

Prognostický význam hladiny apoptotické a genomické DNA v plazmě u kriticky nemocných

Ždárský E.³, Fanta J.², Waldauf P.¹ Slavkovský L.¹, Duška F.¹, Čtrnáctá E.¹, Pacht J.¹

¹Klinika anesteziologie a resuscitace, 3. LF UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

²Chirurgická klinika, 3. LF UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

³Ústav farmakologie, 3. LF UK, Praha

Souhrn

Cíl studie : Stanovit trendy a potencionální prognostický význam změn hladin apoptotické (aDNA) a genomické DNA (gDNA) u pacientů, u nichž inzult různého charakteru vedl k selhávání vitálních funkcí.

Typ studie : Prospektivní otevřená studie.

Název a sídlo pracoviště: Klinika anesteziologie a resuscitace a Chirurgická klinika 3. LF UK a FNKV, Praha; Ústav farmakologie 3. LF UK, Praha.

Materiál a metody: Do studie byla zařazeno 94 kriticky nemocných. Vzorky krve k analýze byly odebrány v den přijetí a potom 3. a 5. den hospitalizace. U každého pacienta byla sledována základní diagnóza, věk a pohlaví, příjmové APACHE II skóre a orgánová dysfunkce; 3. a 5. den byla hodnocena metodikou SOFA délka hospitalizace ve dnech, přežití či úmrtí, z ukazatelů zánětu C-reaktivní protein a počet leukocytů. Analýza byla provedena na sekvenátoru (ABI Prism 377) s užitím originální fenolové extrakční metody. Získané hodnoty plazmy pacientů byly porovnávány s normou získanou z plazmy 86 zdravých dobrovolníků (norma aDNA a gDNA = 100%).

Výsledky: Hladina volné aDNA po zátěži ovlivňuje celkovou hladinu volné DNA zásadním způsobem. Její navýšení v hodnotě mediánu je 16,3násobně vyšší než u gDNA. V trendu dalších 4 dnů vykazovala v celé hodnocené skupině snížení hladin, gDNA naopak zvýšení. Rozdíl v průběhu trendů i obě kvality DNA hodnocené proti normě byly na hladině statistické významnosti $p < 0,001$. Byly zjištěny statisticky významná korelace mezi hladinou aDNA v době přijetí a mortalitou nemocných.

Závěr: U kriticky nemocných dochází bezprostředně po inzultu k výraznému zvýšení volné aDNA v plazmě, která je v dalším průběhu i ukazatelem přežití nemocných ($p < 0,05$).

Klíčová slova: volná plazmatická DNA – apoptotická DNA – genomická DNA – intenzivní péče – prognostika v intenzivní péči

Abstract

Prognostic significance of apoptotic and genomic plasma free DNA levels in critically ill patients

Objective: To establish the trends and prognostic value of plasma levels of the free apoptotic (aDNA) and genomic DNA (gDNA) in patients with failure of vital functions.

Type of study: Prospective observational study.

Setting: University Dept. of Anaesthesiology/CCM and Dept. of Surgery, Charles University, 3rd School of Medicine, Prague.

Material and Methods : 94 critically ill patients were evaluated. The blood samples for DNA analysis were taken on the day of admission, the third and fifth day of hospital stay. The following data were collected: ICU admission diagnosis, age and gender, APACHE II, SOFA, ICU stay in days, ICU survival, CRP and WBC count. The analysis was done on a sequencer (ABI PRISM 377) using of the original phenol extraction method. The results were correlated to the plasma free DNA levels of 86 healthy volunteers (normal value = 100%).

Results: The contribution of aDNA to the total plasma DNA in the critically ill was ~16fold greater than the contribution of gDNA. Apoptotic DNA levels were highest on the day of admission and declined thereafter ($P < 0.001$), whilst the opposite was true for gDNA ($P < 0.001$). The difference in trends and the aDNA and gDNA levels in correlation to normal levels was found statistically significant ($P < 0.001$). Apoptotic DNA on the day of admission significantly differs in survivors and non-survivors ($P < 0.05$).

Conclusion: The free apoptotic DNA plasma level on admission could be a predictor of mortality in critical illness.

Key words: plasma free DNA – apoptotic DNA – genomic DNA – critical care – predictors of mortality

Anest. intenziv. Med., 16, 2005, č. 4, s. 191–196.

Fenomén přítomnosti volné DNA (vDNA) v lidské plazmě je znám od roku 1948 [1]. Soustavná pozornost však byla tomuto jevu věnována až od 70. a především od 90. let minulého století, vždy díky metodickému průlomů zjednodušení a zpřesnění práce s DNA.

Prudce stoupající počet publikovaných prací s tematikou vDNA a mRNA v plazmě potvrzuje, že jde o velmi perspektivní parametry v klinickém monitorování a prognostice [2, 3, 4]. V klinické oblasti je pozornost zaměřena na význam volných nukleových kyselin v plazmě pro diagnostiku nádorových onemocnění, prenatální diagnostiku v porodnictví a autoimunní choroby v interním lékařství. V posledních letech byly publikovány práce zaměřené na oblast závažných poranění a intenzivní péče [5, 6, 7, 8]. Cílem studie, při které byl použit originální postup fenolové extrakční metody vyvinuté jako součást řešení projektu, bylo stanovit trendy a potenciální prognostický význam změn apoptotické a nekrotické DNA u pacientů, kde inzult různého charakteru vedl k selhávání vitálních funkcí.

Soubor pacientů a metoda

Po schválení protokolu studie Etickou komisí 3. LF UK bylo do prospektivní studie v roce 2003 zařazeno 94 kriticky nemocných pacientů indikovaných k resuscitační péči. Kritériem pro zařazení pacienta bylo selhávání jedné nebo více vitálních funkcí v době přijetí na resuscitační oddělení. Vzorky krve k analýze byly odebírány v den přijetí (den 1 – vzorek I) a potom 3. a 5. den hospitalizace na resuscitačním oddělení (vzorek II a vzorek III). Do studie nebyli zařazeni pacienti, kteří v době příjmu byli hodnoceni jako moribundní. U každého nemocného byla sledována základní diagnóza, věk a pohlaví. Bylo stanoveno příjmové APACHE II skóre. Systémová dysfunkce 3. a 5. den byla hodnocena metodikou SOFA [9]. Dále byla sledována délka hospitalizace na resuscitačním oddělení ve dnech a přežití či úmrtí, z ukazatelů zánětu to byly: C-reaktivní protein a počet leukocytů.

Odběrem z centrálního žilního katétru bylo zajištěno 2,7 ml krve do odběrových stříkaček (Sarstedt Monovette EDTA K) s obsahem 1,6 mg EDTA jako antikoagulantů. Krev byla dále centrifugována při 1000 g/5 minut a pokojové teplotě. Po ukončení centrifugace byla plazma odebrána pipetou do Eppendorfových zkumavek a zamražena na -40 °C do provedení analýzy.

Při analýze byla plazma rozmrazena a 150 mikrolitrů bylo centrifugováno při 24 000g (18 000 ot./min na centrifuze Heraeus M3) po dobu 5 minut. Šedesát mikrolitrů plazmy bylo smíšeno se 40 mikrolitry směsi fenol/CHCl₃/2-butanol (4 : 1 : 1) a směs pečlivě pro-

míšena. Deset mikrolitrů centrifugovaného produktu bylo dále smíšeno s 1 mikrolitrem zředěného SYBR Green roztoku (1 : 5000) a 1 mikrolitrem 40% dextranové modři a dobře promíšeno. Poté byla směs nanesena na 12centimetrový plátový 8% agarózový gel o tloušťce 0,5 mm. Elektroforéza (sekvenátor ABI Prism 377) v TBE pufru běžela 2 hodiny při voltáži 1000 V a teplotě udržované vodním chladicím okruhem při 25 °C. Čtení výsledků bylo prováděno ve fluorescenčním okně 550 nm.

Hodnoty hladin aDNA a gDNA z plazmy pacientů byly vyjádřeny v procentech oproti normě. Norma byla získána určením průměru hladin aDNA a gDNA ve vlastním souboru 86 zdravých dobrovolníků a byla ji přiřazena hodnota 100 %. Průměrná hladina aDNA v souboru zdravých kontrol byla tedy 100%, SD = 8 %. Obdobně u gDNA byla u kontrol průměrná hladina 100%, SD = 18 %. Hladiny DNA 1. den byly označeny číslicí I, 3. den číslicí II a 5. den číslicí III. Konkrétně tedy aDNA I je hladina apoptotické DNA 1. den, tzn. při příjmu, gDNAII je hladina genomické DNA 3. den atd. Získaná data byla zpracována programem Statistica 6.0. Výsledky jsou udány jako medián s rozptylem od 25. do 75. percentilu. K vyjádření statistické významnosti byly užity následující testy: Mannův-Whitneyův U-test (dále MW test), ANOVA test a Fischerův LSD (Least Significant Difference) post hoc test (dále FLSD). Pro podrobnější analýzu výsledků, tedy zjištění signifikantnosti rozdílů uvnitř a mezi porovnávanými skupinami, byl použit test ANOVA. Při analýze korelace dvou skupin byl použit Spearmanův korelační koeficient. Jako statisticky významný označujeme výsledek, u kterého byla dosažena (použitím daného statistického testu, viz výše) hladina statistické významnosti $p < 0,05$.

Výsledky

Do studie bylo zařazeno 94 pacientů, z toho 61 mužů a 33 žen, s průměrným věkem 51,6 (SD 20,9). V hodnoceném souboru bylo 30 pacientů s primárně interním onemocněním, 47 pacientů bylo přijato pro těžké trauma (Injury Severity Score – ISS nad 16), 17 pacientů bylo zařazeno do skupiny chirurgických nemocných. U posledně uvedených šlo o pooperační stavy se selháváním vitálních funkcí vyžadující umělou plicní ventilaci a léčbu oběhové nedostatečnosti v podmínkách invazivního monitorování. Průměrná doba hospitalizace byla 13,1 dne, SD 13,6. Krátkodobá hospitalizace, tj. kratší než 7 dnů, byla zjištěna u 33 nemocných, dlouhodobá u 61 pacientů. Z resuscitačního oddělení bylo přeloženo 78 pacientů, u 15 byl průběh onemocnění smrtelný. Profil hodnot APACHE II při přijetí, hodnotu SOFA skóre 3. a 5. den, hodnoty zánětlivých ukazatelů (CRP) a celkový počet leukocytů uvádí tabulka 1.

Bylo zjištěno, že hladina volné apoptotické DNA je

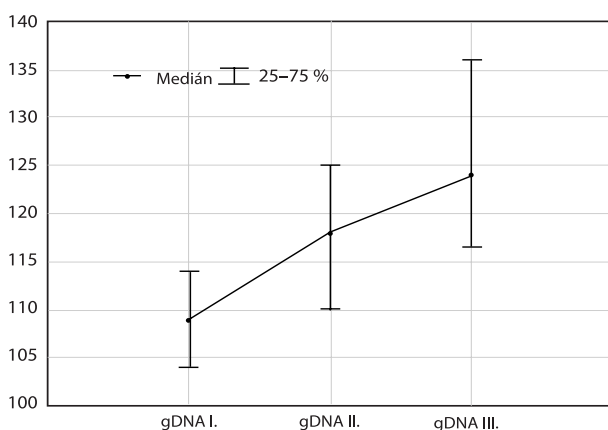
Tabulka 1. Snížení počtu jednotlivých sledovaných parametrů*

	Počet pacientů	Průměr	Směrodatná odchylka	Medián	25. percentil	75. percentil	Minimum	Maximum
APACHE II skóre	94	22,7	8,8	22,0	17,0	30,0	3,0	48,0
SOFA skóre 3. den	90	7,8	3,6	8,0	6,0	10,0	0,0	18,0
SOFA skóre 5. den	83	6,4	3,5	7,0	4,0	9,0	0,0	14,0
Hladina CRP 1. den [mg/l]	86	86,1	109,3	37,9	5,4	127,6	3,0	425,8
Hladina CRP 3. den [mg/l]	86	138,7	84,6	112,7	71,5	206,5	5,8	336,8
Hladina CRP 5. den [mg/l]	79	118,9	77,5	103,6	54,0	186,2	4,8	290,0
Počet leukocytů 1. den [$1 \cdot 10^9/l$]	94	15,4	7,9	15,2	10,9	20,2	0,3	49,6
Počet leukocytů 3. den [$1 \cdot 10^9/l$]	88	12,9	5,5	12,1	9,5	15,9	1,0	27,9
Počet leukocytů 5. den [$1 \cdot 10^9/l$]	81	11,4	5,3	10,6	7,8	14,2	0,1	29,4

*Je způsobeno časným fatálním průběhem onemocnění u některých nemocných.

v hodnotě mediánu 16,3násobně vyšší než hladina genomické DNA. Ve sledovaném období dalších 4 dnů vykazovala v celé hodnocené skupině aDNA snižování hladin, gDNA naopak zvyšování. Rozdíl v prů-

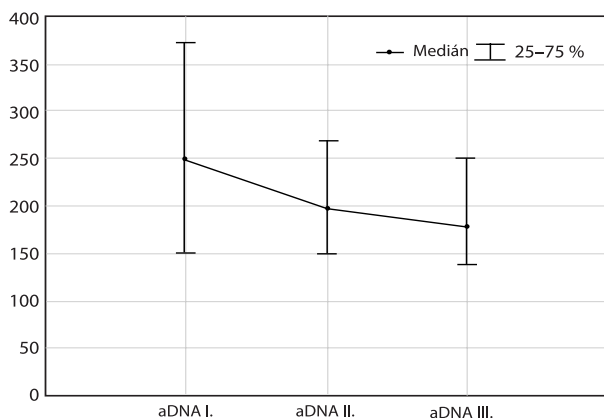
běhu trendů i obě kvality DNA hodnocené proti normě byly na hladině statistické významnosti $p < 0,001$. Zjištěnou dynamiku gDNA a aDNA dokumentují grafy 1 a 2. Elektroforetický obraz u konkrétního vzorku zachycuje obrázek 1.



Graf 1. Hladiny gDNA 1., 3., a 5. den v procentech oproti normě, medián normy = 100 %

Hladiny jsou statisticky významně vyšší v obou skupinách a ve všech dnech oproti normě: $p < 0,001$ (MW test).

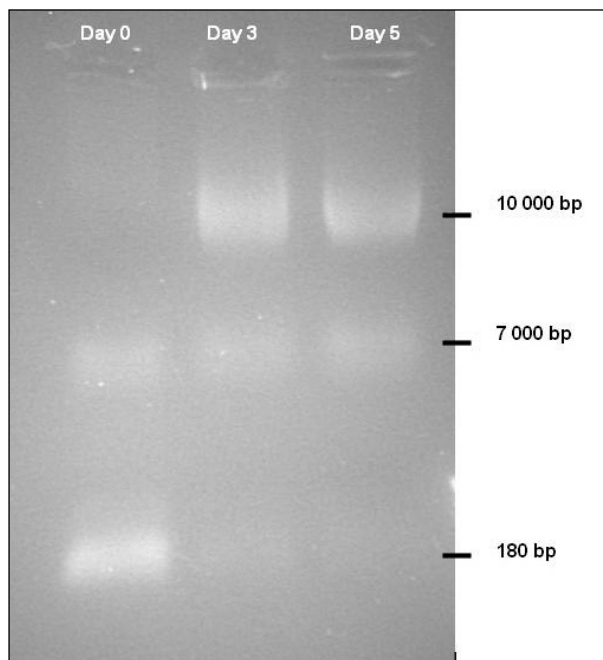
Dynamika: hladiny se liší uvnitř skupin i mezi skupinami $p < 0,05$ až $< 0,001$ (ANOVA, Fischer LSD post hoc test), mimo hladin aDNAII a aDNAIII.



Graf 2. Hladiny gDNA 1., 3., a 5. den v procentech oproti normě, medián normy = 100 %

Hladiny jsou statisticky významně vyšší v obou skupinách a ve všech dnech oproti normě: $p < 0,001$ (MW test).

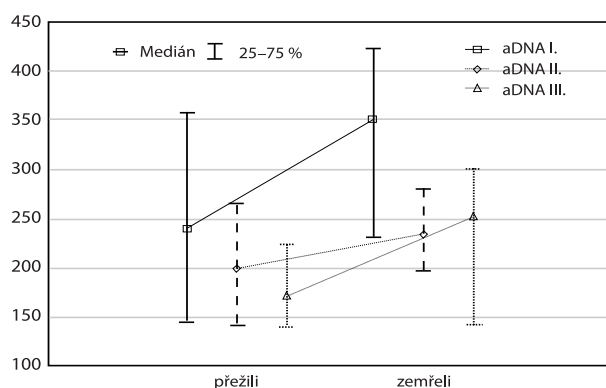
Dynamika: hladiny se liší uvnitř skupin i mezi skupinami $p < 0,05$ až $< 0,001$ (ANOVA, Fischer LSD post hoc test), mimo hladin aDNAII a aDNAIII.



Obr. 1. Typický záznam volné DNA v plazmě u kriticky nemocných. Genomické DNA odpovídají pruhy okolo 10 000 bazických párů. Jejich intenzita narůstá oproti pruhům odpovídající apoptotické DNA.

Dále byl testován rozdíl hladin aDNA a gDNA v jednotlivých podskupinách (podle základní diagnózy, zemřeli/přežili, krátká/dlouhá hospitalizace) a vztah hladin DNA k zánětlivým ukazatelům a hodnotám skórovacích systémů. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl u hladiny aDNA v době přijetí (aDNAI) a mortalitou nemocných ($p < 0,05$, MW test) – graf 3.

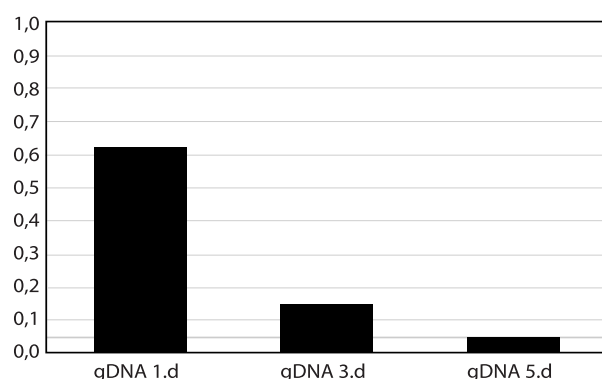
Byla nalezena slabá, přesto však signifikantní korelace mezi hladinou apoptotické DNA při přijetí a 3. den (aDNAI, aDNAII), hodnotou SOFA skóre 3. den ($p < 0,05$, $r^2 = 0,05$, Spearman $r = 0,22$) a korelace mezi hladinou genomické DNA 3. den (gDNAII) a APACHE II skóre při přijetí ($p = 0,01$, $r^2 = 0,08$, Spearman $r = -0,28$).



Graf 3. Hladiny aDNA 1., 3., a 5. den v procentech oproti normě, medián normy = 100 %
Hladina aDNA v 5denním intervalu u pacientů přeživších vs zemřelí.
Přes velký rozptyl hodnot v obou skupinách, je možné identifikovat z dynamiky apoptotické DNA rizikovou skupinu nemocných s hodnotami apoptotické DNA nad 350 % normy.

Po samostatném vyhodnocení skupin pacientů se závažným poraněním a pacientů s interní diagnózou byly zjištěny následující statisticky signifikantní korelace:

1. U traumatologických nemocných byla zachycena korelace mezi hladinami genomické DNA 5. den (gDNAIII) a APACHE II skóre při přijetí ($p < 0,05$, $r^2 = 0,14$, Spearman $r = 0,37$). Byl prokázán trvalý vzestup statistické významnosti tak, jak je dokumentováno na grafu 4.



Graf 4. Hladina statistické významnosti (p) pro závislost hladin gDNA na vstupních APACHE II skóre
Nárůst statistické významnosti hladin genomické DNA k APACHE II skóre ve sledovaném období pěti dnů u pacientů postižených závažným traumatem

2. U pacientů s interním onemocněním byla prokázána korelace mezi hladinou genomické DNA 5. den (gDNAIII) a hladinou CRP při přijetí ($p < 0,05$, $r^2 = 0,11$, Spearman $r = 0,33$) a dále apoptotickou DNA 5. den (gDNAIII) a leukocytózou 3. den ($p < 0,05$, $r^2 = 0,14$, Spearman $r = 0,37$).

3. Vyhodnocením součtu apoptotické a genomické DNA ve vztahu k dalším sledovaným parametrům byla nalezena statisticky významná korelace mezi jeho hodnotami 5. den (aDNAIII + gDNAIII) a leukocytózou 3. a 5. den ($p < 0,05$, $r^2 = 0,13$; Spearman $r = 0,36$ a $p < 0,05$, $r^2 = 0,13$; Spearman $r = 0,35$). Jako hraniční lze označit korelaci mezi genomickou DNA

při přijetí (gDNA I) a hodnotou CRP týž den ($p = 0,05$, $r^2 = 0,11$; Spearman $r = 0,33$).

Diskuse

Odborné publikace zaměřené na studium volných plazmatických nukleových kyselin užívají bez výjimky metodu polymerázové řetězové reakce monitorované v reálném čase (rt PCR). Jeden rys těchto prací je však zarážející: velké rozdíly v hodnotách naměřených na různých laboratorních pracovištích, ale také velký rozptyl hodnot ze stejného experimentu. Odborníci se shodují v tom, že příčinou tohoto jevu je použitá metoda kvantifikace. Potíže v experimentálním uspořádání testů naznačují, že tato metoda není pro klinické použití příliš vhodná. Nepříznivě působí i to, že PCR měření v reálném čase neumožňuje jednoduše a klinicky využitelně rozlišit nízkomolekulární (apoptotickou) a vysokomolekulární (nekrotickou a bakteriální) frakci DNA. Toto je zřejmě hlavní důvod, proč do dnešní doby neexistuje v odborné literatuře o těchto uvedených kvalitách volné DNA žádná informace. V průběhu řešení projektu byly testovány různé metody stanovení, zvláště potom přímá měřicí metoda s použitím ethidium bromidu k vizualizaci na přístroji LS50B, dále potom SDS extrakční metoda využívající laurylsíran sodný (SDS = sodium dodecylsulphate) a fenolová extrakční metoda. Teprve poslední uvedený postup v kombinaci s agarovou elektroforézou na sekvenátoru ABI Prism 377 nám zajistil standardně údaje o obou kvalitách DNA.

Plazmatická koncentrace DNA měřená metodou real-time PCR je zvýšena již 20 minut po traumatu a její koncentrace dobře koreluje se závažností i prognózou onemocnění [6]. Byla prokázána vhodnost sledování parametru vDNA jako ukazatele rizika vzniku závažných orgánových komplikací a úmrtí po traumatu, stejně tak i rozdílná dynamika změn v krátkodobém i dlouhodobém sledování [10]. Po úvodních publikacích zaměřených na oblast traumatologie bylo zjištěno, že podobný prognostický význam mají hladiny vDNA u pacientů s ischemickou či hemoragickou mozkovou příhodou [5]. První práce směřovaná do oblasti intenzivní péče významně rozšířila pole využitelnosti tohoto fenoménu [8]. Potvrdila statisticky významnou korelaci vDNA s hladinou C-reaktivního proteinu a hodnotou skórovacího systému orgánové dysfunkce SOFA. Pozoruhodné bylo i zjištění, že nemocní indikovaní k umělé plicní ventilaci měli signifikantně vyšší hladiny vDNA, stejně tak i ti nemocní, kteří nakonec zemřeli. K podobným nálezům jsme dospěli i v naší studii, navíc jsme prokázali korelaci s hodnotou APACHE II pro hladiny genomické DNA. Zvýšené plazmatické hladiny DNA lze vysvětlit rozsahem primárního poškození tkání, které způsobuje jednak rychlejší vyplavování DNA, jednak její snížená clearance.

Ve všech uvedených studiích však použitá metoda (rt PCR) neumožňovala rozlišit mezi DNA uvolněnou v procesu apoptózy a nekrózy. Naše studie se jako

vůbec první zabývá touto problematikou. Přitom rozlišení kvality vDNA může být zvláště u kriticky nemocných pro hodnocení stavu velmi podstatné. Apoptóza (programovaná buněčná smrt), proces objevený Kerrem v r. 1972, byla tradičně prezentována jako víceméně fyziologický proces sloužící v morfogenezi tkání. Později byla objevena její úloha při odúmrti buněk po nezvratném poškození DNA, u nádorů nebo u atrofie orgánů [11]. Je známo, že apoptóza je spouštěna dvěma mechanismy:

1. Vazbou ligandu (např. TNF- α) na receptor z rodiny Fas proteinů (zvaných též „receptory s doménou smrti“), který spouští kaskádu dějů vedoucích v konečné fázi k aktivaci kaspázy, intracelulární proteázy. Ta zahájí proces buněčné smrti.

2. Intrinsickou cestou, která je nezávislá na signálech z okolí buňky. U tohoto způsobu se ještě rozlišují cesty závislé a nezávislé na aktivaci kaspáz. Apoptóza je spouštěna při těžkém buněčném poškození, např. fragmenty DNA uniklými z jádra či cytochromem C uniklým z poškozených mitochondrií.

V této souvislosti je třeba se zmínit i o další studii zaměřené na ochranný vliv normální hodnoty glykémie na ultrastrukturu mitochondrií hepatocytů u kriticky nemocných. Právě nález hypertrofických mitochondrií a poškozených krist s průkazem snížené aktivity komplexu respiračního řetězce představuje situaci, kdy dochází ke zmíněné aktivaci apoptózy pravděpodobně ovlivňující i hladiny vNK [12]. U kriticky nemocných je známo, že apoptóza je proces částečně zodpovědný za poškození tkání, zejména sekundární lézi. Byla zkoumána u imunokompetentních buněk ve vztahu k SIRS/CARS [13] a u pneumocytů ve vztahu k rozvoji ARDS [11, 14]. Data pocházejí zejména ze studií na zvířatech. Tak např. umělá plicní ventilace vedla u potkanů ke zvýšení Fas-mediované apoptózy [15], jiná práce přinesla histologický průkaz apoptózy endotelií mediovaný faktorem zřejmě tvořeným v ischemizovaném střevě u potkanů po 3 hodinách trvajícím hemoragickém šoku [16]. Jiní výsledky potvrdili v experimentu *in vitro* a prokázali, že se na apoptóze podílejí mechanismy závislé i nezávislé na kaspázách [17]. Liener morfologickými i imunochemickými metodami prokázal zvýšení kaspázami mediované apoptózy pneumocytů za 6 hodin po tupém traumatu hrudníku u potkana [13]. S výjimkou jedné kazuistiky, demonstrující masivní apoptózu hepatocytů u mladého muže za 2,5 hodiny po průstřelu břicha [18], je naše práce první, která v humánní studii prokazuje, že apoptóza je děj, který se již v nejranějších fázích kritického onemocnění významně podílí na uvolnění DNA. Vztah mezi zátěžovou reakcí a volnou apoptotickou DNA v plazmě však ve světové literatuře zatím nebyl studován a popsán.

Použitý protokol je zaměřen na 94člennou skupinu nemocných indikovaných k resuscitační péči a pokrývá období 5 dnů od selhání jedné či více vitálních funkcí. Je tedy pojat podobně jako studie Wijeratnesova [8]. Stejně jako ve studiích předešlých jsme zjistili, že hladina volných nukleových kyselin koreluje s prognózou

nemocných, v našem případě pouze s hladinou apoptotické DNA v době příjmu. Ze zjištěné dynamiky je také zřetelné, že v podmínkách resuscitační péče hladina apoptotické DNA klesá, naopak hladina genomické DNA stoupá. Nelze přesně říci, do jaké míry se na tomto vzestupu podílejí metody resuscitační péče, zvláště umělá plicní ventilace [8]. Za důležitou však považujeme skutečnost, že popsaná dynamika trendů jednotlivých kvalit DNA má zřejmě obecnou platnost a pokrývá celé spektrum kriticky nemocných, a to jak pacienty traumatologické, tak pacienty s klasicky interní diagnózou. Zatímco inzult bezprostředně po zátěži vede k navýšení aDNA a následně zpravidla k jejímu poklesu, hladina nekrotické DNA v čase narůstá. Postupný vzestup nekrotické DNA lze vysvětlit narůstající aktivací systémové zánětlivé reakce organismu na zátěž, se vztahem k orgánové dysfunkci a hodnocené skórováním SOFA. Vzhledem k tomu, že u našich nemocných byly v konkrétních případech zachyceny vysoké hladiny apoptotické DNA již asi do 15–30 minut po inzultu, lze předpokládat, že apoptóza byla spuštěna intrinsickou cestou, obcházející Fas receptory. Fakt, že apoptotická DNA 1. den nekoreluje s APACHE II skóre ale s mortalitou, by mohlo znamenat, že apoptóza provází nějaký patofyziologický děj, který se později nepříznivě prognosticky projeví. Přestože trendy chování obou volných nukleových kyselin jsou popsány na obr. 1 a 2, na jednotlivých případech můžeme demonstrovat pokles nekrotické DNA nebo i opačný trend volných nukleových kyselin apoptotického charakteru. Vůbec nejvyšší hladinu apoptotické DNA jsme zachytili u pacientky s kraniocerebrálním poraněním (785 %) s poměrně rychlým poklesem v druhém odběru na 175%, ve třetím byla zachycena hodnota 199 %. Paralelně k tomu stanovená genomická DNA byla zachycena v dynamice 99–110–120 procent. Ve skupině pacientů s interní diagnózou byla nejvyšší apoptotická DNA zjištěna u nemocné po zástavě oběhu s diagnózou akutního infarktu myokardu a nemocí tří tepen. Zachycená dynamika apoptotické DNA byla 624–390–175 %, paralelně genomická vDNA v době začátku resuscitační péče byla nejvyšší a dále potom klesala (144–125–124 %). Podobné hladiny byly zachyceny u septicky nemocné s endokarditidou a fatálním průběhem onemocnění (592–286–270), nekrotická DNA potom v dynamice 112–107–140 %. Překvapivě vysoké hladiny byly zjištěny u pacientky intoxikované alkoholem a antidepresivy. U ní dominovalo hlavně navýšení apoptotické vDNA (472–365–410 %), při mírném navýšení nekrotické DNA (110–114–108 %). Oproti tomu nekrotické postižení střeva u chirurgicky nemocné s nepříznivým průběhem bylo provázáno hladinami apoptotické DNA v dynamice 547–238–341 % a genomické DNA 110–121–156 %. U pacienta se smrtelným střelným poraněním mozku byla zachycena v době přijetí hladina 188 % apoptotické DNA, další den již 263 %, se vzestupem genomické DNA z 90 na 130 %. U několika hematologických onemocnění s agranulocytózou byla při septických komplikacích zachycena extrémně vysoká apoptotická DNA (782 a 501 %) s překvapivě nízkou genomickou DNA 112–108 %. Tato skutečnost by

mohla vysvětlit i původ dějů vedoucích k navýšení genomické DNA.

Při samostatné analýze skupin postižených traumatem či interním postižením byla nalezena řada statisticky významných korelací. Z diferencí lze usuzovat na rozdíly mezi skupinami nemocných po traumatu, tedy bezprostředně po inzultu, a skupinou pacientů, kteří jsou v lůžkovém zařízení léčení delší dobu. U traumatologické skupiny byla prokázána korelace mezi hodnotou APACHE II a hladinou genomické DNA 5. den po přijetí. Tento náález lze interpretovat tak, že vzestup genomické DNA souvisí s nástupem zánětlivé reakce. Je přitom pozoruhodné, že u apoptotické DNA je korelace na hranici statistické významnosti již 3. den ($p = 0,073$), v dalším odběru 5. den je již na hladině $p = 0,8$. To by mohlo souviset s tím, že u pacientů s vysokým APACHE II skóre, tedy větší zátěží v době přijetí, přetrvávají i vyšší hladiny apoptotické DNA do 3. dne od přijetí. Ve skupině pacientů s interním onemocněním byla nalezena celá řada korelací se sledovanými zánětlivými ukazateli. Nebyla však prokázána korelace s hodnotou APACHE II.

Nalézt konkrétní korelace k orgánovým postižením bude vyžadovat rozšíření počtu sledovaných subjektů, analýzu statisticky hodnotitelných podskupin orgánových postižení či systémů a také dlouhodobější sledování trendů volné DNA. Předpokládáme, že právě toto sledování bude odrážet rozvoj orgánových dysfunkcí či selhání, naopak potom i příznivý průběh onemocnění.

Závěr

Změny hladin apoptotické a genomické DNA v prvních dnech po závažné zátěžové situaci přináší nový pohled na stresovou reakci, zvláště potom aktivaci apoptotických a nekrotických dějů. Dynamika změn koreluje se současně užívanými skórovacími systémy i zánětlivými ukazateli, má tedy prognostický význam a je v klinické praxi použitelná. Předpokládáme, že další studium tohoto jevu by mělo odpovědět především na otázky orgánového původu volné DNA.

Literatura

1. Mandel, P., Metais, P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 142, p. 241–243.
2. Anker, P. et al. Circulating nucleic acids in plasma or serum. *Clin. Chim. Acta*, 2001, 313, p. 143–146.
3. Wu, T. L. et al. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin. Chim. Acta*, 2002, 321, p. 77–87.
4. Taback, B., Hoon, D. S. Circulating nucleic acids and proteomics of plasma/serum: clinical utility. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 2004, Jun, 1022, p. 1–8.
5. Rainer, T. H. et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin. Chem.*, 2003, 49, p. 562–569.
6. Lo, Y. M. D. et al. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin. Chem.*, 2000, 46, p. 319–323.
7. Rainer, T. H. Plasma DNA, prediction and post-traumatic complications. *Clin. Chim. Acta*, 2001, 313, p. 81–85.
8. Wijeratne, X. Y. et al. Cell-Free Plasma DNA as a Prognostic Marker in Intensive Treatment Unit Patients. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2004, 1022, p. 232–238.
9. Vincent, J. L. et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Med.*, 1996, 22, p. 707–710.
10. Lam, N. Y., Rainer, T. H., Chiu, R. W., Joynt, G. M., Lo, Y. M. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin. Chem.*, 2003, 49, 8, p. 1286–1291.
11. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. Apoptosis. In Kumar V. (ed.) *Robins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th ed., Philadelphia : Elsevier 1999, p. 26–45.
12. Vanhorebeek, I., De Vos, R., Messoten, D., Wouters, P. J., De Wolf-Peeters, Ch., Berghe, B. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose controle with insulin in critically ill patients. *Lancet*, 2005, 365, 9453, p. 53–59.
13. Liener, U. C., Knoferl, M. W., Strater, J. et al. Induction of apoptosis following blunt chest trauma. *Shock*, 2003, 20, 6, p. 511–516.
14. Liu, R., Li, S. D., Min, J. X., Xiao, N., Jiang, Q. S., Tian, K. L., Diao, Y. F. PMN apoptosis and its relationship with the lung injury after chest impact trauma. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2004, 117, 6, p. 888–892.
15. Imai, Y., Parodo, J., Kajikawa, O., de Perrot, M., Fischer, S. et al. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA*, 2003, 289, 16, p. 2104–2112.
16. Lu, Q., Xu, D. Z., Davidson, M. T., Hasko, G., Deitch, E. A. Hemorrhagic shock induces endothelial cell apoptosis, which is mediated by factors contained in mesenteric lymph. *Crit. Care Med.*, 2004, 12, p. 2464–2470.
17. Davidson, M. T., Deitch, E. A., Lu, Q., Hasko, G., Abungu, B. et al. Trauma-hemorrhagic shock mesenteric lymph induces endothelial apoptosis that involves both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Ann. Surg.*, 2004, 240, 1, p. 123–131.
18. Schmieg, R. E., Jr, Tinsley, K. W., Swanson, P. E., Karl, I. E., Aft, R. et al. Rapid onset of hepatocyte apoptosis in a patient with trauma. *J. Trauma*, 2000, 49, 3, p. 542–546.

Studie vznikla za podpory projektu grantovou agenturou MZd IGA 7177-3.

Poděkování: Děkujeme týmu lékařů a sester KAR FN Královské Vinohrady, bez jejichž osobního nasazení by projekt nemohl být realizován, a stejně tak i oponentům práce, kteří přispěli k významnému zlepšení kvality publikace. Zvláštní dík patří i prim. MUDr. Ivanu Heroldovi, CSc., vedoucímu redaktorovi časopisu Anesteziologie a intenzivní medicína.

Došlo 28. 2. 2005.

Přijato 7. 5. 2005.

Adresa pro korespondenci:
Doc. MUDr. Jan Páchl, CSc.
KAR FNKV
Šrobárova 50
100 34 Praha 10
e-mail: pachi@fnkv.cz