

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Autoreferát dizertační práce



**Nové biomarkery pro stanovení prognózy  
po srdeční zástavě**

**MUDr. Dagmar Vondráková**

**2017**

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

**Obor:** Fyziologie a patofyziologie člověka

**Předseda oborové rady:** Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

**Školící pracoviště:** Nemocnice Na Homolce, Roentgenova 3, Praha 5, 150 30

**Školitel:** Doc. MUDr. Filip Málek, Ph.D., MBA

**Školitel-konzultant:** Doc. MUDr. Petr Ošťádal Ph.D.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## OBSAH

1.	<b>ÚVOD</b> .....	7
	1.1. Srdeční zástava.....	7
	1.2. Predikce prognózy po srdeční zástavě.....	7
2.	<b>HYPOTÉZY</b> .....	9
3.	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	10
4.	<b>OXIDATIVNÍ STRES A SRDEČNÍ ZÁSTAVA</b> .....	10
	4.1. <b>Oxidativní stres a srdeční zástava na zvířecím modelu</b> .....	10
	4.1.1. <i>Úvod</i> .....	10
	4.1.2. <i>Metody</i> .....	11
	4.1.3. <i>Výsledky</i> .....	12
	4.1.4. <i>Diskuse</i> .....	14
	4.1.5. <i>Závěr</i> .....	16
	4.2. <b>Oxidativní stres u nemocných po srdeční zástavě</b> .....	16
	4.2.1. <i>Úvod</i> .....	16
	4.2.2. <i>Soubor a metody</i> .....	16
	4.2.3. <i>Výsledky</i> .....	17
	4.2.4. <i>Diskuse</i> .....	19
	4.2.5. <i>Závěr</i> .....	20
5.	<b>KOPEPTIN A SRDEČNÍ ZÁSTAVA</b> .....	21
	5.1. <b>Využití příjmových hodnot kopeptinu ke stanovení prognózy u nemocných po srdeční zástavě</b> .....	21
	5.1.1. <i>Úvod</i> .....	21
	5.1.2. <i>Soubor a metodika</i> .....	21
	5.1.3. <i>Výsledky</i> .....	21
	5.1.4. <i>Diskuse</i> .....	23
	5.1.5. <i>Závěr</i> .....	24
6.	<b>NEURON-SPECIFICKÁ ENOLÁZA A SRDEČNÍ ZÁSTAVA</b> ...	24
	6.1. <b>Vztah mezi hladinou neuron-specifické enolázy a prognózou</b>	

<b>po srdeční zástavě závisí na době odběru vzorku .....</b>	24
6.1.1. <i>Úvod</i> .....	24
6.1.2. <i>Soubor a metody</i> .....	24
6.1.3. <i>Výsledky</i> .....	24
6.1.4. <i>Diskuse</i> .....	28
6.1.5. <i>Závěr</i> .....	30
<b>7. SOUHRN DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ.....</b>	30
<b>8. LITERATURA.....</b>	31
8.1. Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce.....	31
8.2. Publikace autora s IF, nesouvisející s dizertační prací.....	32
8.3. Použitá literatura.....	32

## Souhrn

Srdeční zástava je extrémně závažný stav, charakterizovaný globální ischemií, následovanou reperfuční reakcí po úspěšné resuscitaci a obnovení krevního oběhu. Přes veškeré pokroky současné medicíny zůstává prognóza nemocných po srdeční zástavě velmi špatná. Jedním ze zásadních problémů u těchto nemocných je proto včasné a spolehlivé stanovení prognózy, které je nezbytné pro volbu nejvhodnějšího diagnosticko-léčebného postupu. Současné možnosti včasného určení prognózy jsou však velmi omezené.

Cílem naší práce bylo: (i) studium možností ovlivnění oxidativního stresu jako jednoho z klíčových patogenetických faktorů, podílejících se na vývoji tzv. poresuscitačního syndromu, a (ii) zjistit možnosti využití ukazatelů oxidativního stresu, kopeptinu a neuron-specifické enolázy pro časnou predikci prognózy u nemocných po srdeční zástavě.

V experimentální části na zvířecím modelu oběhové zástavy jsme srovnávali účinky hypotermie, ischemického postconditioningu (IPC) a aplikaci oxidu dusnatého (NO) na hladiny ukazatelů oxidativního stresu a orgánového poškození; zjistili jsme že ani podání NO, ani IPC neměli větší protektivní účinek než hypotermie. V klinické části jsme v několika studiích ukázali, že jak kopeptin, tak především neuron-specifická enoláza, měřená ve specifický čas, nabízejí vysokou prognostickou hodnotu pro stanovení krátkodobé i dlouhodobé prognózy. Naproti tomu prognostická hodnota ukazatelů oxidativního stresu byla v našich studiích jen nízká a málo citlivá pro klinické využití.

Naše práce tedy ukázala, že především kopeptin a neuron-specifická enoláza mohou být využity v klinické praxi pro zpřesnění současných možností stanovení prognózy po srdeční zástavě.

**Klíčová slova:** srdeční zástava, prognóza, oxidativní stres, kopeptin, neuron-specifická enoláza

## Summary

Cardiac arrest is an extremely serious condition characterized by global ischemia followed by reperfusion after successful resuscitation and restoration of blood spontaneous circulation. Despite all advances in current medicine, the prognosis of cardiac arrest survivors remains very poor. One of the major problems in these patients is therefore the early and reliable determination of the prognosis that is necessary for choosing the most appropriate diagnostic and therapeutic approach. However, the current possibilities for early prognostication in cardiac arrest survivors remain very limited.

The aims of our work were: (i) to study the possibilities of influencing oxidative stress as one of the key pathogenic factors involved in the development of so-called post-cardiac arrest syndrome; and (ii) to determine the prognostic value of markers of oxidative stress, copeptin and neuron-specific enolase (NSE) in cardiac arrest survivors.

In the experimental part of the work we used porcine model of cardiac arrest for the comparison of the effects of hypothermia, ischemic postconditioning (IPC) and administration of nitric oxide (NO) on oxidative stress burden and organ damage; we found that neither NO nor IPC did have a superior protective effect over hypothermia. In the clinical part, we have shown in several trials that both copeptin and especially NSE, measured at a specific time points, offer a high prognostic value for the determination of short- and long-term prognosis. On the other hand, the prognostic value of the markers of oxidative stress has been low in our studies and not enough sensitive and specific for clinical use.

In conclusion, our work has shown that copeptin and especially NSE can be used to increase the current possibilities of prognostication after cardiac arrest.

**Keywords:** Cardiac Arrest, Prognosis, Oxidative Stress, Neuron-Specific Enolase, Copeptin

# 1. ÚVOD

## 1.1. Srdeční zástava

K srdeční zástavě mimo nemocnici dochází u 35-100 jedinců na 100000 obyvatel za rok, srdeční zástava v nemocnici nastane v 1-5 z 1000 hospitalizací za rok (1-3). Jen u cca 40-50% jedinců, u kterých byla zahájena kardiopulmonální resuscitace, se podaří alespoň krátkodobě obnovit krevní oběh. Celkově srdeční zástavu mimo nemocnici přežije bez výraznějšího neurologického deficitu do propuštění z nemocnice obvykle méně než 15% jedinců (1-3). Nejčastější příčinou netraumatické srdeční zástavy je akutní koronární syndrom a další kardiovaskulární onemocnění; k srdeční zástavě však mohou vést také primárně nekardiální nemoci.

V posledních letech bylo vynaloženo značné úsilí na zefektivnění a optimalizaci péče o nemocné po srdeční zástavě. Bylo ukázáno, že lepších výsledků lze dosáhnout časnější aktivací záchranného procesu, časně zahájenou a kvalitní resuscitací (včetně telefonicky řízené laické resuscitace), časnou defibrilací, co nejčasnějším zahájením rozšířené resuscitace a jak se zdá, také lepší poresuscitační péčí (4-7).

## 1.2. Predikce prognózy po srdeční zástavě

Ještě v 80. letech 20. století bývalo určení prognózy po srdeční zástavě (SZ) a kardiopulmonální resuscitaci (KPR) jednoduché. Z nemocných, kteří byli přijati k hospitalizaci po SZ mimo nemocnici, jen méně než 2% přežila do propuštění (8). Hypoxicko-ischemické poškození mozku bylo považováno za nejvíce poškozující a nejhůře léčitelnou příčinu komatu; pravděpodobnost uzdravení byla pro velkou většinu těchto nemocných mizivá (9).

Postupné zlepšování intenzivní péče o nemocné po srdeční zástavě a především zavedení mírné hypotermie do léčby ischemicko-reperfučního (IR) poškození po KPR – poresuscitačního syndromu - v posledních deseti letech znamenalo významné zlepšení prognózy těchto pacientů. Souběžně se zlepšováním výsledků léčby u nemocných po srdeční zástavě však také vzrůstá potřeba časného stanovení prognózy,

kteře by mohlo bŷt využito při volbě nejvhodnějšího lēčebného postupu a zamezilo by plŷtvání omezenými prostředky na lēčbu infaustních stavů. Je vřak nutné konstatovat že mořnosti stanovení prognózy u nemocných po resuscitaci jsou stále velmi omezené.

Velmi závažným nálezem, spojeným téměř vřdy se řpatnou prognózou po srdeční zástavě, je pŷetrvávající absence kmenových reflexů. K nejčastěji využívaným instrumentálním metodám patŷi elektroencefalografické vyřetření (EEG), provedené po ukončení lēčebné hypotermie a normalizaci tělesné teploty. Ukazatelem řpatné prognózy po srdeční zástavě je generalizovaný ŷtlum aktivity pod 20  $\mu$ V, status epilepticus nebo epileptiformní komplexy s nízkou aktivitou pozadí (10). Status epilepticus lze pozorovat pŷibližně u 30% nemocných po srdeční zástavě, jeho nález je spojen se řpatnou prognózou, ale sám o sobě jeřtě neznamená infaustní stav (11-12). Uvařuje se také, že časně zahájené podávání antiepileptik mŷže u těchto pacientů prognózu zlepřit (13).

Prognostické informace poskytuje také vyřetření somatosenzorických evokovaných potenciálů (SSEP). Oboustranná absence korové odpovědi (N20) pŷi vyřetření SSEP se zdá bŷt spojená s velmi řpatnou prognózou a to i v pŷípadeř, že je vyřetření prováděno v pŷběhu hypotermie (alespoň 14 hodin po srdeční zástavě) (10, 14-15). Pŷesto byly publikovány kazuistiky ojedinělých pŷežití s dobrým neurologickým výsledkem pŷi absenci N20; ani vyřetření SSEP se proto nedoporučuje pouřívat jako jediný prognostický ukazatel (15-16). Pŷítomnost N20 pŷi SSEP má také jen omezenou hodnotu pro predikci dobrého neurologického výsledku (15).

Mezi biochemické prognostické faktory po srdeční zástavě patŷi pŷedevším stanovení hladiny neuron-specifické enolázy (NSE) a proteinu S-100B. Podle doporučení American Academy of Neurology z roku 2006 (10) je hladina NSE > 33  $\mu$ g/L spojena se řpatnými výsledky. Tato hranice byla řiroce, avřak ne všeobecně, pŷijata. Zdálo se totiž, že hladinu NSE mŷže sniřovat hypotermie; v posledních letech byly publikovány pŷáce, dokumentující pŷežití bez významného neurologického deficitu i u nemocných, kteří měli hladinu NSE vyšři než 33  $\mu$ g/L (17).



Protein S-100B je v posledních letech jedním z velmi intenzivně zkoumaných biochemických parametrů, u nějž se předpokládá využití ke stanovení prognózy i u neselektované populace nemocných po srdeční zástavě. Několik autorů ukázalo, že zvýšená hladina S-100B v různých časových intervalech od KPR je spojena s vyšším rizikem špatného neurologického výsledku nebo úmrtí u těchto nemocných (18-21).

Z hlediska stanovení prognózy u nemocných po srdeční zástavě nelze opomenout ani přínos zobrazovacích metod. Nález edému mozku na CT nebo MR koreluje se špatnou prognózou po resuscitaci (10).

Přes veškeré pokroky v časném stanovování prognózy po srdeční zástavě v posledních letech však zůstává nezodpovězena celá řada otázek. Doposud nebyl nalezen ukazatel se 100% prediktivní hodnotou, není jasné, v jakém intervalu od obnovení krevního oběhu je nejpřínosnější provádět vyšetření jednotlivých prognostických ukazatelů a k dispozici jsou zatím jen nedostatečné údaje o výtěžnosti prognostických ukazatelů u různých subpopulací pacientů po srdeční zástavě.

## 2. HYPOTÉZY

- Na patogeneze poresuscitačního syndromu se významně podílí oxidativní stres. Hladina markerů oxidativního stresu odráží závažnost ischemicko-reperfuzního poškození a vyšší hladiny ukazatelů oxidativního stresu jsou spojeny s horší prognózou po srdeční zástavě.
- Těžší ischemické poškození při srdeční zástavě je spojeno s vyšší akutní sekrecí vasopresinu a proto hladina ukazatele této sekrece – kopeptinu – odráží závažnost stavu a lze její stanovení využít k velmi časně predikci prognózy.
- Prediktivní hodnota neuron-specifické enolázy (NSE) pro stanovení prognózy po srdeční zástavě závisí na době odběru krevního vzorku (interval kolaps –

odběr) a pro stratifikaci rizika lze využít nejen absolutní hodnoty NSE, ale i změny hladiny v čase.

### **3. CÍLE PRÁCE**

- Na zvířecím modelu srdeční zástavy a v klinické studii zjistit vztah mezi srdeční zástavou a parametry oxidativního stresu.
- Stanovit prognostickou hodnotu ukazatelů oxidativního stresu po srdeční zástavě.
- Stanovit vztah mezi hladinou kopeptinu při přijetí k hospitalizaci, závažností srdeční zástavy a klinickými výsledky u nemocných po srdeční zástavě mimo nemocnici.
- Určit prognostický význam stanovení NSE v jednotlivých dnech po srdeční zástavě a zjistit vztah mezi změnami hladiny NSE v prvních dnech po zástavě a klinickými výsledky.

## **4. OXIDATIVNÍ STRES A SRDEČNÍ ZÁSTAVA**

### **4.1. Oxidativní stres a srdeční zástava na zvířecím modelu**

#### **4.1.1. Úvod**

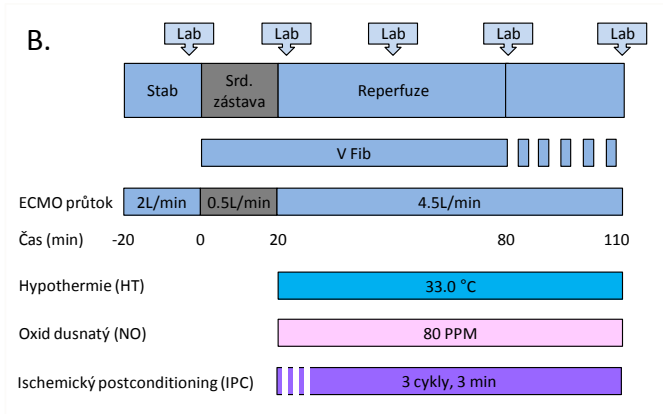
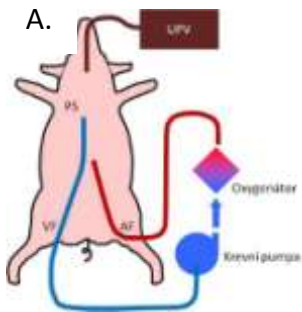
Cílem této experimentální práce bylo porovnat účinek ischemického postconditioningu (IPC) a podání oxidu dusnatého (NO) se standardní léčebnou intervencí - mírnou terapeutickou hypotermií na zvířecím modelu resuscitované srdeční zástavy.

### 4.1.2. Metody

K experimentu bylo použito 15 samic prasete domácího (*Sus scrofa domestica*, stáří 4-5 měsíců, průměrná hmotnost 45 kg). Po zavedení všech katetrů a kanyl (Obrázek 1A), spuštění mimotělního oběhu a po 10 min stabilizace byla vyvolána srdeční zástava indukci fibrilace komor. Srdeční zástava trvala 20 min, poté byla cirkulace obnovena zvýšením extrakorporálního průtoku z 0.5 l/min na 4.5 l/min a následovalo dalších 90 min reperfuze. Po iniciálních 60 min reperfuze, byly umožněny u každého zvířete maximálně 3 pokusy o defibrilaci (bifázickým výbojem 200-270-270J) s cílem nastolit sinusový rytmus; poté následovalo dalších 30 min sledování bez ohledu na výsledek defibrilace (Obrázek 1B).

Zvířata byla randomizována po pěti do tří skupin: 1. skupina hypotermie (HT), 2. skupina NO a 3. skupina IPC. Zvířata v kontrolní - hypotermické skupině byla ochlazená na cílovou teplotu 33°C na začátku reperfuze, uvedená cílová teplota byla dosažena v průběhu prvních 5 min reperfuze u všech hypotermických zvířat a byla udržena až do konce experimentu pomocí tepelného výměníku, který byl napojen na oxygenátor. Ve skupině NO byl NO v koncentraci 80 ppm podáván se směsí plynů do oxygenátoru během celé reperfuze. Ve skupině IPC byla zvířata vystavena 3 cyklům 3 min trvající globální ischemie, následovaných 3 min reperfuze ihned po obnovení cirkulace (Obrázek 1B).

Krevní vzorky ke stanovení ukazatelů orgánového poškození jsme odebírali prasatům v 90. min reperfuze, po odběru byly vzorky hned centrifugované a sérum bylo zmrazeno na teplotu -70 °C až do dalšího zpracování. Stanovovali jsme troponin I (TnI), myoglobin (MGB), kreatinkinázu (CK), alaninaminotranferázu (ALT), neuron-specifickou enolázu (NSE) a cystatin C (CysC). Vzorky ke stanovení reaktivních metabolitů kyslíku (ROM), byly odebrané před srdeční zástavou, 1 min po obnovení oběhu a dále 3 min, 60 min a 90 min během reperfuze; měření ROM bylo prováděno okamžitě po získání krve.



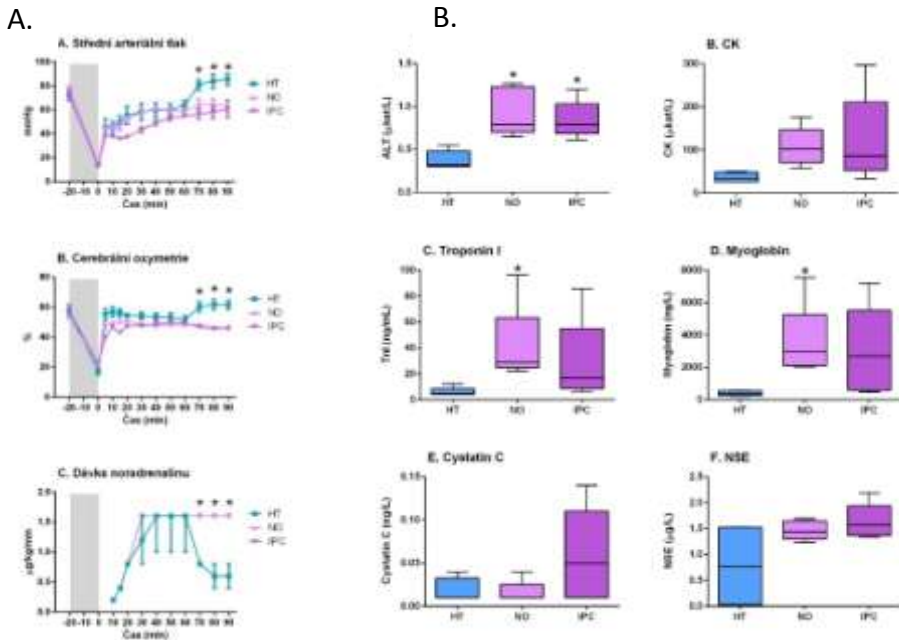
**Obrázek 1. Panel A:** Schema zavedení veno-arteriální extrakorporální membránové oxygenace (ECMO). **Panel B:** schema experimentálního protokolu. Stab, stabilizace; ECMO, extrakorporální membránová oxygenace; V Fib, fibrilace komor.

#### 4.1.3. Výsledky

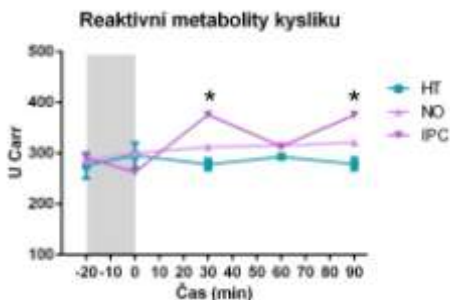
Vstupní hodnoty monitorovaných parametrů byly srovnatelné u jednotlivých skupin zvířat. Střední arteriální tlak (MAP), mozková oxymetrie a dávky noradrenalinu byly podobné mezi jednotlivými skupinami (HT, NO a IPC) v průběhu prvních 60 min reperfuze. V 70., 80. a 90. min byly MAP a mozková saturace významně vyšší ve skupině HT, zatímco dávka noradrenalinu byla v této skupině ve srovnání s IPC a NO skupinou nižší (Obrázek 2A). Defibrilace byla úspěšná u všech zvířat HT skupiny, ale ve skupinách NO a IPC jenom u jednoho z pěti zvířat ( $P=0.01$ ).

Významné rozdíly byly nalezené v hladinách ALT, CK, MGB a TnI (Obrázek 2B). Mnohonásobný srovnávací test ukázal, že hladiny ALT byly signifikantně nižší v HT skupině ve srovnání s jinými skupinami. Hladiny MGB, CK a TnI byly též signifikantně nižší v HT skupině ve srovnání s NO skupinou, zatím co rozdíly mezi HT a IPC skupinou nedosahovaly statisticky významných rozdílů. NO a IPC skupiny byly srovnatelné ve všech měřených parametrech (Obrázek 2B). Hladiny CysC, NSE byly

těž srovnatelné ve všech skupinách (Obrázek 2B). Hladiny ROM byly významně vyšší ve 30. a 90. min reperfuze ve srovnání se vstupní hodnotou u skupin NO a IPC; ve skupině HT byly hodnoty ROM ve všech měřeních srovnatelné (Obrázek 3). Při vzájemném srovnání skupin HT, NO a IPC v jednotlivých časových bodech nebyl nalezen významný rozdíl (Obrázek 3).



**Obrázek 2. Panel A:** vývoj hodnot cerebrální oxymetrie, středního arteriálního tlaku, dávky noradrenalinu. HT – hypotermie, NO – oxid dusnatý, IPC – ischemický postconditioning. **Panel B:** hladiny ukazatelů orgánového poškození 90 minut po obnovení krevního oběhu po srdeční zástavě. HT – hypotermie; NO – oxid dusnatý; IPC – ischemický postconditioning.



**Obrázek 3.** Hladiny metabolitů reaktivního kyslíku po srdeční zástavě. HT – hypotermie; NO – oxid dusnatý; IPC – ischemický preconditioning

#### 4.1.4. Diskuse

Naše studie na zvířecím modelu srdeční zástavy neprokázala větší protektivní účinek NO a IPC na poresuscitační syndrom ve srovnání s mírnou terapeutickou hypotermií. Zjistili jsme, že prasata v HT skupině vykazovala vyšší krevní tlak, mozkovou saturaci a potřebovala nižší dávky noradrenalinu ve srovnání s IPC a NO skupinou; uvedené rozdíly dosáhly statistické významnosti v 70., 80. a 90. min reperfuze, po úspěšné defibrilaci u všech HT zvířat; naproti tomu hemodynamicky účinný srdeční rytmus byl navozen pouze u jednoho z 5 zvířat NO a IPC skupiny. Je proto pravděpodobné, že vyšší hodnoty krevního tlaku a mozkové oxygenace u HT zvířat mohly být ovlivněny sinusovým rytmem po úspěšné defibrilaci. Krevní tlak, tkáňová saturace, spotřeba vazopresorů a srdeční rytmus jsou vzájemně se ovlivňující proměnné, proto z klinického pohledu je těžké identifikovat, který z uvedených faktorů má dominantní roli. Nicméně 100% úspěšná defibrilace u hypotermických zvířat (versus 20% ve zbylých dvou skupinách) ukazuje na protektivní účinek mírné hypotermie. Všechny ukazatele orgánového poškození byly srovnatelné nebo vyšší v IPC a NO skupině než v HT skupině. V naší experimentální práci jsme neprokázali superioritu IPC a NO ve srovnání s mírnou TH v prevenci orgánového poškození po srdeční zástavě.

Naše výsledky se liší od práce Yannopoulou a spol. (22), kteří popsali lepší přežívání a neuroprotektivní účinek IPC u prasečího modelu srdeční zástavy. Tento rozdíl můžeme vysvětlit odlišným zvířecím modelem, kratším trváním srdeční zástavy a IPC s kratším trváním cyklů. Naproti tomu podobně jako v naší práci, také Meybohm a spol. (23) nezjistili protektivní účinek postconditioningu s anestetikem isofluranem po srdeční zástavě.

I když je podání exogenního NO uznávanou terapeutickou intervencí v určitých specifických situacích, výsledky naší práce nepotvrzují pozorování dalších autorů, kteří popisují protektivní účinek inhalace NO po srdeční zástavě. Naše práce se liší od výsledků, publikovaných Nishidou a spol. (24), kteří prokázali, že NOS3 zmenšuje myokardiální a neurologickou dysfunkci a tlumí zánět u potkanů po srdeční zástavě. Podobně Minamishima a spol. (25) popsali lepší přežívání u myší po srdeční zástavě, kterým se aplikoval hydrogen sulfid, stimulační NOS. Uvedené rozdíly je možné vysvětlit rozdílným typem experimentu, ale hlavně exogenním podáním NO v naší studii. Naše výsledky se však liší také od publikovaných výsledků jiných autorů, kteří hodnotili účinek inhalovaného NO po srdeční zástavě. Minamishima a spol. v další studii (26) popsali lepší výsledky po resuscitaci u myší, které inhalovaly NO 23 hod po srdeční zástavě; Kida a spol. (27) zjistili lepší přežívání u myší, které byly léčené kombinací HT s inhalací NO. Popsané diskrepance mohou být vysvětleny nejen rozdílným experimentálním modelem, ale také podáním NO přes oxygenátor v naší studii.

Dále jsme prokázali, že hladiny ROM byly srovnatelné mezi NO, IPC a HT skupinou: mírná terapeutická hypotermie po srdeční zástavě významně redukuje oxidativní stres (28-30). Naše výsledky tedy naznačují, že IPC a podání NO mohou potlačit oxidativní stres v podobném rozsahu jako HT. Nicméně při srovnání vývoje hladin ROM uvnitř jednotlivých skupin jsme našli, na rozdíl od HT u NO a IPC vyšší hodnoty v průběhu reperfuze ve srovnání s hodnotami vstupními.

#### **4.1.5. Závěr**

Výsledky této studie ukázaly, že ischemický postconditioning a podání oxidu dusnatého nemají po srdeční zástavě větší protektivní účinek než hypotermie na udržení krevního tlaku, mozkovou oxygenaci, orgánové poškození a oxidativní stres než mírná léčebná hypotermie.

## **4.2. Oxidativní stres u nemocných po srdeční zástavě**

### **4.2.1. Úvod**

V klinické studii jsme stanovovali hladiny produktů oxidativního stresu u nemocných po srdeční zástavě. Jednalo se o ukazatele oxidativního poškození molekuly DNA (8-hydroxydeoxyguanosin 8-OHdG), RNA (8-hydroxyguanosin - 8-OHG), fosfolipidů (8-isoprostane); u malé skupiny pacientů byly měřeny hladiny nitrotyrosinu (ukazatel oxidativního stresu) a nitrátů/nitritů jako markeru produkce oxidu dusnatého (NO).

### **4.2.2. Soubor a metody**

Do souboru bylo zařazeno 111 nemocných po srdeční zástavě mimo nemocnici s úspěšnou kardiopulmonální resuscitací, kteří zůstávali v bezvědomí (perzistující koma s GCS  $\leq 8$ , průměrný věk 65 let, muži 79%). U těchto pacientů byla zahájena léčba mírnou hypotermií ještě před přijetím do nemocnice podáváním chlazeného fyziologického roztoku rychlostí 30 ml/kg/hod. Infuze byla přerušena v nemocnici po dosažení tělesné teploty 34°C endovaskulárně pomocí systému Thermogard XP (Zoll, Chelmsdorf, MA, USA). U všech nemocných byl použit protokol s cílovou tělesnou teplotou 33°C na dobu 24 hodin (28). Po uplynutí hypotermické fáze byli nemocní postupně ohříváni o 0.15°C za hodinu na cílovou tělesnou teplotu 36.8°C, normotermie byla pak udržovaná až do obnovení vědomí pacienta.



Podskupinu s opakovaným stanovením nitrotyrosinu a nitrátů/nitritů tvořilo původně 11 nemocných.

Krev ke stanovení ukazatelů oxidativního poškození DNA, RNA a fosfolipidů jsme odebírali ihned po přijetí do nemocnice, pak za 12 a za 30 hod po příjmu. Krev k měření nitrotyrosinu a nitrátů/nitritů byla odebírána ihned po příjmu do nemocnice a poté každých 6 hod během celkových 54 hod. Neurologický stav byl hodnocen pomocí CPC (Cerebral Performance Category) (Tabulka 3) (31) a to 30. den po přijetí do nemocnice. Uvedený skórovací systém je standardně používán k určení neurologického stavu po srdeční zástavě.

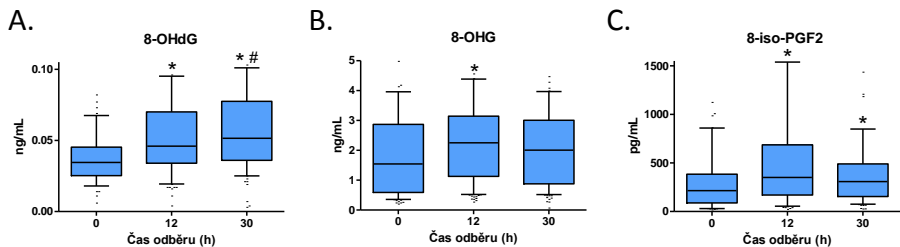
### **Tabulka 3.** Kategorie CPC (Cerebral Performance Category)

- CPC 1 - bez neurologického deficitu
- CPC 2 - lehká až střední neurologická dysfunkce
- CPC 3 - těžký neurologický deficit (není schopen samostatné existence)
- CPC 4 - koma
- CPC 5 - smrt

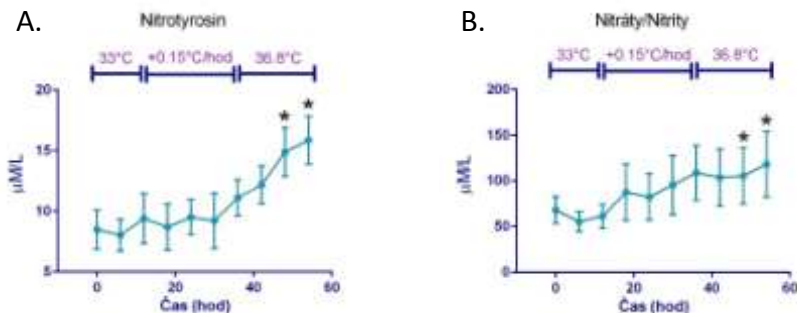
### **4.2.3. Výsledky**

Zaznamenali jsme významné změny v hladinách ukazatelů oxidativního poškození DNA (8-hydroxydeoxyguanosin; 8-OHdG), RNA (8-hydroxyguanosin; 8-OHG) a fosfolipidů (8-isoprostan) v jednotlivých časech měření (0, 12, 30 hod) (Obrázek 6A, 6B, 6C).

V podskupině s častějšími měřeními vybraných parametrů jsme pozorovali vysoce významné rozdíly v produkci nitrotyrosinu ( $P < 0.001$ ). Hladina nitrotyrosinu během normotermie (48. a 54 hodina) byla významně vyšší ve srovnání se všemi měřeními v průběhu hypotermie (Obrázek 7A). Významné změny jsme zaznamenali také u hladin nitrátů/nitritů ( $P < 0.05$ ). Také zde byly hodnoty při normotermii (48. a 54. hodina) významně vyšší ve srovnání s hypotermií (6. a 12 hodinou) (Obrázek 7B).



**Obrázek 6. Panel A:** Vývoj hladiny ukazatele oxidativního poškození DNA, 8-hydroxydeoxyguanosinu (8-OHdG) u nemocných po srdeční zástavě. \* $P < 0.05$  vs. hodnota při přijetí (čas 0); # $P < 0.05$  vs. hodnota za 12 hodin. **Panel B:** Vývoj hladiny ukazatele oxidativního poškození RNA, 8-hydroxyguanosinu (8-OHG) u nemocných po srdeční zástavě. \* $P < 0.05$  vs. hodnota při přijetí (čas 0). **Panel C:** Vývoj hladiny ukazatele oxidativního poškození fosfolipidů, 8-isoprostanu (8-iso-PGF2) u nemocných po srdeční zástavě. \* $P < 0.05$  vs. hodnota při přijetí (čas 0).



**Obrázek 7. Panel A:** Hladiny nitrotyrosinu u nemocných se srdeční zástavou, léčených endovaskulární hypotermií po dobu 24 hodin. \* $P < 0.05$  vs. 0, 6, 12, 18 a 24 hod. **Panel B:** Hladiny nitrátů/nitritů u nemocných se srdeční zástavou, léčených endovaskulární hypotermií po dobu 24 hodin. \* $P < 0.05$  vs. 6 a 12 hod.

Ze sledovaných ukazatelů oxidativního stresu jsme našli vztah s klinickými výsledky pouze pro vstupní hodnotu ukazatele oxidativního poškození RNA, 8-

hydroxyguanosinu (8OHG); plocha pod ROC křivkou byla 0.639, sensitivita 85.7%, specifita 40.5%,  $P=0.0223$ .

#### 4.2.4. Diskuse

Hlavním výsledkem této studie je zjištění dynamických změn v hladinách parametrů oxidativního stresu po srdeční zástavě, nepřímo naznačující aktivní úlohu oxidativního stresu v patofyziologických procesech, které následují po srdeční zástavě.

Vývoj hladin nitrátů/nitritů a nitrotyrosinu, měřených opakovaně v 6-hodinových intervalech ukazují také na vliv hypotermie na supresi oxidativního stresu. Nicméně ze sledovaných parametrů jen vstupní hodnota 8-OHG měla vztah ke klinickým výsledkům, prognóze nemocných, a to jen na hranici klinické významnosti.

Je známo, že oxidativní stres hraje jednu z hlavních úloh v patogeneze IR poškození (32-33). Rychlý vzestup ukazatelů oxidativního stresu a produkce NO byl popsán u různých akutních klinických situací, jako je trauma, cévní mozková příhoda, selhání jater nebo infekce (34-35). Zatím však není možné porovnat výsledky naší studie s žádnou jinou publikovanou klinickou prací, která by sledovala parametry oxidativního stresu po srdeční zástavě. Naše výsledky jsou ale v souladu s několika experimentálními studii na různých modelech srdeční zástavy (25, 36).

Vliv hypotermie na snížení oxidativního stresu a produkce NO byl popsán u zvířecích modelů. V naší práci jsme však poprvé i v klinické studii prokázali, že hypotermie po srdeční zástavě může příznivě ovlivňovat také oxidativní stres.

Naše výsledky jsou v souladu s doposud publikovanými experimentálními studii. Jiang a spol. (35) popsali normalizaci hladin nitrátů/nitritů a signifikantní ovlivnění exprese NO syntázy v mozku za použití hypotermie na modelu akutního ischemického jaterního selhání u potkanů. Stefanutti a spol. (37) pozorovali, že hypotermie u potkanů snižuje oxidativní stres u IR poškození střeva. Scumpia a spol. (38) pozorovali při hypotermii inhibici produkce NO a myeloperoxidase zprostředkovaného poškození srdce po podání endotoxinu u potkanů. Han a spol. (39) zjistili, že hypotermie inhibuje tvorbu NO na experimentálním modelu cévní mozkové

příhody a zánětu. Hypotermií zprostředkované ovlivnění exprese isoformy NO syntázy po lokální mozkové ischemii u potkanů popsali Karabiyikoglu a spol. (40). Lei a spol. (41) pozorovali snížení peroxidace lipidů se zachovalou antioxidační obranou účinkem hypotermie na modelu oběhové zástavy u psa.

Výsledky naší práce jsou v souladu také s dosud publikovanými klinickými studiemi, zaměřenými na vliv hypotermie na oxidativní stres u jiných patologických stavů než je srdeční zástava. Hayashi a spol. (34) pozorovali snížené hladiny nitrátů/nitritů jako výsledek ochlazení na cílové teploty 32-33 °C u nemocných s poraněním mozku nebo mozkovým krvácením. Podobně Wenisch a spol. (42) zjistili redukcí tvorby reaktivních forem kyslíku při aplikaci mírné hypotermie během chirurgických výkonů. Bayir a spol. (43) pozorovali ochranný účinek hypotermie na antioxidační kapacitu po těžkém poranění mozku u dětí.

V naší práci jsme ukázali, že pouze vstupní hladina 8-OHG, tedy ukazatele oxidativního poškození RNA, měla statisticky významný vztah ke klinickým výsledkům a tedy k prognóze pacienta. Relativně nízká senzitivita a specifita 8-OHG pro stanovení prognózy však výrazně omezuje potenciální klinickou využitelnost stanovení tohoto ukazatele. Můžeme pouze spekulovat, proč v naší studii markery oxidativního stresu nesouvisely nebo jen slabě souvisely s prognózou; jako možné vysvětlení se nabízí, že rozsah námi měřeného poškození oxidativním stresem souvisí se systémovou reakcí, naproti tomu prognóza je ovlivněná spíše poškozením mozku, které se systémovým oxidativním stresem nemusí korelovat. Nelze však vyloučit, že jiné parametry oxidativního stresu by mohly s prognózou po srdeční zástavě souviset lépe.

#### **4.2.5. Závěr**

Studie ukázala dynamické změny parametrů oxidativního stresu po srdeční zástavě, redukcí oxidativního stresu a nižší produkci NO během mírné terapeutické hypotermie a klinicky jen omezeně využitelnou prognostickou hodnotu parametrů oxidativního stresu u nemocných, kteří přežili srdeční zástavu.

## **5. KOPEPTIN A SRDEČNÍ ZÁSTAVA.**

### **5.1. Využití příjmových hodnot kopeptinu ke stanovení prognózy u nemocných po srdeční zástavě**

#### **5.1.1. Úvod**

V klinické studii jsme studovali otázku možnosti využití stanovení hodnoty kopeptinu při přijetí k hospitalizaci u nemocných po srdeční zástavě pro velmi časnou predikci prognózy.

#### **5.1.2. Soubor a metody**

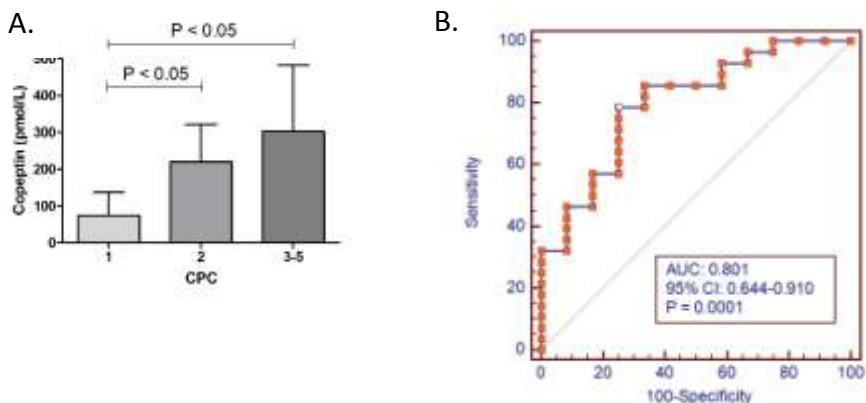
Do souboru byli zařazeni pacienti po srdeční zástavě mimo nemocnici s úspěšnou kardiopulmonální resuscitací, kteří zůstávali v bezvědomí (perzistující koma s GCS  $\leq 8$ ). Nemocní byli léčeni, jak je popsáno v 4.2.2. Krev ke stanovení kopeptinu jsme odebírali ihned po přijetí do nemocnice před jakoukoli intervencí. Neurologický stav jsme hodnotili pomocí CPC (Cerebral Performance Category) (Tabulka 3) (31) a to 30. den po přijetí do nemocnice.

#### **5.1.3. Výsledky**

Do naší studie bylo zařazeno celkově 46 nemocných po srdeční zástavě (červen 2010 až prosinec 2011). Jeden pacient byl vyloučen pro technický problém se zpracováním vzorku krve a dalších 5 pacientů bylo vyloučeno z důvodu nepodepsání informovaného souhlasu pacientem nebo rodinou. Celkově zůstalo v souboru 40 subjektů (průměrný věk 58), vyšší zastoupení měli muži (32 ze 40).

Z celé skupiny nemocných po srdeční zástavě 19 přežilo bez neurologického deficitu (CPC 1), 9 jedinců přežilo s lehkým až středně těžkým neurologickým postižením (CPC 2), u 3 přeživších byl těžký neurologický deficit (CPC 3-4), a 9 pacientů zemřelo (CPC 5).

Hladina kopeptinu byla významně nižší u jedinců s CPC 1 ve srovnání se CPC 2 nebo CPC 3-5 (74.3±65.6 pmol/l, 219.8±101.7 pmol/l a 302.7±180.5 pmol/l;  $P < 0.0001$ ) (Obrázek 8A). ROC křivka byla použita k určení optimální mezí (cut-off) hodnoty kopeptinu pro predikci dobré neurologické prognózy (CPC 1-2; area under the curve (AUC) 0.801; 95% interval spolehlivosti (CI) 0.644 až 0.910;  $P=0.0001$ ) (Obrázek 8B). Optimální cut-off hodnota  $\leq 217.9$  pmol/l, měla senzitivitu pro dobrou neurologickou prognózu 78.6% a specifitu 75%.



**Obrázek 8. Panel A:** Hladiny kopeptinu (průměr ± směrodatná odchylka), měřené při přijetí do nemocnice u nemocných po srdeční zástavě podle kategorií CPC. **Panel B:** Receiver-operating characteristics (ROC) křivka pro kopeptin a predikci neurologické prognózy u nemocných po srdeční zástavě. 95% CI - 95% interval spolehlivosti; AUC – plocha pod křivkou.

Použitím multivariální regresní analýzy jsme ověřovali, jestli může být hladina kopeptinu nezávislým ukazatelem špatné neurologické prognózy nebo úmrtí (CPC 3-5); zjistili jsme, že hladina kopeptinu  $>217.9$  pmol/l byla nezávislým prediktorem, adjustované odds ratio 27.00 (95% CI 2.27 až 321.68;  $P=0.009$ ).

#### 5.1.4. Diskuze

Hlavním výsledkem této práce bylo pozorování, že vstupní hodnota kopeptinu u nemocných po srdeční zástavě, měřená ihned po přijetí do nemocnice, může sloužit k predikci prognózy. Stanovili jsme optimální cut-off hodnotu kopeptinu a ukázali, že nemocní s hladinou kopeptinu  $\leq 217.9$  pmol/l měli vyšší pravděpodobnost přežití s dobrým neurologickým výsledkem.

Časné a přesné stanovení neurologické prognózy u nemocných po srdeční zástavě je zcela zásadní pro zvolení nejvhodnějšího diagnosticko-léčebného postupu, může zabránit nadměrné intenzivní péči a dále pomůže časně a adekvátně informovat příbuzné. V klinické praxi využíváme při hodnocení prognózy evropská doporučení, které se opírají o opakované klinické vyšetření, dále laboratorní a zobrazovací metody. Žádný z uvedených doporučovaných postupů však není vhodný ke stanovení prognózy ihned po přijetí do nemocnice – v tuto dobu jsou k dispozici zpravidla pouze omezené anamnestické údaje a charakteristiky, související s okolnostmi srdeční zástavy; v tomto ohledu mohou naše výsledky přispět k rozšíření prognostických možností.

Výsledky naší studie jsou v souladu s pracemi, které vyšetřovaly hladinu kopeptinu u jiných akutních a kritických stavů (44). Hladina kopeptinu koreluje s klinickým výstupem u následujících stavů: akutní exacerbace chronické obstrukční plicní nemoci (45), ischemická cévní mozková příhoda (46); infarkt myokardu (47-48) srdeční selhání (49-50) a dokonce u nemocných, vyšetřených na urgentním příjmu s nespecifickými potížemi (51). Jaraí a spol. zjistili, že předoperačně stanovená hladina kopeptinu predikuje postoperační klinický vývoj v oblasti vaskulární chirurgie (52). Naše výsledky jsou také v souladu s prací Kima a spol., kteří popsali, že nemocní po srdeční zástavě s relativní adrenální insuficiencí, vyšší hladinou adrenokortikotropního hormonu a vazopresinu mají špatnou neurologickou prognózu (53).

### **5.1.5. Závěr**

Výsledky této práce prokázaly, že hladina kopeptinu, měřená při příjmu do nemocnice u pacientů po srdeční zástavě, může být časným pomocným ukazatelem pro stanovení neurologické prognózy a mortality.

## **6. NEURON-SPECIFICKÁ ENOLÁZA A SRDEČNÍ ZÁSTAVA**

### **6.1. Vztah mezi hladinou neuron-specifické enolázy a prognózou po srdeční zástavě závisí na době odběru vzorku**

#### **6.1.1. Úvod**

V klinické studii jsme studovali prognostický význam stanovení NSE v jednotlivých dnech po srdeční zástavě a vztah mezi změnami hladiny NSE v prvních dnech po zástavě a klinickými výsledky.

#### **6.1.2. Soubor a metody**

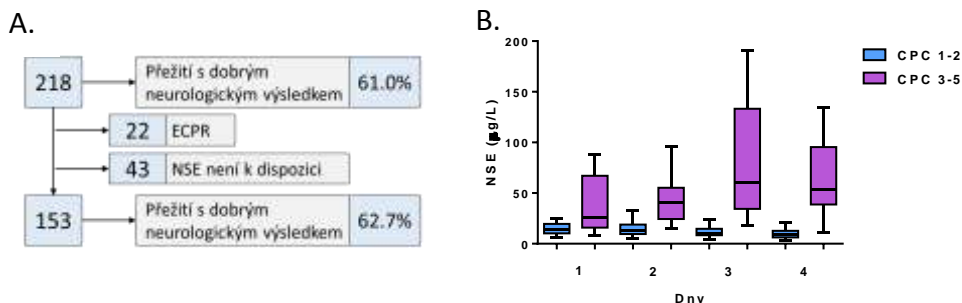
Soubor tvořili nemocní po srdeční zástavě mimo nemocnici s perzistujícím komatem, léčení obdobně, jak je popsáno v 4.2.2. Pacienti s extrakorporální kardiopulmonální resuscitací (ECPR) a s intraaortální balonkovou kontrapulzací (IABK) byli ze souboru vyloučeni. Vzorky krve ke stanovení hladiny NSE byli odebírané nemocným první ráno po přijetí do nemocnice (6-30 hod od kolapsu, den 1), pak každé následující ráno hospitalizace (den 2: 30-54 hod od kolapsu; den 3: 54-78 hod od kolapsu; den 4: 78-102 hod od kolapsu). Neurologický stav byl hodnocen 30. den po zástavě pomocí CPC (31) (Tabulka 3) a sledovali jsme i roční mortalitu.

#### **6.1.3. Výsledky**

V průběhu ražazovacího období (leden 2012 až březen 2015) bylo přijato k hospitalizaci 218 nemocných po srdeční zástavě mimo nemocnici; z uvedeného počtu



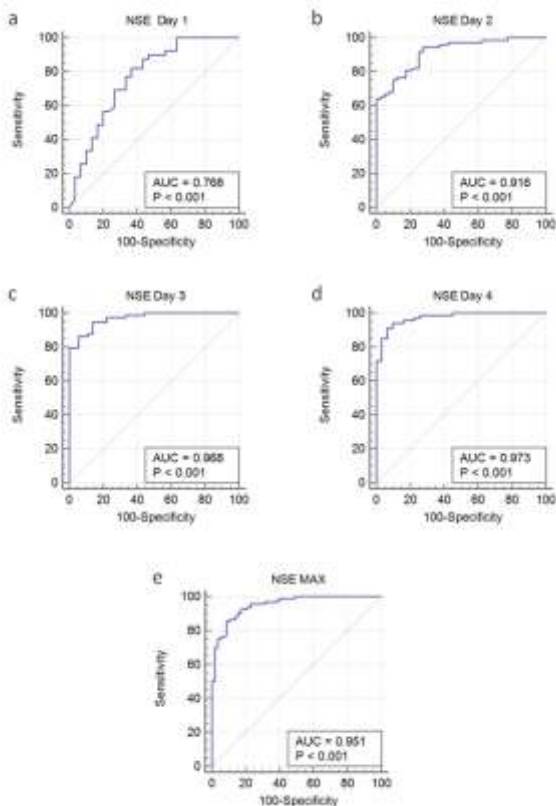
bylo 153 nemocných zařazeno do souboru (Obrázek 9A). Střední hodnota NSE byla 1. den po srdeční zástavě 16.8 mcg/l (min 6.6, max 196.2 mcg/l [n=66]); 2. den 18.3 mcg/l (min 5.5, max 123.6 mcg/l [n=112]); 3. den 14.6 mcg/l (min 4.1, max 368.6 mcg/l [n=108]); 4. den 12 mcg/l (min 3.5, max 300.0 mcg/l [n=112]). Hodnoty NSE byly v jednotlivých dnech významně nižší ve skupině s CPC 1-2 než ve skupině nemocných, u kterých bylo CPC 3-5 (P<0.05): 1. den 14.1 mcg/l vs. 26.1 mcg/l; 2. den 13.1 mcg/l vs. 40.8 mcg/l; 3. den 9.9 mcg/l vs. 60.8 mcg/l; 4. den 8.7 mcg/l vs. 53.0 mcg/l (Obrázek 9B).



**Obrázek 9. Panel A:** Přehled zařazování pacientů do studie. ECPR – Extrakorporální kardiopulmonální resuscitace; NSE – neuron-specifická enoláza **Panel B:** Hladiny Neuron –specifické enolázy (NSE) měřené v jednotlivých dnech. Hladiny NSE byly signifikantně nižší ve skupině CPC 1-2 ve srovnání se skupinou CPC 3-5 v každém měření první čtyři dny po srdeční zástavě.

Pomocí ROC analýzy byly zjištěny následující optimální cut-off hodnoty NSE pro predikci špatné neurologické prognózy (CPC 3-5) 30. den od přijetí k hospitalizaci po srdeční zástavě: NSE den 1 >20.4 mcg/l (senzitivita 63.3%; specifita 82.1%; P=0.002); NSE den 2 >29 mcg/l (senzitivita 72.5%; specifita 94.4%; P<0.001); NSE den 3 >20.7 mcg/l (senzitivita 94.4%; specifita 86.7%; P<0.001); NSE den 4 >19.4 mcg/l (senzitivita 93.5%; specifita 91.0%; P<0.001); a maximální hodnota NSE >27.6 mcg/l (senzitivita 91.2%; specifita 85.4%; P<0.001) (Obrázek 10).

Porovnáním ROC křivek jsme zjistili, že prediktivní hodnota NSE 1. den po srdeční zástavě je významně nižší než 2., 3. a 4. den a maximální NSE. Numericky největší plocha pod křivkou byla 4. den po srdeční zástavě, následovaná 3. dnem a pak maximální hodnotou NSE (Obrázek 10).



**Obrázek 10.** Vztah hladiny neuron specifické enolázy (NSE) a špatné neurologické prognózy (CPC 3-5). Receiver operating characteristics (ROC) křivky jsou konstruované pro jednotlivé dny měření a maximální hodnotu NSE. AUC – plocha pod křivkou; MAX maximální

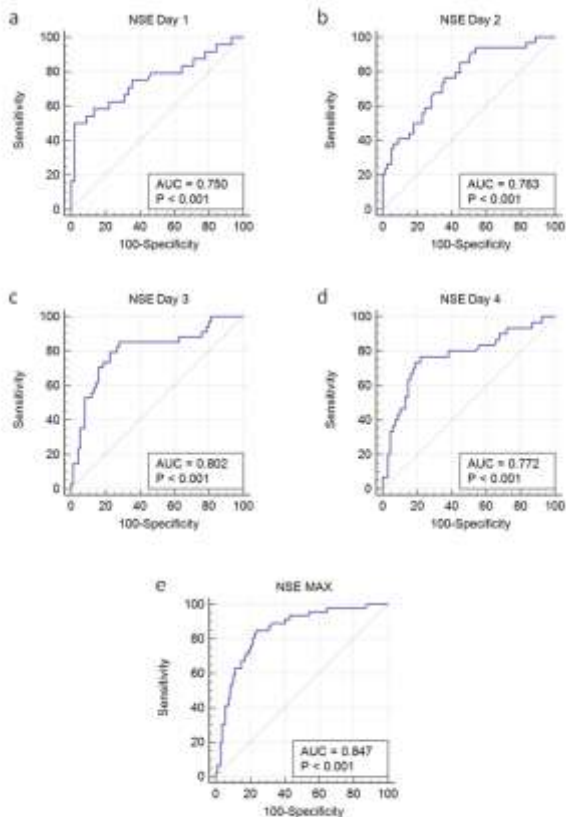
Hodnota NSE >39.8 mcg/l den 1 po srdeční zástavě je spojená se špatnou neurologickou prognózou (CPC 3-5) se 100% specifitou a 42% senzitivitou; NSE >51.1 mcg/l den 2 po srdeční zástavě byla spojená se špatnou neurologickou prognózou se 100% specifitou a 24% senzitivitou; NSE >49.2 mcg/l den 3 po srdeční zástavě byla

spojená se špatnou neurologickou prognózou se 100 specificitou a 52% senzitivitou; NSE >50.2 mcg/l den 4 po srdeční zástavě byla asociovaná se špatnou neurologickou prognózou se 100 specificitou a 42% senzitivitou; maximální hodnota NSE >57.1 mcg/l byla asociovaná s nepříznivou neurologickou prognózou se 100 specificitou a 51% senzitivitou. Multivariantní analýza ukázala, že NSE 3. den (P=0.002) a 4. den (P=0.007) po srdeční zástavě jsou nezávislými prediktory krátkodobé 30-denní prognózy.

Avšak nejen absolutní hodnoty NSE, ale také rozdíly mezi absolutními hodnotami byly významně spojené s 30-denní neurologickou prognózou; nejvyšší prediktivní hodnotu pro špatnou neurologickou prognózu měla změna mezi 4. a 1. dnem po srdeční zástavě. Použití kombinace absolutních hodnot NSE u nemocných po srdeční zástavě s vývojem hladin může významně zvýšit prognostickou přesnost a přínos v klinické praxi: hodnota NSE 4. den >20.0 mcg/l; současně se změnou v hladině mezi 4. a 3. dnem >0.0 mcg/l (jakýkoli vzestup) predikuje špatnou neurologickou prognózu (CPC 3-5) se 100% specificitou a 73% senzitivitou.

Pomocí ROC analýzy jsme našli následující optimální cut-off hodnoty pro NSE a predikci roční mortality: den 1 >35.8 mcg/l (senzitivita 50%; specifita 97.8%; P<0.001); den 2 >18.7 mcg/l (senzitivita 76.5%; specifita 64.1%; P<0.001); den 3 >18.1 mcg/l (senzitivita 85.3%; specifita 72.0%; P< 0.001); den 4 >18.5 mcg/l (senzitivita 76.7%; specifita 77.9%; P<0.001); a maximální hodnota NSE >29.1 mcg/l (senzitivita 84.8%; specifita 76.6%; P<0.001) (Obrázek 11). Predikce roční mortality se 100% specificitou byla spojená s velmi nízkou senzitivitou, která nepřesáhla 20.6%. Mezi jednotlivými ROC křivkami pro NSE a roční mortalitu nebyl významný rozdíl; numericky největší plocha pod křivkou byla pro maximální hodnoty NSE, následována křivkou pro 3. a 4. den (Obrázek 11).

Multivariantní analýza ukázala, že maximální hodnota NSE byla nezávislým prediktorem mortality. Významná asociace s jednorocní mortalitou byla také nalezena pro vybrané změny mezi jednotlivými hodnotami NSE.



**Obrázek 11.** Vztah hladiny neuron specifické enolázy (NSE) a roční mortality. Receiver operating characteristics (ROC) křivky jsou konstruované pro jednotlivé dny měření a maximální hodnotu NSE. AUC – plocha pod křivkou; MAX – maximální.

#### 6.1.4. Diskuse

Naše studie ukázala, že hladina NSE, měřená během prvních 4 dnů po přijetí do nemocnice po srdeční zástavě mimo nemocnici je významně spojená s krátkodobou i dlouhodobou prognózou. Hlavním výsledkem této práce je pozorování, že prediktivní hodnota NSE závisí na čase, kdy byl proveden odběr krve ke stanovení NSE. Jako první jsme popsali významnou prognostickou hodnotu stanovení NSE 4. den po srdeční zástavě a ukázali jsme i významnou asociaci mezi vývojem hodnot NSE a neurologickou prognózou, především změny mezi 1. a 4. dnem měření. Stanovení

hodnot NSE 4. den po srdeční zástavě může být přínosné zvláště u pacientů, kteří zůstávají v bezvědomí 4. den po srdeční zástavě, kdy je určení prognózy zcela zásadní pro volbu dalšího léčebného postupu.

I když hladiny NSE ve všech jednotlivých dnech predikovaly 30-denní prognózu, naše pozorování ukazují, že asociace s klinickými výsledky je závislá na čase odběru krve. Hodnota NSE, měřená 1. den po srdeční zástavě, měla nižší prediktivní hodnotu ve srovnání s ostatními dny a s maximální hodnotou NSE. Nejsilnější asociace s krátkodobou prognózou byla pozorována pro hladinu NSE, stanovenou 4. den po srdeční zástavě, těsně následována hodnotou NSE, měřenou 3. den a pak maximální hodnotou NSE. Na druhou stranu prediktivní hodnota pro dlouhodobou prognózu (roční mortalitu) se u jednotlivých měření NSE významně neliší. Numericky nejsilnější asociace byla nalezena pro maximální hodnotu NSE, následovaná hladinou NSE 3. a 4. den po kolapsu. Asociace s roční mortalitou byly nižší ve srovnání s 30-denními výsledky.

Mezinárodní doporučení pro nemocné po srdeční zástavě mimo nemocnici neobsahují konkrétní hodnotu NSE pro stanovení prognózy ani optimální čas pro odběr krve a nejednotná v tomto ohledu je i další dostupná literární evidence (7). Velká variabilita mezi publikovanými cut-off hodnotami NSE může být zapříčiněna velkou citlivostí na správný odběr krve, manipulaci a na skladování krevních vzorků – všechny uvedené procesy mohou způsobit hemolýzu, která vede k falešně zvýšeným hodnotám NSE (54-55); výsledky měření mohou být ovlivněny i typem použité laboratorní metody (54-56). Nelze také nezmínit, že většina publikovaných prací má velmi omezenou velikost studovaného souboru (7). Abychom minimalizovali riziko hemolýzy v naší práci, vzorky krve byly ihned po odebrání zpracované a uchovány při teplotě -20°C maximálně po dobu jednoho týdne.

Naše výsledky jsou v souladu s dalšími publikovanými pracemi, které popisují vzájemný vztah mezi hodnotami NSE k prognózou nemocných po srdeční zástavě mimo nemocnici. Největší publikovaná studie s opakovaným měřením NSE byla analýza studie TTM (57), která zahrnovala 700 pacientů. Autoři našli vztah mezi

hladinou NSE 24, 48 a 72 hod po srdeční zástavě a 6-měsíční neurologickou prognózou, což je v souladu s našimi výsledky i přes značné rozdíly v metodách stanovení NSE a kontrolou tělesné teploty mezi TTM a naší studií. Srovnání hodnot plochy pod ROC křivkou mezi TTM a naší studií ukazuje, že plocha pro 6-měsíční výsledky v TTM je numericky menší než u 30-denních výsledků, ale vyšší než u roční mortality v naší práci. Lze předpokládat, že uvedený klesající trend v čase po srdeční zástavě mimo nemocnici, odráží vyšší a přesnější prediktivní hodnotu NSE pro stanovení krátkodobé prognózy.

### **6.1.5. Závěr**

Naše výsledky ukazují, že hodnota NSE je užitečný pomocný ukazatel pro stanovení krátkodobé (30-denní) neurologické prognózy a roční mortality u nemocných po srdeční zástavě, kteří jsou léčeni terapeutickou hypotermií s cílovou tělesnou teplotou 33°C. Nejvyšší prognostickou hodnotu mělo stanovení NSE 4. den a 3. den po srdeční zástavě.

## **7. SOUHRN DOSAŽENÝCH VÝSLEDKŮ**

Naše výsledky ukázaly, že oxidativní stres hraje pravděpodobně aktivní úlohu v patogeneze oxidativního stresu, a že hypotermie oxidativní stres tlumí. Hladina ukazatelů oxidativního stresu však v naší práci měla jen slabý, i když statisticky významný vztah s klinickými výsledky a prognózou nemocných po srdeční zástavě. Potenciálně protektivní mechanismy, jako je ischemický postconditioning nebo podání NO, neměly lepší účinek než hypotermie na výši krevního tlaku, spotřebu vasopresorů, mozkovou oxygenaci či známky orgánového poškození, ani na ukazatele oxidativního stresu. Potvrdili jsme tedy hypotézu, že na patogeneze poresuscitačního syndromu se významně podílí oxidativní stres. Naproti tomu se nepodařilo zcela potvrdit hypotézu, že hladina markerů oxidativního stresu odráží závažnost ischemicko-reperfuzního

poškození a vyšší hladiny ukazatelů oxidativního stresu jsou spojeny s horší prognózou po srdeční zástavě.

Naše práce ukázala, že vstupní hladina kopeptinu (měřená při přijetí k hospitalizaci nemocného po srdeční zástavě) je významně vyšší u nemocných se špatnými klinickými výsledky a že vstupní hodnotu kopeptinu je možné využít k velmi časnému stanovení prognózy u nemocných o srdeční zástavě. Potvrdili jsme tedy hypotézu, že těžší ischemické poškození při srdeční zástavě je spojeno s vyšší akutní sekrecí vasopresinu a proto hladina ukazatele této sekrece – kopeptinu – odráží závažnost stavu a její stanovení lze využít k časné predikci prognózy.

V neposlední řadě naše práce ukázala, že prediktivní hodnota neuron-specifické enolázy je významně závislá na čase odběru, nejvyšší prognostickou hodnotu má stanovení NSE 4. a 3 den. Vyšší prognostickou hodnotu jsme našli pro stanovení 30-denní neurologické prognózy než pro určení roční mortality. Pomocí relativně jednoduchého postupu s využitím dvou hodnot NSE a jejich změny můžeme stanovit špatnou prognózu se 100% specificitou a vysokou, 73% senzitivitou. Potvrdili jsme proto hypotézu, že prediktivní hodnota NSE pro stanovení prognózy po srdeční zástavě závisí na době odběru krevního vzorku (interval kolaps – odběr) a pro stratifikaci rizika lze využít nejen absolutní hodnoty NSE, ale i změny hladiny v čase.

## 8. LITERATURA

### 8.1. Publikace s IF, které jsou podkladem dizertační práce

1. Vondrakova D, Kruger A, Janotka M, Malek F, Dudkova V, Neuzil P, Ostadal P. Association of neuron-specific enolase values with outcomes in cardiac arrest survivors is dependent on the time of sample collection. *Crit Care*. 2017 Jul 8;21(1):172. (IF 5.358)
2. Psotova H, Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, Janotka M, Vondrakova D, Svoboda T, Hrachovina M, Taborsky L, Dudkova V, Strunina S, Kittnar O, Neuzil P. Ischemic Postconditioning and Nitric Oxide Administration Failed to Confer Protective Effects in a Porcine Model of Extracorporeal Cardiopulmonary Resuscitation. *Artif Organs*. 2016 Apr;40(4):353-9. (IF 2.403)
3. Ostadal P, Kruger A, Zdrahalova V, Janotka M, Vondrakova D, Neuzil P, Prucha M. Blood levels of copeptin on admission predict outcomes in out-of-hospital cardiac arrest survivors treated with therapeutic hypothermia. *Crit Care*. 2012 Oct 4;16(5):R187. (IF 5.358)

4. Krüger A, Ošťádal P, Vondráková D, Janotka M, Herget J. Nitrotyrosine and nitrate/nitrite levels in cardiac arrest survivors treated with endovascular hypothermia. *Physiol Res*. 2012;61(4):425-30. **(1.461)**

## 8.2. Publikace autora s IF, nesouvisející s dizertační prací

1. Ostadal P, Rokyta R, Kruger A, Vondrakova D, Janotka M, Smíd O, Smalcova J, Hromadka M, Linhart A, Bělohávek J. Extra corporeal membrane oxygenation in the therapy of cardiogenic shock (ECMO-CS): rationale and design of the multicenter randomized trial. *Eur J Heart Fail*. 2017 May;19 Suppl 2:124-127. **(IF 6.526)**
2. Ostadal P, Mlcek M, Strunina S, Hrachovina M, Kruger A, Vondrakova D, Janotka M, Hala P, Kittnar O, Neuzil P. Novel porcine model of acute severe cardiogenic shock developed by upper-body hypoxia. *Physiol Res*. 2016 Nov 8;65(4):711-715. **(1.461)**
3. Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, Hala P, Lacko S, Mates M, Vondrakova D, Svoboda T, Hrachovina M, Janotka M, Psotova H, Strunina S, Kittnar O, Neuzil P. Increasing venoarterial extracorporeal membrane oxygenation flow negatively affects left ventricular performance in a porcine model of cardiogenic shock. *J Transl Med*. 2015 Aug 15;13:266. **(IF 3.786)**
4. Littnerova S, Parenica J, Spinar J, Vitovec J, Linhart A, Widimsky P, Jarkovsky J, Miklik R, Spinarova L, Zeman K, Belohlavek J, Malek F, Felsoci M, Kettner J, Ostadal P, Cihalik C, Spac J, Al-Hiti H, Fedorco M, Fojt R, Kruger A, Malek J, Mikusová T, Monhart Z, Bohacova S, Pohludkova L, Rohac F, Vaclavik J, Vondrakova D, Vyskocilova K, Bambuch M, Dusek L. Positive influence of being overweight/obese on long term survival in patients hospitalised due to acute heart failure. *PLoS One*. 2015 Feb 24;10(2):e0117142. **(IF 2.806)**
5. Ostadal P, Kruger A, Vondrakova D, Janotka M, Psotova H, Neuzil P. Noninvasive assessment of hemodynamic variables using near-infrared spectroscopy in patients experiencing cardiogenic shock and individuals undergoing venoarterial extracorporeal membrane oxygenation. *J Crit Care*. 2014 Aug;29(4):690.e11-5. **(IF 2.648)**
6. Ostadal P, Vondrakova D, Kruger A, Janotka M, Psotova H, Prucha M. Alteration in lipoprotein-associated phospholipase A2 levels during acute coronary syndrome and its relationship to standard biomarkers. *Lipids Health Dis*. 2012 Nov10;11:153. **(IF 2.073)**
7. Málek F, Ošťádal P, Pařenica J, Jarkovský J, Vitovec J, Widimský P, Linhart A, Fedorco M, Coufal Z, Miklík R, Krüger A, Vondráková D, Špinar J. Uric acid, allopurinol therapy, and mortality in patients with acute heart failure--results of the Acute HEART FAILURE Database registry. *J Crit Care*. 2012 Dec;27(6):737.e11-24. **(IF 2.648)**
8. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem*. 2010 Dec;345(1-2):91-104. **(IF 2.669)**
9. Vondrakova D, Ostadal P, Kruger A. Immediate effect of intensive atorvastatin therapy on lipid parameters in patients with acute coronary syndrome. *Lipids Health Dis*. 2010 Jul 14;9:71. **(IF 2.073)**
10. Vondráková D, Málek F, Ošťádal P, Vránová J, Sedláčková L, Šedivá L, Petrů J, Škoda J, Neuzil P. Short term effect of CRT on biomarkers of cardiac remodelling and fibrosis: NT-proBNP, sST2, galectin-3, and a marker of oxidative stress--ceruloplasmin--a pilot study. *Int J Cardiol*. 2012 Aug 23;159(2):159-60. **(IF 6.189)**
11. Vondráková D, Málek F, Ošťádal P, Vránová J, Miroslav P, Schejbalová M, Neuzil P. Correlation of NT-proBNP, proANP and novel biomarkers: copeptin and proadrenomedullin with LVEF and NYHA in patients with ischemic CHF, non-ischemic CHF and arterial hypertension. *Int J Cardiol*. 2011 Aug 4;150(3):343-4. **(IF 6.189)**
12. Kutil B, Ostadal P, Vejvoda J, Kukacka J, Cepova J, Alan D, Krüger A, Vondrakova D. Alterations in serum selenium levels and their relation to troponin I in acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 2010 Dec;345(1-2):23-7. **(IF 2.669)**

## 8.3. Použitá literatura

1. Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A consensus statement from the



- International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, European Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Asia, and the Resuscitation Council of Southern Africa); the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; and the Stroke Council. *Circulation*. 2008;118(23):2452-83.
2. Nolan JP, Neumar RW, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Bottiger BW, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Resuscitation*. 2008;79(3):350-79.
  3. Grasner JT, Lefering R, Koster RW, Masterson S, Bottiger BW, Herlitz J, et al. EuReCa ONE-27 Nations, ONE Europe, ONE Registry: A prospective one month analysis of out-of-hospital cardiac arrest outcomes in 27 countries in Europe. *Resuscitation*. 2016;105:188-95.
  4. Hollenberg J, Svensson L, Rosenqvist M. Out-of-hospital cardiac arrest: 10 years of progress in research and treatment. *Journal of internal medicine*. 2013;273(6):572-83.
  5. Perkins GD, Handley AJ, Koster RW, Castren M, Smyth MA, Olasveengen T, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 2. Adult basic life support and automated external defibrillation. *Resuscitation*. 2015;95:81-99.
  6. Soar J, Nolan JP, Bottiger BW, Perkins GD, Lott C, Carli P, et al. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015: Section 3. Adult advanced life support. *Resuscitation*. 2015;95:100-47.
  7. Nolan JP, Soar J, Cariou A, Cronberg T, Moulaert VR, Deakin CD, et al. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines for Post-resuscitation Care 2015: Section 5 of the European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015. *Resuscitation*. 2015;95:202-22.
  8. Lombardi G, Gallagher J, Gennis P. Outcome of out-of-hospital cardiac arrest in New York City. The Pre-Hospital Arrest Survival Evaluation (PHASE) Study. *JAMA*. 1994;271(9):678-83.
  9. Levy DE, Caronna JJ, Singer BH, Lapinski RH, Frydman H, Plum F. Predicting outcome from hypoxic-ischemic coma. *JAMA*. 1985;253(10):1420-6.
  10. Wijdicks EF, Hijdra A, Young GB, Bassetti CL, Wiebe S. Practice parameter: prediction of outcome in comatose survivors after cardiopulmonary resuscitation (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2006;67(2):203-10.
  11. Rossetti AO, Oddo M. The neuro-ICU patient and electroencephalography paroxysms: if and when to treat. *Curr Opin Crit Care*. 2010.
  12. Rossetti AO, Logroscino G, Liaudet L, Ruffieux C, Ribordy V, Schaller MD, et al. Status epilepticus: an independent outcome predictor after cerebral anoxia. *Neurology*. 2007;69(3):255-60.
  13. Rossetti AO, Oddo M, Liaudet L, Kaplan PW. Predictors of awakening from postanoxic status epilepticus after therapeutic hypothermia. *Neurology*. 2009;72(8):744-9.
  14. Bouwes A, Binnekade JM, Zandstra DF, Koelman JH, van Schaik IN, Hijdra A, et al. Somatosensory evoked potentials during mild hypothermia after cardiopulmonary resuscitation. *Neurology*. 2009;73(18):1457-61.
  15. Oddo M, Rossetti AO. Predicting neurological outcome after cardiac arrest. *Curr Opin Crit Care*. 2011;17(3):254-9.
  16. Leithner C, Ploner CJ, Hasper D, Storm C. Does hypothermia influence the predictive value of bilateral absent N20 after cardiac arrest? *Neurology*. 2010;74(12):965-9.
  17. Fugate JE, Wijdicks EF, Mandrekar J, Claassen DO, Manno EM, White RD, et al. Predictors of neurologic outcome in hypothermia after cardiac arrest. *Ann Neurol*. 2010;68(6):907-14.
  18. Tiainen M, Roine RO, Pettila V, Takkunen O. Serum neuron-specific enolase and S-100B protein in cardiac arrest patients treated with hypothermia. *Stroke*. 2003;34(12):2881-6. Epub 2003/11/25.
  19. Bottiger BW, Mobes S, Glatzer R, Bauer H, Gries A, Bartsch P, et al. Astroglial protein S-100 is an early and sensitive marker of hypoxic brain damage and outcome after cardiac arrest in humans. *Circulation*. 2001;103(22):2694-8.

20. Shinozaki K, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Abe R, Nakada TA, et al. Serum S-100B is superior to neuron-specific enolase as an early prognostic biomarker for neurological outcome following cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2009;80(8):870-5.
21. Mortberg E, Zetterberg H, Nordmark J, Blennow K, Rosengren L, Rubertsson S. S-100B is superior to NSE, BDNF and GFAP in predicting outcome of resuscitation from cardiac arrest with hypothermia treatment. *Resuscitation*. 2011;82(1):26-31.
22. Yannopoulos D, Segal N, Matsuura T, Sarraf M, Thorsgard M, Caldwell E, et al. Ischemic post-conditioning and vasodilator therapy during standard cardiopulmonary resuscitation to reduce cardiac and brain injury after prolonged untreated ventricular fibrillation. *Resuscitation*. 2013;84(8):1143-9.
23. Meybohm P, Gruenewald M, Zacharowski KD, Albrecht M, Lucius R, Foesel N, et al. Mild hypothermia alone or in combination with anesthetic post-conditioning reduces expression of inflammatory cytokines in the cerebral cortex of pigs after cardiopulmonary resuscitation. *Crit Care*. 2010;14(1):R21.
24. Nishida T, Yu JD, Minamishima S, Sips PY, Searles RJ, Buys ES, et al. Protective effects of nitric oxide synthase 3 and soluble guanylate cyclase on the outcome of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *Crit Care Med*. 2009;37(1):256-62.
25. Minamishima S, Bougaki M, Sips PY, Yu JD, Minamishima YA, Elrod JW, et al. Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation*. 2009;120(10):888-96.
26. Minamishima S, Kida K, Tokuda K, Wang H, Sips PY, Kosugi S, et al. Inhaled nitric oxide improves outcomes after successful cardiopulmonary resuscitation in mice. *Circulation*. 2011;124(15):1645-53.
27. Kida K, Shirozu K, Yu B, Mandeville JB, Bloch KD, Ichinose F. Beneficial effects of nitric oxide on outcomes after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in hypothermia-treated mice. *Anesthesiology*. 2014;120(4):880-9.
28. Kruger A, Ostadal P, Vondrakova D, Janotka M, Herget J. Nitrotyrosine and nitrate/nitrite levels in cardiac arrest survivors treated with endovascular hypothermia. *Physiol Res*. 2012;61(4):425-30.
29. Ostadal P, Mlcek M, Kruger A, Horakova S, Skabradova M, Holy F, et al. Mild therapeutic hypothermia is superior to controlled normothermia for the maintenance of blood pressure and cerebral oxygenation, prevention of organ damage and suppression of oxidative stress after cardiac arrest in a porcine model. *J Transl Med*. 2013;11:124.
30. Sunde K, Pytte M, Jacobsen D, Mangschau A, Jensen LP, Smedsrud C, et al. Implementation of a standardised treatment protocol for post resuscitation care after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 2007;73(1):29-39.
31. Jennett B, Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet*. 1975;1(7905):480-4.
32. Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2000;47(3):446-56.
33. Dhalla NS, Temsah RM, Neticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000;18(6):655-73.
34. Hayashi N, Utagawa A, Kinoshita K, Izumi T. Application of a novel technique for clinical evaluation of nitric oxide-induced free radical reactions in ICU patients. *Cell Mol Neurobiol*. 1999;19(1):3-17.
35. Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. Hypothermia attenuates oxidative/nitrosative stress, encephalopathy and brain edema in acute (ischemic) liver failure. *Neurochem Int*. 2009;55(1-3):124-8.
36. Fiskum G, Danilov CA, Mehrabian Z, Bambrick LL, Kristian T, McKenna MC, et al. Postischemic oxidative stress promotes mitochondrial metabolic failure in neurons and astrocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:129-38.
37. Stefanutti G, Pierro A, Vinardi S, Spitz L, Eaton S. Moderate hypothermia protects against systemic oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock*. 2005;24(2):159-64.
38. Scumpia PO, Sarcia PJ, Kelly KM, DeMarco VG, Skimming JW. Hypothermia induces anti-inflammatory cytokines and inhibits nitric oxide and myeloperoxidase-mediated damage in the hearts of endotoxemic rats. *Chest*. 2004;125(4):1483-91.

39. Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, Yenari MA. Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *J Neurosci.* 2002;22(10):3921-8.
40. Karabiyikoglu M, Han HS, Yenari MA, Steinberg GK. Attenuation of nitric oxide synthase isoform expression by mild hypothermia after focal cerebral ischemia: variations depending on timing of cooling. *J Neurosurg.* 2003;98(6):1271-6.
41. Lei B, Tan X, Cai H, Xu Q, Guo Q. Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation. *Stroke.* 1994;25(1):147-52.
42. Wenisch C, Narzt E, Sessler DI, Parschalk B, Lenhardt R, Kurz A, et al. Mild intraoperative hypothermia reduces production of reactive oxygen intermediates by polymorphonuclear leukocytes. *Anesthesia and analgesia.* 1996;82(4):810-6.
43. Bayir H, Adelson PD, Wisniewski SR, Shore P, Lai Y, Brown D, et al. Therapeutic hypothermia preserves antioxidant defenses after severe traumatic brain injury in infants and children. *Crit Care Med.* 2009;37(2):689-95.
44. Katan M, Christ-Crain M. The stress hormone copeptin: a new prognostic biomarker in acute illness. *Swiss Med Wkly.* 2010;140:w13101.
45. Stolz D, Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Leuppi J, Miedinger D, Bingisser R, et al. Copeptin, C-reactive protein, and procalcitonin as prognostic biomarkers in acute exacerbation of COPD. *Chest.* 2007;131(4):1058-67.
46. Katan M, Fluri F, Morgenthaler NG, Schuetz P, Zweifel C, Bingisser R, et al. Copeptin: a novel, independent prognostic marker in patients with ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2009;66(6):799-808.
47. Potocki M, Reichlin T, Thalman S, Zellweger C, Twerenbold R, Reiter M, et al. Diagnostic and prognostic impact of copeptin and high-sensitivity cardiac troponin T in patients with pre-existing coronary artery disease and suspected acute myocardial infarction. *Heart.* 2012;98(7):558-65.
48. Narayan H, Dhillon OS, Quinn PA, Struck J, Squire IB, Davies JE, et al. C-terminal provasopressin (copeptin) as a prognostic marker after acute non-ST elevation myocardial infarction: Leicester Acute Myocardial Infarction Peptide II (LAMP II) study. *Clin Sci (Lond).* 2011;121(2):79-89.
49. Miller WL, Hartman KA, Grill DE, Struck J, Bergmann A, Jaffe AS. Serial measurements of midregion proANP and copeptin in ambulatory patients with heart failure: incremental prognostic value of novel biomarkers in heart failure. *Heart.* 2012;98(5):389-94.
50. Alehagen U, Dahlstrom U, Rehfeld JF, Goetze JP. Association of copeptin and N-terminal proBNP concentrations with risk of cardiovascular death in older patients with symptoms of heart failure. *JAMA.* 2011;305(20):2088-95.
51. Nickel CH, Ruedinger J, Misch F, Blume K, Maile S, Schulte J, et al. Copeptin and peroxiredoxin-4 independently predict mortality in patients with nonspecific complaints presenting to the emergency department. *Acad Emerg Med.* 2011;18(8):851-9.
52. Jarai R, Mahla E, Perkmann T, Archan S, Tentzeris I, Huber K, et al. Usefulness of pre-operative copeptin concentrations to predict post-operative outcome after major vascular surgery. *Am J Cardiol.* 2011;108(8):1188-95.
53. Kim JJ, Hyun SY, Hwang SY, Jung YB, Shin JH, Lim YS, et al. Hormonal responses upon return of spontaneous circulation after cardiac arrest: a retrospective cohort study. *Crit Care.* 2011;15(1):R53.
54. Rundgren M, Cronberg T, Friberg H, Isaksson A. Serum neuron specific enolase - impact of storage and measuring method. *BMC Res Notes.* 2014;7:726.
55. Mlynash M, Buckwalter MS, Okada A, Caulfield AF, Venkatasubramanian C, Eyngorn I, et al. Serum neuron-specific enolase levels from the same patients differ between laboratories: assessment of a prospective post-cardiac arrest cohort. *Neurocrit Care.* 2013;19(2):161-6.
56. Stern P, Bartos V, Uhrova J, Bezdickova D, Vanickova Z, Tichy V, et al. Performance characteristics of seven neuron-specific enolase assays. *Tumour Biol.* 2007;28(2):84-92.
57. Stammel P, Collignon O, Hassager C, Wise MP, Hovdenes J, Aneman A, et al. Neuron-Specific Enolase as a Predictor of Death or Poor Neurological Outcome After Out-of-Hospital Cardiac Arrest and Targeted Temperature Management at 33 degrees C and 36 degrees C. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65(19):2104-14.