-PT and post-PT measurement, respectively). The catheter was also used to follow the mean systemic arterial blood pressure (SBP). In another group, the procedure was identical, but an i.p. injection of NAC aqueous solution (400 mg/kg) (Akbay *et al.* 1999) was given concurrently with the induction of anesthesia (CA+NAC, n=6). Since the process of carotid artery cannulation itself represents a degree of trauma, another group was used in which this procedure was avoided. Blood samples in this group (LV, n=6) were obtained under the same anesthesia by a quick puncture of the left ventricle across the chest wall.

Polytrauma was modeled under anesthesia by bilateral fracture of femurs and tibiae (Ban *et al.* 2008) plus incision of the right liver lobe through laparotomy. This represents a severe polytrauma (in humans with similar injuries, the ISS score would be above 25). The

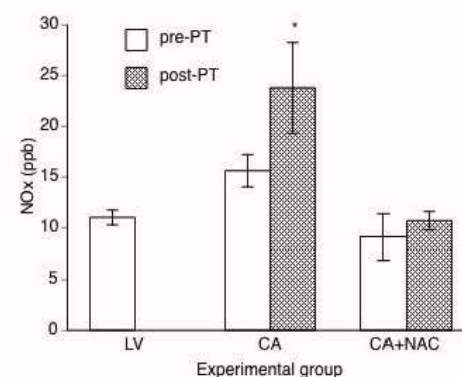
ensuing blood loss resulted into gradual SBP decline. The post-PT blood sample for NO<sub>x</sub> determination was taken when the SBP dropped to one half of its initial value.

Serum NO<sub>x</sub> concentration was measured by chemiluminescence NO analyzer (Sievers NOA 270) after hot acidic reduction, as described previously (Beitl *et al.* 2016, Hampl *et al.* 1996), and expressed as parts per billion (ppb) of NO in the stripping gas.

The data were evaluated statistically using the GraphPad Prism 6 software. Unpaired t-test, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons post hoc test or two-way ANOVA were used as appropriate, with P<0.05 considered significant. The results are presented as means ± S.E.M.

## Results

In the LV group, serum NO<sub>x</sub> concentration was 11.0±0.7 ppb. There was a tendency for the carotid artery cannulation procedure to increase NO<sub>x</sub> (to 15.6±1.6 ppb in the CA group pre-PT) that, however, did not reach statistical significance. The experimental polytrauma caused further, this time significant, rise in NO<sub>x</sub> (to 23.8±4.5 ppb; Fig. 1). NAC administration at the time of inducing anesthesia resulted in NO<sub>x</sub> concentration pre-PT that was significantly lower than that without NAC (9.1±2.2 ppb). NAC prevented any increase in NO<sub>x</sub> after polytrauma (Fig. 1).



**Fig. 1.** N-acetyl-L-cysteine (NAC) prevents an increase in serum NO<sub>x</sub> concentrations caused by experimental polytrauma. LV = the group in which blood samples were obtained by left heart ventricle puncture; CA = the group in which blood samples were obtained from cannulated carotid artery; CA+NAC = the group in which blood samples were obtained from cannulated carotid artery after treatment with NAC; pre-PT = measurement obtained before inflicting experimental polytrauma; post-PT = measurement obtained when systemic blood pressure fell to 50% of its initial value after inflicting experimental polytrauma. \*P<0.05.

Administration of NAC did not affect mean SBP pre-PT (68.5±3.8 mm Hg in CA, 73.5±5.0 mm Hg in CA+NAC,  $P>0.05$ ), nor post-PT (28.8±4.6 vs. 19.3±0.7 mm Hg,  $P>0.05$ ). Similarly, hematocrit was not affected by NAC pre-PT (42.5±0.9 % in CA, 41.3±0.7 in CA+NAC,  $P>0.05$ ) nor post-PT (19.2±0.5 vs. 14.3±2.3 %,  $P>0.05$ ).

## Discussion

The main finding of this study is that augmentation of antioxidant defense by NAC administration prevents serum NOx increase caused by experimental polytrauma. In addition, this experiment in rats confirms our previous finding in human patients that serum NOx is a suitable candidate for a marker of the severity of polytrauma clinical course. Our observation that the procedure of carotid artery cannulation did not result in an increase in serum NOx that would be statistically significant corresponds to our previous finding in humans that only more severe, but not minor, injuries cause NOx elevation (Beitl *et al.* 2016). In terms of practical utility, this is advantageous – serum NOx seems to be a selective marker of only a serious, but not minor, injury. This – together with the significant elevation of NOx after experimental polytrauma – confirms the selectivity of this marker for just serious injuries.

The present study in rats did not replicate our previous finding in human patients that serum NOx increases only up to quite severe polytrauma, but the most serious cases display normal NOx levels (Beitl *et al.* 2016). In fact, our experimental rats were in a serious condition after the polytrauma – their mean SBP fell by about one-half at the time of the post-PT NOx measurement, as did their hematocrit. The reason for this discrepancy cannot be revealed from our data, but it is possible that the differences in methodology might be responsible. In human patients, NOx levels had predictive value only when measured on admission to the trauma center, but not later (Beitl *et al.* 2016). In the experimental rats, the post-PT values were measured only after the animals proceeded to a critical condition. Alternatively, the differences in treatment are likely to contribute to the observed discrepancy. While the human patients with severe polytrauma received massive supporting therapy, the rats were left with no intervention.

Treatment with NAC completely prevented the

increase in NOx after polytrauma. This result very clearly refutes the hypothesis that increased superoxide levels are responsible for the reduction of NOx observed in human patients with extremely severe polytrauma. If it were so, NAC treatment should potentiate, rather than reduce NOx. Our present results prove that the causality is the other way around – ROS are necessary for the elevation of NOx in polytrauma. The most likely explanation is that superoxide (and/or other ROS) produced by inflammatory cells activated by the polytrauma induce massive NO production. One likely mechanism involves stabilization of hypoxia-inducible factor(s) (HIF) by ROS (Niecek *et al.* 2012, Pan *et al.* 2007). HIF is well known to regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) (Forsythe *et al.* 1996) that, in turn, induces and upregulates NO synthase (Kroll *et al.* 1998, Shen *et al.* 1999). VEGF is upregulated in polytrauma (Grad *et al.* 1998, Vajtr *et al.* 2014). The NO production must be high, as the interaction with superoxide appears insufficient to offset this effect. The most likely source of greatly elevated NO production is the inducible isoform of the NO synthase. Most of the cells that express this enzyme are sensitive to oxidative stress (Preiser 2012).

NO participates in the maintenance of SBP (Hampl *et al.* 1993). Thus, reduced NOx after NAC treatment in polytrauma might be expected to help prevent the drop in SBP. However, We did not observe any significant effect on SBP post-PT caused by NAC. It is possible more effect could be seen with more prolonged duration, or factors other than NO play considerably larger role in severe hypotension.

An important practical question is whether our results with NAC can have some practical utility. Serum NOx concentration can either be just a marker of injury, or it can, in addition, have a pathogenetic role in the consequences of polytrauma. If the latter is true, then augmentation of the antioxidant defense, for example by NAC (a substance already used clinically), can improve the prognosis of patients with severe polytrauma. This is quite likely, inasmuch high production of the highly reactive NO are well known to damage proteins, lipids and DNA (Pacher *et al.* 2007). Further research of this issue is warranted.

In conclusion, we have shown that experimental polytrauma in rats causes elevation in serum NOx concentration that is prevented by antioxidant treatment with NAC. This implies that ROS production is necessary for the NOx to rise after polytrauma.

**Conflict of Interest**

There is no conflict of interest.

**Acknowledgements**

Supported by Grant Agency of the Czech Republic grant number GA13-01710S.

**References**

- AKBAY A, CINAR K, UZUNALIMOGLU O, ERANIL S, YURDAYDIN C, BOZKAYA H, BOZDAYI M: Serum cytotoxin and oxidant stress markers in N-acetylcysteine treated thioacetamide hepatotoxicity of rats. *Hum Exp Toxicol* **18**: 669-676, 1999.
- ALLER MA, ARIAS JL, ARIAS J: Post-traumatic inflammatory response: perhaps a succession of phases with a nutritional purpose. *Med Hypotheses* **63**: 42-46, 2004.
- ARCHER S, HAMPL V, MCKENZIE Z, NELSON D, HUANG J, SHULTZ P, WEIR EK: Role of endothelial-derived nitric oxide in normal and hypertensive pulmonary vasculature. *Semin Respir Med* **15**: 179-189, 1994.
- ARCHER SL, SHULTZ PJ, WARREN JB, HAMPL V, DEMASTER EG: Preparation of standards and measurement of nitric oxide, nitroxyl, and related oxidation products. *Methods* **7**: 21-34, 1995.
- BAN Y, SHEN H, LI TS: An experimental study of a rat model with MODS as a result of trauma induced infection. (In Chinese) *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* **20**: 41-44, 2008.
- BEITL E, BAŇASOVÁ A, MKOVÁ D, HAMPL V: Nitric oxide as an indicator for severity of injury in polytrauma. *Bratisl Med J* **117**: 217-220, 2016.
- FORSYTHE JA, JIANG BH, IYER NV, AGANI F, LEUNG SW, KOOS RD, SEMENZA GL: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**: 4604-4613, 1996.
- GRAD S, ERTEL W, KEEL M, INFANGER M, VONDERSCHMITT DJ, MALY FE: Strongly enhanced serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) after polytrauma and burn. *Clin Chem Lab Med* **36**: 379-383, 1998.
- HALLIWELL B: Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* **70**: 257-265, 2012.
- HAMPL V, ARCHER SL, NELSON DP, WEIR EK: Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure. *J Appl Physiol* **75**: 1748-1757, 1993.
- KEEL M, TRENTZ O: Pathophysiology of polytrauma. *Injury* **36**: 691-709, 2005.
- KOEKKOEK WA, VAN ZANTEN AR: Antioxidant vitamins and trace elements in critical illness. *Nutr Clin Pract* **31**: 457-474, 2016.
- KROLL J, WALTENBERGER J: VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 743-746, 1998.
- LACHMANOVÁ V, HNLIČKOVÁ O, POVÝŠILOVÁ V, HAMPL V, HERGET J: N-acetylcysteine inhibits hypoxic pulmonary hypertension most effectively in the initial phase of chronic hypoxia. *Life Sci* **77**: 175-182, 2005.
- MONCADA S, HIGGS A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**: 2002-2012, 1993.
- NIECKNIG H, TUG S, REYES BD, KIRSCH M, FANDREY J, BERCHNER-PFANNSCHMIDT U: Role of reactive oxygen species in the regulation of HIF-1 by prolyl hydroxylase 2 under mild hypoxia. *Free Rad Res* **46**: 705-717, 2012.
- PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* **87**: 315-424, 2007.
- PAN Y, MANSFIELD KD, BERTOZZI CC, RUDENKO V, CHAN DA, GIACCIA AJ, SIMON MC: Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **27**: 912-925, 2007.
- PREISER JC: Oxidative stress. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **36**: 147-154, 2012.
- SHEN BQ, LEE DY, ZIONCHECK TF: Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Fk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem* **274**: 33057-33063, 1999.

---

VAJTR D, SPRINGER D, STANEK L, BENADA O, SAMAL F, BERAN M, STREJC P, PRUSA R, ZIMA T: Pathomorphology of inflammatory response following traumatic brain injury, serum values of interleukins, and gene polymorphisms. *Soud Lek* **59**: 40-47, 2014.

ZHANG F, LAU SS, MONKS TJ: The cytoprotective effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-induced cytotoxicity is independent of its ability to enhance glutathione synthesis. *Toxicol Sci* **120**: 87-97, 2011.

---