

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

Studijní obor: Pediatrie

Téma: Aspirace žaludečního obsahu a respirační selhání u dětí

Název práce: Aspirace žaludečního obsahu a respirační selhání u dětí – proteomická analýza séra a bronchiálního aspirátu



MUDr. René Hrdlička

Typ závěrečné práce: disertační

Vedoucí práce/školitel: prof. MUDr. Jiří Kobr, Ph.D.

Plzeň 2016

Poděkování:

Poděkování patří na prvním místě mému školiteli, prof. MUDr. Jiřímu Kobrovi, Ph.D., a to nejen za podstatné odborné připomínky a pomoc, ale také za velmi důležitou osobní podporu během studia.

Dále chci poděkovat celému týmu JIRP Dětské kliniky za vynikající spolupráci jak v klinické části, tak při zpracování výsledků.

Práce by rovněž nemohla vzniknout bez významného podílu laboratorního zázemí – poděkování patří pracovníkům Centrální laboratoře pro imunoanalýzu.

A v neposlední řadě chci poděkovat kolegům z domovského pracoviště, kteří velmi ochotně převzali některé mé úkoly, na které už nezbývalo sil a času. Významnou zásluhu mají rovněž moji nejbližší v soukromém životě.

OBSAH

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	4
2	ÚVOD.....	6
3	DEFINICE ASPIRACE, PATOFYZIOLOGIE, DIAGNOSTIKA	7
3.1	MECHANISMY VEDOUcí K ASPIRACI	7
3.2	PATOFYZIOLOGIE ASPIRACE	9
3.3	DIAGNOSTIKA ASPIRACE	9
3.4	SPECIFICKÉ BIOMARKERY	11
3.5	CYTOKINY	15
3.6	POTENCIONÁLNÍ BIOMARKERY	16
3.7	SIGNÁLNÍ MOLEKULY	17
4	AKTUÁLNÍ MOŽNOSTI VYŠETŘENÍ KONCENTRACE BIOMARKERŮ PRO ZPŘESNĚNÍ DIAGNOSTIKY ASPIRAČNÍHO SYNDROMU	19
4.1	ÚVOD.....	19
4.2	MULTIPLEXOVÁ IMUNOANALÝZA	19
4.3	CHARAKTERISTIKA TYPŮ IMUNOANALÝZY	19
4.4	VYŠETŘENÍ ANALYZÁTOREM MAGPIX®	21
5	METODIKA:.....	22
5.1	CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTŮ	22
5.2	ODBĚR MATERIÁLU.....	24
5.3	PŘEHLED SLEDOVANÝCH MARKERŮ	24
6	VÝSLEDKY:	25
6.1	CÍL A HYPOTÉZA PRÁCE:	25
6.2	VÝSLEDKY.....	26
7	DISKUZE	35
8	ZÁVĚR.....	37
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	38

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADM	adrenomedullin
ALI	acute lung injury
ARDS	acute respiratory distress syndrome
BAL	bronchoalveolární laváž
BNP	brain natriuretic peptide
BPD	bronchopulmonální dysplazie
CAP	community acquired pneumonia
CAPS	combined acid and small food particles
CD	cluster of differentiation
CCD	charge coupled device
CINC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant
CPS	carbamoyl phosphate synthase
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ET	endothelin
FiO ₂	inspirační frakce kyslíku
GER	gastroezofageální reflux
HCl	kyselina chlorovodíková
HFOV	high frequency oscillatory ventilation
ICAM	intercellular adhesion molecule 1
IL	interleukin
JIP	jednotka intenzivní péče

LIS	lung injury score
LLAM	lipid-laden alveolar macrophages
MCP	monocyte chemoattractant protein
MIP	macrophage inflammatory protein
MMP	matrix metalloproteinase
MODS	multiple organ dysfunction syndrome
P _a O ₂	parciální tlak kyslíku v arteriální krvi
PCT	procalcitonin
PPI	proton pump inhibitor
PSI	pneumonia severity index
RSV	respiratory syncytial virus
SIDS	sudden infant death syndrome
SNAP	small non-acidified gastric particles
TIMP	tissue inhibitor matrix metalloproteinase
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TREM	triggering receptor expressed on myeloid cells
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
VAP	ventilator-associated pneumonia
VCAM	vascular adhesion molecule
VILI	ventilator induced lung injury

2 ÚVOD

Aspirace v dětském věku, zvláště pak u dětí nejmenších věkových kategorií, je společnou problematikou lékařů řady oborů. S touto závažnou a bohužel i v dnešní době mnohdy fatální komplikací, se setkávají nejčastěji lékaři urgentní medicíny, pediatři, dětské anesteziologové a chirurgové. Vzhledem k dostupnosti nových laboratorních postupů bylo hlavním cílem při vzniku této práce přispět k případnému doplnění aktuálních diagnostických postupů a pomoci tak nejen lékařům pečujícím o akutně nemocné děti, ale hlavně jejich malým pacientům. Jak vyplývá z vlastní práce, i přes významné pokroky v dětské intenzivní péči, zůstává řada problémů nezodpovězena.

Práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni - PRVOUK P-36.

3 DEFINICE ASPIRACE, PATOFYZIOLOGIE, DIAGNOSTIKA

Aspirace je definována jako spontánní a nežádoucí vniknutí nefyziologického obsahu pod vazy hlasové. Kromě vlastního žaludečního obsahu může být přítomná i bakteriální složka, tekutiny, krev, částice potravy. Aspirace může být tichá, případně klinicky nerozpoznatelná, anebo s klinickým korelátem různé závažnosti. Na rozdíl od regurgitace při aspiraci vždy vnikne aspirát pod vazy hlasové a následně do dolních cest dýchacích. Ani při využití současných diagnostických postupů nebývá aspirace vždy včas diagnostikována a řada aspiračních příhod není rozpoznána [1,2]. U dětí, zvláště novorozenců a kojenců, je riziko aspirace vyšší než u ostatní populace.

3.1 Mechanismy vedoucí k aspiraci

Riziko aspirace je v pediatrické populaci vyšší než u pacientů ostatních věkových kategorií. Přirozená funkce a koordinace polykání bývá porušena řadou negativních vlivů, které zvyšují riziko aspirace. Z patofyziologického hlediska k nim řadíme následující mechanismy [3]:

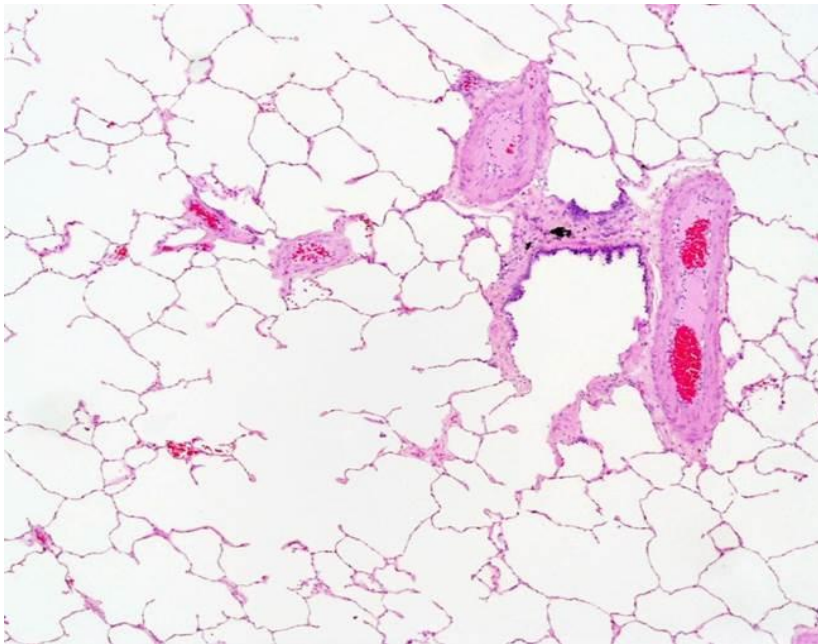
- Přejídná nekompetence gastroezofageálního přechodu - význam tohoto faktoru stoupá při zavedené nazogastrické sondě, gastrostomii, přítomném gastroezofageálním refluxu.
- Snížená motilita žaludku – bývá potencována mechanickou střevní obstrukcí, hypoxémií, šokovým stavem nebo užitím sedativ či anestetik.
- Zvýšení nitrobřišního tlaku – ileus, meteorismus, ascites. U dětí nejmenších věkových kategorií (novorozenci, malí kojenci) se tento mechanismu může uplatnit i po krmení.

Obranným mechanismem aspirace je reflexní apnoe, která zabraňuje pokračující aspiraci. Extrémním důsledkem je prolongovaná vagotonie s rezultujícím syndromem náhlého úmrtí kojence (SIDS). Ve většině případů však dochází při aspiraci ke korozivnímu poškození alveolokapilární membrány kyselým žaludečním obsahem

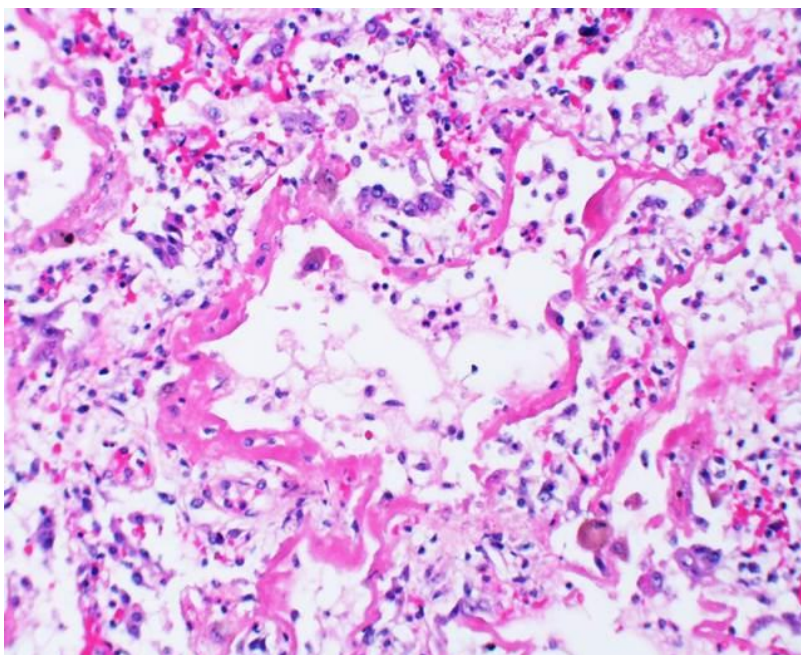
spojené se zvýšením její propustnosti. Výsledkem je extravaskulární exsudace tekutiny s vysokým obsahem proteinu a následná respirační dysfunkce.

Mikroskopické nálezy alveolokapilární membrány a změny při plicním poškození jsou znázorněny na obrázku 1 a 2:

Obrázek 1: Normální mikroskopický nálezy alveolokapilární membrány



Obrázek 2: Poškození alveolokapilární membrány při ARDS



3.2 Patofyziologie aspirace

Z patofyziologického hlediska lze rozdělit jednotlivé typy aspirace následovně:

- Aspirace čistého žaludečního sekretu, charakteru kyseliny chlorovodíkové s pH 1,5.
- Aspirace malých žaludečních částic nekyselé povahy (SNAP)
- Kombinovaná aspirace malých částic s HCl (CASP)

Vlastní poškození plicní tkáně po aspirační příhodě může být způsobeno přímým působením nízkého pH, jehož výsledkem je apoptóza či nekróza pneumocytů I. typu. Dalším mechanismem může být nepřímé poškození alveolokapilární membrány působením proinflamatorních mediátorů s následnou aktivací capsaicin-senzitivních receptorů (TRPV1) [4,5]. Experimentální práce u potkanů sledovala vliv jednotlivých typů aspirace na vývoj plicního poškození. Plicní poškození bylo sledováno změnami v poměru P_{aO_2}/F_{iO_2} , obsahem albuminu a počtem buněk v BAL. Poškození způsobené působením CAPS bylo závažnější v následujících ohledech: byly zvýšené hladiny IL-10, CINC-1 a MCP-1, naopak došlo ke snížení hladiny TNF α oproti aspiraci izolované žaludeční kyseliny či SNAP. Statistická analýza prokázala korelaci vzestupu hladiny IL-10 v BAL a alveolárního úniku albuminu u plicního poškození na podkladě aspirace. Je popsán efekt aplikace anti-IL-10 na zvýšení indexu permeability albuminu, ale tento efekt nebyl prokázán u anti-MCP-1. Výsledek studie ukázal, že různé typy aspirace mohou být charakterizovány typickými cytokinovými profily zahrnující IL-10 a MCP-1 a mohou mít diagnostické či prognostické využití [6].

3.3 Diagnostika aspirace

Ani současný pokrok v diagnostice plicního selhání nepřinesl definici zlatého standardu pro diagnostiku aspirací indukovaného plicního poškození. Dalším důležitým problémem je absence jasných diagnostických kritérií, která by poukázala na včasnou diagnostiku podílu bakteriálního podílu na aspirační příhodě. Odlišení aspirační pneumonitidy (inflamatorního plicního poškození) a aspirační pneumonie (zánětu na podkladě bakteriální kontaminace) představuje i nadále významný úkol

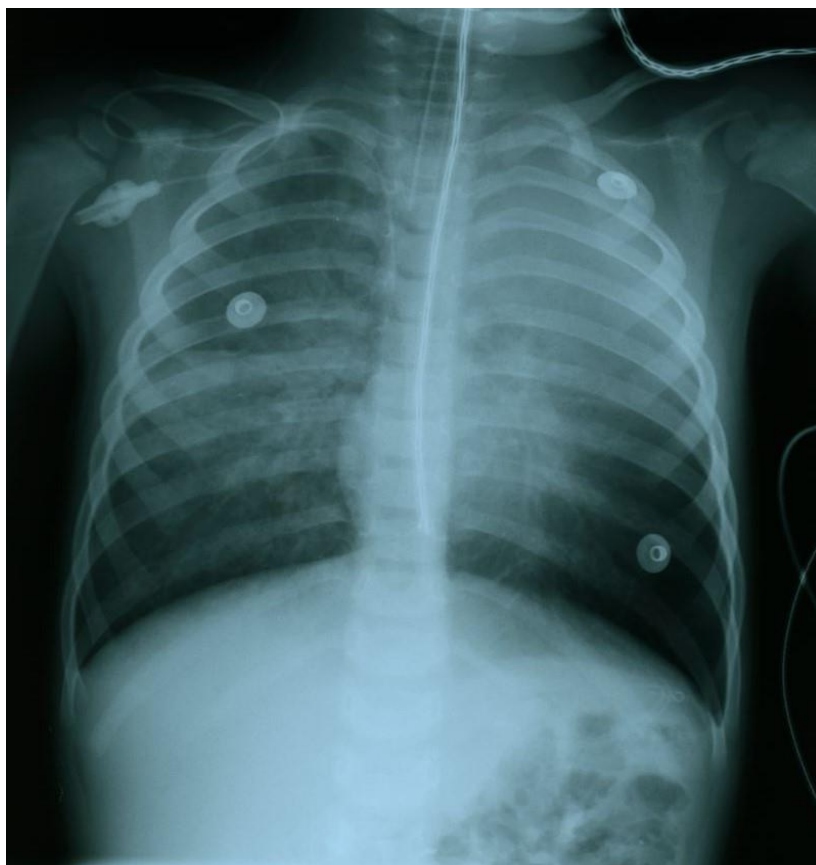
pro intenzivní medicínu [7]. Léčba aspirační pneumonie vyžaduje včasné nasazení antibiotické terapie. Rutinní podání antibiotik u každého aspiračního poškození plic je spojeno se zvýšením rizika následného rozvoje bakteriální superinfekce multirezistentními kmeny [8]. Neindikované podání antibiotik navíc zvyšuje riziko rozvoje pneumonie typu VAP na jednotkách intenzivní péče [9].

Významným diagnostickým kritériem aspirace tak i v dnešní době zůstávají klinické příznaky. Mezi základní klinické příznaky řadíme pískoty, tachypnoe, cyanózu, hypoxémii a hypotenzi, s následným rozvojem respiračního selhání. Jedná se však o příznaky velmi nespecifické. Navíc se setkáváme se situací, kdy aspirace bývá klinicky zcela němá. Specifickým příznakem pro aspiraci je přítomnost částic potravy, případně obsahu dutiny ústní, v bronchoalveolárním aspirátu. Jak již bylo uvedeno, pro včasné zahájení antibiotické terapie je nezbytné rozpoznat vniknutí bakteriálně kontaminovaného obsahu do dolních cest dýchacích. Experimentální studie prokázala vyšší bakteriální kontaminaci u zvířat s aplikací bakterií po aplikaci kyselého gastrického aspirátu, proti skupině s aplikací solného roztoku s neutrálním pH [10]. Riziko bakteriální kontaminace s rozvojem pneumonie je při aspirační příhodě vysoké, na druhé straně paušální, a ne ve všech případech indikované nasazení antibiotické terapie, zvyšuje výskyt rezistence nemocničních bakteriálních kmenů.

V klinické diagnostice aspirace je stále podstatné vyloučení ostatních příčin respiračního selhání. K diagnóze napomáhá kombinace respiračního selhání s přítomností zánětlivých změn na rentgenovém snímku, které bývají dominantně v dependentních okřscích plic. Ty mohou být ovlivněny polohou pacienta, při které k aspiraci došlo. Typický rentgenový nález je znázorněn na obrázku 3. Ani další využívané postupy, jako je pH monitoring, mikrobiální analýza, cytologie respiračního sekretu či endoskopie neprokázaly jednoznačné výsledky pro potvrzení diagnostiky aspirace [11,12,13]. Určení biomarkerů aspirace by mohlo výrazně zpřesnit diagnostiku aspirace, bakteriální kontaminaci spojenou s aspirací a následně tak přizpůsobit léčbu pacientů.

Využití specifických biomarkerů v diagnostice aspirace bylo studováno jak ve studiích u zvířat, tak v humánní medicíně. Některé slibné výsledky získané v experimentální medicíně nebyly dosud dostatečně ověřeny v klinické praxi [14].

Obrázek 3: Rentgenový nálezn aspiranční bronchopneumonie u dítěte



3.4 Specifické biomarkery

Pepsin – jedná se o proteázu trávicího traktu uvolňovanou z hlavních buněk žaludeční sliznice. Uvolňuje se degradací pepsinogenu jako zásobního prekurzoru působením HCl. Díky fyziologické absenci pepsinu v dýchacím systému je jeho nálezn v BAL významným indikátorem aspirace. Z historického hlediska se jedná o první biomarker studovaný v souvislosti s aspirací. Ke stanovení aktivity pepsinu v dýchacích cestách byla využita jeho schopnost rozštěpit definované množství hemoglobinu [15]. Řada studií se dále zaměřila na možnost využití pepsinu jak v experimentálních, tak klinických studiích [16.17]. V pediatrii se objevila snaha využít pepsin nejen v diagnostice aspirace a mikroaspirace, ale rovněž v diagnostice gastroezofageálního refluxu. Zvýšená hladina pepsinu byla prokázána u dětí s klinicky prokázanou aspirací (přítomnost mléka v aspirátu z endotracheální kanyly)

a dále u dětí s proximálním (ale nikoli distálním) GER. U dětí s kombinovaným typem GER (proximální a distální), byla vyšší hladina pepsinu jen u pacientů s klinickými příznaky chronického kašle [18]. U většiny dětí s anamnézou GER či chronických respiračních potíží, byla nalezena pozitivita pepsinu. V kontrolní skupině nebyla zaznamenána pozitivita pepsinu ani v jednom případě [19,20]. Průkaz pepsinu je možné využít k diagnostice aspirace ventilovaných novorozenců, u kterých došlo k aspiraci na podkladě GER [21]. Přítomnost pepsinu byla zaznamenána v tracheálním aspirátu u více než 90% ventilovaných nezralých novorozenců a byla častější u pacientů se zavedenou enterální výživou. U více než poloviny těchto novorozenců došlo k rozvoji bronchopulmonální dysplazie [22]. To poukazuje na možný podíl aspirace jako jedné etiologické příčiny rozvoje BPD. U akutně vzniklého respiračního selhání s nutností ventilace dospělých pacientů nepřinesly výsledky detekce pepsinu jednoznačné výsledky. Klinická data uvádí záchyt pepsinu z tracheálního aspirátu jen u 10% ventilovaných pacientů živených sondou. Pozitivní nález byl navíc pouze u pacientů, kteří neměli zvýšenou polohu horní poloviny těla [23,24].

U pacientů po transplantaci plic byl sledován vztah mezi aspirací žaludečního obsahu a dysfunkcí allograftu. Studie u 13 pacientů prokázala přítomnost pepsinu u všech transplantovaných pacientů, ale u žádného kontrolního zdravého dobrovolníka. Většina transplantovaných pacientů byla léčena PPI, ale tato léčba oproti předpokladům neměla vliv na potlačení příznaků GER [25].

V současné době je význam stanovení pepsinu, jako ukazatele aspirace zpochybňován. Je to dáno absencí standardu průkazu pepsinu v publikovaných klinických studiích. K tomu přistupuje problém velmi krátkého časového úseku, kdy je možno pepsin v BAL zachytit. Problémem je rovněž kvantitativní stanovení pepsinu v BAL, které bývá ovlivněno řadou faktorů.

Lipid-laden macrophages (LLAM) – jsou makrofágy, ve kterých je při mikroskopickém vyšetření patrný obsah lipidu. Původně byly považovány za průkaz aspirátu s přítomností tukových částic. V roce 1985 Corwin a Irwin prokázali přítomnost těchto makrofágů i u pacientů s ostatními onemocněními plicního parenchymu. V laboratorní praxi se jedná o semikvantitativní mikroskopické vyšetření 100 makrofágů s určením stupně obsahu lipidů v cytoplasmě makrofágů. Obsah

lipidu v makrofágu je hodnocen stupnicí od 0 do 4 dle opacifikace (průhlednosti) cytoplasmy. Stupeň 0 je dán naprostou průhledností cytoplasmy (bez obsahu tukové složky) a stupeň 4 úplnou neprůhledností cytoplasmy způsobenou přítomností lipidů. Dle popsaného hodnocení se může výsledný index pohybovat od 0 do 400. Ve své době se jednalo o doplňující možnost průkazu či vyloučení pravděpodobnosti aspirace u plicního onemocnění, avšak s relativně nízkou senzitivitou. Ta dosahovala pouze 57% [26]. Recentní studie však nepotvrdily signifikantní korelaci mezi obsahem LLAM a aspirací. U zvířecího modelu nebyl zaznamenán rozdíl v LLAM indexu při instilaci aspirátu s obsahem škrobových částí a roztoku obsahujícího bakterii *Pseudomonas aeruginosa* [27]. K obdobnému závěru došly i klinické studie. V *Pediatric* Bauer et al., neprokázali rozdíl v množství LLAM u dětí s chronickým plicním onemocněním s přítomností či nepřítomností aspirace [28]. Uvedené práce tak nepotvrdily vhodnost tohoto diagnostického postupu v diagnostice aspirace, a to ani u chronického plicního postižení.

Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (sTREM) – jedná se o skupinu receptorů exprimovaných na polymorfonukleárních neutrofilech a na zralých monocitech. Jsou charakterizované přítomností jediné imunoglobulin-like domény. Podléhají regulaci po TLR aktivaci. Hypotéza o specifitě těchto receptorů jako infekčních markerů nebyla potvrzena. Následné studie prokázaly vzestup sTREM při systémové odpovědi i při polytraumatech a inflamatorních střevních onemocněních [29,30]. Z uvedených důvodů se také nepotvrdila možnost využití sTREM jako markeru aspirace, či případný přínos pro diagnostiku aspiračního syndromu.

Procalcitonin – je peptid složený ze 116 aminokyselin s identickou sekvencí jako prohormon kalcitoninu [31]. Na rozdíl od něj však procalcitonin nevykazuje hormonální aktivitu. Za fyziologického metabolického stavu je PCT přítomen v C-buňkách štítné žlázy. Při bakteriální infekci je detekovatelný vzestup hladiny PCT za 2 - 4 hodiny po inzultu, maximální hladina je obvykle naměřena za 8 - 24 hodin po začátku zánětlivé odpovědi a vzestup je závislý na délce trvání infekce. Pokles PCT je pak signálem uzdravování. V pediatrii bylo využití procalcitoninu poprvé dokumentováno Assicotem et al., u diferenciální diagnostiky virové a bakteriální meningitidy [32]. V současné době je hladina PCT v séru rutinně používána jako ukazatel rychlé diagnostiky v intenzivní péči. Určité limity jeho použití jsou při lokálním zánětu, u maligních onemocnění a u pacientů s akutním kardiálním

selháním. Po studii Assicota následovala studie u pacientů se zánětlivým plicním postižením a u pacientů s aspirační pneumonií. Tato skupina pacientů byla porovnávána s nálezy u zdravých dobrovolníků bez plicní patologie. Studie prokázala nejvyšší hladinu PCT v séru u pacientů s pneumonií, v případě pacientů s aspirací byla naproti tomu nejvyšší hladina N-PCT peptidu (amino-terminal PCT peptid) [33]. I když se prokázalo zvýšení nejen sérové hladiny PCT, ale i ostatních prekurzorů kalcitoninu, v klinické praxi se uplatnil PCT jako hlavní marker bakteriální infekce, bez specifického významu pro respirační trakt.

Další práce se zaměřily na PCT jako možný ukazatel aspirace. Do studie bylo zařazeno 23 pacientů s uzavřeným poraněním hlavy [34]. U devíti pacientů se zjevnou aspirací diagnostikovanou přítomností zánětlivé infiltrace na RTG snímku do 24 hodin po inzultu a/nebo zjevnými známkami aspirace při bronchoskopickém vyšetření byly naměřeny iniciálně vyšší hodnoty než u pacientů bez aspirace. Je však potřeba připomenout, že i když sérová hladina PCT byla prokazatelně vyšší u pacientů s aspirací, ani v tomto případě nelze odlišit mezi dvěma skupinami aspirovaných pacientů – s příměsí mikrobiálních patogenů v aspirátu a bez ní.

CRP – poprvé byl detekován v roce 1930 u pacientů s pneumonií. Svůj název získal na základě reakce s pneumokokovým C-polysacharidem plasmy pacientů v akutní fázi pneumokokové pneumonie. V dalším období se stal jednou z klinicky nejčastěji využívaných bílkovin akutní fázi a významným ukazatelem inflamatorní reakce. Předpokládá se, že hraje hlavní úlohu v opsonizaci infekčního agens a jeho následné likvidaci [35]. Existuje jen limitovaný počet studií poukazujících na roli CRP u aspiračního syndromu, navíc s nejednoznačnými závěry [36]. Oproti praktickému využití v diagnostice bakteriální infekce dýchacích cest, ostatních orgánových systému i sepse tak stanovení hladiny CRP nelze jednoznačně využít v diagnostickém postupu aspiračního syndromu.

Brain natriuretic peptide – případně jeho neaktivní fragment NT-proBNP přispívá dlouhodobě ke zpřesnění diagnostiky kardiálního selhání. Jedná se o peptid s natriuretickým účinkem, který je za fyziologických okolností minimálně syntetizován v kardiomyocytech. K navýšení syntézy a následnému uvolnění dochází za patologických stavů, při tlakovém či objemovém přetížení myokardu. Je uvolněn ve formě prohormonu, který je následně štěpen na dva fragmenty s odlišnou biologickou

aktivitou (aktivní a neaktivní). Tato diagnostika je široce používána pro velmi dobrou dostupnost vyšetření a výrazné zvýšení původních fyziologických hodnot BNP $< 50 \text{ ng.l}^{-1}$ na hodnoty nad 500 ng.l^{-1} a obvykle až nad 1000 ng.l^{-1} v případě kardiálního selhání. V případě měření NT-proBNP jsou hodnoty zhruba poloviční. Řada prací prokázala jeho diagnostický a prognostický přínos nejen u kardiálního selhání, ale rovněž u plicního postižení (ARDS) [37]. V klinice se využívá jak stanovení BPN, tak jeho neaktivní složky, ale vzhledem k delšímu biologickému poločasu a stabilitě nachází větší uplatnění měření hladiny NT-proBNP.

Exhaled breath condensate leukotriens – leukotrieny se řadí mezi deriváty kyseliny arachidonové. Hrají významnou roli v zánětlivé odpovědi. Významné místo pak představují v patofyziologii astmatu. Leukotrien třídy B_4 (LTB_4) přispívá k chemotaxi a aktivaci neutrofilů a následné akumulaci těchto neutrofilů v plicích a dýchacích cestách u infekčních zánětlivých onemocnění postihujících respirační trakt. U LTB_4 byla experimentálně prokázána významná role i při sekundárním poškození při aspiraci kyselého obsahu [38]. Dle klinické pediatrické studie byla nalezena vyšší koncentrace exhalovaných leukotrienů u dětí s CAP oproti obdobně stejně velké skupině zdravých dětí [39]. Ačkoli v současné době není po technické stránce metoda měření vydechovaných leukotrienů standardizována, je možno ji označit na slibnou pro diagnostiku zánětlivého postižení dýchacího systému, a to včetně aspirace.

3.5 Cytokiny

V současné době je podrobně popsána jejich patogeneze plicního poškození na podkladě aspirace s následnou inflamatorní reakcí. Řada z nich se rovněž podílí na imunologických reakcích při expozici mikrobiálním patogenům. Po strukturální stránce se obvykle jedná o peptidy. Řadí se sem peptidy ze skupiny prozánětlivých cytokinů ($\text{TNF-}\alpha$), interleukiny ($\text{IL-1}\beta$ a IL-6) neutrofilní specifické chemokiny (IL-8) cytokiny a monocyty aktivované neutrofilní chemoatraktanty (CINC-1 , MCP-1 , MIP-2). Aktivita uvedených cytokinů generuje vzestup protizánětlivých cytokinů ($\text{IFN-}\gamma$, IL-10). Ty naopak snižují zánětlivou reakci a jejich vzestup je v optimálním případě

spojený se zlepšením stavu. Měření cytokinů v BAL využil Hutson et al., v experimentální práci na skupinách hlodavců se základními typy modelové aspirace (fyziologický roztok, HCl, SNAP a CASP). Jako prediktivní ukazatel byla statisticky významná změna koncentrace v BAL u TNF- α , MCP-1 a MIP-2. Výsledky u zvířat ukázaly nadějnou cestu využití změny hladiny cytokinů v BAL za 6 a za 24 hodin po experimentálním inzultu pro diagnostiku jednotlivých typů aspirace [40]. Jedná se o důležitou práci v diagnostice aspirace s nadějnými předpoklady pro aplikaci v humánní medicíně.

3.6 Potencionální biomarkery

Pokud se týká diagnostiky sepse či stupně orgánové poškození, nalezneme celou řadu biomarkerů, které přináší slibné výsledky pro klinické využití. Jen u málokterých však nalezneme podrobnější údaje o významu těchto biomarkerů při diagnostice aspirace.

Biomarkery, u kterých se předpokládá využití v diagnostice aspiračního syndromu, jsou následující:

Carbamoyl-phosphat synthase (CPS)-1. Řadí se do skupiny mitochondriálních enzymů exprimovaných v hepatocytech a slizničních střevních buňkách. Podílí se jako katalyzátor v močovinovém cyklu jaterní buňky. Potvrdil se předpoklad zvýšení CPS-1 u septických stavů a studie u myši prokázaly platnost této hypotézy [41]. Zda by tento biomarker mohl být přínosem jako ukazatel přítomnosti aspirace, případně při odlišení aspirace s/bez bakteriální patogenní příměsi, však dosud zůstává nezodpovězeno.

Dalším perspektivním biomarkerem je **endothelin (ET)-1** a jeho prekurzor (proET-1). Jsou součástí endotelinového systému s účastí na řadě patofyziologických pochodů, včetně sepse [42]. Klinická studie u 21 dospělých pacientů prokázala zvýšenou mortalitu u pacientů, kteří měli časně zvýšenou hladinu ET-1. Toto zvýšení bylo ve skupině pacientů, kteří nepřežili, doprovázeno i zvýšením TNF- α [43].

Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) jedná se o víceligandový transmembránový receptor o hmotnosti 35 kDa exprimovaný ve tkáních a cévách,

nejvyšší koncentraci pak RAGE dosahuje v plicní tkáni [44]. Je mu přisuzována významná úloha v aktivaci nukleárního faktoru κ B. Právě pro lokalizaci receptoru hlavně v plicní tkáni je předpoklad využití tohoto markeru pro diagnostiku poškození pneumocytů I. řádu [45].

Copeptin je peptid složený ze 39 aminokyselin, který vzniká odštěpením z prekurzoru, který má copeptin společný s vasopresinem. Rozsáhlá studie prokázala jeho prognostický význam u pacientů s infekcí dolních dýchacích cest. Vyšší hladina byla spojena se závažnějším průběhem a horší prognózou. Význam této studie spočívá v rozsáhlé kohortě pacientů ve studii, celkem do ní bylo zahrnuto 545 pacientů [46].

Adrenomodullin je peptid složený z 52 aminokyselin s vasodilatačním efektem. Hraje důležitou roli v imunoregulačních mechanismech. Jeho význam spočívá v inhibici proinflamatorní cytokinové produkce, mimo jiné inhibicí exprese MCP-1 [47]. Limitací pro jeho klinické využití je velmi rychlá eliminace z oběhu. Jako řešení se nabízí využití stabilnější prekurzoru (pro-ADM). Slibné výsledky byly nalezeny u pacientů s CAP, kde hladina pro-ADM byla signifikantně vyšší u pacientů s horší prognózou hodnocenou dle PSI [48].

3.7 Signální molekuly

Metaloproteinázy:

Matrix metaloproteináza 9 – řadí se do skupiny zinek-dependentních endopeptidáz. MMP9 spolu s elastázou působí jako regulační faktor pro migraci neutrofilů přes bazální membránu. MMP-9 se podílí na řadě buněčných pochodů, včetně produkce bioaktivních molekul, exprese apoptických ligandů či modelaci povrchových receptorů řady buněk. Regulačně pak při vzestupu hladiny MMP-9 působí specifické inhibitory metaloproteináz (TIMP). V průběhu studia matrix metaloproteináz byla zjištěna jejich významná úloha v regulaci vývoje extracelulární matrix v embryonální fázi [49]. Následně byla popsána jejich úloha v řadě biochemických a biologických pochodů [50]. V klinické problematice se prokázala klíčová role MMP-9, MMP-2 a jejich inhibitorů v patofyziologii inflamatorního poškození plic u ARDS u dospělých pacientů [51]. U patofyziologických pochodů u pediatrických pacientů s plicním selháním

nebyly prokázány identické výsledky jako u dospělých, autoři tento fakt vysvětlují kromě odlišného mechanismu rozvoje pediatrického ARDS také větší plasticitou plicního parenchymu u dětí ve stádiu reparačních změn [52]. Byla rovněž studována úloha MMP-9 jako prediktivního ukazatele závažnosti ARDS u dětí. Ve studii u 33 dětských pacientů s ARDS (kontrolní skupina zahrnovala 21 ventilovaných pacientů bez ARDS) byl prokázán statisticky významný vzestup MMP-8 i MMP-9. Rovněž v případě časného zvýšení MMP-9 byla prokázána statisticky významná korelace s délkou umělé plicní ventilace [53].

Adhezivní molekuly:

Adhezivní molekuly patří do skupiny proteinů odpovědných za adhezi leukocytů na endoteliální buňky, prezentaci antigenů s následnou aktivací leukocytů. Jsou indukovány vzestupem hladin cytokinů.

Intercellular Adhesion Molecule 1 – dle CD klasifikace nese označení CD 54. ICAM-1 je exprimována na povrchu řady buněk imunitního systému. U pediatrických pacientů byla zjištěna vyšší hladina u pacientů s akutním plicním poškozením. Vysoké hladiny ICAM-1, které dosahovaly hodnoty nad $1000\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, pak byly spojeny rovněž s vyšší úmrtností pacientů [54]. K obdobnému závěru pak dospěli autoři při studiu dynamiky ICAM-1 u dětí s indikací HFOV [55].

Vascular Adhesion Molecule 1 – dle CD klasifikace má označení CD 106. Řadí se mezi významné komponenty v leukocyto-endoteliální adhezivní kaskádě v daném časovém intervalu. Tento faktor je proto řadí k perspektivním ukazatelům rozvoje plicního poškození. V recentní klinické studii u dospělých pacientů došli autoři k obdobným závěrům jako u studií s adhezivní molekulou ICAM-1 [56].

Fraktalkin – řadí se do skupiny chemokinů CX₃C a po stránce strukturální se jedná o polypeptid. Primárně je exprimován na povrchu endoteliálních buněk s úkolem podpory adheze leukocytů na aktivované endoteliální buňky. Jako signální molekula působí v solubilní formě a je silným chemoatraktantem monocytů a T-lymfocytů.

4 AKTUÁLNÍ MOŽNOSTI VYŠETŘENÍ KONCENTRACE BIOMARKERŮ PRO ZPŘESNĚNÍ DIAGNOSTIKY ASPIRAČNÍHO SYNDROMU

4.1 Úvod

Jedním z důvodů relativně pomalého pokroku ve zpřesnění diagnostiky aspiračního syndromu byla finanční i technologická náročnost používaných metodik. To byl důvod limitace využití těchto vyšetření v klinické praxi, které se tak uplatňovaly hlavně v experimentálních studiích. Teprve zavedení multiplexové imunoanalýzy umožnilo výraznější pokrok v klinické analýze biomarkerů. Zavedení multiplexové imunoanalýzy na lékařské fakultě UK v Plzni (pracoviště Centrální laboratoře pro imunoanalýzu) v roce 2004 přineslo významné možnosti pro klinickou praxi. Spolupráce s uvedeným pracovištěm byla významným faktorem umožňující vlastní provedení práce.

4.2 Multiplexová imunoanalýza

Multiplexová imunoanalýza je analytický postup, který umožňuje stanovení většího množství analytů v jediném vzorku o malém objemu (mikrolitry). Podle metodiky provedení dělíme multiplexovou imunoanalýzu na tandemovou hmotnostní spektrometrii, mikročipy a XMAP metodiku.

4.3 Charakteristika typů imunoanalýzy

Jednotlivé typy se liší nejen vlastním provedením analýzy, ale rovněž dalšími parametry. Charakteristika podtypů imunoanalýzy je uvedena s ohledem na klinické využití [57]. Klady a zápory jednotlivých metodik jsou uvedeny v tabulce 1.

Tandemová hmotnostní spektrometrie:

Tato metodika je vhodná pro vyšetření velkého počtu vzorků. Pořizovací náklady jsou vysoké. Velké nároky jsou kladeny na obsluhující personál. V pediatrii (resp. neonatologii) se tato metodika rutinně využívá při novorozeneckém screeningu metabolických vad. Tandemová hmotnostní spektrometrie umožní vyšetření řady metabolických vad s nízkou incidencí plošným vyšetřením všech novorozenců metodou suché kapky krve [58].

Mikročipy:

Jedná se o vyšetření proteinů na podkladě genetiky. Určitou nevýhodou je semikvantitativní stanovení výsledků, což je limitujícím faktorem pro porovnávání výsledků a jejich statistické zpracování.

XMAP:

Imunoanalytická metodika umožňující kvantitativní určení koncentrace většího počtu analytů. Tato metoda umožňuje analýzu různých tělesných tekutin jak v humánních, tak experimentálních podmínkách. Počet látek, které je možno analyzovat, záleží na použitém přístrojovém vybavení.

Špičkové přístroje Flexmap[®] umožňují analýzu až 500 látek v jednom vzorku, doba vyšetření je méně než 30 minut. Jedná se však o vybavení finančně extrémně náročné, které nebývá běžně k dispozici. Vlastní zpracování probíhá metodou průtokové cytometrie. Měřený analyt je navázán na barevné mikrokuličky a vlastní měření probíhá 2 lasery, kdy jeden měří druh analytu (kvalitu) a druhý množství analytu (kvantitu).

Přístroj Luminex[®] 100/200TM je analytické zařízení pracující na obdobném principu a umožňuje vyšetření až 100 analytů z 1 vzorku.

Zařízení Magpix[®] představuje dostupnou variantu pro vyšetření maximálně 50 vzorků v objemu 25 mikrolitrů. Doba vyšetření je do 60 minut. Toto zařízení je dostupné pro

potřeby Fakultní nemocnice Plzeň a Lékařské fakulty UK v Plzni. Výsledky tohoto vyšetřovacího postupu byly využity pro vlastní práci.

4.4 Vyšetření analyzátozem Magpix®

Tento typ analyzátoru představuje optimální poměr mezi náklady a výtěžností.

U preanalytické fáze odpadá nutnost separace na mikrofiltračních destičkách, což umožňuje automatizaci a následně zrychlení celého postupu. Vlastní analýza již neprobíhá na podkladě průtokové cytometrie, ale magnetické separace. Barevné kuličky nesoucí antigen nebo protilátku jsou zároveň magnetické a při měření jsou magnetem nataženy do měřící komůrky a umístěny na měřící stěnu. Dojde k osvětlení zeleným (525nm vlnové délky) a červeným (635nm vlnové délky) laserem. Vlastní vyhodnocení probíhá po nasnímání CCD kamerou a následným softwarovým zpracováním. Jedná se o otevřený systém, lze tedy využívat kity s různou skladbou vyšetřovaných analytů. Určitou nevýhodou (ale stejnou jako v ostatních postupech) je nemožnost statimového vyšetření.

Tabulka 1: Srovnání jednotlivých metodik

Metodika	Cena	Náročnost	Srovnání	Proteom	Genom
Tandemová MS	-	-	+	+	+
Mikročipy	+	+	-	+	+
XMAP	+	+	+	+	+

5 METODIKA:

5.1 Charakteristika souboru pacientů

Kritériem pro zařazení pacienta do souboru bylo respirační selhání u pacienta < 18 let věku s nutností umělé plicní ventilace. Etiologicky se ve všech případech jednalo o plicní selhání na podkladě aspirace. Všichni pacienti byly léčeni na JIRP Dětské kliniky LF UK a FN Plzeň.

Závažnost plicního postižení byla hodnocena dle Lung Injury Score (Murray score), které je uvedeno v tabulce 2. Závažnost celkového stavu dětských pacientů byla hodnocena podle Pediatric risk of mortality score - PRISM [59].

Požadovaným kritériím vyhovovalo celkem 15 pacientů, ve věkovém rozmezí od 0 – 132 měsíců, s mediánem 34 měsíců. Poměr muži/ženy byl 7/8. LIS skóre hodnotící závažnost respiračního selhání mělo medián 2,0 s rozmezím od 0,5 do 2,8. PRISM skóre hodnotící závažnost celkového stavu pomocí predikce mortality se pohybovalo od 10 do 40 s mediánem 18. Jednalo se tedy o pacienty v klinicky závažném stavu. Dva pacienti zemřeli, mortalita v daném souboru pacientů byla 13,3%. Podrobné údaje jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 2

Lung Injury Score

1. RTG nález:

Bez alveolární konsolidace	0
Alveolární konsolidace v 1 kvadrantu	1
Alveolární konsolidace ve 2 kvadrantech	2
Alveolární konsolidace ve 3 kvadrantech	3
Alveolární konsolidace ve 4 kvadrantech	4

2. Hypoxemické skóre:

PaO ₂ /FiO ₂ > 300	0
PaO ₂ /FiO ₂ 225 – 300	1
PaO ₂ /FiO ₂ 175 – 224	2
PaO ₂ /FiO ₂ 100 – 174	3
PaO ₂ /FiO ₂ < 100	4

3. PEEP skóre (v případě UPV):

PEEP ≤ 5 cm H ₂ O	0
PEEP 6 – 8 cm H ₂ O	1
PEEP 9 – 11 cm H ₂ O	2
PEEP 12 – 14 cm H ₂ O	3
PEEP > 15	4

4. Plicní compliance (je-li známá):

Compliance > 80 ml/cm H ₂ O	0
Compliance 60 – 79 ml/cm H ₂ O	1
Compliance 40 – 59 ml/cm H ₂ O	2
Compliance 20 – 39 ml/cm H ₂ O	3
Compliance < 19 ml/cm H ₂ O	4

Celkové skóre se vypočte podílem každé části:

0 – bez plicního poškození

1 – 2,5 – lehké až střední plicní poškození

> 2,5 – těžké plicní poškození

Tabulka 3: Souhrn údajů výzkumu

	N	průměr	SD	medián	Minimum	maximum
Počet pacientů	15					
Věk (měsíce)	15	22,0	34,0	9,0	0,0	132,0
Hmotnost (kg)	15	11,4	11,9	9,0	3,0	50,0
Pohlaví						
Žena	8	53,3				
Muž	7	46,7				
PRISM	15	18,9	9,3	18,0	10,0	40,0
LIS	15	2,0	0,5	2,0	1,0	2,8
Úmrtí						
Ano	2	13,3				
Ne	13	86,7				

5.2 Odběr materiálu

U daných pacientů byla vyšetřována koncentrace sledovaných analytů v séru a bronchoalveolární aspirátu v čase za 1, 24 a za 48 hodin. Jako čas 0 byl určen čas intubace u pacientů intubovaných na JIRP, případně čas přijetí na JIRP u těch pacientů, kteří vyžadovali UPV již před přijetím na JIRP. Vlastní imunoanalýza byla provedena s využitím přístroje Magpix[®].

5.3 Přehled sledovaných markerů

Do studie byly zařazeny markery, které se podílejí na patofyziologické kaskádě respiračního selhání, tedy TNF- α , IL-6 a BNP. Tyto byly doplněny biomarkery, u kterých jsme zvažovali možnost jejich následného využití v upřesnění diagnostiky aspiračního syndromu (MMP9 a TIMP1, ICAM, VCAM a fraktalkin).

6 VÝSLEDKY:

6.1 Cíl a hypotéza práce:

Na základě nově dostupných imunoanalytických metod byla provedena analýza biomarkerů u dětských pacientů s respiračním selháním na podkladě aspirace. Byly vyšetřovány jednotlivé markery v séru a bronchoalveolární tekutině, která byla získána tracheální aspirací. Při práci byla využita metodika imunoanalytické sandwichové metody systémem MAGPIX[®]. Popis této metody je uveden v předchozím textu.

V daném souboru pacientů byly stanoveny k ověření 3 cíle:

1. *Existence korelace mezi dynamikou koncentrace analytů v séru a BAL.*
2. *Statistická významnost časového vzestupu (poklesu) sledovaných biomarkerů v séru a BAL.*
3. *Závislost dynamiky sledovaných biomarkerů na klinické závažnosti stavu pacienta (dle LIS a PRISM skóre).*

U všech pacientů byla vyšetřena hladina biomarkerů v čase 1, 24 a 48 hodin a to jak v plasmě, tak v bronchoalveolární tekutině. Čas 0 byl dán u pacientů s provedenou intubací před přijetím na JIRP časem přijetí, u ostatních pacientů časem intubace. Výčet markerů s jednotkami, ve kterých je udána jejich koncentrace, je uveden v tabulce 4.

Tabulka 4: Seznam markerů

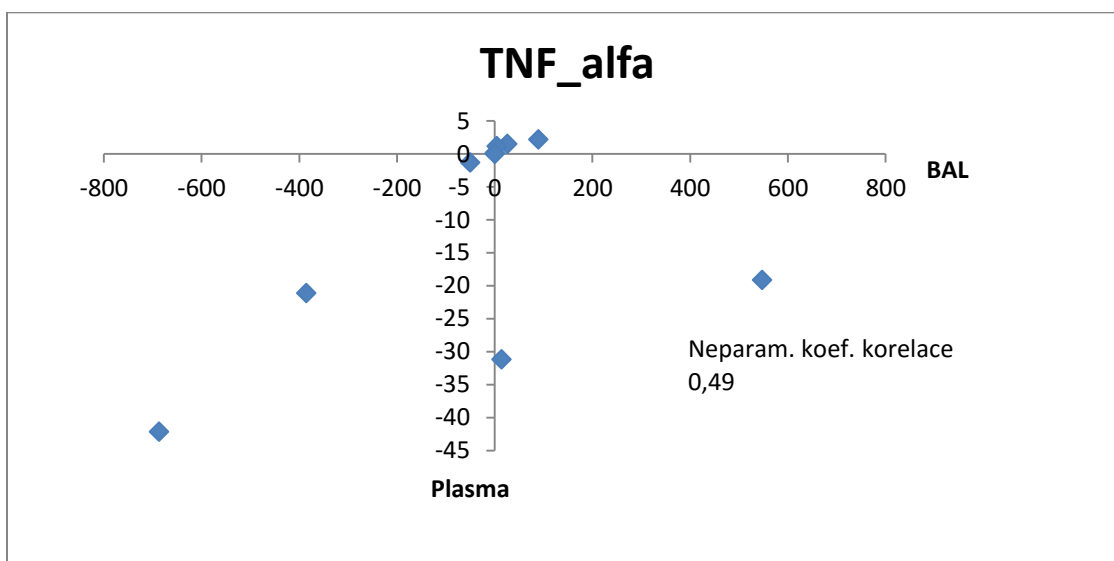
TNF- α (pg.ml ⁻¹)	MMP9 (pg.ml ⁻¹)	BNP (pg.ml ⁻¹)	Fractalkin (pg.ml ⁻¹)
IL-6 (pg.ml ⁻¹)	TIMP1 (ng.ml ⁻¹)	ICAM (ng.ml ⁻¹)	VCAM (ng.ml ⁻¹)

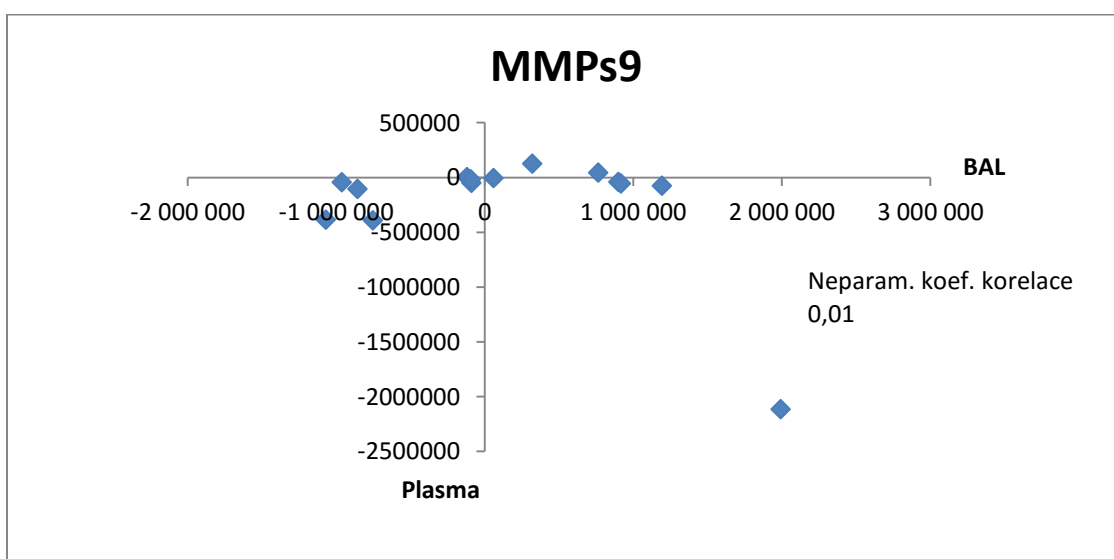
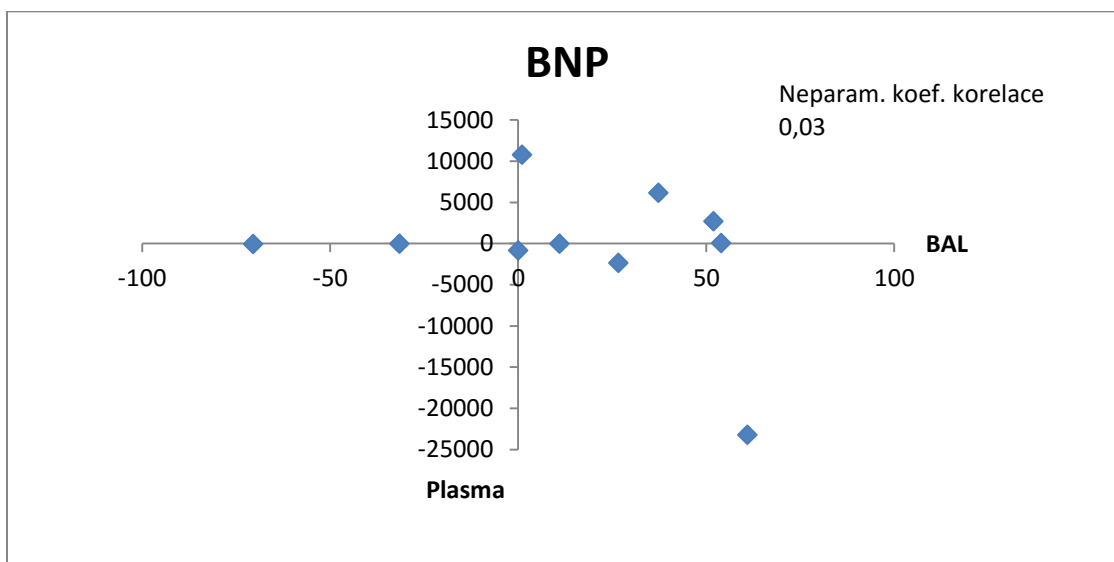
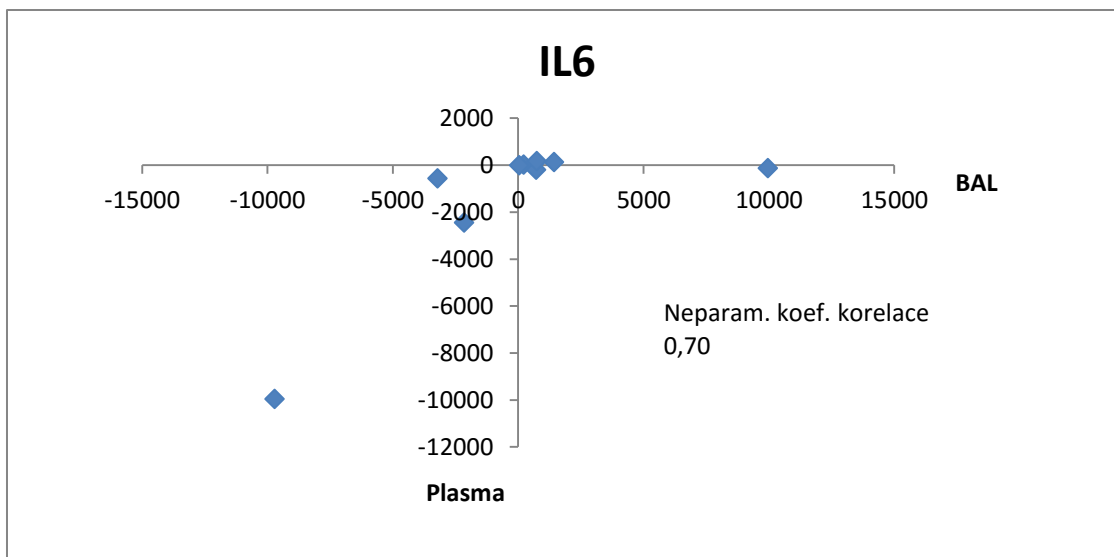
6.2 Výsledky

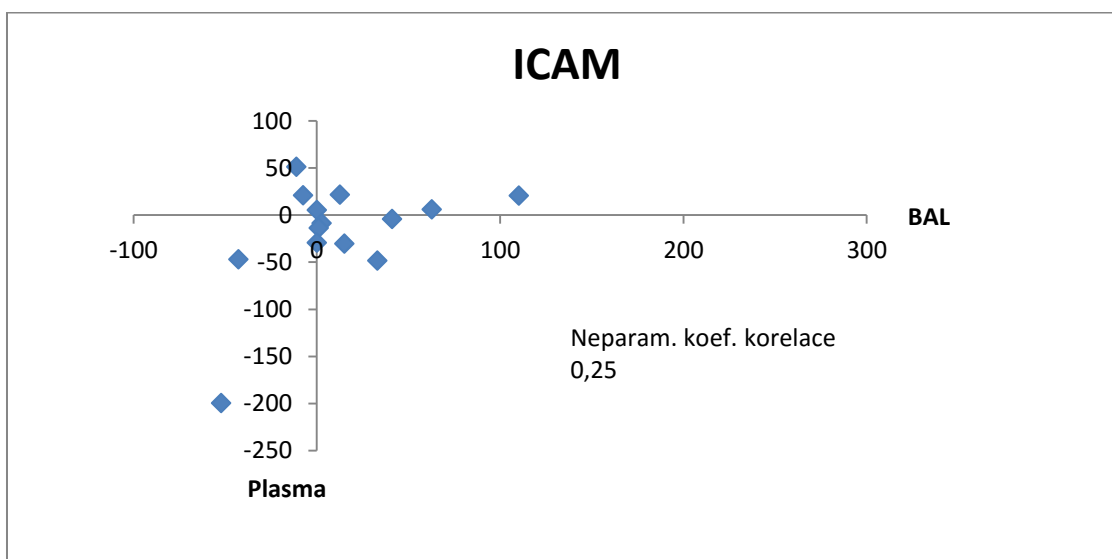
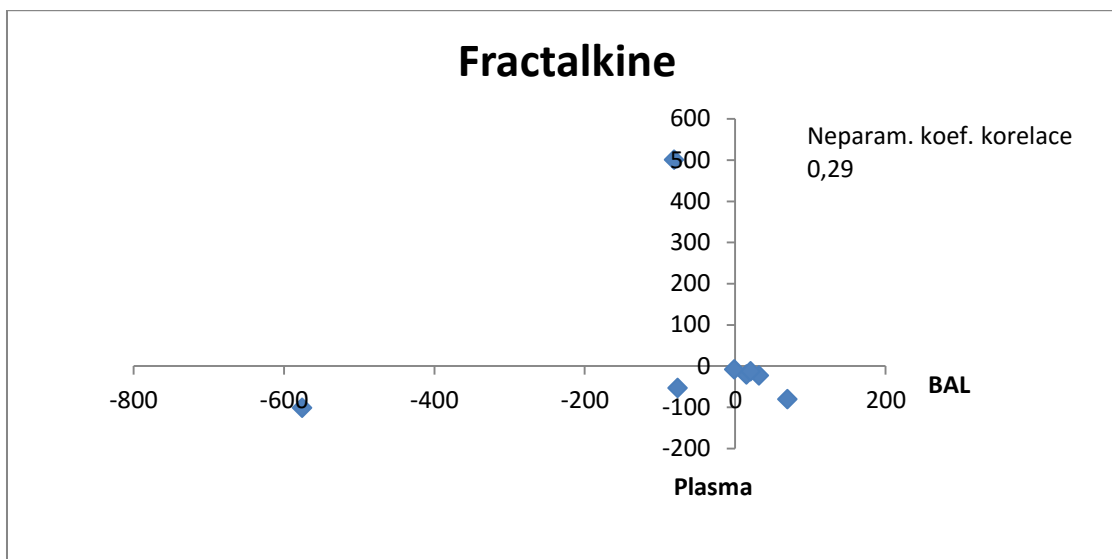
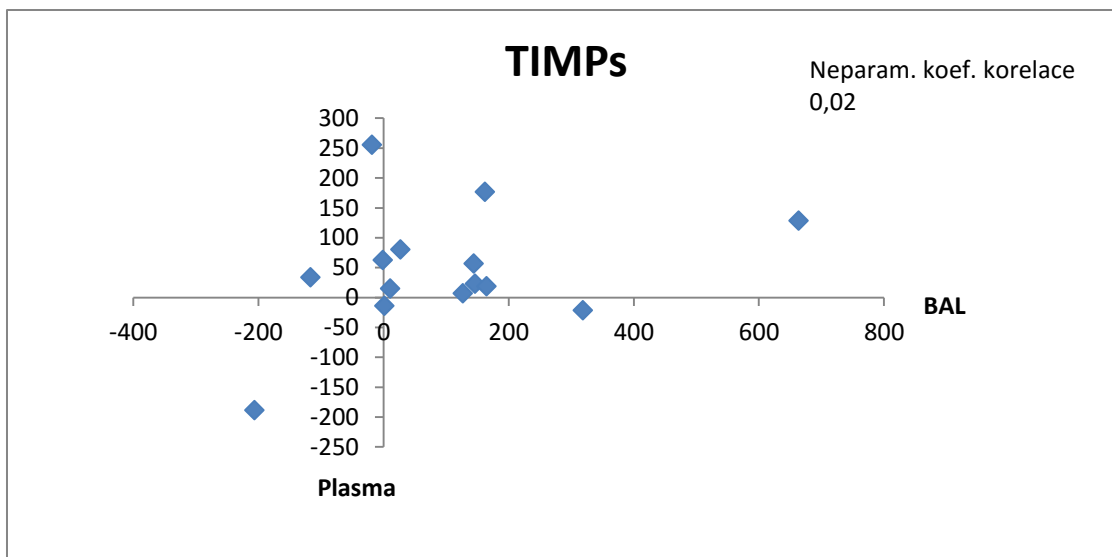
1. Výsledky prvního cíle - existence korelace mezi dynamikou koncentrace analytů v plasmě a tracheálním aspirátu

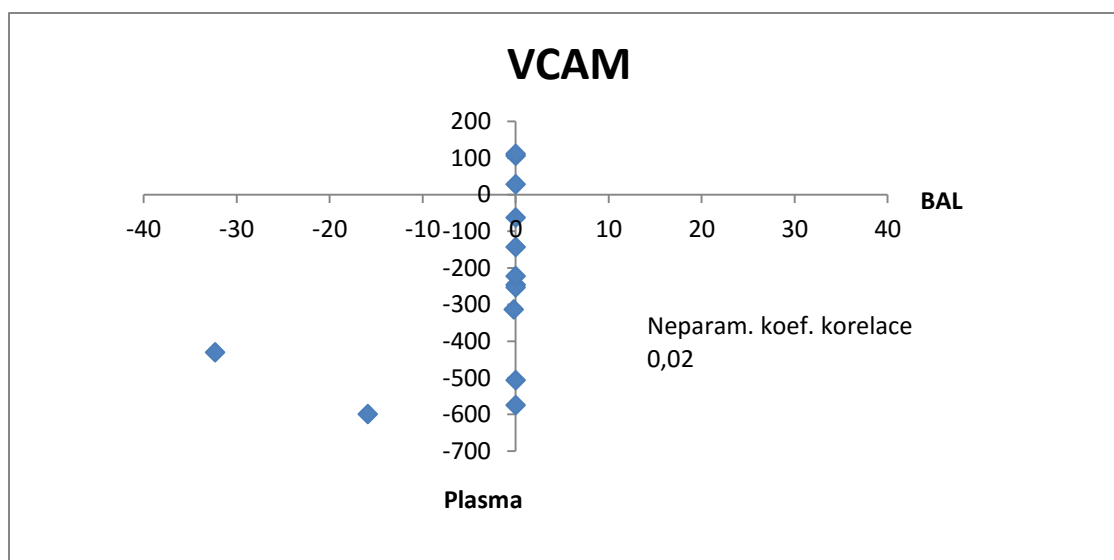
Výsledky jsou uvedeny v následujících grafech pro jednotlivé biomarkery. V uvedených grafech byl hodnocen 24 hodinový rozdíl, který byl stanoven jako hodnoty v čase 24 minus hodnota v čase 1. Vzhledem k počtu pacientů a hodnot rozložení výsledků byly použity neparametrické koeficienty korelace.

Výsledky jsou uvedeny v následujících grafech pro jednotlivé biomarkery:









U žádného ze sledovaných parametrů nebyla prokázána statisticky významná korelace mezi dynamikou změny biomarkerů v séru a BAL.

2. Výsledky druhého cíle - statistická významnost vzestupu (poklesu) sledovaných biomarkerů v séru a v bronchoalveolární tekutině

Hodnocení dynamiky změn koncentrace mediátorů v čase jsou uvedeny v následujících tabulkách. Pro statistické zhodnocení byl vybrán Wilcoxonův párový test:

Hodnoty biomarkerů v séru v čase 1 hodina:

Parametry	N	Medián	1. kvartil	3. kvartil
TNF_alfa	14	8,76	4,84	24,46
IL6	15	133	11,41	575,56
BNP	15	277,98	96,34	2271,59
MMPs9	14	175 978	79 003,3	284951
TIMPs1	14	115,95	71	169,8
Fractalkine	13	73,12	48,63	122,95
ICAM	14	155,15	121,06	218,07
VCAM	13	1074,13	919,21	1698,7

Změna hodnot biomarkerů v séru v čase 24 hodin:

Parametry	N	medián	1. kvartil	3. kvartil	p	Významnost
TNF_alfa	14	5,555	3,34	9,46	0,0382	*
IL6	15	49	17,16	149,46	0,0884	NS
BNP	15	1404,66	55,03	8246,31	0,57	NS
MMPs9	14	67624,02	38753,02	175927,5	0,0303	*
TIMPs	14	151,1	81	301,9	0,0413	*
Fractalkine	13	33,06	9,17	58,5	0,2081	NS
ICAM	14	146,32	107,31	191,69	0,3967	NS
VCAM	14	966,225	673,09	1354,89	0,0088	**

Změna hodnot biomarkerů v séru v čase 48 hodin:

Parametry	N	medián	1. kvartil	3. kvartil	p	Významnost
TNF- α	13	8,06	4,22	9,9	0,0464	*
IL6	14	49,08	19,29	104,9	0,0736	NS
BNP	14	324,21	34,32	1864,92	0,7057	NS
MMPs9	13	82199,34	67517,08	118814,5	0,0231	*
TIMPs	13	166,7	83,6	219,8	0,9165	NS
Fractalkine	12	29,68	17,315	60,995	0,0597	NS
ICAM	13	157,14	102,86	187,28	0,7532	NS
VCAM	13	809,04	674,18	1229,73	0,0186	*

Z výše uvedeného přehledu je patrné, že statistickou významnost změn koncentrace sledovaných biomarkerů v séru mají po 24 hodinách: TNF- α , MMP9, VCAM (sestupné tendence) a TIMP1 (vzestup). Po 48 hodinách jsou statisticky významné změny v séru u TNF- α a MMP9 (po úvodním poklesu následný vzestup) a VCAM, kde došlo k opětovnému, statisticky významnému poklesu.

Hodnoty biomarkerů v BAL v čase 1 hodina:

	N	medián	1. kvartil	3. kvartil
BAL- TNF- α	12	4,2	0,64	55,155
BAL- IL-6	10	644,515	13,24	2184,2
BAL- BNP	12	3,2	3,2	29,73
BAL- MMPs 9	15	331762,3	112339	991962,3
BAL- TIMPs 1	15	28,9	16	97,3
BAL - Fractalkine	11	14,66	3,2	96,2
BAL- ICAM	15	11,47	8	28,83
BAL- VCAM	15	8	8	8

Změna hodnot biomarkerů v BAL v čase 24:

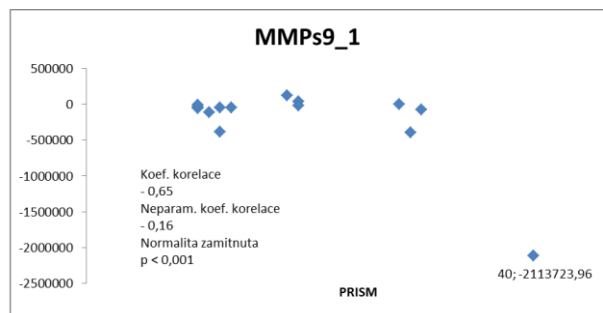
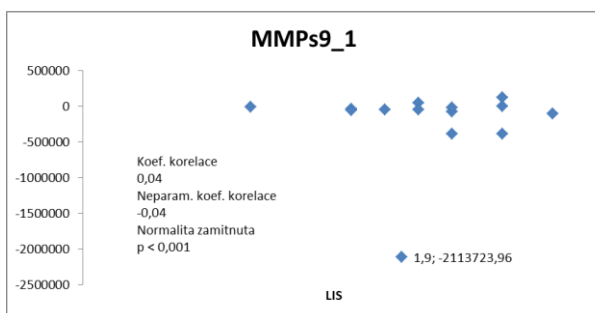
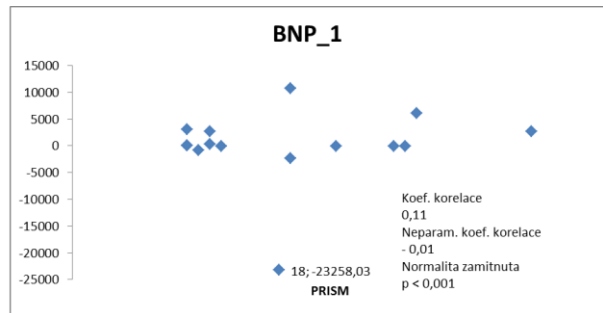
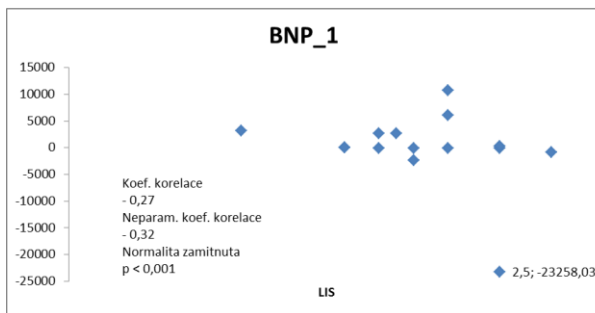
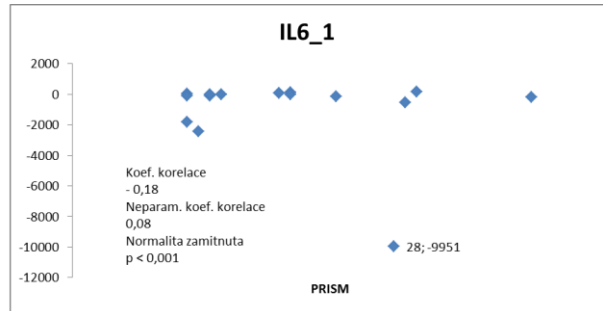
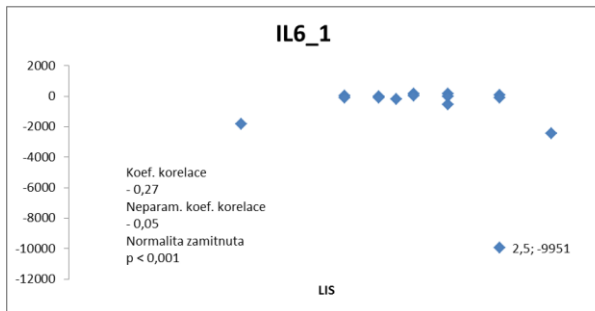
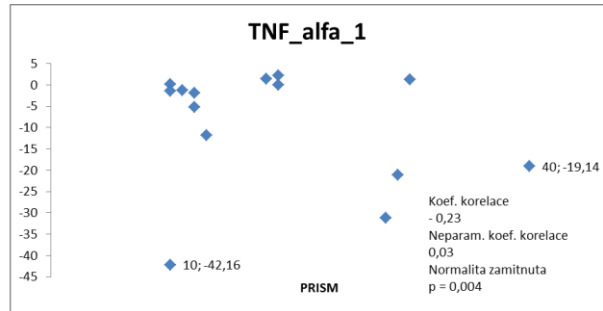
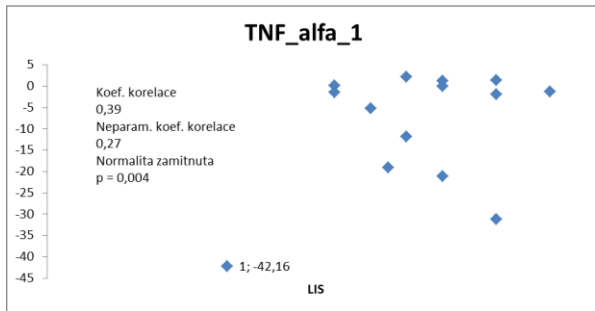
Parametry	N	medián	1. kvartil	3. kvartil	p	významnost
BAL- TNF- α	14	6,21	0,64	27,11	0,8934	NS
BAL- IL-6	13	361,08	53,55	1434,32	0,859	NS
BAL- BNP	13	40,45	16,2	57,21	0,2207	NS
BAL- MMPs 9	15	570103	196112,7	1395976	0,4265	NS
BAL- TIMPs 1	15	160,3	31,1	192,9	0,0409	*
BAL - Fractalkine	9	26,51	19,46	54,5	0,5754	NS
BAL- ICA (ng/ml)	15	22,57	8	70,54	0,1632	NS
BAL-VCAM (ng/ml)	15	8	8	8	0,666	NS

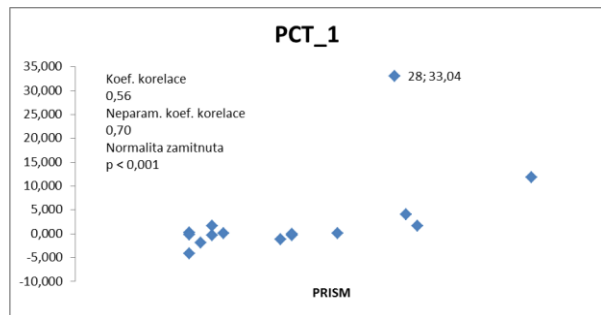
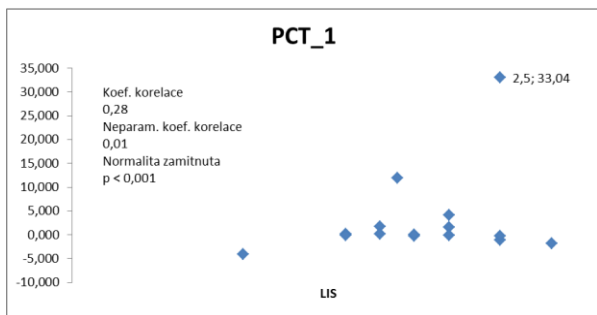
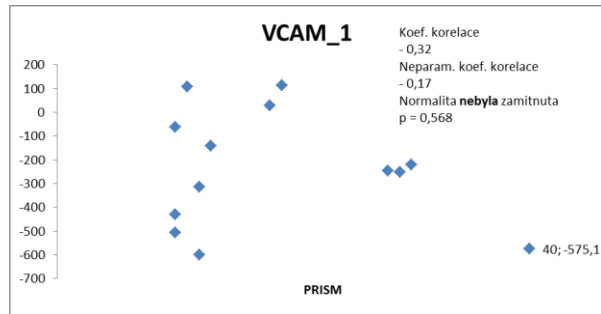
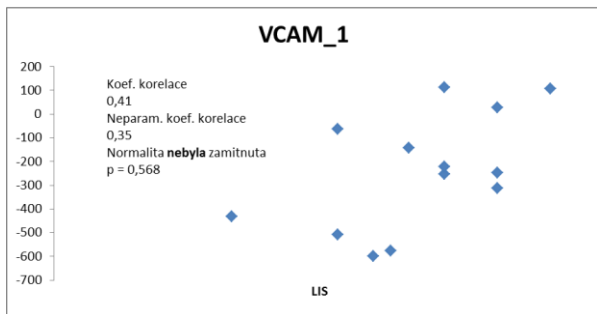
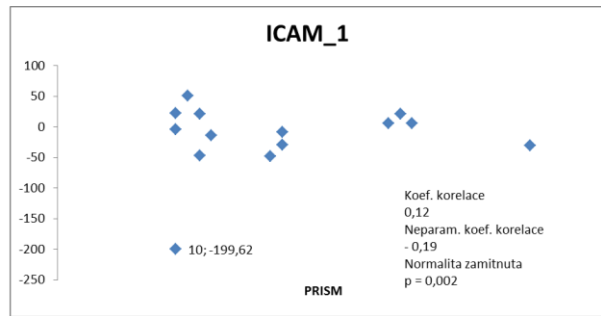
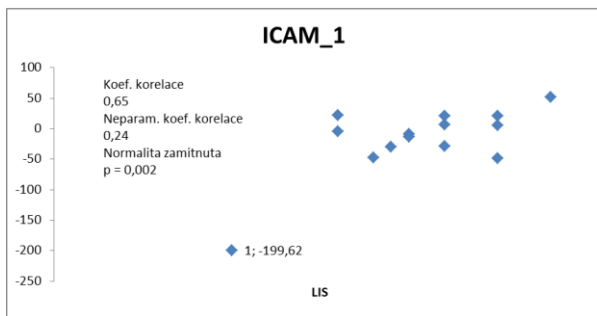
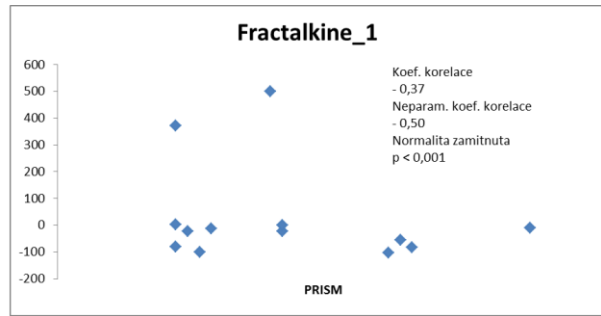
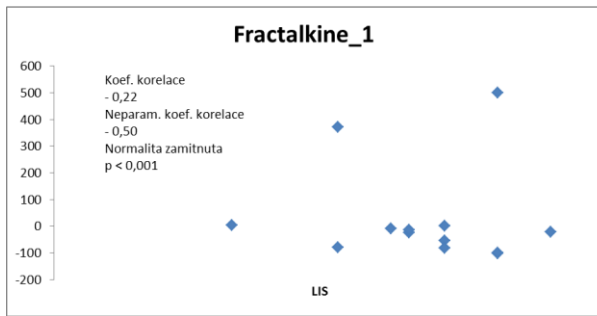
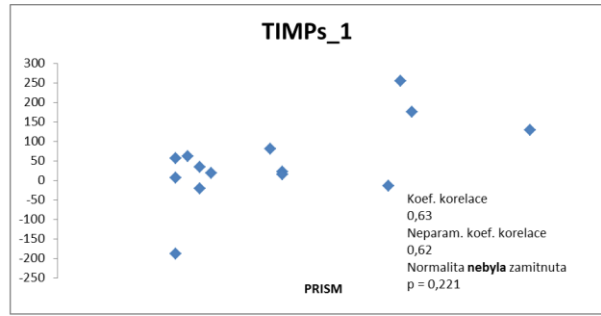
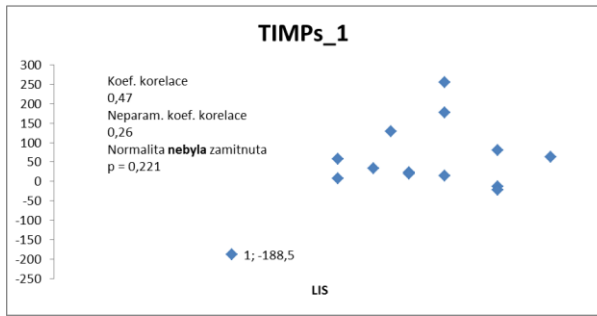
Změna hodnot biomarkerů v BAL v čase 48 hodin:

Parametry	N	medián	1. kvartil	3. kvartil	p	významnost
BAL- TNF- α	10	10,425	1,75	38,44	0,944	NS
BAL- IL-6	10	182,865	64,02	676,83	0,2626	NS
BAL- BNP	10	20,265	7,97	46,39	0,5276	NS
BAL- MMPs 9	14	472079	222318,8	868332,6	0,7299	NS
BAL- TIMPs 1	14	144,45	38,2	215,8	0,0595	NS
BAL - Fractalkine	12	57,695	17,695	78,43	0,475	NS
BAL- ICAM (ng/ml)	14	10,955	8	25,25	0,8505	NS
BAL- VCAM (ng/ml)	14	8	8	8	0,8243	NS

Změna hladin sledovaných biomarkerů v BAL byla statisticky významná po 24 hodinách pouze u TIMPs1 (vzestup), změny po 48 hodinách neprokázaly statistickou významnost ani u jednoho biomarkeru.

3. Závislost dynamiky biomarkerů na závažnosti plicního postižení (dle LIS a PRISM skóre):





Poslední část statistického zpracování vycházela z předpokladu možné hodnocení závažnosti klinického stavu, tedy z korelace mezi dynamikou koncentrace jednotlivých biomarkerů a závažností klinického stavu dle LIS a PRISM skóre. V této části práce však nebyla prokázána korelace ani v jednom ze sledovaných biomarkerů.

7 DISKUZE

Plicní selhání u dětí představuje závažný stav v dětské intenzivní péči. Uvedená studie využívá nové možnosti imunoanalytických metod a navazuje na experimentální práci [60], která vznikla na stejném pracovišti. Věnuje se v pediatrii významné oblasti respiračního selhání na podkladě aspirace. V písemnictví je relativně malé množství prací, zabývajících se touto oblastí.

Závažným problémem v analýze a následné interpretaci imunologické kaskády jednotlivých markerů může být rozlišení vlivu primárního inzultu (aspirace) a následné terapie (umělá plicní ventilace) s rizikem rozvoje VILI. To se v práci prokázalo v analýze dynamiky biomarkerů v plasmě a v BAL. Změny hladin mediátorů v séru a BAL nemají statisticky prokázanou korelaci. Pro případné budoucí studie z toho vyplývá vhodnost vyšetření koncentrace v obou biologických materiálech.

Statisticky významné jsou změny v sérových hladinách TNF- α , MMP9, VCAM a TIMP1. U prvních tří jmenovaných dochází v prvních 24 hodinách k významnému poklesu sérových hladin. Tyto výsledky jsou v souladu s dříve publikovanou prací Šašek et al. [61], která hodnotila dětské pacienty s respiračním selháním s různými etiologickými příčinami. Určitým překvapením jsou nižší absolutní hodnoty sérových hladin u všech sledovaných markerů. Nepotvrdila se tak úvaha, že aspirace by měla mít vyšší mediátorovou odezvu pro předpokládanou agresivitu úvodního inzultu způsobujícího plicní poškození. Po 48 hodinách došlo u pacientů s aspirací ke statisticky významné změně jen u VCAM (pokračující pokles). Opačný trend (vzestup) byl pozorován u tkáňového inhibitoru TIMP1, který byl v čase 24 hodin statisticky významný. Jedná se o reakci tkáňového inhibitoru s vazbou na zinkový atom MMP9.

Poněkud odlišné, ale dle závěrů v bodu 1 vcelku očekávané výsledky, pak byly ve sledování dynamiky koncentrace analytů v BAL. Statisticky významný byl pouze pokles TIMP1 ve 24. hodině.

Další fáze práce se soustředila na zjištění vztahu mezi změnami hladin jednotlivých markerů a závažností klinického stavu hodnoceného dle skórovacích systémů LIS a PRISM. Bylo využito neparametrických metod korelace z důvodu zamítnutí normality rozložení. Statisticky významná korelace mezi změnou hladiny sledovaných markerů a závažností plicního poškození (LIS) a celkového stavu pacienta (PRISM) nebyla prokázána.

Ze sledovaných markerů se potvrdily slibné výsledky sledování hladin matrixových metaloproteináz (v uvedeném případě MMP9) a jejího inhibitoru (TIMP1). Ze skupiny adhezivních molekul zprostředkovávajících pevnou vazbu leukocytů na endoteliální buňky byly zaznamenány statisticky významná data u VCAM. V kontroverzi s publikovanou prací Šaška se neprokázaly změny u fractalkinu a ICAM.

Jedním z významných cílů práce měl být příspěvek k diferenciální diagnostice plicního selhání na podkladě aspirace. Jak je uvedeno v patofyziologické části, mechanismus plicního poškození při aspiraci má svá specifika a přes řadu provedených studií je objektivní diagnostika stále obtížná. V této práci byly prokázány nižší sérové hladiny MMP9 u aspirovaných pacientů než u souboru pacientů s ostatními typy respiračního selhání. Co je ale podstatné, je průkaz vysokých hladiny MMP9 v BAL. Ve sledovaném souboru jsou naměřené hodnoty ve 48.hodině více než 2 krát vyšší než v recentní práci Kong et al., která sledovala dětské pacienty s respiračním selháním na podkladě RSV infekce [62]. Přičemž v citované práci koncentrace MMP9 výrazně převyšují hodnoty u pacientů s ostatními typy respiračního selhání plicního i mimoplicního původu. Co je dále významné, že hodnoty MMP9 jsou v případě aspirovaných pacientů vysoké již při úvodním stanovení v čase 1. Tento údaj tak vysvětluje absenci statisticky významného vzestupu hladin MMP9 v BAL právě pro již vysokou koncentraci v čase 1.

8 ZÁVĚR

Aspirace je stále velmi závažným stavem, který se v pediatrii objevuje s vyšší frekvencí než u dospělé populace. Rozvoj imunoanalytických metod umožňuje zavést do klinické praxe vyšetření řady biomarkerů. Cílem této práce bylo analyzovat průběh cytokinové reakce u skupiny pacientů, u kterých stále přetrvává nedostatek validních informací při diagnostice a předpokládaném vývoji klinického stavu. Práce potvrdila význam řady biomarkerů – MMP9, TIMP1, TNF- α a VCAM. Za významnou skutečnost lze považovat průkaz významně zvýšených hodnot MMP9 v BAL a to již v úvodní fázi onemocnění. Tyto hodnoty významně převyšovaly hodnoty u RS virových infekcí, u kterých byla dosud prokázána nejvyšší stimulace MMP9. Do budoucna by bylo vhodné ověření tohoto poznatku na větším souboru pacientů. U sledovaného souboru pacientů se naopak nepodařilo prokázat korelaci mezi dynamikou koncentrace MMP9 (ale ani u dalších biomarkerů) a závažností plicního poškození. Predikce závažnosti plicního postižení s využitím multiplexové imunoanalýzy tracheálního aspirátu tak zůstává i nadále otevřena pro využití v klinické praxi.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Marik PE. Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. *N Engl J Med.* 2001 March; 344(9):665-671.
2. Zaloga GP. Aspiration-related illnesses: definitions and diagnosis. *JPEN J Parenteral Enteral Nutr.* 2002; 26(6 Suppl):S2-7.
3. Novák I. et al. Intenzivní péče v pediatrii. Galén 2008.
4. Martling CR, Lundberg JM. Capsaicin sensitive afferents contribute to acute airway edema following tracheal instillation of hydrochloric acid or gastric juice in the rat. *Anesthesiology.* 1988 March; 68(3):350-356.
5. Arredouani MS et al. MARCO is a major binding receptor for unopsonized particles and bacteria on human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 2005 Nov; 175(9):6058-6064
6. Knight PR¹, Davidson BA, Nader ND, Helinski JD, Marschke CJ, Russo TA, Hutson AD, Notter RH, Holm BA. Progressive, severe lung injury secondary to the interaction of insults in gastric aspiration. *Exp Lung Res.* 2004 Oct-Nov; 30(7):535-57.
7. Raghavendran K., Nemzek J., Napolitano LM, Knight PR. Aspiration-induced lung injury. *Crit Care Med.* 2011 Apr; 39(4):818–826.
8. Kollef MH, Fraser VJ. Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Ann Intern Med.* 2001 Feb 20; 134(4):298-314.
9. Van Saene HK, Baines PB. The prevention of ventilator-associated pneumonia. *N Engl J Med.* 1999 Jul 22; 341(4):293-4.
10. Rotta, Alexandre T.; Shiley, Kevin T., Davidson, Bruce A., Helinski, Jadwiga D., Russo, Thomas A., Knight, Paul R. Gastric acid and particulate aspiration injury inhibits pulmonary bacterial clearance. *Crit Care Med.* 2004 March; 32(3): 747-754.
11. Patti MG, Debas HT, Pellegrini CA. Esophageal manometry and 24-hour pH monitoring in the diagnosis of pulmonary aspiration secondary to gastroesophageal reflux. *Am. J. Surg.* 1992 April; 163(4):401–406.
12. Marik P, Careau P. The role of anaerobes in patients with ventilator-associated pneumonia and aspiration pneumonia: a prospective study. *Chest.* 1999 Jan; 115(1):178–183.
13. Knauer-Fischer S, Ratjen F. Lipid-laden macrophages in bronchoalveolar lavage fluid as a marker for pulmonary aspiration. *Pediatr. Pulmonol.* 1999; 27:419–422.

14. Jaoude PA, Knight PR, Ohtake P, El-Solh AA. Biomarkers in the diagnosis of aspiration syndromes. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010 Apr; 10(3):309-319.
15. Anson M. Estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol* 1938; 22(1):79-89.
16. Chester M. A volume and pH determination of tracheal residue postaspiration. *J. Clin. Anesth* 1993 May-June; 5(3):240-243.
17. Potts RG, Yaroukian M, Guerrero P et al. Comparison of blue dye visualization and glucose oxidase test strip methods for detecting pulmonary aspiration of enteral feedings in intubated adults. *Chest* 1993 Jan; 103:117-121.
18. Farrell S, McMaster C, Gibson D, Shield MD, McCallion WA. Pepsin in bronchoalveolar lavage fluid: a specific and sensitive method of diagnosing gastroesophageal reflux-related pulmonary aspiration *J. Pediatr. Surg.* 2006 Febr; 41:289-293.
19. Krishnan U, Mitchell JD, Messina I, Day AS, Bohane TD. Assay of tracheal pepsin as a marker of reflux aspiration. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2002 Sept; 35(3):303-308.
20. Meert KL, Daphtary KM, Metheny NA. Detection of pepsin and glucose in tracheal secretions as indicators of aspiration in mechanically ventilated children. *Pediatr. Crit. Care Med.* 2002 Jan; 3(1):19-22.
21. Farhath S, Aghai YH, Nakhla T, et al. Pepsin, a reliable marker of gastric aspiration, is frequently detected in tracheal aspirates from premature ventilated neonates: relationship with feeding and methylxanthine therapy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr* 2006 Sep; 43(3):336-341.
22. Farhath S, He Y, Nakhla T, et al. Pepsin, a marker of gastric contents, is increased in tracheal aspirates from preterm infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 2008 Feb; 121(2):253-259.
23. Methenz NA, Chang YH, Ye JS, et al. Pepsin as a marker for pulmonary aspiration. *Am. J. Crit. Care* 2002 Mar; 11(2):150-154.
24. Metheny NA, Clouse RE, Chang YH, Steward BJ, Oliver DA, Kollef MH. Tracheobronchial aspiration of gastric contents in critical ill tube-fed patients: frequency, outcomes, and risk factors. *Crit. Care Med* 2006 Apr; 34(4):1007-1015.

25. Ward C, Forrest IA, Brownlee IA et al. Pepsin like activity in bronchoalveolar lavage fluid is suggestive of gastric aspiration in lung allografts. *Thorax* 2005; 60(10):872-874.
26. Corwin RW, Irwin RS. The lipid-laden alveolar macrophage as a marker of aspiration in parenchymal lung disease. *Am Rev. Respir. Dis.* 1985 Sep; 132(3):576-581.
27. Pinto LA, Dias AO, Machado DC, Jones MH, Stein RT, Pitrez PM. Diagnosis of pulmonary aspiration: a mouse model using a starch granule test in bronchoalveolar lavage. *Respirology* 2008 Jun; 13(4):594-598.
28. Bauer ML, Lyrene RK. Chronic aspiration in children: evaluation of the lipid-laden macrophage index. *Pediatr. Pulmonol.* 1999 Aug; 28(2):94-100.
29. Giamarellos-Bourboulis EJ, Mouktaroudes M, Tsaganos T, et al. Evidence for the participation of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in the systemic inflammatory response syndrom after multiple trauma. *Trauma* 2008 December; 65(6):1385-1390.
30. Park JJ, Cheon JH, Kim BY, et al. Correlation of serum-soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 with clinical disease activity in inflammatory bowel disease. *Dig. Dis. Sciences* 2009 Jul; 54(7):1525-1531.
31. Le Moullec JM, Julliene A, Chenais J, et al. The complete sequence of human preprocalcitonin. *FEBS Lett* 1984 Feb; 167(1):93-97.
32. Assicot M, Gendrel D, Carsin H, Raymond J, Guilbaud J, Bohoun C. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet* 1993 Feb; 341(8844):515-518.
33. Nylen ES, Snider RH Jr, Thompson KA, Rohatgi P, Becker K. Pneumonitis-associated hyperprocalcitoninemia. *Am. J. Med. Sci* 1996 Jul; 312(1):12-18.
34. Pusch F, Wilding F, Freitag H, Weinstabl C. Procalcitonin as a diagnostic marker in patients with aspiration after close head injury. *Wien Klin. Wochenschr.* 2001; 113(17-18):676-680.
35. Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin. Immunol* 2005 Nov; 117(2):104-111.
36. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive protein. *J. Biol. Chem.* 2004 Nov; 279(47):487-490.

37. Bajwa EK, Januzzi JL, Gong MN, Thomson BT, Christiani DC. Prognostic value of plasma N-terminal probrain natriuretic peptide levels in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2008 Aug; 36(8):2322-2327.
38. Goldman G., Welbourn R., Klausner JM., et al. Neutrophil accumulations due to pulmonary thromboxane synthesis mediate acid aspiration injury. *J. Appl. Physiol* 1991 Apr; 70(4):1511-1517.
39. Carraro S, Andreola B, Alinovi R, et al. Exhaled leukotriene B4 in children with community acquired pneumonia. *Pediatr. Pulmonol.* 2008 Sep; 43(10):982-986.
40. Huston AD, Davidson BA, Raghavendran K, et al. Statistical prediction of the type of gastric aspiration lung injury based on early cytokine/chemokine profiles. *Anesthesiology* 2006 Jan; 104(1):73-79.
41. Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Struck J, Cook CH. Carbamoyl phosphate synthase-1: a marker of mitochondrial damage and depletion in the liver during sepsis. *Crit. Care Med.* 2006 Sep; 34(9):2439-2446.
42. Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur. J. Pharmacol.* 2000 Oct; 497(1-2):1-15.
43. Brauner JS, Rohde LE, Clausell N. Circulating endothelin-1 and tumor necrosis factor- α : early predictors of mortality in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 2000 Mar; 26(3):305-313.
44. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 2001 Oct; 108(7):949-955.
45. Uchida T, Shirasawa M, Ware LB et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006 May; 173(9):1008-1015.
46. Müller B, Morgenthaler N, Stolz D, et al. Circulating levels of copeptin, a novel biomarker, in lower respiratory tract infections. *Eur. J Clin. Invest.* 2007 Jan; 37(2):145-152.
47. Iwamoto M, Osajima A, Tamura M, et al. Adrenomedullin inhibits pressure-induced mesangial MCP-1 expression through activation of protein kinase A. *J. Nephrol* 2003; 16:673-681.

- 48.** Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Stolz D. et al. Pro-adrenomedullin to predict severity and outcome in community-acquired pneumonia, *Crit. Care* 2006; 10(3):R96.
- 49.** Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Jul; 274(31):21491-21494.
- 50.** Parks WC. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound repair and regeneration*. 1999 Nov; 7(6):409-527.
- 51.** Lanchou J, Corbel M, Tanguy M, Germain M, Boichot E et al. Imbalance between matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 2003 Feb; 31(2):536-542.
- 52.** Kong MY, Gaggar A, Li Y, Winkler M, Blalock JE, et al. Matrix metalloproteinase activity in pediatric acute lung injury. *Int J Med Sci* 2009; 6(1):9-17.
- 53.** Kong MY, Li Y, Oster R, Gaggar A, Clancy JP. Early elevation of matrix metalloproteinase-8 and-9 in pediatric ARDS is associated with an increased risk of prolonged mechanical ventilation. *Plos One*. 2011; 6(8): e22596.
- 54.** Flori HR, Wate LB, Glidden D and Matthay MA: Early elevation of plasma soluble intercellular adhesion molecule-1 in pediatric acute lung injury identifies patients at increased risk of death and prolonged mechanical ventilation. *Pediatr Crit Care Med* 2003; 4(3):315-321.
- 55.** Samransamruajkit R, Prapphal N, Deelodegenavong J, Poovorawan Y. Plasma Soluble Intercellular Adhesion Molecule-1 (sICAM-1) in Pediatric ARDS During High Frequency Oscillatory Ventilation: A Predictor of Mortality. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology* 2005 Dec; 23:181-188.
- 56.** Attia EF, Jolley SE, Crothers K, Schnapp LM, Liles WC. Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (sVCAM-1) Is Elevated in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Plos One* February 26, 2016.

- 57.** Windrichová (Vrzalová) J. Multiplexová imunoanalýza a její využití. CEVA [online] 28.leden2014, poslední aktualizace 28.leden 2014 [cit.]. Dostupný z WWW: <http://www.ceva-edu.cz/mod/data/view.php?d=13&rid=306>.
- 58.** Chrastina P., Šťastná S., Myšková H., Košařová M., Elleder M., Zeman J. Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch metodou tandemové hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* 2005; 13 (34), 77–80.
- 59.** Pollack MM, Ruttimann UE, Getson PR. Pediatric risk of mortality (PRISM) score. *Crit Care Med.* 1988 Nov; 16(11): 1110-6.
- 60.** Kobr J, Pizingerova K, Fremuth J, Sasek L., Kocova J., Hes O., Racek J, Topolcan O. Signaling Molecules for Early Detection of Adverse Interactions during Mechanical Ventilation in Animal Models. *In Vivo* 2011; 25: 209-218.
- 61.** Šašek L., Fremuth J., Pizingerová K., Kobr J. Změny vybraných systémových cytokinů při závažném plicním postižení u dětí. *Čes-slov Pediat* 2016; 71(5-6):251-259.
- 62.** Kong MY, Clancy JP, Peng N, Li Y, Szul TJ, Oster R, Sullender W, Ambalavanan N, Blalock JE, Gaggar A. Pulmonary matrix metalloproteinase-9-activity in mechanically ventilated children with respiratory syncytial virus. *Eur Respir J.* 2014 Apr; 43(4):1086-96.

Souhlasím s půjčováním doktorské disertační práce “ Proteomická analýza bronchoalveolárního aspirátu a séra u dětí s respiračním selháním na podkladě aspirace žaludečního obsahu“.