

MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA

**Morfologické a funkční aspekty rozvoje
neurogenního plicního edému**

Habilitační práce
(komentovaný soubor prací)

MDDr. MUDr. Jiří Šedý, Ph.D., MBA, FICD

Ústav normální anatomie LF Univerzity Palackého v Olomouci

2018

PROHLÁŠENÍ

Habilitační práce je předložena ve formě komentovaného souboru 13 souvisejících publikací. Autor zde prezentuje výsledky systematického výzkumu problematiky etiopatogeneze neurogenního plicního edému, kterým se zabývala vědecká skupina vedená autorem v letech 2005–2015. Autor samostatně vytvořil experimentální model neurogenního plicního edému a postupně vedl a s kolegy aktivně prováděl všechny studie týkající se této problematiky, o čemž svědčí i skutečnost, že je u všech publikací na toto téma prvním autorem a u velké části z nich i autorem korespondujícím. Kromě toho publikoval v domácím tisku na toto téma přehledový článek a monografii, kde je jediným autorem. Autor se v průběhu profesní dráhy zabýval i řadou dalších témat, jejich detailní popis však překračuje zaměření této práce, proto je v závěru práce uveden pouze přehled publikačních výstupů a ocenění, které byly završením těchto projektů (viz dále).

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval všem svým učitelům a spolupracovníkům, kteří mě v celé mé práci trpělivě podporovali a bez nichž by nebylo možné těchto výsledků dosáhnout. Jmenovitě bych rád poděkoval prof. MUDr. Miloši Grimovi, DrSc. za uvedení do fascinujícího světa vědy, prof. Janu Kučerovi, M.D., Ph.D., za tvrdý ale neskonale přínosný výcvik v systematické experimentální práci, prof. MUDr. Evě Sykové, DrSc. za odborné vedení v průběhu Ph.D. studia, MUDr. Josefu Zichovi, DrSc. a RNDr. Jaroslavu Kunešovi, DrSc. za spolupráci na projektech týkajících se neurogenního plicního edému, prof. MUDr. Svatoplukovi Adámkovi, CSc. za spolupráci na projektech týkajících se chirurgie příštítných tělísek, doc. MUDr. Ladislavovi Jarolímovi, CSc. za spolupráci na projektech týkajících se chirurgie pánevní oblasti, doc. MUDr. et MUDr. René Foltánovi, Ph.D., FEBOMFS za dlouholetou klinickou i vědeckou spolupráci v oblasti orální a maxilofaciální chirurgie a v neposlední řadě i doc. RNDr. Petru Mlejnkovi, Ph.D. za velkou podporu a možnost působit na Ústavu normální anatomie v Olomouci. Děkuji také spoluautorům všech publikací uvedených v této práci, kteří rovněž přispěli nemalým dílem a bez nichž by tato práce nemohla vzniknout. Na závěr bych rád poděkoval všem členům své rodiny, především za trpělivost, se kterou byli ochotni snášet mé absence u rodinného krbu či hledět večer co večer na má kulatá záda, skloněná nad monitorem.

GRANTOVÁ PODPORA

Tato práce byla podpořena následujícími grantovými projekty: AVOZ50390512, AVOZ50110509, 1M0538, LC554, GAČR309/06/1246, IGA MZ 1A8697-5, IGA MZ NR/8339-3, 1M0510, MSM 0021620806, GAČR 309/03/H095, MŠMT 2B06130, GA AV IAA500390902, AVOZ 503905703, National Science Foundation (NSF)- 0077922, EC FP6 project RESCUE (LSHB-CT-2005-518233), EC FP6 project STEMS LSBH-CT-2006-037328 a projekt UNCE 204021.

SEZNAM ZKRATEK

Angl. – anglicky

ALI – Acute Lung Injury, akutní plicní poškození (selhání)

ARDS – Adult Respiratory Distress Syndrome, syndrom akutní dechové tísně

ATP – adenosin trifosfát

AVČR – Akademie Věd České Republiky

BBB score – škála hodnocení neurologických funkcí u potkana s poškozenou míchou nazvaná podle prvních písmen příjmení autorů: Basso, D.M., Beattie M.S., and Bresnahan J.C. (Basso et al., 1995)

CNS – centrální nervový systém

CT – Computed Tomography, počítačová tomografie

DAD – diffuse alveolar damage, difuzní poškození alveolů

DNA – Deoxyriboneukleová kyselina

FLASH – Fast Low Angle Shot

FOV – field of view, zorné pole

i.m. – intramuskulárně, do svalu

inh. – inhalační

i.p. – intraperitoneálně

i.v. – intravenózně, nitrožilně

MR – Magnetická Rezonance

MRI – Magnetic Resonance Imaging, Magnetická rezonance

NPE – neurogenní plicní edém

pCO₂ – parciální tlak oxidu uhličitého

PEEP – Positive End Expiratory Pressure, přetlaková mechanická ventilace

P-index – plicní index

PNS – periferní nervový systém

pO₂ – parciální tlak kyslíku

RARE – Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement

RTG – Rentgen, Rentgenové vyšetření

s.c. – subkutánně, podkožně

SCI – Spinal Cord Injury, míšní poranění

S.E.M – Standard Error of Mean, směrodatná odchylka

SUDEP – sudden unexpected death in epilepsy

TE – echo time

TEM – Transverse Electro Magnetic

Th_{1, 2, 3...} – hrudní obratel 1, 2, 3 etc.

TR – repetition time

TrueFISP – True Fast Imaging with Steady-state free Precession

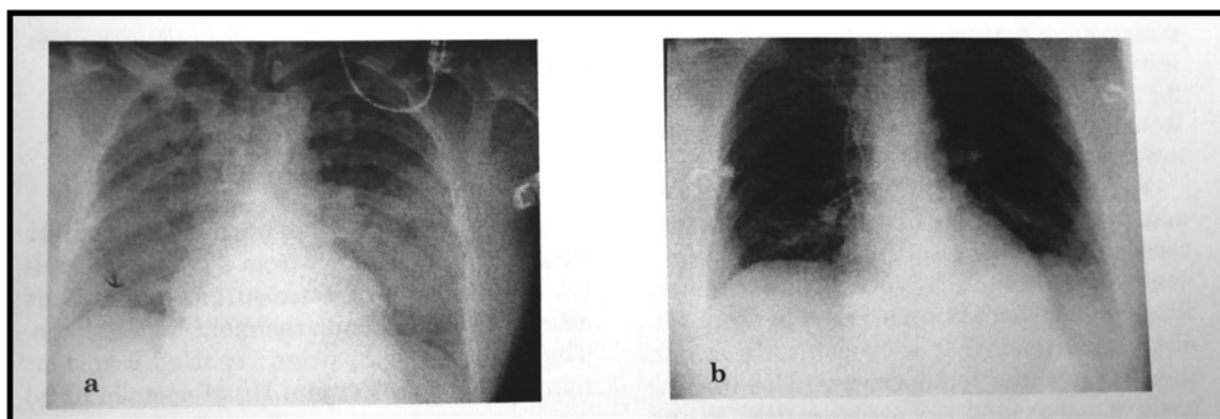
OBSAH

| | |
|-----------------------------------|-----|
| 1. Úvod..... | 5 |
| 2. Cíle práce..... | 38 |
| 3. Metodické postupy..... | 39 |
| 4. Výsledky..... | 43 |
| 5. Všeobecná diskuse..... | 281 |
| 6. Závěry..... | 285 |
| 7. Shrnutí..... | 286 |
| 8. Summary..... | 287 |
| 9. Plány do budoucna..... | 288 |
| 10. Literatura..... | 289 |
| 11. Přehled publikací autora..... | 398 |
| 12. Udělená ocenění..... | 304 |

1 ÚVOD

Neurogenní plicní edém (hemoragický plicní edém, neurohemodynamický plicní edém; NPE) je definován jako akutně vzniklý intersticiální a/nebo intraalveolární otok (edém) plicní tkáně, který vzniká na základě předchozího poškození tkáně centrálního nervového systému (CNS) (Fontes et al., 2003) (obr. 1). Jako první popsal neurogenní plicní edém Shanahan již v roce 1908 jako komplikaci opakovaných epileptických záchvatů u 11 pacientů – byl to právě on, kdo vyslovil tezi o spojitosti těžkého poškození centrálního nervového systému se vznikem plicního edému a zároveň první, kdo použil pro tento edém název „neurogenní“ (Shanahan, 1908).

Neurogenní plicní edém vzniká řádově v minutách až hodinách po poranění. Vzhledem k jeho „neurogenní“ povaze jej řadíme k nekardiogenním (extrakardiálním) plicním edémům. Z hlediska mechanismu vzniku se však jedná o poměrně unikátní klinickou jednotku, neboť se zde synergicky uplatňují oba základní mechanismy vzniku plicního edému, jmenovitě vysoký tlak intravaskulární a intersticiální tekutiny společně se zvýšenou permeabilitou plicního parenchymu, které se u jiných typů edému vyskytují izolovaně (Colice, 1984). Kromě toho je zde hemoragická složka vyjádřena výrazně více, než u kteréhokoli jiného edému (viz dále). To je důvodem, proč nejsou jeho etiopatogeneze ani terapeutické přístupy, navzdory předchozímu výzkumu a řadě klinických zkušeností, stále objasněné.



Obr. 1 Závažný neurogenní plicní edém na předozadním RTG snímku hrudníku u pacienta se subarachnoidálním krvácením v okamžiku přijetí (vlevo) a po úspěšné terapii (vpravo). Podle Weiss a Meyer (2015).

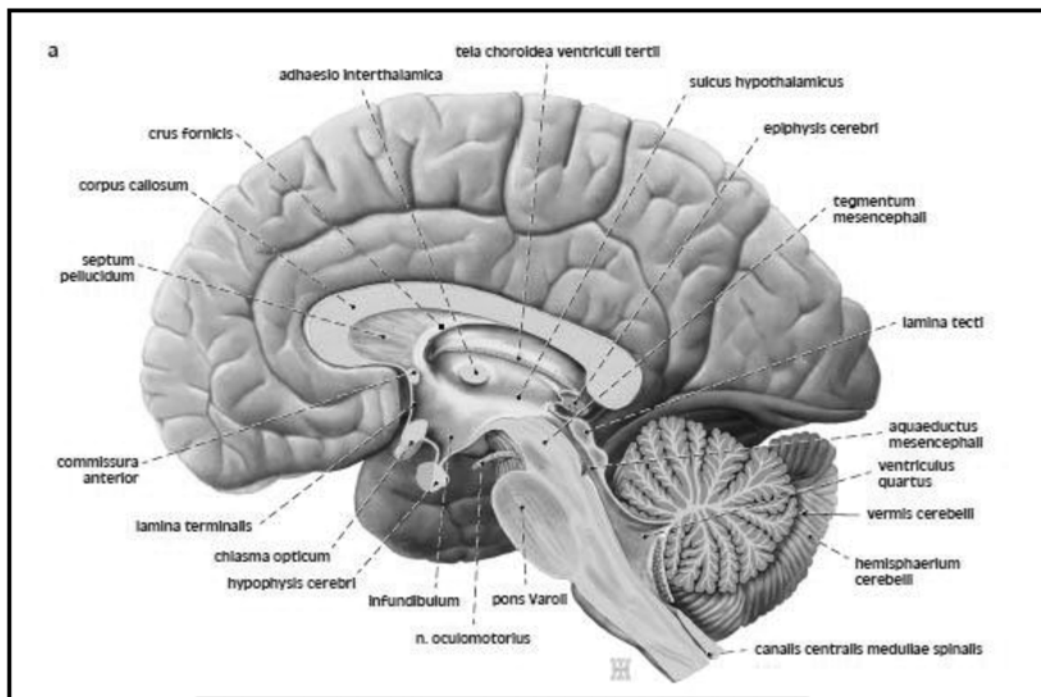
Není snad na světě klinická jednotka, jejíž epidemiologická data by vykazovala tak heterogenní výsledky jako právě neurogenní plicní edém. Podle různých klinických studií se vyskytuje v 1–71 % případů poškození centrálního nervového systému. Většina studií naštěstí naznačuje, že pravda bude zřejmě někde uprostřed, okolo 20–30 % pacientů s těžkým, náhle

vzniklým poškozením CNS. Nižší čísla jsou pravděpodobně zaviněna skutečností, že neurogenní plicní edém je u celé řady pacientů s poškozením CNS zamaskován jinými faktory, nebo je jeho význam v dané chvíli považován za druhořadý, vzhledem k často velmi těžkému celkovému klinickému stavu a nutnosti řešení důležitějších, akutně život ohrožujících stavů (akutní tepenné krvácení, počínající známky herniace mozkové tkáně apod.). Zvýšená čísla jsou pak pravděpodobně způsobena označením jakéhokoli plicního edému za neurogenní, což je opačný extrém. Mortalita neurogenního plicního edému se pohybuje okolo 10 %. Z epidemiologických údajů však není jasné, zda je toto poměrně vysoké číslo způsobeno skutečně edémem plic nebo původním, často velmi těžkým poškozením CNS. Neurogenní plicní edém postihuje kromě lidí také řadu živočišných druhů, je tedy rovněž neopominutelnou součástí veterinární medicíny (Bouyssou et al., 2017).

Velice rozporuplná epidemiologická data naznačují, že je tato jednotka spíše řazena mezi ostatní plicní edémy a není kladen důraz na její neurogenní původ. Neurogenní plicní edém bohužel klinický obraz ostatních plicních edémů pouze připomíná, jeho nebezpečí tkví ve výše zmíněných patofyziologických odlišnostech (viz dále), v jejichž důsledku je často klinický průběh výrazně proměnný a tedy i hůře předvídatelný, což může vést v klinické praxi k dramatickým, život ohrožujícím situacím.

1.1 FUNKČNÍ ANATOMIE NERVOVÉHO SYSTÉMU

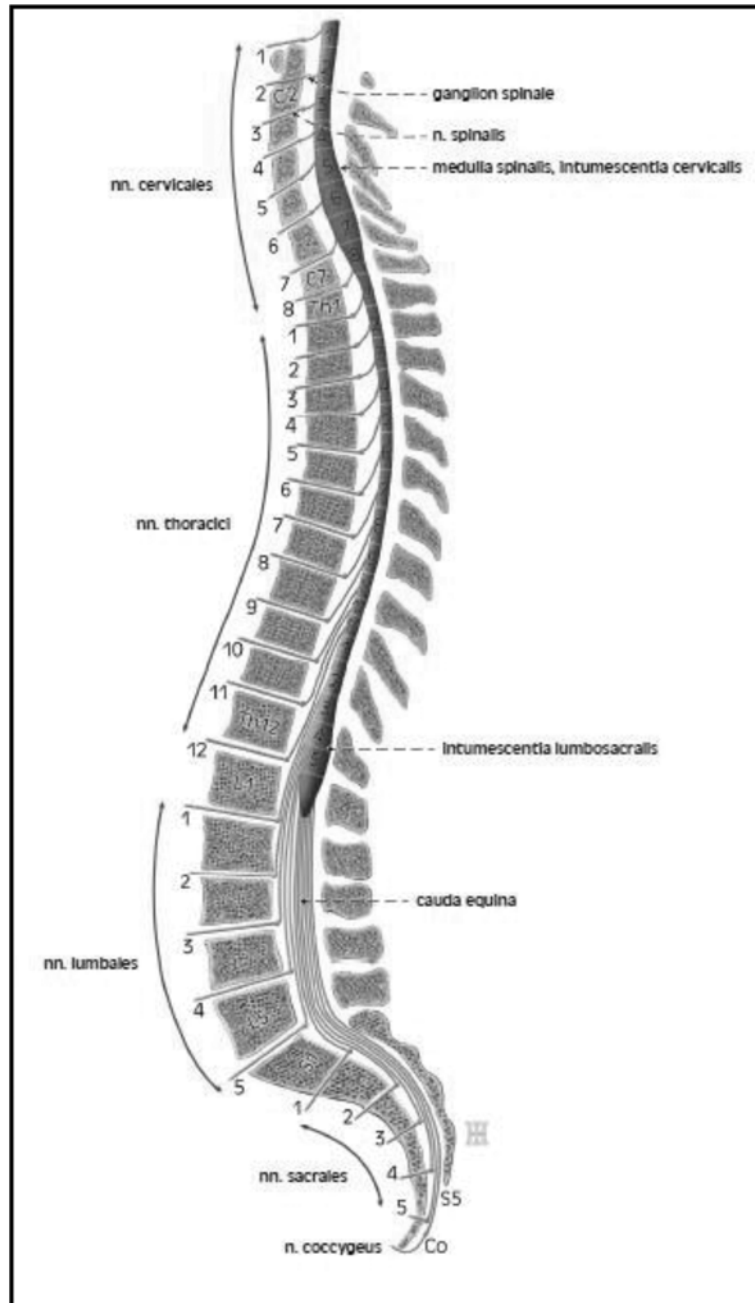
Nervový systém rozdělujeme na centrální nervový systém (*systema nervosum centrale*), a periferní nervový systém (*systema nervosum periphericum*). Centrální nervový systém tvoří soubor jader a drah, které makroskopicky vytvářejí mozek (lat. *cerebrum*; řec. *encephalon*), a míchu (*medulla spinalis*). Periferní nervový systém tvoří ganglia a nervy, které souborně vytvářejí systém hlavových nervů (*nervi craniales*), míšních nervů (*nervi spinales*), pletení – (*plexi*), ganglií (*ganglia*) a specializovaných zakončení buď dostředivého charakteru (receptory), nebo odstředivého charakteru (efektory). Shluk neuronů, šedou hmotu (*substantia grisea*), nazýváme v centrálním nervovém systému termínem jádro (*nucleus*), v periferním nervovém systému termínem uzel (*ganglion*). Skupiny výběžků, bílou hmotu (*substantia alba*), nazýváme v centrálním nervovém systému termínem dráha (*tractus nervosus*), v periferním nervovém systému termínem nerv (*nervus*). Periferní nervový systém rozdělujeme na část vůlí ovladatelnou neboli somatický nervový systém (*systema nervosum somaticum*), a část vůlí neovladatelnou neboli autonomní nervový systém (*systema nervosum autonomicum*).



Obr. 2 Lidský mozek na sagitálním řezu. Podle Grim et al. (2017).

Mozek (obr. 2) je soubor nervové tkáně uložené v lebeční dutině. Při vnějším pohledu jsou nápadné dvě pravolevě téměř symetrické poloviny (hemisféry), spojené pruhem bílé hmoty (*corpus callosum*). Mozek se skládá z koncového mozku (*telencephalon*), mezimozku (*diencephalon*), středního mozku (*mesencephalon*), Varolova mostu (*pons Varoli*), mozečku (*cerebellum*) a prodloužené míchy (*medulla oblongata seu bulbis*). *Telencephalon* se skládá z mozkové kůry (*pallium*), podkorových jader (bazální ganglia), a malé spojovací části vytvořené při ventrálním okraji *corpus callosum*, označované jako *septum*. Morfologicky rozlišujeme na mozkové kůře s typickou závitovou morfológií (*gyrifikací*) ventrálně uložený čelní lalok (*lobus frontalis*), kranálně uložený temenní lalok (*lobus parietalis*), dorzálně uložený týlní lalok (*lobus occipitalis*), laterálně uložený spánkový lalok (*lobus temporalis*), a mediálně uložený vkleslý okrsek (*lobus insularis; insula*). Střední mozek, Varolův most a prodloužená mícha tvoří souborně mozkový kmen (*truncus encephali*). Uvnitř mozku jsou uloženy čtyři mozkové komory (*ventriculi encephali*), vyplněné mozkomíšním mokem (likvor). Na povrchu je mozek kryt měkkou plenou (*pia mater*), pavučnicí (*arachnoidea mater*) a tvrdou plenou (*dura mater*). *Pia mater* přiléhá těsně na povrch mozku. Mezi *pia mater* a *arachnoidea* je vytvořen subarachnoidální prostor (*spatium subarachnoideum*), mezi *arachnoidea* a *dura mater* je vytvořen subdurální prostor (*spatium subdurale*). V subarachnoidálním prostoru cirkuluje likvor a hromadí se zde ve specifických cisternách (*cisternae cerebellomedullares*). Likvor je tvořen ultrafiltrací v cévních choroidálních pleteních uvnitř mozkových komor a vstřebává se do žilních splavů. *Dura mater* pevně srůstá s periostem vnitřní plochy kostí lebečního krytu. Duplikatury *dura mater* vytvářejí typické

žilní splavy (*sinus durae matris*), ve kterých proudí žilní krev. Mezi další významné duplikatury patří: mediánní duplikatura, vytvořená mezi hemisférami velkého mozku (*falx cerebri*), řasa tvrdé pleny oddělující mozeček od velkého mozku (*tentorium cerebelli*) a některé další.

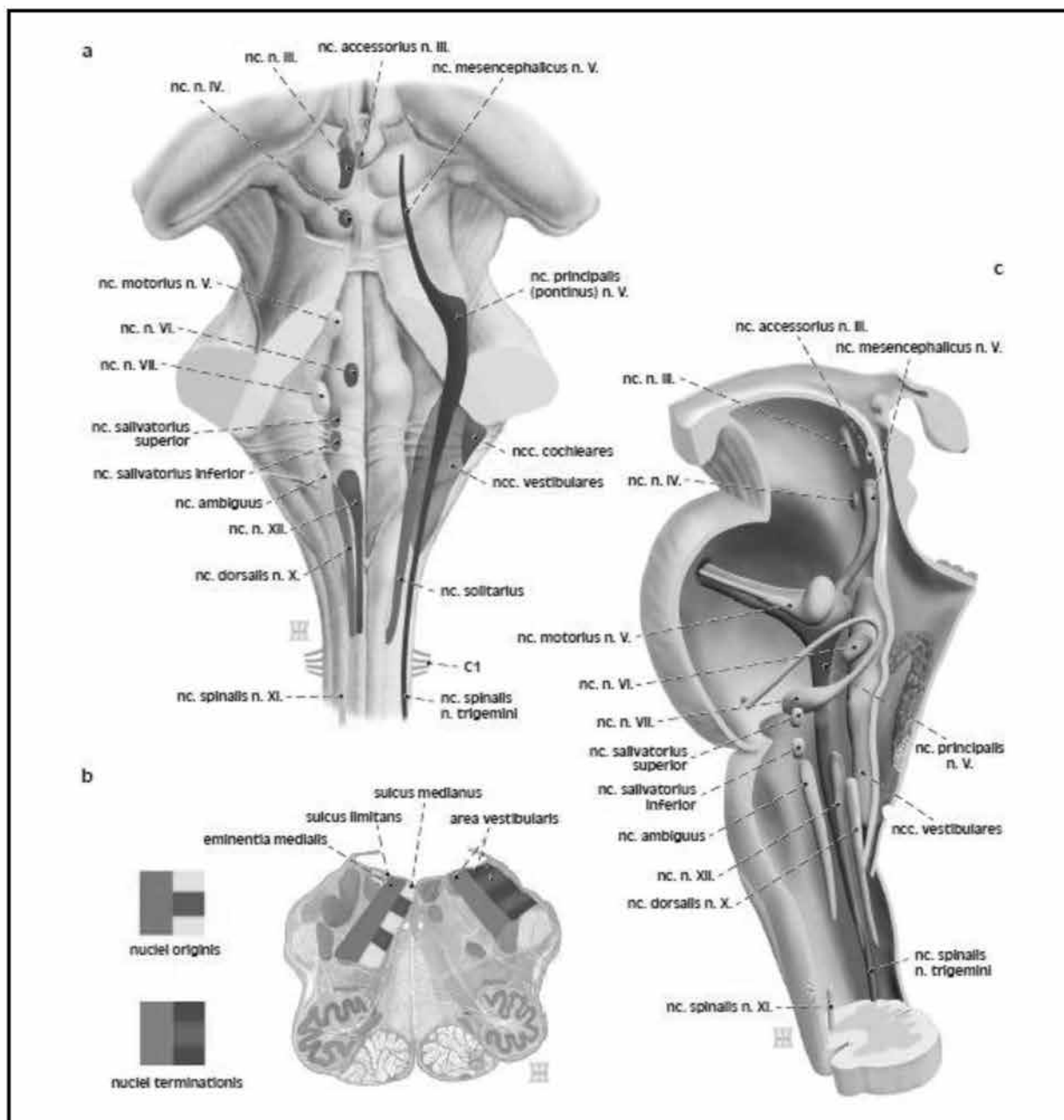


Obr. 3 Lidská páteřní mícha na sagitálním řezu včetně vztahu míšních a obratlových segmentů (vertebromeduální topografie). Podle Grim et al. (2017).

Mícha (obr. 3) je podlouhlý, na řezu oválný provazec nervové tkáně, uložený v páteřním kanálu, ze kterého vycházejí míšní nervy. Kraniálně pokračuje do prodloužené míchy mozku, kaudálně končí slepě v lumbální oblasti. V centru míchy je vytvořen kaudálně slepě končící

centrální kanálek (*canalis centralis*), vyplněný likvorem. Na povrchu je mícha kryta měkkou plenou míšní (*pia mater spinalis*), pavučnicí (*arachnoidea mater spinalis*), a tvrdou plenou míšní (*dura mater spinalis*). *Pia mater* přiléhá těsně na povrch míchy. Mezi *pia mater* a arachnoideou je vytvořen subarachnoidální prostor (*spatium subarachnoidale*), mezi arachnoideou a *dura mater* je vytvořen subdurální prostor (*spatium subdurale*), mezi *dura mater* a periostem kostí páteřního kanálu je vytvořen epidurální prostor (*spatium epidurale*). Autonomní (vegetativní) systém inervuje ty části těla, které nejsme schopni ovládat vůlí. Podle funkce jej dělíme na část sympatickou neboli sympatikus (*pars sympathica*), a část parasympatickou neboli parasympatikus (*pars parasymphatica*). Název sympatiku pochází od termínu „sympathin“, což je starší souborné označení mediátorů tohoto systému (adrenalinu a noradrenalinu). Název parasympatiku pak vyjadřuje, že tento systém pracuje paralelně se sympatikem (lat. *para* – vedle). Rozložení jader v centrálním nervovém systému reflektuje označení sympatiku termínem thorakolumbální systém (rozsah C₈-L₂), označení parasympatiku pak termínem kraniosakrální systém (oblast hlavových nervů a křížová oblast S₂-S₄). Sympatikus tvoří tu část autonomního nervového systému, která, podle klasického popisu, připravuje organismus k obraně, útoku nebo úteku (angl. fight or flight), tj. zrychluje srdeční činnost, zrychluje a prohlubuje dýchání, zvyšuje krevní tlak, rozšiřuje koronární tepny a bronchy, snižuje činnost trávicího systému, působí vyprázdnění střev a močového měchýře a působí rovněž dnes již u člověka nevýznamné vzpřímení chlupů („husí kůže“), odpovídající zjevení srsti u nižších savců, které mělo za cíl optické zvětšení postavy. Naproti tomu parasympatikus (řec. *para* – při, vedle) naopak udržuje organismus v klidu při odpočinku a trávení, proto vyvolává zpomalení srdeční činnosti, snižuje krevní tlak, zužuje koronární tepny a bronchy a zvyšuje činnost trávicího systému.

Pod spodinou čtvrté mozkové komory (*fossa rhomboidea*), je v prodloužené míše uloženo dýchací centrum. Skládá se ze dvou skupin neuronů, uspořádaných jako ventrální a dorzální respirační skupiny. Centrum reguluje především vlastní pohyb dýchacích svalů (Grim et al., 2014). Kraniálně odtud je uloženo pneumotaktické centrum, které je dýchacímu centru nadřazeno. Toto centrum zpracovává údaje o koncentraci kyslíku a oxidu uhličitého v krvi, signály z chemoreceptorů v *glomus caroticum* a na spodině čtvrté mozkové komory, dále údaje o tělesné teplotě a krevním tlaku (Grim et al., 2014). Aferentní vlákna (*nervi afferentes*) k těmto jádrům přicházejí z mozkové kůry, mechanoreceptorů plic, dýchacích cest a stěny hrudníku, dále pak z centrálních a periferních chemoreceptorů a z proprioreceptorů dýchacích svalů. Eferentní vlákna (*nervi efferentes*) naopak směřují do dýchacích svalů, podkorových autonomních center a mozkové kůry.

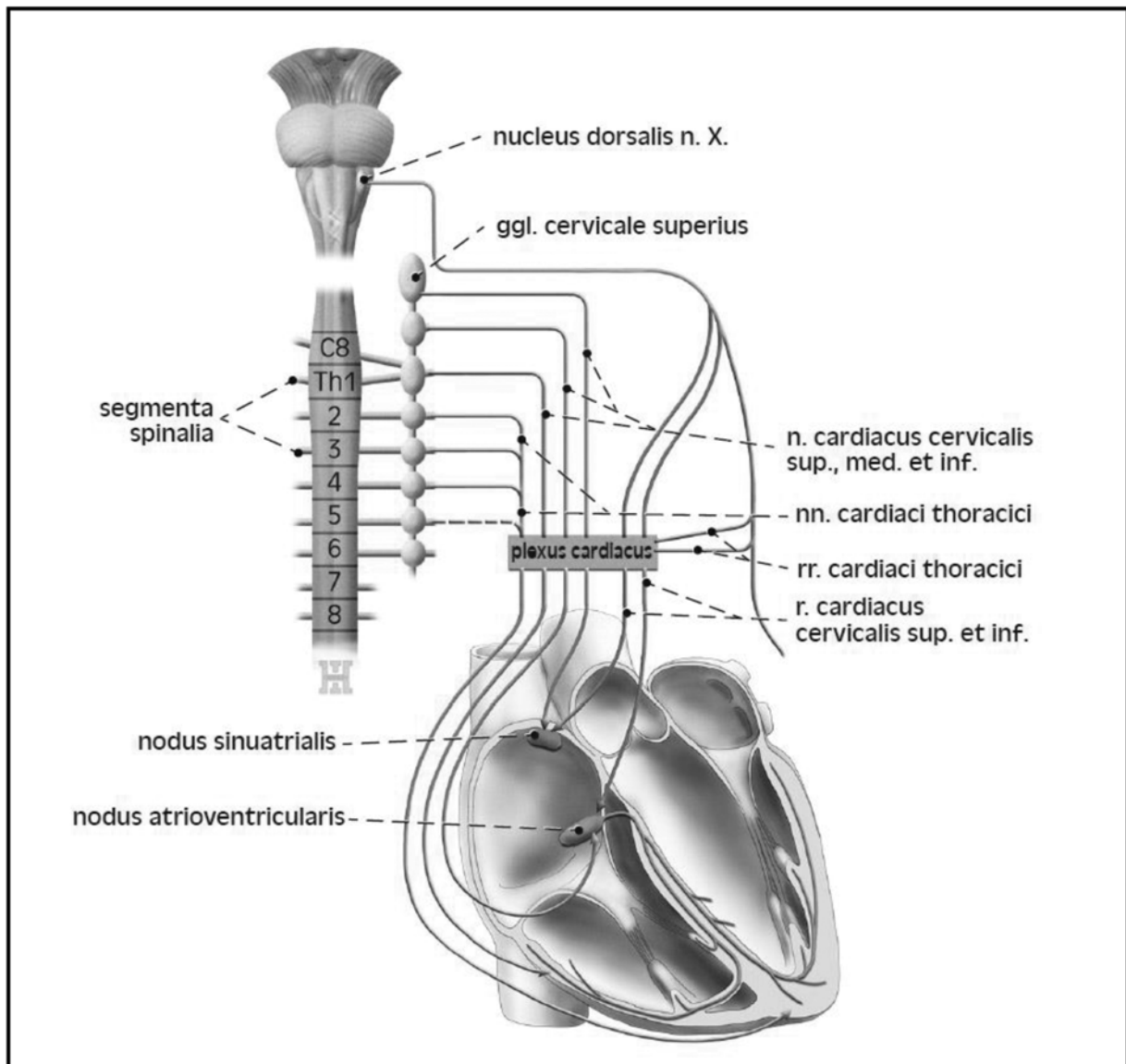


Obr. 4 Kmenová jádra hlavových nervů při pohledu z dorzokraniální strany na spodinu čtvrté mozkové komory. Podle Grim et al. (2017).

V mozkovém kmeni je v těsné blízkosti dýchacího a pneumotaktického centra, při *nucleus dorsalis nervi vagi* uloženo i centrum regulace srdeční akce, ze kterého vystupují pregangliová sympatická a parasympatická eferentní vlákna, která končí jako sympatické *nervi cardiaci* nebo parasympatické *rami cardiaci nervi vagi* v oblasti srdce, kde vytvářejí povrchovou a hlubokou pletěň (*plexus cardiacus superficialis et profundus*), ve kterých jsou uložena i příslušná autonomní *ganglia cardiaca*, kde dochází k přepojení části těchto vláken (Eliška a Elišková, 1995, Grim et al., 2014). Sympatická postgangliová vlákna na svých zakončeních uvolňují neurotransmitery (noradrenalin), kterými působí na alfa- a beta-

adrenergní receptory kardiomyocytů pracovního myokardu a převodního systému srdečního, čímž zvyšují tepovou frekvenci (pozitivně chronotropní), sílu srdečního stahu (pozitivně inotropní efekt), dráždivost srdečního svalu (pozitivně bathmotropní efekt) a rychlost vedení vzruchu (pozitivně dromotropní efekt). Naopak terminální parasymphatická vlákna uvolňují acetylcholin (jsou tzv. cholinergní) a vazoaktivní neuropeptidy, přičemž efekt na srdeční sval je opačný než u sympatiku. V tělesném klidu tonus parasymphatiku nad sympatikem převládá (Eliška a Elišková, 1995) (obr. 4, 5).

Dále je v mozgovém kmeni (obr. 4), v retikulární formaci pod *trigonum nervi vagi*, uloženo vazomotorické centrum, které je klíčové pro regulaci krevního tlaku. Toto centrum prostřednictvím autonomních vláken reguluje průsvit cév (Grim et al., 2014).



Obr. 5 Autonomní inervace srdce – míšní sympatikus (červeně) a hlavový parasymphatikus (zeleně). Podle Grim et al. (2017).

1.2 FUNKČNÍ ANATOMIE DÝCHACÍHO APARÁTU

Dýchací aparát člověka se skládá z vnějšího nosu (*nasus externus*), dutiny nosní (*cavitas nasi*), vedlejších dutin nosních (*sinus paranasales*), ústní a hrtanové části hltanu (*oropharynx et laryngopharynx*), hrtanu (*larynx*), průdušnice (*trachea*), průdušek (*bronchi*) a plic (*pulmones*), ke kterým funkčně řadíme i hrudní koš (*cavitas thoracis*) a dýchací svaly (*musculi respiratorii*). Pravá plíce (*pulmo dexter*), složená ze tří laloků (*lobi*), je uložena v pravé pohrudniční dutině (*cavitas pleuralis dextra*), zatímco levá plíce (*pulmo sinister*), složená pouze ze dvou laloků, v pohrudniční dutině levé (*cavitas pleuralis sinistra*). Pravá plíce má deset segmentů, levá pouze osm. Místo, kde do plic vstupuje plicní tepna (*arteria pulmonalis*), plicní žíly (*venae pulmonales*) a záhy se větvící hlavní průduška (*bronchus principalis*) se označuje jako hilus (*hilum pulmonale*). Kraniální část plíce označujeme jako hrot (*apex pulmonis*), kaudální část jako bazi (*basis pulmonis*). Plíce je pokrytá poplicnicí (*pleura visceralis*), hrudní dutina pohrudnicí (*pleura parietalis*), mezi nimi je úzký prostor vyplněný tekutinou – interpleurální prostor (*spatium interpleurale*). Pravá a levá hlavní průduška se uvnitř plicního parenchymu postupně větví na stále menší větve, až do terminálních plicních sklípků (*alveoli pulmonales*). Kolem tohoto větvení neboli bronchiálního stromu (*arbor bronchialis*), jsou v řídkém intersticiálním vazivu uloženy lymfatické uzliny a větve plicních tepen, žil, nervů a lymfatických cév (Čihák, 2002; Williams a Bannister, 1995).

Pravá plíce je o 1/10 objemnější než levá. Celkový objem plic je okolo čtyř litrů, hmotnost má pouze 700 g. V inspiriu pojmu plíce okolo pěti litrů vzduchu, z toho tři litry jsou obsaženy v plicních sklípcích. Plíce obsahují přibližně 300 miliónů plicních sklípků, které zaujímají celkovou plochu okolo 70 m². Plicní sklípek (*alveolus pulmonis*), má průměr 0,1–0,2 mm. V okolí alveolu je uloženo 4–12 kapilárních kliček. Stěnu alveolu vystylají pneumocyty podložené basální membránou a jemným skeletem z elastických a kolagenních vláken. V alveolu se nacházejí dva typy pneumocytů – membranózní pneumocyty I. typu, podílející se na difuzi plynů a sekreční (granulární) pneumocyty II. typu, produkující surfaktant, což je jemný film, který snižuje povrchové napětí a chrání tak *alveolus* před kolapsem. Výměna kyslíku a oxidu uhličitého probíhá přes alveolo-kapilární membránu, jež se skládá z výběžku pneumocytu, bazální membrány a endotelu kapiláry. Intersticiium plic je vyplněno imunitně aktivními buňkami, které zajišťují ochranu proti cizorodým látkám a fagocytují cizorodé nebo nepotřebné částice. Mezi hlavní dýchací svaly (*musculi respiratorii majores*) řadíme bránici (*diaphragma*), jež funkčně tvoří významný inspirační sval a současně také mezižeberní svaly, přičemž vnější (*musculi intercostales externi*) jsou funkčně vdechové, inspirační, zatímco vnitřní dvě skupiny svalů (*musculi intercostales interni et intimi*) jsou funkčně výdechovými, expiračními svaly. Ostatní příčně pruhované svaly, které se upínají na hrudní koš a podílejí

se tak na dýchacích pohybech, označujeme jako vedlejší dýchací svaly (*musculi respiratorii accessorii seu auxiliares*). Kromě dýchání (*respiratio*) mají plíce schopnost metabolizovat určité sloučeniny, udržovat acidobazickou rovnováhu, filtrovat toxické substance z oběhu a tvořit zásobník krve. Většina dýchacích svalů je inervována příslušnými větvemi hrudních nervů. Za zmínku stojí inervace bránice z míšního segmentu C₃ – C₅ cestou bráničního nervu (*nervus phrenicus*). Části dýchacích cest, neschopné výměny dýchacích plynů (ventilace), jako je nosní dutina, průdušnice apod., se označují jako anatomicky mrtvý prostor. Části plic, které v daném okamžiku nejsou schopny výměny plynů, označujeme jako funkčně mrtvý prostor. Anatomicky mrtvý prostor je konstantní, funkčně mrtvý prostor je proměnlivý (Ganong, 2005; Brožek et al., 1999).

Plíce jsou inervovány zejména vůlí neovladatelným autonomním nervovým systémem, sympatikem a parasympatikem. Parasympatická vlákna přicházejí cestou větví desátého hlavového nervu (*nervus vagus*), sympatická vlákna pocházejí z druhého až čtvrtého ganglia hrudního sympatiku (*ganglion sympathicum thoracicum secundum et quartum*). Obecně platí, že plicní řečiště je zásobeno autonomními nervy méně, než řečiště systémové. Autonomní vlákna přicházejí do plic přes hilus a při dalším větvení respektují větvení plicních cév a bronchiálního stromu. Vznikají takto pleteně v okolí jednotlivých bronchů a tepen (*plexus peribronchialis et periarterialis*). V periarteriální pleteni převažují sympatická vlákna. Peribronchiální pleteně zasahují až po interalveolární septa a převažují zde parasympatická vlákna, kde jsou místy vmezeřena parasympatická ganglia. Autonomní nervy plicních cév probíhají v jejich *tunica media*. Inervace je nejhustší v místě cévního větvení. Plicní tepny, ve kterých jsou přítomna autonomní nervová vlákna, mají průměr nejčastěji mezi 30–500 μm. Ve srovnání se systémovými tepnami mají plicní tepny obecně nižší obsah hladké svaloviny a autonomních nervů. Plicní žíly mají autonomní složku vyjádřenu ještě méně. Většina aferentních vláken vede z plic informace z baroreceptorů a chemoreceptorů, vlákna vedoucí bolest jsou zastoupena velmi málo. Poplicnice je s výjimkou oblasti kolem hilu úplně nebolestivá (Čihák, 2002; Williams a Bannister, 1995).

1.3 FUNKČNÍ ANATOMIE CÉVNÍHO SYSTÉMU

Krevní oběh (*circuitus sanguinis*) rozdělujeme na systémový (velký, vysokotlaký; *circuitus sanguinis major*) a plicní (malý, nízkotlaký; *circuitus sanguinis minor*). Systémový krevní oběh začíná výstupem aorty z levé srdeční komory (*ventriculus sinister*), pokračuje větvením tepen (*arteriae*) a tepének (*arteriolae*) do celého těla až v kapiláry (*vasa capillaria*). Z nich se dále sbírají postkapilární venuly (*venulae postcapillares*), venuly (*venulae*), žíly (*venae*) a nakonec dvě hlavní sběrné žíly, horní a dolní dutá žíla (*vena cava superior et inferior*), které ústí do pravé srdeční předsíně (*atrium dextrum*). Plicní krevní oběh začíná v pravé komoře

(*ventriculus dexter*), ze které vystupuje plicnice (*truncus pulmonalis*), která se záhy rozděluje na pravou a levou plicní tepnu (*arteria pulmonalis dextra et sinistra*), vstupující plicním hilem do příslušné plíce, kde se dále dělí až na kapiláry. Z kapilár se podobně jako v systémovém oběhu sbírají žíly až do čtyř hlavních plicních žil (*venae pulmonales dextrae et sinistrae, superiores et inferiores*), které se vlévají do levé předsíně (*atrium sinistrum*). Kromě toho existuje oběh lymfatický (*circuitus lymphaticus*), který sbírá tekutinu z intersticia a pomocí lymfatických cév ji převádí zpět do žilního systému. Cestou mezi intersticiem a žilami prostupuje tato tekutina (lymfa), přes lymfatické uzliny (*noduli lymphatici*). Jako tepny se označují cévy vystupující ze srdce, jako žíly cévy vstupující do srdce. V systémovém krevním oběhu vedou tepny krev okysličenou, v plicním odkysličenou. Podobně v systémovém krevním oběhu vedou žíly krev odkysličenou, v plicním okysličenou. Plíce jsou napojeny na všechny tři oběhy. Plicní krevní oběh zde reprezentuje tzv. funkční oběh, který představuje hlavní zdroj krve pro plíce, systémový krevní oběh reprezentuje tzv. nutriční oběh, který je velmi redukován. Lymfatický oběh je vytvořen stejně jako v jiných orgánech. Mezi arteriálním a žilním systémem obou oběhů a rovněž mezi oběma oběhy jsou vytvořeny spojky, anastomózy (Eliška a Elišková, 1995; Williams a Bannister, 1995).

1.4 BIOMECHANIKA DÝCHÁNÍ A VÝMĚNY PLYNŮ

Do dýchacích cest vstupuje vzduch nosem nebo ústy a dále pokračuje orofaryngem, laryngofaryngem, laryngem, tracheou a bronchy a jejich větvemi až do alveolů. Kromě toho, že dýchací cesty přivádějí vzduch do alveolů, zbavují jej většiny nečistot, prostřednictvím imunity brání zavlečení infekce do organismu, upravují vzduch tepelně, zvlhčují jej, ovlivňují jeho distribuci do jednotlivých úseků dýchacího traktu a vytvářejí hlas. Optimální dýchání vzniká na základě optimálního vyladění mezi distribucí a difuzí plynů, perfuzí plic a neurohumorální regulací dýchání. Dechový cyklus zahrnuje vdechovou fázi (inspirium), výdechovou fázi (expirium) a klidovou fázi. Inspirium je založeno na kontrakci příčně pruhovaných dýchacích svalů, které rozšiřují hrudník do všech stran. Rozšíření hrudníku je možné jednak na základě i) pohybů jednotlivých žeber v kloubech a omezeně i v chrupavčitých spojeních, ii) pohybu bránice a iii) trojího zakřivením žeber, konkrétně v horizontálním směru, ve vertikálním směru a podél vlastní osy (Čihák, 2002.). Rozšíření hrudníku pasivně rozšiřuje i objem plic, díky konstantní šířce interpleurální štěrbině. Zatímco tlak v plicích odpovídá vnějšímu atmosférickému tlaku, v interpleurální štěrbině je tlak nižší; tato skutečnost se označuje jako transtorakální tlakový gradient. Expirium je vesměs děj pasivní, význam expiračních svalů roste při námaze. Z hlediska plic jsou inspirium i expirium ději pasivními – zatímco při inspiriu se celá plíce rozpíná na základě rozšiřování objemu hrudníku, při expiriu je retraktilním tahem elastických vláken (elasticitou plic), objem plic obnoven do původního stavu. Jev se souborně označuje jako poddajnost plic

(compliance). Dýchání rozlišujeme brániční (břišní), hrudní (kostální) a smíšené. Za normálních okolností dýcháme smíšeně, ze 2/3 bráničním a z 1/3 hrudním dýcháním; tento poměr se u mužů a žen liší. Dýchání se přizpůsobuje potřebám organismu změnami dechového objemu, frekvence dýchání, perfuze plic a koordinace hrudního a abdominálního dýchání (Ganong, 2005; Williams a Bannister, 1995).

Ventilace plic zajišťuje výměnu vzduchu mezi okolní atmosférou a alveolárním prostorem, perfuze plic zajišťuje distribuci plynů do celého organismu a odtud zpět do plic. Výměnu plynů v plicích umožňuje proudění vzduchu v dýchacích cestách ve směru tlakových gradientů. Od terminálních bronchiolů k alveolům se stává významnou také difuze a dýchací plyny tak difundují od alveolární membrány ve směru koncentračních gradientů. Suchý atmosférický vzduch se skládá z přibližně 21 % kyslíku, 0,04 % oxidu uhličitého, 78 % dusíku a 0,92 % vzácných plynů. Za normálních okolností je v atmosférickém vzduchu parciální tlak kyslíku 160 mm Hg, parciální tlak oxidu uhličitého 0,3 mm Hg a parciální tlak dusíku a vzácných plynů 600 mm Hg. Pokud je směs plynů v kontaktu s kapalinou, rozpouští se jednotlivé plyny v kapalině úměrně jejich rozpustnosti v kapalině a jejich parciálním tlakům v plynné fázi. Pokud trvá kontakt dostatečně dlouho, ustaví se rovnováha a jednotlivé plyny získají v kapalině stejné parciální tlaky jako v plynné fázi. V systémové arteriální krvi je parciální tlak kyslíku 100 mm Hg, parciální tlak oxidu uhličitého 40 mm Hg a parciální tlak dusíku a vzácných plynů 571 mm Hg. Ve smíšené žilní krvi je parciální tlak kyslíku 40 mm Hg, parciální tlak oxidu uhličitého 46 mm Hg a parciální tlak dusíku a vzácných plynů 571 mm Hg (Brožek et al., 1999; Ganong, 2005).

S každým vdechem se do plic dostane přibližně 0,5 litru vzduchu. Při průměrné dechové frekvenci 15/min je minutový dechový objem 7,5 litru vzduchu, což se označuje jako celková ventilace plic. Z každého 0,5 litru vzduchu však zůstane 150 ml v anatomicky mrtvém prostoru, reálně tedy probíhá v klidu ventilace na základě pouze 350 ml vzduchu na každý vdech, tedy 5,25 litru za minutu – to je alveolární ventilace plic.

Základem schopnosti plic reagovat na jakoukoli změnu potřeby organismu je zajištění optimálního poměru ventilace–perfuze. Základem této regulace je Eulerův–Liljestrandův alveolo–kapilární reflex, kdy na základě hypoventilace dojde k lokální vazokonstrikci malých plicních arterií. Tento mechanismus je naprosto klíčový pro ekonomiku plicního řečiště; je totiž schopen udržet saturaci krve na vysoké úrovni a zároveň předcházet „nevyužití“ krve, přicházející do plic. Ventilace a perfuze jsou i za klidových fyziologických podmínek různé v různých částech plic – poměr ventilace/perfuze je při stoji u hrotu plic vysoký a směrem k bazi se snižuje. Vleže se poměr na hrotu a při bazi vyrovnává, což souvisí se změnami

hydrostatických tlaků v cévách. Kromě toho je i intrathorakální tlak různý v různých částech plic – při apexu je okolo $-10 \text{ mm H}_2\text{O}$, při bazi plic okolo $-2,5 \text{ mm H}_2\text{O}$.

Další složkou fyziologie dýchání je difuze kyslíku a oxidu uhličitého mezi alveolem a plicní kapilárou, která závisí na difuzní kapacitě alveolokapilární membrány a difuzní kapacitě erytrocytů. Tuto difuzi popisuje Fickův zákon, podle kterého je rychlost difundujících plynů přímo úměrná velikosti alveolokapilární plochy pro výměnu plynů, gradientu parciálního tlaku plynů a materiálové difuzní konstantě membrán (Ganong, 2005).

Na proces difuze plynů navazuje transport plynů krví, který závisí zejména na vazbě plynů na erytrocyty. Pouze malá část plynů je rozpuštěna v krvi. Vazba krevních plynů na erytrocyty závisí na několika faktorech (tab. 1). Z tabulky mimo jiné vyplývá známý fakt, že pokud se parciální tlak CO_2 zvýší, sytí se erytrocyty CO_2 a odevzdávají O_2 . Tyto efekty lze popsat vazebnou křivkou O_2 a disociační křivkou CO_2 . Závislost vazebné křivky O_2 na parciálním tlaku CO_2 se označuje jako Bohrův efekt.

Tab. 1 Vliv různých zvýšení různých faktorů na snížení/zvýšení sycení hemoglobinu kyslíkem (souborně podle různých autorů).

| Zvýšený faktor | Nasycení erytrocytu kyslíkem |
|------------------------------|------------------------------|
| Hemoglobin | Zvyšuje |
| Teplota | Zvyšuje |
| pH (c H^+) | Snižuje |
| Parciální tlak CO_2 | Snižuje |
| 2,3– bis–fosfoglycerát | Zvyšuje |
| ATP | Zvyšuje |

Primární silou, která určuje přestup tekutiny přes stěnu plicních kapilár do intersticia a odtud případně i do lumina plicních alveolů, je plicní kapilární hydrostatický tlak. Zvýšený kapilární hydrostatický tlak má proto schopnost indukovat plicní edém. Tlak v plicních cévách je výslednicí tlaku na úrovni *arteria pulmonalis* a tlaku v levé srdeční předsíni. Plicní kapilární hydrostatický tlak vychází z hodnot plicního arteriálního tlaku, cévního odporu plicního řečiště a celkových parametrů krevního toku. Při pohledu na vlastní plicní tkáň tedy hodnoty kapilárního hydrostatického tlaku odrážejí stupeň plicní rezistence a schopnost distribuce krve mezi prekapilární a postkapilární částí plicního krevního oběhu. V normálních plicích zdravého člověka je tlak v levé předsíni mírně nižší než plicní diastolický tlak. Hodnoty plicního kapilárního tlaku se pohybují okolo 6–8 mm Hg. Jeho hodnoty mírně rostou v systole a klesají téměř k nule v diastole. V okamžiku, kdy je zvýšený

tlakový gradient mezi *arteria pulmonalis* a levou srdeční předsíní – transpulmonální tlakový gradient, mění se i hodnoty plicního kapilárního tlaku. Příkladem takových stavů je akutní syndrom dechové tísně (ARDS), plicní hypertenze, sepse, zánětlivé stavy plicní tkáně, hypoxie nebo kardiovaskulární choroby. Měření plicního kapilárního tlaku je v humánní medicíně velmi obtížné. Důležitou skutečností je, že na hodnoty kapilárního hydrostatického tlaku lze na podkladě častěji měřených hodnot tlaku v plicnici usuzovat jen velmi přibližně (Ganter et al., 2006).

1.5 OBECNÉ ASPEKTY ROZVOJE PLICNÍHO EDÉMU SE ZŘETELEM K EDÉMU NEUROGENNÍMU

Normální funkce plicní tkáně vyžaduje co nejtenčí bariéru pro výměnu plynů mezi krevním řečištěm a vzduchem v plicích. Za normálních okolností je pohyb tekutiny přes stěnu cév přísně regulován. Pokud dojde k poruše tohoto mechanismu z nejrůznějších příčin a současně k relativnímu nebo absolutnímu zmnožení tekutiny v oblasti mimo cévní řečiště na úkor tekutiny uvnitř cév, vzniká otok tkáně – edém. Plicní edém může mít celou řadu příčin, může probíhat různě závažně, s dočasnými nebo trvalými důsledky (Vinš, 2003). Pro klinickou praxi je důležité, že plicní edém poměrně často zásadně komplikuje zdravotní stav pacienta a může dokonce vést navzdory intenzivní léčbě k jeho smrti. Plicní edém můžeme rozdělovat podle celé řady hledisek, přičemž nejčastěji jsou zdůrazňována hlediska etiologická a patofyziologická (Hulín et al., 2009; Nečas et al., 2009). Podrobné rozdělení plicních edému viz *publikace 13*. Plicní edém vzniká na podkladě porušené rovnováhy intravaskulární a intersticiální tekutiny. Může vznikat z celé řady příčin, které vedou k jednomu nebo více z následujících dějů (Hulín et al., 2009; Nečas et al., 2009; Weiss a Meyer, 2015):

Nejčastější příčinou je zvýšení kapilárního hydrostatického tlaku. Vzniká při přetlaku v žilním systému plic, který může být způsoben jak vlastními plicními cévami, tak poruchou přečerpávání krve levým srdcem. Dalším důvodem může být zvýšení objemu cirkulujících tekutin buď v celém organismu, nebo významná centralizace oběhu do oblasti životně důležitých orgánů, způsobená nejrůznějšími příčinami. Mechanismus zvýšení propustnosti kapilární stěny vzniká na podkladě přímého nebo humorálně podmíněného rozšíření prostoru mezi jednotlivými endotelovými buňkami, případně jejich poškozením. Vede k nárůstu extravazace tekutiny a krevních elementů do intersticia a odtud eventuálně do intraalveolárního prostoru. Zvýšení povrchového napětí vnitřní plochy alveolů hraje roli v okamžiku, kdy v důsledku poškození nebo změny struktury surfaktantu, které vede ke změně vlastností na hranici vzduch–tekutina, dojde ke kolapsu příslušných částí plic a úniku tekutiny do alveolů. Snížení onkotického tlaku krevní plazmy vzniká při relativním nebo

absolutním poklesu množství bílkovin krevní plazmy, zejména albuminu. Výsledkem je změna osmotického gradientu a únik tekutiny z intravaskulárního prostoru do intersticia. Snížení lymfatické drenáže plicního parenchymu vzniká na podkladě zánětu nebo metastatického rozsevu. Může být rovněž vrozené. Vede k nedostatečnému odvádění lymfy plicní tkání a jejímu hromadění v plicním parenchymu.

Předstupněm plicního edému je překrvení plicního parenchym, kongesce plic. Vlastní plicní edém se projevuje zvýšením tekutiny nejdříve v mezibuněčné hmotě plicního parenchymu – intersticiální edém, následně únikem tekutin do oblasti plicních sklípků – intraalveolární edém a dále i do dalších úseků dýchacích cest. Neurogenní plicní edém je charakterizován významným stupněm dilatace plicních kapilár, kongescí kapilár krvinkami, intraalveolárním krvácením a intersticiálním (perivaskulárním) a intraalveolárním edémem, který je tvořen na proteiny–bohatým tkáňovým mokem – exsudátem, jež obsahuje více než 70 % plazmatické hladiny proteinů. Stejně jako ostatní typy plicního edému, je i rozvoj neurogenního plicního edému charakterizován třemi fázemi (stádii): preedémovou fází, intersticiálním edémem a rozvinutým alveolárním edémem (Nečas et al., 2009).

U preedémové fáze dochází nejprve ke kongesci plic a následně ke zvýšenému pohybu tekutiny z kapilár do intersticia. Přebytek přívodu tekutiny je však stále kompenzován zvýšenou lymfatickou drenáží.

Ve fázi intersticiálního edému je překročena drenážní kapacita intersticia až o 30 % a tekutina se začíná hromadit v poddajném vazivu mezi bronchioly, arteriolami a venulami. Tento edém je nejprve perikapilární a většinou asymetricky lokalizovaný na jedné straně kapiláry, k níž z obou stran přiléhají plicní alveoly. Při nepoškozené epitelové části alveolo–kapilární membrány jeví tekutina hromadící se v intersticiu tendenci nešířit se dále do alveolů, neboť epitelová výstelka alveolů je prakticky zcela neprostupná pro proteiny. V intersticiální tekutině je za normálních okolností relativně vysoká koncentrace proteinů, která dosahuje až 75 % plazmatické koncentrace, což vytváří velmi silný osmotický gradient, který táhne tekutinu z alveolárního prostoru směrem do intersticia a zabraňuje tak intraalveolárnímu edému. Plicní edém si tedy může zachovat charakter intersticiálního edému i při poměrně vyšším stupni naplnění intersticia tekutinou. V tomto stavu se v plicním parenchymu rozšiřuje prostor zaujímaný alveolárními stěnami na úkor alveolárních prostor vyplněných plynem a dochází tak k restriční poruše dýchání v důsledku zmenšené funkční kapacity plic. Kromě toho se zásadně zvyšuje hmotnost plicní tkáně, klesá její poddajnost a zvyšuje se plicní cévní odpor. Tekutina však intraalveolárně neuniká. Za hranici intersticiálního edému je u člověka považována tloušťka alveolární stěny alespoň 2 μm (Nečas

et al., 2009). Při normálním objemu intersticiální tekutiny závisí tlak v intersticiu jednak na přítomnosti pevných struktur pojivové tkáně, jednak na hydrostatickém tlaku přítomné tekutiny. Tlak pevných struktur intersticia je za normálních okolností vyšší ve srovnání s atmosférickým tlakem vzduchu v alveolech – pevné struktury totiž musí odolat působení vzduchu. Naproti tomu tlak tekutiny přítomné v intersticiu je nižší než tlak vzduchu v alveolu – za normálních okolností není žádoucí, aby tekutina vystupovala intraalveolárně. Sumací obou tlaků vzniká tlak, který je za normálních okolností blízký nule. Nahromaděním tekutiny v intersticiu se zvyšuje hydrostatický tlak v tomto prostoru. Pokud je primární příčinou edému zvýšený intravaskulární tlak, působí vlastně zvýšení intersticiálního tlaku v důsledku hromadění tekutiny v intersticiu proti zvýšenému intravaskulárnímu tlaku. Nahromadění tekutiny však kromě zvyšování hydrostatického tlaku rovněž rozvolňuje pevné součásti intersticia, jehož kompenzační mechanismy takto oslabuje. Při určitém objemu nahromaděné intersticiální tekutiny jsou od sebe pevné struktury intersticia natolik vzdálené, že se jejich role přestává uplatňovat a dominujícím faktorem se stává pouze hydrostatický tlak a objem intersticiální tekutiny. S dále rostoucím objemem intersticiální tekutiny se proto začne hydrostatický tlak do té doby nepoměrně zvyšovat, a jakmile dosáhne hodnoty atmosférického tlaku vzduchu v alveolech, začne docházet k unikání tekutiny intraalveolárně. Tekutina, která se hromadí v intersticiálním prostoru, se volně šíří do perivaskulární a peribronchiální tkáně, kde je za normálních okolností nižší hydrostatický tlak. Dochází tak k přesouvání tekutiny směrem k plicním hilům a jejímu odvádění od míst s vysokou koncentrací alveolů. Tento kompenzační mechanismus umožňuje nahromadění až 500 ml tekutiny bez zásadního zvýšení jejího hydrostatického tlaku v intersticiu. V tomto prostoru dochází rovněž ke zvýšené resorpci tekutiny zpět do krve. Perivaskulární a peribronchiální části intersticia rovněž komunikují s interlobárními septy a viscerální pleurou. Tekutina, která takto ve zvýšené míře proniká do pleurální dutiny, je odtud odváděna lymfatickým systémem parietální pleury. Nahromadění tekutiny v pleurálním prostoru v podobě pleurálního výpotku sice omezuje objemové změny plic, avšak méně, než kdyby byla tato tekutina v plicním intersticiu. Pro neurogení plicní edém je typická téměř úplná absence tohoto pleurálního výpotku, což zřejmě souvisí s rychlostí, jakou se tento edém rozvíjí.

Třetí stadium, stadium alveolárního edému, odpovídá situaci, kdy jsou překročeny objemové možnosti intersticiálního prostoru, a tlak tekutiny vede k rozrušení spojů alveolárních membrán. Počátkem tohoto stadia je okamžik, kdy se s rostoucím objemem intersticiální tekutiny začne hydrostatický tlak zvyšovat natolik, že dosáhne hodnoty atmosférického tlaku vzduchu v alveolech. Někteří autoři hovoří o prolomení epitelové bariéry alveolů (Nečas et al., 2009). Roli zde hraje jak tlak tekutiny, tak překonání povrchového napětí surfaktantu

pronikající tekutinou, která umožní její vylití do nitra alveolů. Tekutina se může uvnitř alveolů nacházet jak izolovaně při jejich stěnách, tak vyplňovat celý vnitřní objem alveolu.

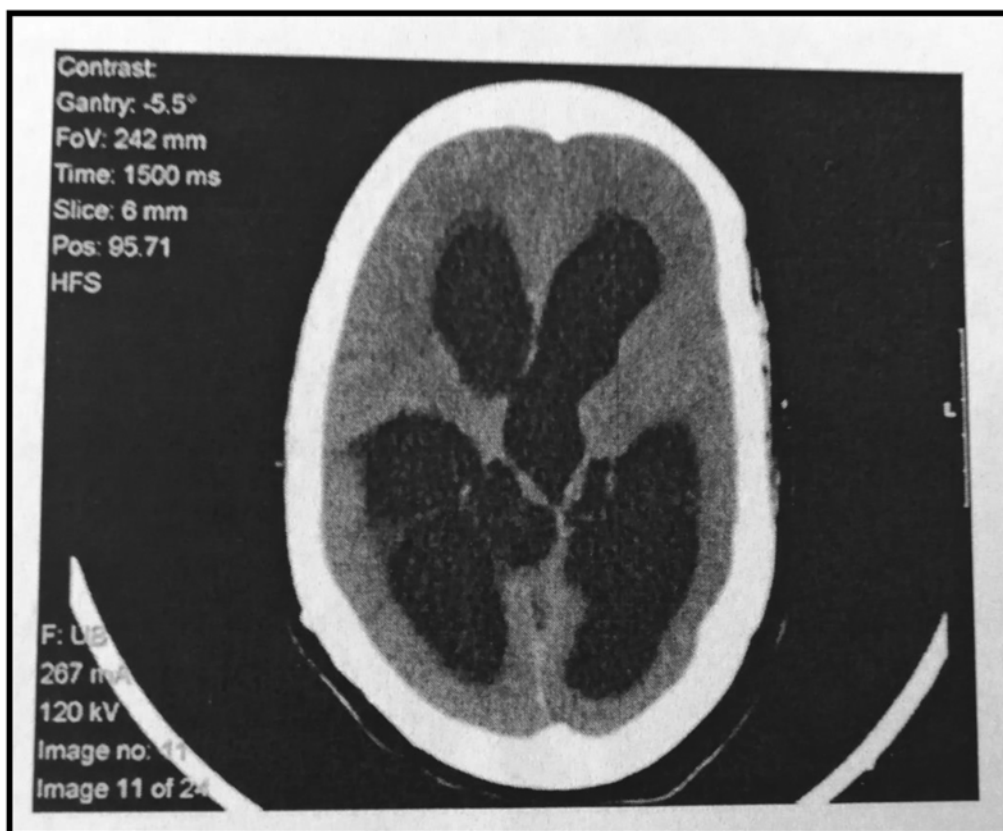
V případě neurogenního plicního edému však na sebe všechny fáze navazují velmi rychle a navíc jsou doplněny o často masivní hemoragické poškození, které nezřídka klinickému obrazu dominuje. Patofyziologicky představuje vznik neurogenního plicního edému nerovnováhu Starlingových sil, odvislých od permeability kapilárního endotelu, cévního povrchu a hydrostatického a osmotického tlaku (Malik, 1985; Colice, 1984). Roli Starlingových sil při vzniku neurogenního plicního edému popisuje Starlingova rovnice (Starling, 1918). Míra efluxu tekutiny je přímo úměrná hydrostatickému tlaku v kapiláře a nepřímo úměrná onkotickému tlaku v kapiláře. Za fyziologických okolností prochází kapilární stěnou do intersticia okolo 15 ml tekutiny za hodinu, což odpovídá 0,01 % z celkového objemu plazmy, která proteče za tuto dobu systémem plicních kapilár. V případě rozvoje plicního edému je toto množství vyšší i o několik řádů. Zatímco za normálních okolností je většina této tekutiny odváděna systémem lymfatických cév zpět do žilního řečiště, v případě zvýšeného úniku tekutiny extravaskulárně tyto mechanismy brzy nedokáží tento děj dostatečně kompenzovat a rozvíjí se nejprve intersticiální a následně intraalveolární edém plic. Při extrémně náhlých objemově–tlakových změnách v plicním kapilárním řečišti navíc může dojít k mechanickému poškození kapilárních stěn a extravazaci krevních elementů.

1.6 PŘÍČINY NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Etiopatogeneze neurogenního edému byla předmětem intenzivního výzkumu zejména v 70.–80. letech 20. století, poté byl výzkum této problematiky z neznámého důvodu utlumen, navzdory stále nejasnému mechanismu jeho vzniku. Ačkoli je podezřívána celá řada mechanismů, není přes všechny snahy etiopatogeneze neurogenního plicního edému dodnes spolehlivě vysvětlena. Etiologie neurogenního plicního edému je dnes nejčastěji definována jako neuro-humorálně-stresová.

Jak bylo řečeno výše, neurogenní plicní edém se vyskytuje u pacientů s různými formami poškození centrálního nervového systému. Rozvíjí se nejčastěji v řádu hodin po poškození centrálního nervstva nebo akutní exacerbaci chronického onemocnění mozku nebo míchy. Velmi rychle se rozvíjející neurogenní edém se může vyvinout i v řádu minut až desítek minut, tento typ je však spíše vzácný. U těžkých poranění mozku a míchy (zejména krční) je plicní edém častým nálezem. Častěji se u těchto úrazů vyskytuje neurogenní plicní edém u mladších pacientů, pravděpodobně vzhledem k paradoxně „reaktivnějšímu“ kardiovaskulárnímu aparátu u mladších (Simmons et al., 1969a, 1969b). Nejčastěji se rozvíjí u těžkých traumat centrálního nervového systému, u pacientů s epilepsií a v případech

subarachnoidálního krvácení (Kennedy et al., 2015). Méně často se vyskytuje u pacientů se subdurálním krvácením, intracerebrálním nebo intramedulárním krvácením, hyponatremické encefalopatie, meningitidy, intrakraniálních a intraspinálních tumorů spojených s rozvojem hydrocefalu, u *lupus erythematoses* a u záchvatu roztroušené sklerózy (Malik, 1985; Fontes, 2003; Tzelepis a McCool, 2015). Kromě toho může neurogení plicní edém vzniknout velmi vzácně i iatrogeně při neurochirurgických zákrocích (viz kazuistika 7 v publikaci 13) nebo jako jejich komplikace, například v důsledku dysfunkce atrioventrikulárního shuntu (Cruz et al., 2016) (obr. 6). Podobný mechanismus vzniku jako v případě neurogeního plicního edému je podezříván i u plicního edému vznikajícího na podkladě feochromocytomu a u onemocnění rukou, nohou a úst (Rassler, 2007; McMinn, 2002). Relativně sporné je označení neurogeního plicního edému u toxických poškození tkáně centrálního nervového systému exogenními substancemi jako jsou salicyláty (Broderick et al., 1976), heroin (Steinberg a Karliner, 1968) či metadon (Frاند et al., 1972). Efekty těchto látek jsou někdy přirovnávány k experimentálnímu modelu neurogeního plicního edému, který je indukován vpravením alkaloidu veratrinu do *cisterna magna* (Minnear a Connel, 1982).



Obr. 6 Triventrikulární hydrocefalus v CT obraze u selhávajícího ventrikulo-atriálního shuntu. U pacienta se jako důsledek selhání shuntu rozvinul neurogení plicní edém. Podle Cruz et al. (2016).

Neurogenní plicní edém byl popsán až u 20 % těžkých poranění mozku, charakterizovaných Glasgow Coma Scale < 8 (Bratton et al., 1997) (tab. 2). Studie Rogerse et al. (1995) popisuje výskyt neurogenního plicního edému ve 32 % případech poranění mozku s následkem smrti, přičemž 50 % pacientů s NPE zemřelo do tří dnů. Výskyt neurogenního plicního edému bývá v případech poranění mozku nejčastěji sdružen s náhlým vzestupem intrakraniálního tlaku (Baumann et al., 2007). Byly však popsány i případy, kde prokazatelně ke vzestupu intrakraniálního tlaku nedošlo a přesto se edém rozvinul (Popp et al., 1982). Poškození plic v důsledku neurogenního plicního edému je vedle infekce nejčastější příčinou kontraindikace jejich použití pro transplantaci u pacientů s diagnostikovanou mozkovou smrtí. Trulock (1997) udává, že neurogenní plicní edém je jednou z příčin toho, že pouze 20 % multiorgánových dárců má plíce ve stavu vhodném k transplantaci – to odpovídá i údajům z transplantačního centra III. chirurgické klinicky FN Motol (osobní korespondence, MUDr. Lukáš Pollert). Co se týče ostatních orgánů, bývá transplantace u dárců s rozvinutým neurogenním plicním edémem rovněž ztížena. Nověji se ukazuje, že stav dárce s neurogenním plicním edémem lze výrazně zlepšit inhalací oxidu dusnatého; Park et al. (2014) takto docílili úspěšné transplantace ledvin. Plíce takového dárce však pochopitelně není možné použít k transplantaci.

Tab. 2 Glasgowská škála kómatu (angl. Glasgow Coma Scale). Modifikováno podle Ball a Phillips (2004).

| ÚKON | SKÓRE | ÚKON | SKÓRE | ÚKON | SKÓRE |
|---------------------|-------|---------------------------|-------|-----------------------|-------|
| Otevření očí | | Motorická odpověď | | Slovní odpověď | |
| Spontánně | 4 | Vyhoví | 6 | Orientovaný | 5 |
| Na oslovení | 3 | Lokalizuje bolest | 5 | Zmatený | 4 |
| Na bolest | 2 | Uhýbá od bolesti | 4 | Nepřiléhavá | 3 |
| Chybí | 1 | Flexní reakce na bolest | 3 | Nesmyslná | 2 |
| | | Extenční reakce na bolest | 2 | Chybí | 1 |
| | | Chybí | 1 | | |

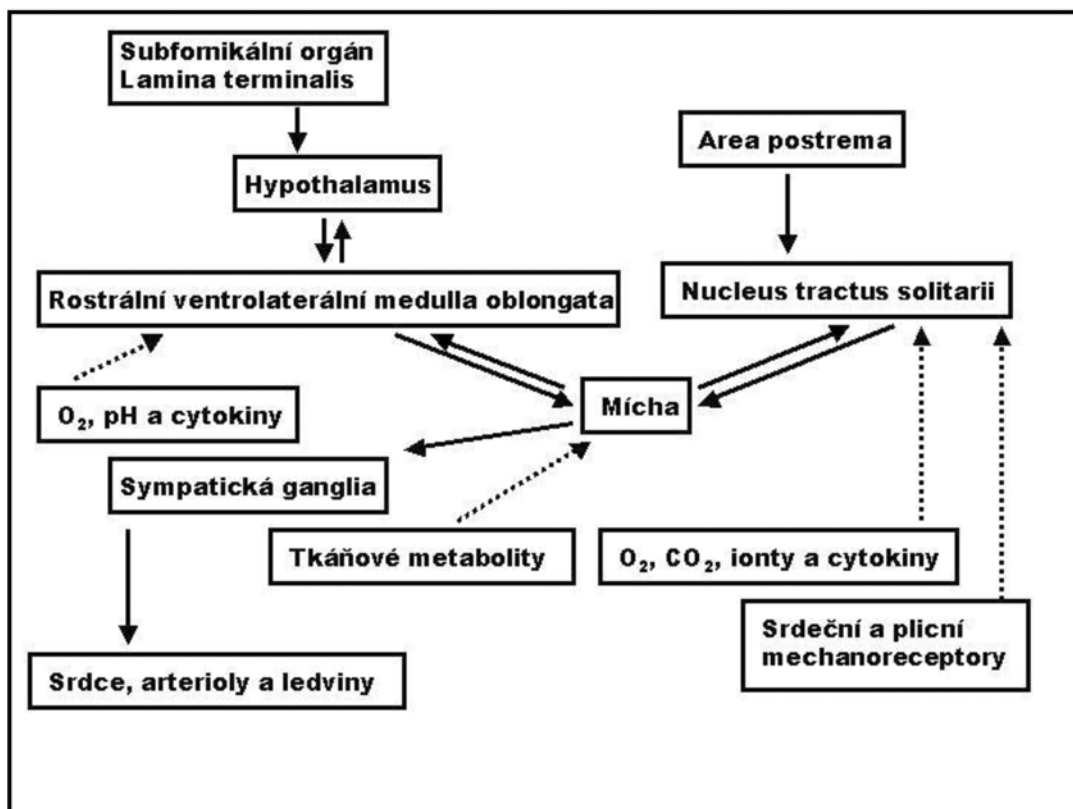
Subarachnoidální krvácení, vznikající zejména na podkladě ruptury aneurysmatu mozkové tepny, je jednou z nejčastějších příčin neurogenního plicního edému. Velmi významná data udává studie Weira (1978), popisující výskyt neurogenního plicního edému u 71 % případů fatálního subarachnoidálního krvácení. Z této studie však vyplývá, že pouze 31 % pacientů

mělo klinické známky plicního edému v období před úmrtím. V rozsáhlé retrospektivní studii na 477 pacientech našli Muroi et al. (2008) neurogení plicní edém u 8 % pacientů. U všech pacientů se jednalo o rozsáhlý plicní edém s výraznou hemoragickou složkou. Edém byl signifikantně častější u pacientů, u kterých se příčina nacházela v dorzální části Willisova tepenného okruhu. Zvýšený intrakraniální tlak byl nalezen u 67 % pacientů s edémem. I když byly u 83 % pacientů nalezeny zvýšené srdeční markery, žádný z pacientů neměl v anamnéze ani v průběhu hospitalizace zjištěnu závažnou srdeční vadu. Neurogení plicní edém měl zásadní dopad na návrat neurologických funkcí; Glasgow Coma Scale (tab. 2) nižší než 4 mělo více než 77 % pacientů s neurogením plicním edémem ve srovnání s 25 % pacientů bez neurogeního plicního edému. V případě subarachnoidálního krvácení byl opakovaně popsán pozdní nástup rozvoje neurogeního plicního edému, který se vyvíjel i několik dní po nejvýznamnější atace krvácení. Kromě toho se zpočátku mírný edém po různém období latence nebo zdánlivé resoluce opět rozvíjí ve výrazně těžší až smrtelný stav (Fisher a Abdoul–Nasr, 1979).

Epileptický záchvat je jednou z nejčastějších netraumatických příčin neurogeního plicního edému. Terminologicky se někdy označuje jako postiktální plicní edém, pokud je nalezen v rámci autopsie u diagnózy náhlého nečekaného úmrtí u epilepsie (angl. sudden unexpected death in epilepsy; SUDEP). Nejčastější příčinou je záchvat typu *grand mal* (Izumida et al., 2017; Kennedy et al., 2015). Neurogení plicní edém se zde vždy rozvíjí v období po vlastním epileptickém záchvatu, u jednoho jedince i vícekrát za život (Colice et al., 1984; Mulroy et al., 1985; Darnell a Jay, 1982). Neurogení plicní edém byl nalezen až u jedné třetiny pacientů s fatálním *status epilepticus* (Simon, 1993; Ohlmacher, 1910). V soudně-lékařské studii Leestma et al. (1989) se neurogení plicní edém dokonce vyskytoval ve 45 z 52 případů epileptických pacientů s nevysvětlenou příčinou smrti – u těchto případů však bylo sporné, zda byl plicní edém skutečnou příčinou smrti. Ve studii Mulroye et al. (1985) bylo zjištěno, že neurogení plicní edém ohrožuje zejména dětské pacienty s epilepsií. Na podkladě roztroušené sklerózy vzniká neurogení plicní edém velmi vzácně, ve světové literatuře je popsáno pouze několik kazuistik. V těchto případech vzniká neurogení plicní edém nejčastěji na podkladě ztráty inhibiční funkce určitých jader mozkového kmene, které umožní hyperaktivaci center neurogeního plicního edému v prodloužené míše mozkového kmene (viz kazuistika 6 v publikaci 13). *Lupus erythematosus* je systémové autoimunitní onemocnění, postihující celou řadu tkání těla. V případě, že postihuje i stěnu plicních cév ve formě vaskulitidy, ledviny ve formě nefritidy nebo působí trombocytopenii, může se stát predisponujícím faktorem při rozvoji neurogeního plicního edému a potencovat tak jeho hemoragickou složku (Chang et al., 2005).

1.7 FUNKČNÍ MORFOLOGIE CENTER ROZVOJE NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

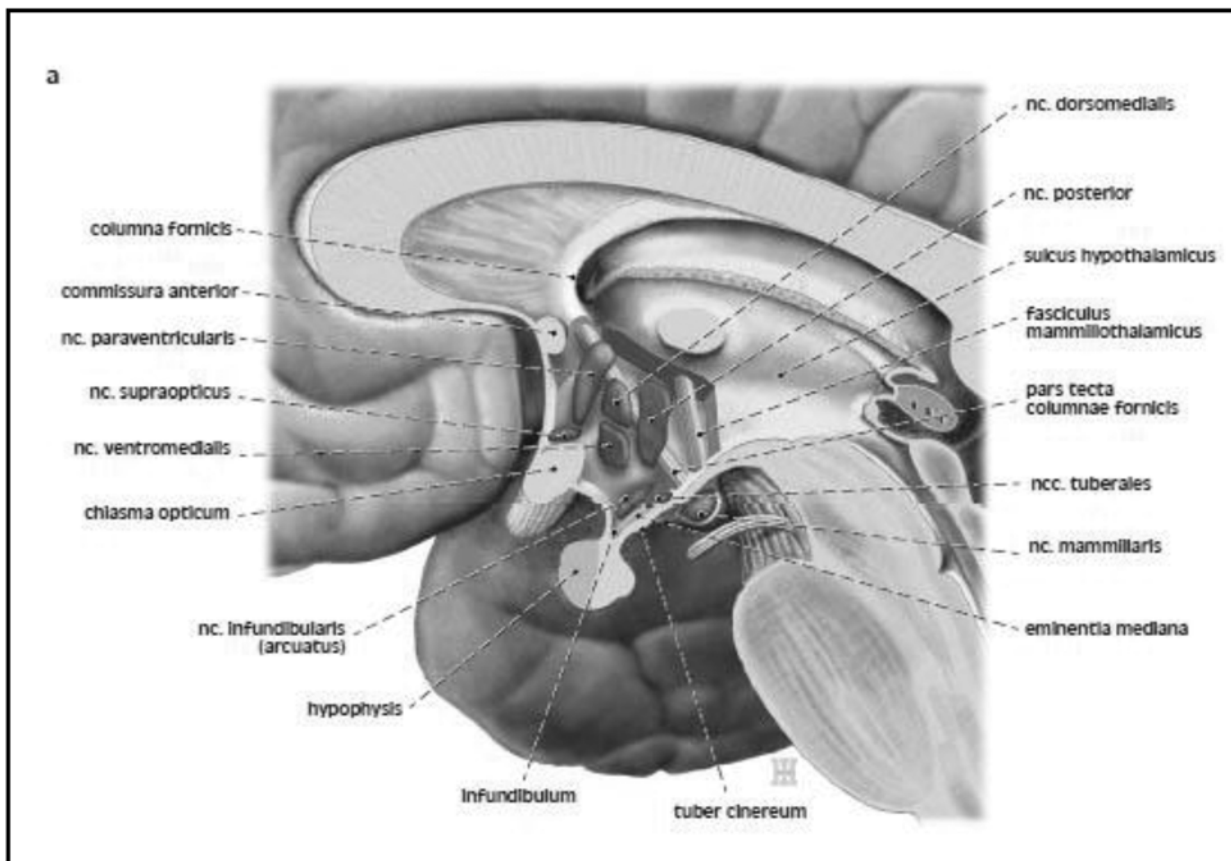
Bylo prokázáno, že neurogení plicní edém vzniká při těžkých poškozeních nejrůznějších částí mozku i míchy. Ačkoli je tedy *a priori* splněna implikace „poškození určitého centra => neurogení plicní edém“, není tím řečeno, že edém nemůže vyvolat poškození jakékoli jiné části centrálního nervového systému. K tomu může přispívat jednak působení zvýšeného intrakraniálního tlaku, jednak vyplavení celé řady neurohumorálních působků z poškozené tkáně centrálního nervstva (obr. 7).



Obr. 7 Systémy centrálního nervového systému, jež se uplatňují v regulaci bazálního sympatického tonu, které jsou zásadní pro udržování klidového krevního tlaku. Hlavními strukturami na úrovni centrálního nervstva jsou rostrální ventrolaterální medulla oblongata, mícha, hypothalamus a nucleus tractus solitarii. Vyšší korové struktury na obrázku nejsou vyobrazeny, neboť mají v regulaci krevního tlaku relativně malý podíl (výjimkou jsou některé případy extrémním stresem indukované hypertenze). Klíčovými vstupy pro centrální nervstvo jsou impulzy z kardiopulmonálních mechanoreceptorů, z nejrůznějších chemoreceptorů a signály zprostředkované tkáňovými působky. Peptidergní regulace je zprostředkována z circumventrikulárních orgánů, kterou zde zastupují subfornikální orgán, organum vasculosum laminae terminalis a area postrema. Regulaci rovněž napomáhají struktury hematoencefalické bariéry (nevyobrazeny). Modifikováno podle Guyenet (2006).

Celá řada experimentálních i klinických prací přímo i nepřímo ukazuje, že vznik neurogenního plicního edému vychází z vasomotorických center rostrální ventrolaterální části prodloužené míchy – adrenergní area A1, inhibující vasokonstrikční sympatický tonus (Blessing et al., 1981), adrenergní area A5, *nucleus tractus solitarii* (Reis et al., 1977), *nucleus dorsalis nervi vagi*, *area postrema* a ventrální medulární *raphe* (Malik, 1985). Blessing et al. (1981) prokázali v experimentech na králících, že bilaterální destrukce A1 katecholaminových neuronů, uložených ve ventrální dorzolaterální *medulla oblongata*, způsobuje v několika pooperačních hodinách smrtelný neurogenní plicní edém. Bilaterální léze těchto jader způsobuje extenzivní sympatickou aktivaci, stimulaci plicních nervových vláken typu C a rozvoj systémové hypertenze a plicního edému. O *nucleus tractus solitarii* je známo, že integruje aferentní chemoreceptivní signály a převádí je na excitační impulsy do nervů ovlivňujících dechové svaly v okamžiku, kdy v jejich blízkosti klesá pH a obsah kyslíku – role *nucleus tractus solitarii* při rozvoji neurogenního plicního edému je proto rovněž podezřívána (Lu et al., 2014). Samotný oxidativní stres mozkové tkáně však byl jako příčina neurogenního plicního edému na zvířecím modelu vyloučen (Khademi et al., 2015).

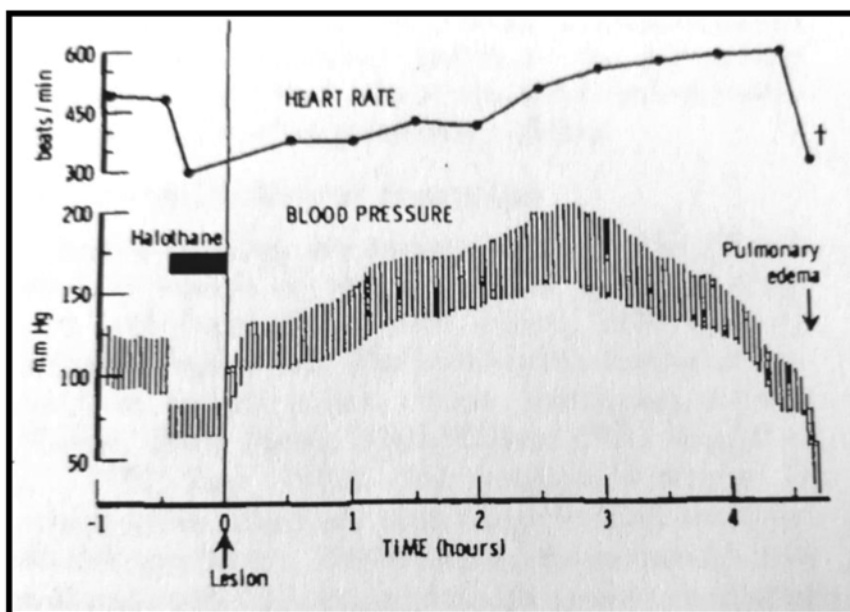
Experimentální model plicního edému u potkanů je indukován vpravením fibrinu do *cisterna magna*, model plicního edému u psů je indukován vpravením alkaloidu veratrinu opět do *cisterna magna* (viz dále), tedy v obou případech do bezprostřední blízkosti výše uvedených jader. Pokud jsou tato jádra skutečně místem vzniku neurogenního plicního edému, významně to podporuje teorii o excesivní aktivaci sympatiku, označované jako katecholaminová bouře (viz dále), jako příčině neurogenního plicního edému. Preventivní funkce alfa-adrenergních blokátorů (fentolamin) při vzniku neurogenního plicního edému tuto teorii jen potvrzují. Kromě toho byly v experimentu s různými výsledky k potlačení rozvoje použity – blokáda cervikálních sympatických ganglií, sympatektomie, adenalektomie a decerebrace. Poměrně dlouhou dobu byla jako centrum rozvoje neurogenního plicního edému podezřívána i některá jádra ventrálního hypothalamu, tehdy nazývaná „edémogenní“, mezi nimi zejména preoptická area (Reynolds, 1963). Pozdější experimenty však prokázaly, že role hypothalamických jader (obr. 8, 9) při rozvoji edému má spíše modulační charakter (Malik, 1985). Stimulace hypothalamických jader v experimentu sice vyvolá sekreci katecholaminů, které v důsledku způsobí zvýšení plicního kapilárního hydrostatického tlaku, jejich množství však není schopno vyvolat plicní edém. Toho bylo dosaženo pouze v případě vpravení alkaloidu akotininu do oblasti ventrálního hypothalamu (Minnear a Connel, 1982).



Obr. 8 Jádra hypothalamu (modře) na sagitálním řezu mozkiem. Podle Grim et al. (2017).

1.8 FUNKČNÍ MORFOLOGIE MECHANISMŮ ROZVOJE NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Celá řada dat a klinických zkušeností ukazuje, že neurogení plicní edém může rovněž způsobit náhlá hyperaktivace většího množství drah, které vedou do center neurogeního plicního edému. Typicky nastává tato situace u subarachnoidálního krvácení (Fontes et al., 2003) nebo u kompresní léze v hrudní části míchy (přehled viz [publikace 9](#)). Experimentální data ukazují, že anestezie, aplikovaná epidurálně nebo intrathekálně do místa léze může rozvoji neurogeního plicního edému zabránit, což lze velmi dobře sledovat i ve vymizení hemodynamické odpovědi (Hall et al., 2002). Experimenty na mechanicky ventilovaných zvířatech také ukázaly, že neurogenímu plicnímu edému můžeme zabránit, pokud provedeme transekcii krční míchy nad úrovní nebo přímo v úrovni míšní C₇ (Chen et al., 1973; Chen a Chai, 1976). V této oblasti se totiž nacházejí dráhy sympatiku, které převádějí tyto autonomní signály do oblasti plic. Vzato z opačného pohledu, rozvoj neurogeního plicního edému můžeme potencovat, pokud míšní dráhy v této úrovni stimulujeme.



Obr. 9 Průběh krevního tlaku (blood pressure) a tepové frekvence (heart rate) u potkana narkotizovaného halothanem, u kterého byla provedena bilaterální elektrolytické poškození jader ventrálního hypothalamu (lesion). Dnes již klasický experiment, který v roce 1975 provedli Nathan a Reis, jenž ukazuje kritický význam správné volby experimentálního modelu. Ač je experiment proveden zcela korektně, jeho podobnost s klinickou praxí je minimální – výsledek experimentu, který prezentuje hemodynamiku rozvoje neurogenního plicního edému jako společnou elevaci krevního tlaku a tepové frekvence (!) vedl k rozsáhlým diskuzím, které pracovaly s fenoménem elevace tepové frekvence jako s nezpochybnitelným faktem, byť jej ve skutečnosti provází její pokles (rozsáhlejší diskuze této problematiky viz publikace 5, 9, 10). Obrázek převzat z Malik (1985).

Epidemiologická data ukazují, že neurogenní plicní edém vzniká zejména při rozsáhlejších poškozeních centrálního nervstva, s výrazným podílem případů se zvýšeným intrakraniálním tlakem (Baumann et al., 2007). V experimentu bylo prokázáno, že při náhlém zvýšení intrakraniálního tlaku dochází ke zvýšení tlaku systémového a mírnému zpomalení srdeční frekvence, již během jedné minuty. Zvýšení systémového a plicního tlaku, spojené se zvýšeným žilním návratem, pozitivně inotropním účinkem na srdce a zvýšeným srdečním výdejem v závislosti na zvýšení tlaku intrakraniálního se označuje jako Cushingův reflex (Simmons et al., 1969a, 1969b). Cílem tohoto reflexního mechanismu je za každou cenu perfundovat otékající tkáň centrálního nervstva proti rostoucí periferní kapilární rezistenci; jeho důsledkem je však plicní edém. Zakladatel neurochirurgie, Harvey William Cushing sám vysvětlil tento reflexní mechanismus na základě skutečnosti, že se v prodloužené míše hodnoty intrakraniálního tlaku přiblíží hodnotám tlaku systémového a mozkový perfuzní tlak klesne pod prahovou hodnotu, při které je mozková cirkulace ještě schopna autoregulace a zajištění 100 % nutričních potřeb (Cushing, 1901).

Při injekci plné krve nebo roztoku albuminu do *cisterna magna* umírá 50 % pokusných zvířat na komplikace spojené se vznikem neurogenního plicního edému. Přitom množství vpravené tekutiny je mnohem důležitější než její složení. Někteří autoři prokázali, že role zvýšeného intrakraniálního tlaku při vzniku neurogenního plicního edému je dána zejména tlakovou ischemií jader prodloužené míchy a deformací mozkového kmene, které vedou ke Cushingově odpovědi, zejména ve smyslu zvýšení krevního tlaku (sympatikus) a poklesu srdeční frekvence (parasympatikus) (Thompson a Malina, 1959). Dnes se ukazuje, že mechanická deformace mozkového kmene má mnohem větší vliv na rozvoj systémové odpovědi, jejíž součástí je i neurogenní plicní edém, než ischemická složka ve smyslu Cushingovy teorie.

Jiní autoři prokázali, že při provedení bilaterální adrenalectomie před zákrokem na míše ke zvýšení systémového tlaku ani změnám srdeční frekvence nedochází (Bravo et al., 2002; Chen et al., 1973; Schoultz a DeLuca, 1974). Na druhé straně, oboustranná vagotomie nemá žádný protektivní efekt při vzniku neurogenního plicního edému, naopak rozsah edému ještě více zhoršuje. Zvýšení intrakraniálního tlaku prokazatelně poškozuje centra v prodloužené míše, která jsou podezřívána ze spuštění sympatické bouře (viz dále). Klinické studie ukazují, že subarachnoidální krvácení z ruptury aneurysmatu v povodí *arteria vertebralis* vede ke vzniku neurogenního plicního edému častěji, než ruptura aneurysmatu v jiné lokalizaci (Ochiai et al., 2001).

Nepřímé důkazy nasvědčují tomu, že ztráta krve může mít „protektivní“ vliv při rozvoji neurogenního plicního edému, neboť se nemohou v dostatečné míře uplatnit významné tlakové změny, způsobené sympatickou bouří. Z doby války ve Vietnamu pochází kazuistika vojáka, který byl střelen nejdříve do břicha a poté do hlavy. Kulka, která zasáhla břišní dutinu, způsobila laceraci *vena cava inferior* a masivní vnitřní krvácení. Voják zemřel na následky poranění mozku, v plicích však nebyly nalezeny žádné známky plicního edému (Simmons et al., 1969a).

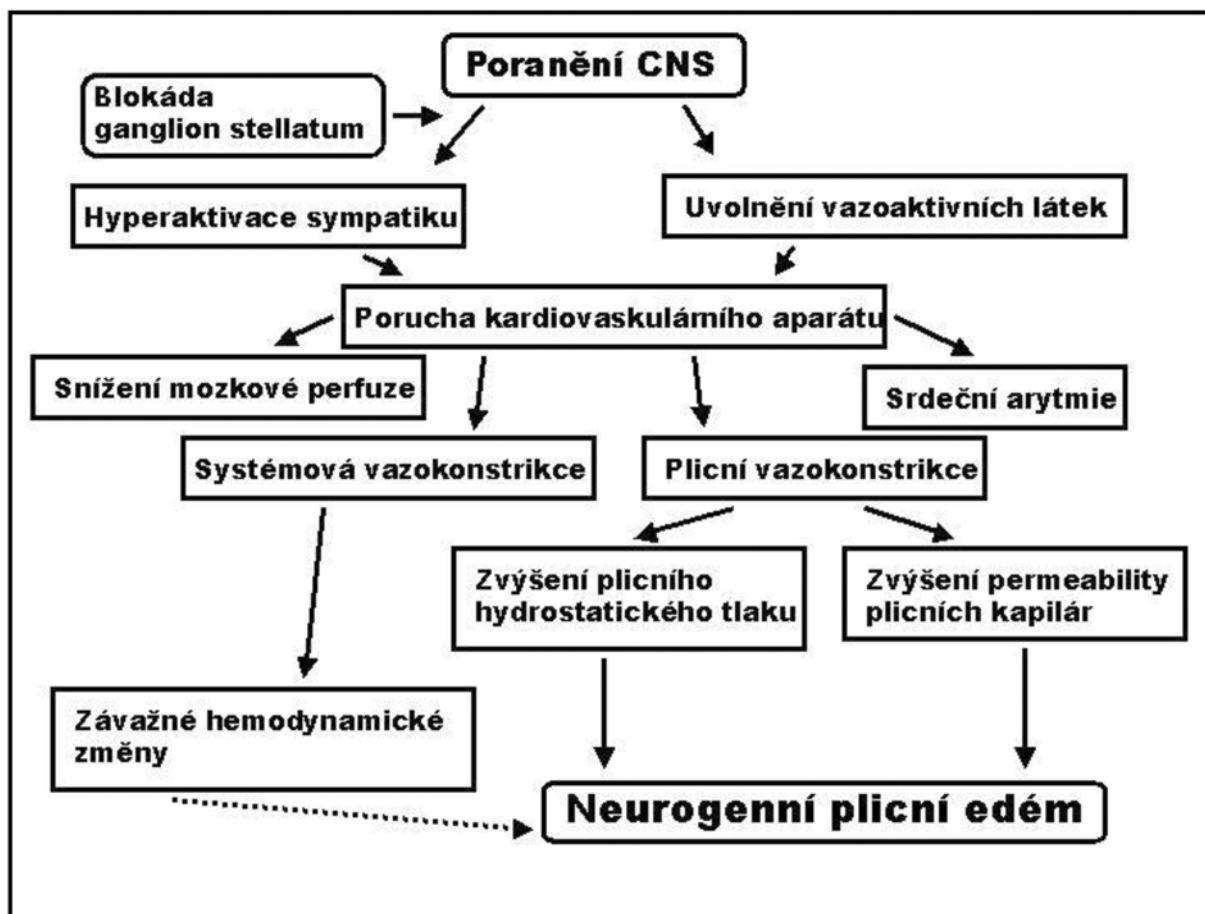
Na vzniku neurogenního plicního edému se nejpravděpodobněji podílí náhle vzniklá systémová alfa-adrenergická stimulace sympatiku a uvolnění vasoaktivních substancí, označovaná jako katecholaminová bouře (angl. catecholamine storm) nebo méně často Cushingova odpověď (angl. Cushing response). Výsledkem je generalizovaná vasokonstrikce a nárůst systémového a plicního tlaku, vedoucí k centralizaci oběhu. Následkem těchto změn je zvýšení plicního hydrostatického tlaku, poškození cévní a alveolární stěny, nárůst permeability alveolární stěny a uvolňování tekutiny a krevních buněk do intraalveolárního prostoru. Teorie patofyziologického mechanismu, která se snaží vysvětlit vznik náhlých

rozsáhlých hemoragií do plicního parenchymu na základě katecholaminové bouře, se označuje jako teorie výbuchu (angl. blast theory) (viz dále).

Role sympatického systému při rozvoji neurogenního plicního edému byla přímo i nepřímo prokázána celou řadou experimentů s využitím nejrůznějších experimentálních modelů. Příkladem je studie Novitzkyho et al. (1986), kteří na opičím modelu zabránili rozvoji neurogenního plicního edému, indukovaného nafouknutím balónku intrakraniálně, chirurgickou sympatektomií. Celkový pohled na tyto experimenty navíc ukazuje, že čím má pokusné zvíře sofistikovanější plicní autonomní systém, tím pravděpodobněji se rozvine neurogenní plicní edém, navíc je o to závažnější. O náchylnosti k jeho rozvoji tedy vypovídá již samotný morfologický substrát (Malik, 1985). Někteří autoři, aby zdůraznili roli plicního řečiště a sympatiku při jeho vzniku, razili pro neurogenní plicní edém termín neurohemodynamický plicní edém (Malik, 1985). Následky katecholaminové bouře jsou zvýšení systémového a plicního krevního tlaku, pokles tepové frekvence, centralizace krevního oběhu, zvýšený venózní návrat, zvýšení levostranného end-diaastolického tlaku, zvýšení kapilárního hydrostatického tlaku a extravazace tekutiny, vedoucí k plicnímu edému.

Za zmínku v tomto kontextu také stojí hypotéza Zhang et al. (2013), která předpokládá, že blokádu sympatického *ganglion stellatum* by bylo možné zabránit rozvoji neurogenního plicního edému. S tímto tvrzením lze souhlasit pouze do určité míry, neboť sympatické nervy ovlivňující srdeční činnost, neprocházejí pouze přes toto ganglion, nýbrž také přes *ganglion cervicale superius et medium* a současně přes druhé až páté *ganglion sympathicum thoracicum* (Eliška a Elišková, 1995), které tato blokáda není schopna postihnout. V kaskádě, kterou Zhang et al. (2013) nabízejí (viz obr. 10) je také nutné odmítnout rozvoj neurogenního plicního edému pouze na podkladě zvýšení plicního hydrostatického tlaku a permeability plicních kapilár, a přitom stavět závažné hemodynamické změny samostatně (viz obr. 10).

V experimentech na zvířatech bylo opakovaně prokázáno, že rozvoji neurogenního plicního edému předchází náhlé významné zvýšení systémového krevního tlaku. Blessing et al. (1981) pozorovali zvýšení systémového tlaku o 40 mm u králíků, kterým experimentálně vyvolali neurogenní plicní edém pomocí bilaterální destrukce A1 neuronů v *medulla oblongata*. Reis et al. (1977) vyvolali neurogenní plicní edém pomocí léze *nucleus tractus solitarii* na modelu laboratorního potkana a předpokládali, že smrt zvířete nastává na základě levostranného srdečního selhání v terénu těžké hypertenze. Blessing et al. (1981) pozorovali zvýšení cévní rezistence v abdominální aortě o 350 %, a to bezprostředně po inzultu, spouštějícím neurogenní plicní edém. Bradykardie je častým průvodním jevem při rozvoji neurogenního plicního edému.

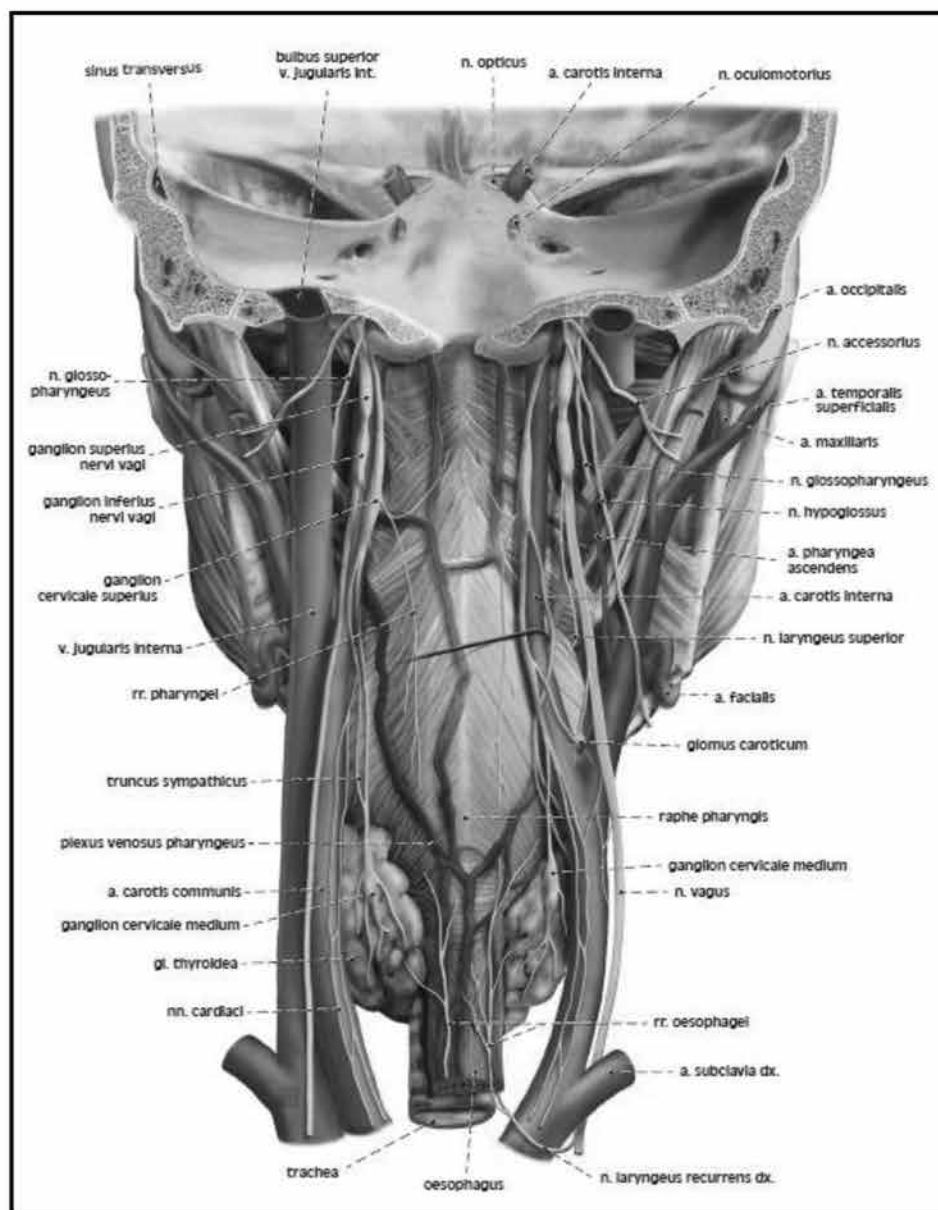


Obr. 10 Hypotéza možné prevence neurogeního plicního edému autorů Zhang et al. (2013), publikovaná v IF časopise *Medical Hypotheses*, která pracuje se sympatikem jako s jedním hlavních etiopatogenetických faktorů v rozvoji neurogeního plicního edému. Hypotéza vychází mimo jiné i z publikací autora (publikace 4, 5, 8, 9), které jsou v článku citovány. Tečkovanou čáru doplnil autor habilitační práce (vysvětlení viz text).

Experimentálně bylo pozorováno, že bradykardie vzniká souběžně s elevací systémového tlaku (Blessing et al., 1981). Pravděpodobným podkladem bradykardie je, podobně jako při aktivaci sympatiku, komprese a ischemie mozkového kmene. Bradykardie přímo následuje zvýšení intrakraniálního tlaku. Jádra mozkového kmene, odpovědná za tuto reakci, jsou pravděpodobně *nucleus tractus solitarii* a *nucleus ambiguus*. Experimentální data ukazují, že osu „mozkový kmen – srdeční frekvence“ není možno velmi ovlivnit změnami systémového krevního tlaku (Guyenet, 2006). Zajímavé je, že experimentální intrakraniální hypertenze na levé straně mozkového kmene má výrazně větší vliv na rozvoj arytmií než na straně pravé. Pravděpodobně je to dáno asymetrickou autonomní periferní inervací srdce (Krasney a Koehler, 1976). Z těchto pokusů je zřejmé, že bradykardie pozorovaná u neurogeního plicního edému může vznikat více na základě ovlivnění center v centrálním nervovém systému, než na podkladě periferního baroreflexu. Bradykardii u neurogeního

plicního edému je možné zvrátit pomocí bilaterální vagotomie nebo léze *nucleus dorsalis nervi vagi*.

Zajímavá je role *nervus vagus*, desátého hlavového nervu (obr. 11), který je jediným zdrojem parasymptiku plic. Stimulace *nervus vagus*, například pomocí acetylcholinu, indukuje plicní vasodilataci a snížení kapilárního hydrostatického tlaku. Působení acetylcholinu je přitom dvojího typu – jednak působí na muskarinové receptory plicní hladké svaloviny cév, která takto ochabuje, jednak v plicním cévním řečišti inhibuje uvolňování katecholaminů (Bergofsky, 1980). Naproti tomu, uvolnění vazoaktivního intestinálního polypeptidu z *nervus vagus* je příkladem působení alternativní, non-cholinergní, non-adrenergní cesty.



Obr. 11 *Nervus vagus v kontextu topografie parafaryngeálního a retrofaryngeálního prostoru. Pohled z dorzální strany. Podle Grim et al. (2017).*

V experimentech na morčeti, králíkovi a potkanovi bylo ukázáno, že oboustranné přetěti *nervus vagus* (bilaterální vagotomie) je schopno samo o sobě vyvolat plicní edém. Ačkoli byl tomuto edému původně přiřazován stejný patofyziologický mechanismus jako edému neurogennímu – tj. excesivní aktivace sympatiku na základě vyřazení parasympatiku, tedy ono úplné odstranění závaží z jedné misky vah a úplné převážení misky druhé (Schmitt a Meyers, 1957), další experimenty tyto úvahy nepotvrdily. Ukázalo se totiž, že bilaterální vagotomie pod odstupem *nervus laryngeus recurrens* plicní edém nevyvolává a byly tak potvrzeny úvahy skeptiků, kteří tvrdili, že tento druh edému je způsoben obstrukcí dýchacích cest v důsledku laryngeálního a bronchiálního spasmu. Obstrukce dýchacích cest vyústí ve zvýšené nasávání a hromadění vzduchu v postižených plicních segmentech. V nepostižených plicních segmentech vzniká reflexním mechanismem negativní intersticiální tlak, který vyústí ve zvýšení transkapilárního filtračního tlaku v převzdušněných částech plic a dochází k rozvoji plicního edému. Nakonec se ukázalo, že bilaterální vagotomie pod odstupem *nervus laryngeus recurrens* nemá ani stupňující, ani protektivní vliv na rozvoj neurogenního plicního edému (Malik, 1985).

Sympatická a parasympatická visceromotorická inervace plicního řečiště ovlivňuje tonus plicních cév. Jakákoli změna eferentní autonomní aktivity může zvýšit nebo snížit plicní kapilární hydrostatický tlak (Bergofsky, 1980). Je nepochybné, že změny v hodnotách kapilárního hydrostatického tlaku se zásadním způsobem uplatňují při vzniku neurogenního plicního edému. V důsledku zvýšené sympatické aktivity dochází ke zvýšení systémového tlaku, centralizaci oběhu a tím i zvýšenému množství krve ve vysokotlaké centrální části oběhu. Toto zvýšení tlaku je jednak na vrub samotnému poškození míšní tkáně, jednak zvýšení intrakraniálního tlaku a působení na centra v prodloužené míše. Na tak náhle zvýšené nároky zřejmě nemůže srdce, zejména levá komora, dostatečně zareagovat a pravděpodobně dochází ke snížení množství krve přečerpané levým srdcem a městnání krve v nízkotlakém cévním systému plic. Bylo prokázáno, že existuje korelace mezi tlakem v levé předsíni a stupněm neurogenního plicního edému (Malik, 1985). Tato tvrzení podporuje i paralelní zjištění nižšího krevního průtoku v aortě na modelu neurogenního plicního edému (Malik, 1985). Dochází tak k náhle vzniklému enormnímu nárůstu kapilárního hydrostatického tlaku, extrémním změnám a vzniklé nerovnováze Starlingových sil, působících na stěnu kapilár, exsudaci tekutiny a při překročení určitých hodnot i k poškození až popraskání stěn kapilár a vzniku krvácení, které je častým doprovodným znakem neurogenního plicního edému a může být příčinou úmrtí pacienta. Role sympatikem-aktivované plicní venokonstrikce, a na jejím základě vzniklé další zvýšení kapilárního hydrostatického tlaku a plicní vaskulární permeability, není rovněž zanedbatelná (Dauber a Weil, 1983). Hypotéza o zásadní roli

zvýšeného kapilárního hydrostatického tlaku je podpořena i zjištěním nízkého sérového poměru tekutina–proteiny u zvířat s neurogenním plicním edémem (Smith a Matthay, 1997).

Nezanedbatelnou roli v rozvoji plicního edému hraje i použité anestetikum, ať již v kontextu chirurgických operací, tak v experimentálním designu na pokusných zvířatech. U inhalačního anestetika isofluranu bylo ukázáno, že indukuje reversibilní snížení alveolární epiteliální tekutinové clearance a snižují tak práh pro vznik plicního edému. Isofluran také inhibuje mitochondriální oxidaci, což vede ke snížené produkci ATP v pneumocytech II. typu a stimuluje tak produkci laktátu v těchto buňkách. Navíc snižuje syntézu fosfatidylcholinu a indukuje apoptózu pneumocytů II. typu, což zásadním způsobem poškozuje surfaktant. U intravenózních anestetik typu pentobarbitalu nebo kombinace ketaminu–xylazinu tento nežádoucí efekt zjištěn nebyl. Použití isofluranu tedy primárně vytváří podmínky pro vznik neurogenního plicního edému. Navíc, nízké koncentrace isofluranu zřejmě zvyšují stres pokusného zvířete a vznik neurogenního plicního edému je dále potencován. Při použití jiných anestetik, jako je např. lidokain, ketamin, xylazin, pentobarbital, halothan a sevofluran byl během vytváření míšňí léze v experimentu rovněž pozorován rozvoj neurogenního plicního edému, doprovázeného krvácením (Leal Filho et al., 2005a, 2005b). Zvýšení tlaku v nízkotlakém plicním řečišti navíc působí barotrauma endotelu plicních kapilár a poruchy kapilární permeability jsou tak dále stupňovány. Výsledkem je exsudace tekutiny až protržení kapilární stěny, vedoucí ke krvácení. Permeabilitu plicních kapilár zvyšuje neuropeptid Y, adrenalin a noradrenalin.

Oxid dusnatý je mediátor, syntetizovaný z L-argininu pomocí enzymu NO syntázy, který je mimo jiné podezříván i z rozvoje neurogenního plicního edému. Anand et al. (1998) ukázali, že intravenózní aplikace L-argininu dokázala zabránit nadměrnému zvýšení permeability plicních kapilár u plicního edému vzniklého v souvislosti s nadmořskou výškou (angl. high-altitude pulmonary edema). Některé studie naznačují, že oxid dusnatý původem z prodloužené míchy je schopen zabránit neurogennímu plicnímu edému (Hamdy et al., 2000, 2001; Kondo et al., 2004). Kromě toho bylo ukázáno, že injekce inhibitorů NO syntázy do těsné blízkosti *nucleus tractus solitarii* a rostrální ventrolaterální *medulla oblongata* zvýší tonus sympatiku (Hironaga et al., 1998; Zanzinger et al., 1995) a může tedy působit jako faktor přispívající k rozvoji či k horšímu průběhu neurogenního plicního edému.

Z řady experimentů vyplývá, že zvýšený krevní tlak hraje sice velmi důležitou roli, není však jediným zdrojem rozvoje neurogenního plicního edému. V roce 1981 provedli Hoff et al. pokus, ve kterém modelovému zvířeti pomocí pouštění žilou regulovali tlak na normálních hodnotách v kritické době rozvoje neurogenního plicního edému. Neurogenní plicní edém byl

sice menšího rozsahu, jeho rozvoj byl však pravidlem (Hoff et al., 1981). Podobnou zkušenost máme i u našich experimentálních zvířat – pokud zvíře během výkonu v rámci experimentálního poranění míchy více krvácí, existuje menší pravděpodobnost, že zemře na následky neurogenního plicního edému; edém však vytvořen bude (Šedý, Zicha, nepublikováno). Tato zjištění odpovídají hemodynamickým vlastnostem krevního řečiště.

Epitel alveolární stěny hraje kritickou úlohu při minimalizaci vlhkosti intraalveolárního prostoru vzdušných plicních sklípků, která je nezbytná pro správnou výměnu plynů. Mnohé studie ukazují klíčovou roli epitelu alveolární stěny při absorpci a reabsorpci isotonické tekutiny z intraalveolárního prostoru plicních sklípků proti vzrůstajícímu osmotickému gradientu do lumina plicních kapilár. Je známo, že hlavní podíl na tomto procesu má transport Na^+ a K^+ iontů, což lze nepřímo prokázat inhibicí procesu vstřebávání tekutiny z intraalveolárního prostoru amiloridem a ouabainem. Porušení této iontové rovnováhy může potencovat vznik neurogenního plicního edému.

Nověji je v etiopatogenezi neurogenního plicního edému diskutována teorie výbuchu (blastická teorie), jež předpokládá poškození jemných plicních cév a následný vzestup permeability jejich stěn v důsledku náhlého vzestupu plicního vaskulárního tlaku, který může být iniciován například plicním vazospasmem nebo náhlým zvýšením žilního návratu do plic. Blastickou teorii podporují experimenty West et al. (1992a, 1992b), kteří prokázali poškození stěn plicních kapilár při překročení tlaku 40 mm Hg. Slabinou této teorie je opakované experimentální i klinické zjištění, že plicní vaskulární hypertenze nemusí být nutně přítomna u všech případů neurogenního plicního edému (Bowers et al., 1979; Touho et al., 1989). Kromě toho bylo zjištěno, že zvýšený plicní tlak v důsledku poškození centrálního nervového systému nemusí vždy vést k neurogennímu plicnímu edému (Landolt et al., 1983).

Rozvoj a stupeň neurogenního plicního edému ovlivňuje celá řada farmak a neurohumorálních působků. Mezi nejvýznamnější a nejčastěji diskutované patří adrenalin, noradrenalin, neuropeptid Y. Adrenalin a noradrenalin hrají prokazatelně roli v průběhu katecholaminové bouře, infuze adrenalinu a noradrenalinu však *per se* neurogenní plicní edém nezpůsobuje (Rossel, 1980). Neuropeptid Y je neurohumorální působek, který má celou řadu farmakologických účinků, jako např. antinociceptivní, anxiolytický a orexigenní (zvyšující chuť k jídlu) a roli v modulaci cirkadiálního rytmu (Naveilhan et al., 2001). Pokud je experimentálně do plic vpraven neuropeptid Y, který je mimo jiné společně s noradrenalinem vylučován sympatickými nervy a zvyšuje tak stupeň plicní vazodilatace a plicní vaskulární permeabilitu, reaguje organismus pokusného zvířete zvýšením plicní vaskulární permeability a vznikem plicního edému. Neuropeptid Y přitom působí přímo na

endotelové buňky. Neuropeptid Y je schopen působením na GABAergní, glutamatergní a dopaminergní nervové dráhy ovlivňovat hloubku anestezie na úrovni centrálního nervového systému (Naveilhan et al., 2001). Různé druhy anestetik, jako např. pentobarbital nebo ketamin, jsou zpětně schopny ovlivňovat receptory pro neuropeptid Y a v důsledku pak i modulovat vznik neurogenního plicního edému (Leal Filho et al., 2005a, 2005b). Experimentální údaje ukazují, že endogenní opioidy (např. endorfiny) jsou zodpovědné za zvýšení plicní vaskulární permeability a objem extravaskulární tekutiny na podkladě zvýšení nitrolebního tlaku (Peterson et al., 1983). Tato zjištění jsou založena na základě pozorovaného protektivního vlivu naloxonu (antagonista opioidních receptorů) při rozvoji neurogenního plicního edému. Bylo prokázáno, že podání fentolaminu je schopno zabránit rozvoji neurogenního plicního edému (Maron a Dawson, 1980; Malik, 1985; Hakim et al., 1979). Experimentální i klinická data ukazují, že beta-adrenergní složka je při rozvoji neurogenního plicního edému méně významná. Colgan et al. (1983) ukázal na psím modelu hypertenze, že propranolol redukuje plicní intravaskulární tlak a rozsah plicního zkratu.

Důsledkem závažných hemodynamických změn, k nimž dochází v průběhu rozvoje neurogenního plicního edému, může být i sekundární poškození myokardu. Syndrom bývá často označován jako syndrom myokardiálního otřesu (angl. neurogenic stunned myocardium) nebo Tako-Tsubo kardiomyopatie (Mierzewska-Schmidt et al., 2015). Projevuje se nejčastěji reverzibilní generalizovanou hypokinézou srdečního svalu, doprovázeného sníženou ejekční frakcí. Vznik syndromu myokardiálního otřesu je nejpravděpodobněji způsoben náhlým vzestupem sérových katecholaminů, který je jedním z mechanismů, spouštějících neurogenní plicní edém. Zvýšení katecholaminů bylo u pacientů doloženo v několika kazuistikách; Weiss a Meyer (2015) jej například pozorovali společně s prolongovanou hypertenzí a zvýšením specifické myokardiální kreatinkinázy a troponinu T u pacienta s těžkým neurogenním plicním edémem jako následkem po subarachnoidálním krvácení, vzniklém na podkladě ruptury aneurysmatu. Kromě toho se může podílet i katecholaminy vyvolaný nárůst systémové cévní rezistence. Syndrom je podmíněn generalizovaným výskytem mikronekróz v srdečním svaly (Marshall a Nyquist, 2009). Mimořádně důležité je zjištění, že navzdory tomu, že syndrom myokardiálního otřesu vede v akutním stadiu často k výraznému zhoršení až smrti pacienta, při zvládnutí této situace nezanechává na myokardu téměř žádné funkčně-morfologické stopy a v průběhu 4–5 dnů se spontánně upraví. V těchto místech tedy spočívá velký potenciál pro budoucí výzkum, jehož cílem by mělo být terapeuticky ochránit srdeční sval proti působení negativního vlivu neurogenního plicního edému a pomoci mu aktivně překlenout nejtěžší období, s výhledem vědomí, že v následujícím období bude schopen spontánní restituace *ad integrum*.

Diferenciálně diagnosticky může být někdy obtížné odlišit syndrom myokardiálního otřesu od infarktu myokardu (Seow et al., 2007).

1.9 NÁSLEDKY NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Neurogenní plicní edém má celou řadu důsledků, z nichž nejvýznamnější je omezení kapacity plic v důsledku omezení plochy pro výměnu dýchacích plynů a z toho vyplývající snížení množství kyslíku v organismu – hypoxie. Dochází ke zvětšení vzdálenosti mezi alveolárním vzduchem a krví a rovněž zmenšení celé plochy, určené pro výměnu plynů, což vede ke snížení množství kyslíku, který může difundovat přes alveolo-kapilární membránu (Khademi et al., 2015). Vyplnění alveolů tekutinou se zachovaným průtokem krve v bezprostředním okolí zaplavených alveolů způsobuje vznik pravolevého plicního zkratu. Zvýšení obsahu tekutiny v plicích a případné poškození alveolů, provázené snížením koncentrace surfaktantu vede ke snížení poddajnosti plicní tkáně a zvýšení úsilí, které je nutné vynaložit k dechové funkci. Významným nebezpečím neurogenního plicního edému je také náhlý a velmi razantní rozvoj, který může během několika minut ukončit život pacienta. V jeho patogenezi hraje významnou úlohu hemoragická složka, která je nejvíce vyjádřena právě u tohoto typu plicního edému. Vznik neurogenního plicního edému může být navíc potencován plicní kapilární vasokonstrikcí nebo změnami ve stěnách plicních cév v důsledku systémové choroby.

Plicní edém může rovněž zvyšovat odpor dýchacích cest kladený proudění vzduchu, které tkví v omezení průsvitu drobných bronchiolů peribronchiálním edémem, reflexním bronchospasmu a v těžších případech i vlastním zaplavením dýchacích cest tekutinou. Rizikem neléčeného neurogenního plicního edému je rozvoj pneumonie, atelektázy a pleurálního výpotku.

Poruchy ventilace se již tradičně rozdělují na obstrukční a restriční formy. Podkladem obstrukční poruchy je snížení objemu vzduchu, který je dopraven k částem plicního parenchymu, schopným ventilace. Naopak podstata restriční poruchy tkví v zmenšení (restriční) množství funkčního parenchymu plic, schopného ventilace. Z tohoto pohledu se při vzniku dušnosti u neurogenního plicního edému uplatňují oba tyto faktory. Obstrukční mechanismus je dán zaplněním dýchacích cest edematózní tekutinou a krví, restriční mechanismus destrukcí alveolokapilárních membrán parenchymu a prokrvácením intersticia.

1.10 OSTATNÍ KLINICKÉ ASPEKTY NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Celá řada studií i klinických zkušeností naznačuje, že neurogení plicní edém je v humánní medicíně velmi komplikovanou klinickou jednotkou, a to nejen z hlediska etiopatogeneze. Studium dalších aspektů této problematiky, zejména podrobností anamnézy, vyšetření, diferenciální diagnostiky a terapie přesahuje zaměření této práce, proto zde nejsou dále rozváděny – byly však autorem dříve podrobně zpracovány v monografii týkající se neurogeního plicního edému (viz *publikace 13*). Tato monografie rovněž obsahuje příznačné kazuistiky neurogeního plicního edému ze světové literatury, komentované autorem v kontextu jeho experimentální práce (viz *publikace 13*, s. 38-46).

Neurogení plicní edém je navzdory své vysoké mortalitě a dosud ne zcela dokonale poznané patofyziologii a poměrně omezeným terapeutickým možnostem relativně málo experimentálně studovanou oblastí. Výzkum neurogeního plicního edému se ve světě omezuje nejčastěji na publikaci kazuistik z klinické praxe, retrospektivních studií, přehledových článků a pouze výjimečně na experimentální práce, kde je však problematika neurogeního plicního edému studována pouze okrajově nebo jako vedlejší fenomén. Vzhledem k tomu, že ve světě v této chvíli není vytvořena skupina vědců, která by tento problém cíleně studovala, může být příspěvek českých vědců i vytvoření experimentální skupiny pro studium etiopatogeneze neurogeního plicního edému, přínosem.

2 CÍLE PRÁCE

- 1.** Objasnit úlohu anestezie v rozvoji neurogenního plicního edému a stanovit rozsah poškození plic u různých koncentrací anestezie.
- 2.** Vytvořit experimentální model neurogenního plicního edému.
- 3.** Stanovit funkční a morfologický neurologický dopad neurogenního plicního edému u zvířat s těžkým plicním edémem, navozeným epidurální balónkovou míšní lézí v isofluranové anestezii o nízkých koncentracích.
- 4.** Optimalizovat protokol míšního poškození u laboratorního potkana.
- 5.** Stanovit dopad postupné gradace expanze balónku v míšním kanálu na hemodynamické změny a stupeň rozvoje neurogenního plicního edému.
- 6.** Zjistit úlohu jiných experimentálních modelů poranění míchy na rozvoj neurogenního plicního edému.
- 7.** Detailně objasnit hemodynamické změny provázející vznik a rozvoj neurogenního plicního edému.
- 8.** Vyhodnotit roli oxidu dusnatého v rozvoji neurogenního plicního edému.
- 9.** Objasnit roli sympatického nervového systému v rozvoji neurogenního plicního edému.
- 10.** Posoudit úlohu náhlé hyperaktivace míšních drah a zvýšení intrakraniálního tlaku v rozvoji neurogenního plicního edému.
- 11.** Pokusit se nalézt preventivně–terapeutické modality, kterými by bylo možné v budoucnu minimalizovat nebo zvrátit rozvoj neurogenního plicního edému.
- 12.** Přispět k diskuzi o neurogením plicním edému formulací vlastní hypotézy o etiopatogenetickém mechanismu nízkého stupně anestezie na rozvoj neurogenního plicního edému.
- 13.** Prezentovat komplexně problematiku neurogenního plicního edému odborníkům v ČR formou přehledového článku a monografie.

3 METODICKÉ POSTUPY

Ve studiích byla použita velká řada metodických postupů, z nichž nejvýznamnější jsou stručně uvedeny v následujícím přehledu. Podrobný popis jednotlivých experimentálních procedur a design jednotlivých experimentů je uveden v jednotlivých příložených publikacích v druhé části práce.

Laboratorní zvířata a modely

V experimentální části práce, prováděné v laboratorních podmínkách sloužil jako model laboratorní **potkan kmene Wistar** o definované váze. Do studie byli zařazeni pouze samci, neboť bylo prokázáno, že charakter a intenzita regenerace tkání se u samic může lišit v závislosti na hormonálních cyklech (Luize *et al.* 2008; *publikace 11*). Studie byly prováděny v souladu s nařízením Evropské komise (the European Communities Council Directive) ze dne 24. 11. 1986 (86/609/EEC), týkajícího se nakládání s experimentálními zvířaty a schváleny příslušnou etickou komisí. Potkani byli ustájeni v akreditovaných zvěřincích v prostorách Akademie Věd ČR, v.v.i., kde jim byla poskytnuta potrava i voda *ad libitum* (*publikace 1–5*), pokud design experiment nevyžadoval jinak (*publikace 6*).

MODEL POKRANĚNÍ MÍCHY – základním experimentálním modelem, ze kterého vycházely další studie, byl **model balónkové kompresní míšní léze**, který vyvinuli Vanický *et al.* (2001). Model využíval k indukci míšního poranění Fogartyho katétr, zasunutý do epidurálního prostoru do výše míšního Th8–9, který po nafouknutí na objem 15 μ l vyvolal kompresní poranění míchy (transverzální míšní lézi), odpovídající v klinickém obraze paraplegii. Po uplynutí doby 5 minut byl katétr vyfouknut, vyjmut a provedena sutura tkání ve vrstvách. Tento výkon byl prováděn při definované teplotě, aby byl vyloučen efekt hypotermie a hypertermie v patofyziologii míšního poranění (Cambria *et al.*, 1997; Urdziková *et al.*, 2006). Model jsme modifikovali pro účely našich studií (*publikace 1–6*). Kromě toho byla prováděna **transekce** a **hemisekce** míchy vlastního designu (*publikace 1 a 14*).

MODEL NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU – pro účely dalšího studia jsme vytvořili a dále používali vlastní model neurogenního plicního edému u potkana (*publikace 2*), který vycházel z původního modelu balónkové kompresní míšní léze podle Vanického *et al.* (2001), doplněný o kontinuální monitoraci hemodynamických parametrů a řadu dalších experimentálních procedur, popsanych níže.

MODEL HYPERTENZE – v rámci studia vlivu hypertenze na rozvoj neurogenního plicního edému jsme studovali následující inbrední kmeny dospělých potkanů: (1) **spontánně hypertenzní potkany** (angl. spontaneously hypertensive rats; SHR), (2) **sůl–rezistentní Dahlovy potkany krmené dietou s nízkým obsahem soli** (angl. salt-resistant Dahl rats with low-salt diet; DR–LS), (3) **sůl–rezistentní Dahlovy potkany krmené dietou s vysokým obsahem soli** (angl. salt-resistant Dahl rats with high-salt diet; DR–HS), (4)

sůl–senzitivní Dahlovy potkany krmené dietou s nízkým obsahem soli (angl. salt–sensitive Dahl rats with low–salt diet; DS–LS), (5) **sůl–senzitivní Dahlovy potkany krmené dietou s vysokým obsahem soli** (angl. salt–sensitive Dahl rats with high–salt diet; DS–HS). Dietu tito potkani přijímali celkem 4 týdny. Dieta s nízkým obsahem soli obsahovala 0.3 % NaCl, zatímco dieta s vysokým obsahem soli obsahovala 8 % NaCl (*publikace 6*).

Experimentální postupy

Ve studiích byla použita velká řada experimentálních procedur, ze kterých je v následujícím přehledu vybrány nejvýznamnější.

ANESTEZIE – k anestezii experimentálních zvířat byla ve většině studií použita inhalační **isofluranová anestezie** o koncentraci 1,5–3 % ve vzduchu, při proudu anestetické směsi 300 ml/min. K aplikaci byla využita individualizovaná nosní maska a přístroj Isofluran vapor (*publikace 2*). Koncentrace anestetika byla volena v závislosti na typu dané studie, s ohledem na výsledky naší metodické studie na toto téma (*publikace 1*). V některých studiích jsme rovněž využívali celkovou anestezii pentobarbitalem o koncentraci 60 mg/kg (*publikace 1 a 2*) nebo lokální epidurální anestezii 100 µl mesocainu o koncentraci 10 mg/ml (*publikace 5*).

MONITORACE HEMODYNAMICKÝCH PARAMETRŮ – arteriální krevní tlak a tepová frekvence byly monitorovány u potkanů pomocí systému PowerLab system (AD Instruments, Colorado Springs, USA) a to po zavedení monitorovací kanyly u anestezovaného zvířete do *arteria carotis communis* (*publikace 1, 3–6*).

APLIKACE FARMAK – ve studiích byla experimentálním zvířatům aplikována poměrně velká plejáda nejrůznějších farmak, buď k primárnímu účelu, který měla plnit (analgetika, antibiotika, imunosupresiva) nebo jako součást studie jejich efektu v daném experimentálním designu. Podrobnosti o jednotlivých léčivech i jejich dávkách a způsobech aplikace jsou uvedeny v příložených publikacích.

BEHAVIORÁLNÍ TESTOVÁNÍ – potkani ve studiích týkajících se míšního poranění byli v pooperačním období testováni z hlediska neurologických funkcí (*publikace 1 a 11*). Testování zvířat prováděli dva zkušení experimentátoři (autor společně s někým z týmu, zpravidla s Dr. Urdzikovou), u kterých bylo předem prokázáno, že se shodnou ve více než 95 % případů. Motorika pánevních končetin byla testována pomocí BBB testu (Basso et al., 1995), senzitivní funkce pánevních končetin byla testována pomocí komerčně dostupného plantárního testu (Ugo Basil, Comerio, Italy). Důvody volby právě těchto testů a současně i jejich přínosy a možná rizika ve studiu poranění míchy byly široce diskutovány v našem přehledovém článku (*publikace 11*).

RTG ZOBRAZENÍ – pomocí dentálního RTG přístroje (Prostyle Intra, Planmeca Oy, Helsinki, Finland) jsme u potkanů prováděli předozadní snímky hrudníku (*publikace 1 a 2*).

ZOBRAZENÍ MAGNETICKOU REZONANCÍ – k tomuto účelu jsme využívali přístroj Bruker Biospec 47/20, 4.7T, 20 cm, opatřený 200 mT/m gradientním systémem, jehož komora byla přizpůsobena k provedení vyšetření u potkanů. Potkani byli při vyšetření v celkové inhalační anestezii, přičemž byla monitorována jejich dechová frekvence přístrojem Graseby respiration sensor (Graseby, UK) a srdeční funkce pomocí EKGHR2 monitoru (Rapid, Germany). Vyšetření v T2 váženém obraze probíhalo u potkanů v celkové anestezii. Dle zadání studie bylo provedeno MR zobrazení míchy (*publikace 1*).

ANALÝZA KRVE – některé experimenty vyžadovaly stanovení **hladiny adrenalinu a noradrenalinu** v krvi pomocí komerčního kitu 2-CAT RIA kit (LDN, Hamburg, Germany), jehož senzitivita pro stanovení těchto katecholaminů byla 0,03 ng/ml (*publikace 5*).

HISTOLOGICKÉ A IMUNOHISTOCHEMICKÉ ZPRACOVÁNÍ – pokud to vyžadovalo zadání studie, bylo provedeno klasické histologické vyšetření tkání, barvených hematoxylin–eosinem, luxolovou modří či kresylvioletí (*publikace 1 a 2*). Klasické a nejjednodušší vyhodnocení stupně neurogenního plicního edému bylo prováděno pomocí standardního histologického zpracování plicní tkáně a jejího obarvením hematoxylinem–eozinem. Toto zpracování však s sebou přináší změnu hydratačního stavu tkáně v průběhu fixace, dehydratace a zalévání do parafinu. Zvážené a posouzené plíce byly fixovány 4% paraformaldehydem ve fosfátovém pufru imerzí po dobu 1–2 dní. Tkáně byly následně odvodněny vzestupnou řadou ethanolů, prosyceny benzenem a dále parafinem a nakonec zalaty do parafinu. Parafinové řezy, silné 5 µm byly připevněny na sklíčko pomocí směsi bílku s glycerinem na tepelné destičce. Dále byly řezy odparafinovány pomocí xylenu, rehydratovány pomocí sestupné řady alkoholů a barveny hematoxylinem–eozinem (*publikace 1 a 2*).

VIZUÁLNÍ ANALÝZA PLICNÍHO EDÉMU – pro minimalizaci posmrtných změn na plicích a vyvarování se jejich poškození byl proces vyjímání plic ještě před započítím pokusů nacvičen tak, aby netrval déle než 30 sekund. Při vyjímání plic byl brán zřetel na zachování celistvosti plicního parenchymu a odstřížení cév plicního hilu v úrovni jejich výstupu z plic za účelem minimalizace změny jejich hmotnosti pro následné stanovení plicního indexu (viz dále).

Stupeň subpleurálního krvácení do plic je hodnocen makroskopicky, bezprostředně po vyjmutí plic z hrudníku potkana a jejich *zvážení* (*publikace 1*). Každá plíce je posuzována zvlášť a zařazena do jednoho z následujících stupňů: (i) **zdravá plíce** (žádné krvácení na povrchu plic), (ii) **stupeň I** (maximálně 10 % povrchu plic je prokrváčeno), (iii) **stupeň II** (25–50 % povrchu plic prokrváčeno) a (iv) **stupeň III** (více než 50 % povrchu plic je prokrváčeno). Mírný stupeň krvácení v oblasti plicního hilu, cca. 2 mm v průměru, je standardním nálezem, souvisejícím s odříznutím plicních cév. Po odběru plic byla na závěr provedena pitva zvířete z hlediska možných nálezů na dalších orgánech.

HMOTNOSTNÍ ANALÝZA PLICNÍHO EDÉMU – ke zjišťování stupně plicního edému byla použita jednoduchá, avšak velmi citlivá technika stanovení tzv. **plického indexu** (Leal Filho et al., 2005a, 2005b), který v podstatě odráží relativní hmotnost plic. Tento index byl spočítán jako podíl mokré hmotnosti plic a tělesné hmotnosti zvířete v gramech. Normální hodnoty plicního indexu se pohybují mezi 0,44–0,49. Plicní index mezi 0,50–0,55 svědčí o zvýšeném množství tekutiny na úkor intersticiálního edému a vaskulární kongesce a odpovídá lehkému stupni neurogenního plicního edému. Plicní index nad 0,55 je již známkou středně těžkého neurogenního plicního edému, u kterého je již vyjádřena intraalveolární složka, plicní index nad 0,8 již vypovídá o velmi těžkém stupni plicního edému, na který pokusná zvířata často umírají. Obecně jsme pozorovali, že závažný plicní edém vykazoval hodnoty plicního indexu nad 0,7 (publikace 1–6). Výhodou použití plicního indexu bylo, že plicní tkáň jsme mohli dále histologicky zpracovávat (publikace 1 a 2). Možnou alternativou ke stanovení plicního indexu je stanovení a porovnání suché a mokré váhy plic.

HISTOLOGICKÁ ANALÝZA PLICNÍHO EDÉMU – pro zjištění stupně edému alveolární stěny bylo využito vybraných parafinových řezů, barvených hematoxylinem–eozinem. Vyhodnocení řezů bylo prováděno mimo hilovou oblast. U každého reprezentativního řezu byla změřena tloušťka všech alveolárních stěn v daném poli s použitím specializovaného softwaru, programu Neurolucida (MicroBrightField, Inc., USA), dokud nebylo dosaženo 100 měření. Z jednotlivých měření byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Data z jednotlivých skupin byla následně srovnána pomocí statistických metod (publikace 1 a 2).

ZOBRAZENÍ PLICNÍHO EDÉMU – ke stanovení stupně plicního edému *in vivo* byl využito RTG zobrazení, konkrétně přístroj Image Station In–Vivo FX System (Kodak, Německo). Potkani byli jednu hodinu po skončení výkonu narkotizováni pentobarbitalem (50 mg/kg) a uloženi do přístroje, pomocí kterého byl zhotoven RTG snímek. K zobrazení jsme využívali i magnetickou rezonanci, která, ač se pro vyhodnocení plicní tkáně neosvědčuje, má velký význam pro odhalení léze v centrálním nervovém systému (publikace 1).

Statistická analýza

Numerické výsledky byly ve většině studií prezentovány jako průměrná hodnota \pm standardní odchylka (S. E. M.). Ke statistické analýze získaných dat byla použita plejáda statistických testů, ve všech případech zvolená na základě doporučení statistika. Nejčastěji používanými testy byl Studentův T–test, ANOVA, Kruskal–Wallis a Mann–Whitney U–test. Hladina významnosti byla stanovena pro $p < 0,05$ (podrobnosti viz publikace 1–6)

4 VÝSLEDKY

Tato sekce je rozdělena na dvě části. V první části autor předkládá koncepci řešení jednotlivých cílů habilitační práce (číslování odpovídá jednotlivým cílům). Ve druhé sekci jsou přiloženy kopie publikovaných prací, kde je tato problematika uvedena podrobně. Povšechná diskuze celé problematiky, závěry a shrnutí, pak následují za touto statí.

4.1 VÝSLEDKY – KONCEPCE ŘEŠENÍ JEDNOTLIVÝCH CÍLŮ

1. Úloha anestezie v rozvoji neurogenního plicního edému

Je všeobecně známo, že jak forma, tak hloubka anestezie mají zásadní vliv na intenzitu a typ odpovědi jedince na poškození. Různí autoři ukazují různý vliv anestetik na rozvoj neurogenního plicního edému, ať již ve smyslu jeho potenciace či inhibice (Leah Filho, 2005a,b; Mesquita et al., 2002; Pandey et al., 2000). Účinky ketaminu, xylazinu a pentobarbitalu na rozvoj neurogenního plicního edému již byly zpracovány (Leah Filho, 2005a,b; Mesquita et al., 2002; Pandey et al., 2000), ale úloha koncentrace vdechovaného isofluranu, jednoho z nejčastěji užívaných inhalačních anestetik jak v experimentu, tak v klinické medicíně, nebyla dosud v detailu stanovena.

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – cílem této práce bylo objasnění úlohy anestezie v rozvoji neurogenního plicního edému a stanovení rozsahu poškození plic u různých koncentrací anestezie. K tomuto cíli nás vedlo vlastní pozorování, kdy v průběhu přípravy modelu epidurální balónkové kompresní míšní léze (Vanický et al., 2001) docházelo u významného množství experimentálních zvířat k úmrtí v důsledku respiračních komplikací několik minut po provedení míšní léze. Klinický obraz respiračních komplikací odpovídal obrazu neurogenního plicního edému. Protože jediným známým faktorem, ve kterém se jednotlivé pokusy lišily, byla právě hloubka anestezie, rozhodli jsme se ji detailně prozkoumat.

METODIKA – experimenty jsme prováděli na potkanech, samcích kmene Wistar o hmotnosti v rozsahu 270–330 g. Potkani byli uvedeni do inhalační isofluranové anestezie o definované koncentraci buď 1,5% nebo 3% isofluranu ve vzduchu, v obou případech při stejném průtoku anestetické směsi (300 ml/min). Zvířatům byla provedena epidurální balónková kompresní míšní léze (Vanický et al., 2001) a následně byli vyšetřeni sérií diagnostických metod z hlediska přítomnosti neurogenního plicního edému a jeho závažnosti, z nichž část jsme sami navrhli (více viz [publikace 1 a 7](#)).

VÝSLEDKY – výsledky práce jasně demonstrovaly, že u zvířat narkotizovaných 1,5% isofluranem došlo v návaznosti na provedení balónkové kompresní míšní léze k rychlému rozvoji těžkého neurogenního plicního edému, na jehož následky více než 40 % zvířat zemřelo. RTG obraz, relativní váha plic i histologické vyšetření plicní tkáně prokázaly přítomnost těžkého neurogenního plicního edému. Naproti tomu, zvířata narkotizovaná 3%

isofluranem, všechna přežila provedení balónkové kompresní míšní léze bez rozvoje plicního edému (více viz [publikace 1 a 7](#)).

DISKUSE – bylo prokázáno, že inhalační anestetika typu isofluranu či halothanu snižují clearance alveolárního epitelu a takto snižují práh pro rozvoj plicního edému (Rezaiguia–Delclaux et al., 1998; Laffon et al., 2002). Isofluran kromě toho inhibuje mitochondriální oxidaci, což vede ke snížení produkce ATP v pneumocytech II. typu a tak stimuluje produkci laktátu těmito buňkami. Kromě toho snižuje syntézu fosfatidylcholinu a indukuje apoptózu pneumocytů II. typu, což poškozuje surfaktant (Mollieux et al., 1999). Někteří autoři proto vyjádřili svou obavu a doporučili opatrné používání inhalačních anestetik (Wiener–Kronisch a Gropper, 1998). Tento negativní efekt nebyl pozorován v případě intravenózních anestetik typu pentobarbitalu nebo ketaminu–xylazinu. I když je třeba tyto a další možnosti ovlivnění plicní tkáně a hemodynamických parametrů isofluranovou anestezí brát v potaz, v případě rozvoje neurogenního plicního edému předpokládáme spíše celkový vliv anestetik na inhibici sympatického nervového systému, jehož náhlá hyperaktivace je nejvíce podezřívána z rozvoje neurogenního plicního edému (viz teze č. 9). Tuto problematiku jsme se proto rozhodli dále studovat.

ZÁVĚR – v této studii bylo prokázáno, že nízké hladiny isofluranové anestezie umožní rozvoj neurogenního plicního edému u potkanů s poraněním míchy, zatímco vysoké hladiny isofluranové anestezie naopak jeho rozvoji zabrání.

2. Experimentální model neurogenního plicního edému

Za účelem výzkumu neurogenního plicního edému byla připravena celá řada experimentálních modelů, které však ne vždy zcela vyhovují účelu, pro který byly zhotoveny. Příkladem jsou modely na bázi vstříkovaní fibrinu (Ishikawa et al., 1988), veratrinu (Kondo et al., 2004; Maron, 1985) či akotininu (Minnear a Connell, 1982), ve všech případech do *cisterna magna*. Zodpovědné za rozvoj plicního edému u těchto modelů je však považováno acetylcholinem zprostředkované zvýšení permeability cév (Bosso et al., 1990) a nikoli hyperaktivace sympatiku, podezřívána z rozvoje neurogenního plicního edému u pacientů (Fontes et al., 2003). Příkladem dalšího modelu je psí model intravenózní injekce kyseliny olejové (Dauber a Weil, 1983), který je ještě méně vhodný.

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – cílem práce bylo vytvořit experimentální model neurogenního plicního edému, který by svým charakterem i patofyziologickým mechanismem co nejvíce odpovídal klinické situaci u pacientů, a současně byl relativně snadno proveditelný, reprodukovatelný a spolehlivý.

METODIKA – při vytváření modelu neurogenního plicního edému jsme vycházeli z předchozích výsledků popsaných v tezi č. 1 a vyhodnotili jednotlivé etapy provádění balónkové kompresní míšní léze při anestezii 1,5% isofluranem (více viz [publikace 2](#)).

VÝSLEDKY – ukázalo se, že balónková kompresní míšní léze u zvířat narkotizovaných 1,5% isofluranem může sloužit jako model těžkého neurogenního plicního edému, zatímco provedení stejného zásahu při 3% isofluranové anestezii lze využít jako negativní kontrolu. Chirurgickou kontrolou k tomuto modelu je situace, kdy v 1,5% isofluranové anestezii nedochází k nafouknutí balónku zavedeného do páteřního kanálu. Jako zdravá zvířata pak lze vyhodnotit potkany, kteří byli po celou dobu výkonu v příslušné anestézii, bez provedení chirurgického výkonu (více viz *publikace 2*).

DISKUSE – v historii výzkumu neurogenního plicního edému byla popsána celá řada modelů, které však většinou odrážely skutečnou klinickou situaci pouze vzdáleně. Jejich příprava je většinou podmíněna aplikací exogenních substancí do *cisterna magna* (Ishikawa et al., 1988; Kondo et al., 2004; Maron, 1985; Minnear a Connell, 1982) nebo přímo do mozkové tkáně (Hamdy et al., 2000, 2001). Jako extrémní se jeví modely typu intravenózní injekce kyseliny olejové (Dauber a Weil, 1983) nebo bilaterální cervikální vagotomie (Iazzetti a Maciel, 1988). Vzhledem k velmi odlišným etiopatogenetickým mechanismům rozvoje plicního edému u různých modelů je nutné při porovnávání výsledků jednotlivých studií na tyto rozdíly brát zřetel.

ZÁVĚR – vytvořili jsme snadno proveditelný, reprodukovatelný a spolehlivý model neurogenního plicního edému u laboratorního potkana. Jeho hlavní předností je skutečnost, že vychází z poranění centrálního nervového systému, které je navíc provázeno akutním zvýšením sympatické aktivity (viz také teze č. 9), což přesně odpovídá situaci u pacienta.

3. Funkční a morfologický neurologický dopad rozvoje neurogenního plicního edému

Poranění mozku a míchy má často zásadní dopady na sensitivní, senzorké, motorické, autonomní i kognitivní funkce centrálního nervového systému. Dopad neurogenního plicního edému jako jedné z komplikací poranění centrálního nervového systému na tyto funkce nebyl dosud detailně popsán, navzdory tomu, že je k dispozici celá řada behaviorálních testů, rutinně používaných k hodnocení závažnosti poranění centrálního nervového systému (*publikace 11*).

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – cílem práce bylo detailně popsat funkční neurologický dopad rozvoje neurogenního plicního edému u potkanů s poraněním míchy, který nastává i u pacientů s poraněním centrálního nervového systému (Fontes et al., 2003; Macleod, 2002). Vzhledem k závažnému stavu, kterým tato komplikace je, předpokládáme rovněž sekundární poškození centrálního nervstva, které by se mohlo odrazit ve zhoršeném návratu neurologických funkcí po poranění míchy.

METODIKA – u potkanů jsme navodili neurogenní plicní edém s použitím našeho experimentálního modelu (*publikace 2*). Motorické funkce pánevních končetin byly

posuzovány s použitím BBB testu (Basso et al., 1995), sensitivní funkce pak pomocí komerčně dostupného plantárního testu, pracujícího na principu měření času, potřebného k reakci na tepelný stimulus (Ugo Basil, Comerio, Italy). Dva nezávislí badatelé prováděli testování zvířat před provedením míšní léze, 24 hodin po ní a následně jedenkrát týdně, celkově po dobu 7 týdnů (více viz *publikace 1*).

VÝSLEDKY – hodnocení BBB i plantárního testu ukázalo zhoršení jak motorických, tak senzitivních neurologických funkcí v průběhu celého experimentu u zvířat s těžkým neurogenním plicním edémem. Ve 2. a 3. týdnu po poranění míchy dosáhly tyto rozdíly statistické významnosti (více viz *publikace 1*).

DISKUSE – zhoršení neurologických funkcí u zvířat s neurogenním plicním edémem je pravděpodobně způsobeno celkově horším zdravotním stavem těchto experimentálních zvířat. Z klinické praxe je známa empirická zkušenost, že pacienti s rozvinutým neurogenním plicním edémem mají horší prognózu než pacienti bez plicního edému, a to i v případech, když neurogenní plicní edém vymizí po několika dnech (Fontes et al., 2003; Macleod, 2002). Ze studií zabývajících se poraněním míchy vyplývá, že změny v prvních hodinách po poranění jsou pro pacienta nejkritičtější (Bracken et al., 1997; Syková et al., 2006). Pokud je toto rané stadium po poranění komplikováno neurogenním plicním edémem, může výrazně zhoršovat zotavení nervových drah, což se v našem experimentu projevilo zhoršením v BBB a plantárním testu.

ZÁVĚR – rozvoj neurogenního plicního edému výrazně zhoršuje návrat sensorimotorických neurologických funkcí po poranění míchy, s maximem v 2.–3. týdnu po poranění.

4. Optimalizace protokolu míšního poškození u laboratorního potkana.

Poranění míchy představuje těžkou, život ohrožující klinickou jednotku se závažnými, často trvalými následky. Na světě se vyskytuje s průměrnou incidencí 40 případů na 1 milion obyvatel a postihuje zejména mladé lidi v produktivním věku (Basso, 2004; Bracken et al., 1997; *publikace 11*). Poranění míchy je charakterizováno komplexem motorických, sensitivních a autonomních dysfunkcí, jejichž závažnost a rozsah trvalého poškození odpovídá rozsahu poškození míchy. V experimentu se ke studiu poranění míchy nejčastěji používá laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*). Jako modely míšního poranění používáme transekcí, hemisekcí, kontuzi, kompresi, ischemii či excitotoxickou lézi (Basso, 2004; Bracken et al., 1997; *publikace 11*).

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – cílem práce bylo optimalizovat protokol modelu epidurální balónkové kompresní míšní léze u laboratorního potkana, původně popsany v roce 2001 slovenskými kolegy (Vanický et al., 2001).

METODIKA – v této studii jsme vycházeli z metodiky v bodech 1–3. Zaměřili jsme se na anestetický protokol a na měření krevního tlaku v průběhu kompresní balónkové míšní léze (více viz *publikace 1 a 2*).

VÝSLEDKY – pro provádění balónkové kompresní míšní léze je optimální použití isofluranové anestezie v rozmezí 2,5–3 % isofluranu ve vzduchu při proudu anestetické směsi 300 ml/min. Použití nižších koncentrací anestezie než 2,5 % isofluranu ve vzduchu vede k rozvoji neurogenního plicního edému, který může zhoršovat návrat neurologických funkcí a zkreslovat výsledky. Naopak použití vyšších koncentrací než 3 % isofluranu ve vzduchu vede k úmrtí zvířete v důsledku předávkování anestetikem. Během balónkové kompresní míšní léze je možné monitorovat krevní tlak a tepovou frekvenci, jejichž typický průběh byl popsán a lze tak hodnotit jejich odchylky v důsledku dalších souběžných intervencí, např. různých farmakologických zásahů (více viz *publikace 1 a 2*).

DISKUSE – model balónkové kompresní míšní léze podle Vanického et al. (2001) je využíván celou řadou laboratoří na světě. Do této chvíle byl 70× citován (podle WOS). Je vhodným modelem, neboť velmi dobře odráží klinickou situaci kompresního poranění kaudálního úseku hrudní míchy na podkladě vpáčení kostního úlomku či hematomu (Vanický et al., 2001; Urdziková et al., 2006; *publikace 11*). Používá se převážně ke studiu vlivu kmenových buněk a nejrůznějších dalších terapeutických modalit na léčbu následků míšního poranění. Umožňuje jak morfologické, tak funkční studie (Urdziková et al., 2006; Syková et al., 2006). Naproti tomu není vhodný pro posuzování ostrých (řezných) poranění míchy – k tomuto účelu však mohou sloužit jiné, dobře dokumentované modely (Hejčl et al., 2008, 2009; *publikace 11*).

ZÁVĚR – naše výsledky rozšiřují možnosti použití modelu epidurální balónkové kompresní míšní léze a eliminují některé z možných *bias*, které by mohly vzniknout v průběhu jeho přípravy.

5. Dopad stupňovité expanze balónku v míšním kanálu na hemodynamické změny a stupeň rozvoje neurogenního plicního edému

V našich předchozích studiích byl detailně popsán dopad akutní expanze balónku modifikovaného Fogarthyho katétru v epidurálním prostoru hrudní míchy na rozvoj neurogenního plicního edému (viz teze 1–4). V klinické praxi se však v některých případech setkáváme i se situací, kdy dochází k expanzi v míšním kanále postupně, například postupnou tvorbou hematomu (Simard et al., 2012). Ačkoli existuje celá řada studií, popisujících rozvoj akutního neurogenního plicního edému, v literatuře jsme nenalezli studii, která by monitorovala vliv postupné expanze v centrálním nervovém systému na rozvoj neurogenního plicního edému.

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – cílem práce bylo stanovit účinky postupně prováděné balónkové kompresní míšní léze na rozvoj neurogenního plicního edému. Vzhledem k úloze akutní hyperaktivace nervových drah, zapojených do regulace sympatiku (viz také teze č.10) předpokládáme při rozložení balónkové expanze v čase méně výraznou akutní sympatickou odpověď, což by se projevilo méně výrazným vzestupem krevního tlaku a poklesem tepové frekvence a vedlo i k rozvoji lehčího stupně neurogenního plicního edému, možná i k zabránění jeho vzniku. Výsledky práce tak mohou přispět ke klinické interpretaci rozvoje neurogenního plicního edému rozvíjejícího se s odstupem delší doby po poranění centrálního nervového systému (Mackersie et al., 1983).

METODIKA – ve studii byl použit model neurogenního plicního edému (viz teze č. 2). Pro účely studie byl modifikován protokol vytváření míšní léze tak, aby místo okamžité expanze balónku na cílový objem 15 μ l bylo prováděno postupné nafukování balónku buď v „rychlém“ režimu 5 μ l – 5 μ l – 5 μ l, nebo „pomalém“ režimu 3 μ l – 2 μ l – 2 μ l – 2 μ l – 2 μ l – 2 μ l – 2 μ l – 2 μ l (ve všech případech byl cílový objem 15 μ l). Časový interval mezi jednotlivými etapami nafukování balónku byl 30 sekund. Kromě toho jsme provedli pokus s jednorázovým nafouknutím balónku na cílový objem 5 μ l resp. 10 μ l. Všechny ostatní součásti experimentálního zásahu byly zachovány shodně s původním protokolem modelu neurogenního plicního edému (viz teze č. 2). V průběhu výkonu jsme monitorovali krevní tlak a tepovou frekvenci. Následně byl vyhodnocen stupeň neurogenního plicního edému dle metodiky zavedené v předchozí studii (viz teze č. 1) (více viz [publikace 3](#)).

VÝSLEDKY – studie prokázala, že rychlý režim expanze balónku v míšním kanále způsobuje závažný neurogenní plicní edém, zatímco režim pomalé expanze rozvoji této komplikace zabraňuje. Hemodynamické změny odpovídají rozvoji neurogenního plicního edému (viz také teze č. 7). V situaci, kdy je balónek nafouknut na cílovou hodnotu menší než 15 μ l, také nedochází k rozvoji edému (více viz [publikace 3](#)).

DISKUSE – naše výsledky ukazují, že pomalé nafouknutí balónku v míšním kanále nevyvolá rozvoj neurogenního plicního edému, s nejvyšší pravděpodobností v důsledku snazší adaptace organismu na postupné hemodynamické změny nastávající v delším časovém intervalu (viz také teze č. 7). Poulat a Couture (1998) ve své studii ukázali, že intrathekální injekce endothelinu-1 způsobí aktivaci endotelinových receptorů typu A v sympatických míšních neuronech. Jejich aktivace následně způsobí hyperaktivaci sympatiku, masivní uvolnění katecholaminů, intenzivní plicní vazokonstrikci, zvýšení plicní permeability a plicní edém (Poulat a Couture, 1998). Jedním z možných vysvětlení může být skutečnost, že pomalá stupňovitá léze vede k postupnému uvolňování vazoaktivních substancí, na které se organismus může dobře adaptovat, zatímco v případě rychlého nafouknutí balónku je hyperaktivace sympatiku příliš silná. Podkladem další hypotézy může být aktivace různého množství nervových drah, vedoucích do spouštěcích zón neurogenního plicního edému

lokalizovaných na bázi čtvrté komory mozkové (Baumann et al. 2007, Leal Filho et al. 2005a, 2005b). Není vyloučena ani kombinace těchto faktorů (více viz [publikace 3](#)).

ZÁVĚR – pomalá stupňovitá kompresní míšňí léze nevyvolá neurogenní plicní edém, zatímco rychlá stupňovitá nebo okamžitá léze vedou k jeho rozvoji.

6. Vliv různého typu poranění míchy na rozvoj neurogenního plicního edému

Rozvoj neurogenního plicního edému byl popsán na celé řadě modelů (viz teze č. 2). Z modelů využívajících poranění míchy jsou to zejména model popsáný Leal Filhem et al. (2005a, 2005b) a náš model (viz teze č. 2). Nebylo však dosud systematicky popsáno, zda může u potkana v isofluranové anestezii neurogenní plicní edém vznikat i na podkladě jiného typu poranění míchy.

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – cílem práce bylo objasnit, zda poranění míchy jiného typu než komprese hrudní míchy je schopná vyvolat neurogenní plicní edém. Vzhledem k naší teorii vzniku neurogenního plicního edému na podkladě sympatické hyperaktivace a konkomitantního akutního zvýšení intrakraniálního tlaku (viz teze č. 9), jsme předpokládali, že intervence typu hemisekce či transekce míchy neurogenní plicní edém nevyvolá. Chtěli jsme také ověřit, jaký bude mít vliv komprese bederní míchy, kde je sídlo parasympatiku, nikoliv sympatiku jako v případě modelu neurogenního plicního edému.

METODIKA – zvířata byla uvedena do 1,5% isofluranové anestezie a byl jim zaveden katetr na měření krevního tlaku a tepové frekvence (viz teze 1 a 4). Následně byla zvířatům provedena (1) kompletní transekce míchy, (2) hemisekce míchy či (3) zavedení a nafouknutí katetru v oblasti bederní míchy. Následně byl vyhodnocen stupeň rozvoje neurogenního plicního edému a zhodnoceny hemodynamické parametry (více viz [publikace 3 a 5](#)).

VÝSLEDKY – v souladu s naší hypotézou nezpůsobovala ani jedna ze zmíněných intervencí neurogenní plicní edém (více viz [publikace 3 a 5](#)).

DISKUSE – z našich studií vyplývá, že intervence, které nepůsobí náhlou hyperaktivací míšňích drah zapojených do regulace sympatiku (viz teze č. 9) jako jsou transekce míchy, hemisekce míchy nebo balónková kompresní míšňí léze v bederní oblasti míchy, nepůsobí neurogenní plicní edém. Navíc jsme již dříve ukázali, že pouze rychlá a nikoliv pomalá stupňovitá léze je schopná vyvolat neurogenní plicní edém (viz teze č. 5). Celá řada klinických zkušeností ukazuje, že okamžik náhlé hyperaktivace míšňích a mozkových nervových drah se úzce shoduje s okamžikem vzniku neurogenního plicního edému (Baumann et al., 2007; Fontes et al., 2003). Je tedy zřejmé, že v rozvoji neurogenního plicního edému hraje roli jak rozsah, tak délka působení stimulu. Chen et al. (1973) a Dragosavac et al. (1997) ukázali, že mozková komprese vedla k systémové arteriální hypertenzi a plicnímu edému, přičemž této odpovědi bylo možné zabránit transekcí míchy v úrovni C₇, avšak nikoliv decerebrací. Na druhé straně jsme nepozorovali rozvoj neurogenního plicního edému při nafouknutí balónku

v páteřním kanálu v úseku, odpovídajícím uložení bederní části míchy. Tato skutečnost je pravděpodobně důsledkem chybné sympatických nervových vláken a neuronů na této úrovni míchy.

ZÁVĚR – intervence, které nepůsobí náhlou hyperaktivaci míšních drah, zapojených do regulace sympatiku, jako jsou transekce míchy, hemisekce míchy nebo balónková kompresní léze bederní míchy, nepůsobí neurogení plicní edém.

7. Hemodynamické změny provázející vznik a rozvoj neurogeního plicního edému

V experimentech na zvířatech bylo opakovaně prokázáno, že rozvoji neurogeního plicního edému předchází náhlé významné zvýšení systémového krevního tlaku, jako projev hyperaktivace sympatiku, která je předpokládaným základním mechanismem vzniku neurogeního plicního edému (Fontes et al., 2003, Baumann et al., 2007). Blessing et al. (1981) pozorovali zvýšení systémového tlaku o 40 mm Hg u králíků, kterým experimentálně vyvolali neurogení plicní edém pomocí bilaterální destrukce A1 neuronů v *medulla oblongata*. Reis et al. (1977) vyvolali u laboratorního potkana neurogení plicní edém pomocí léze *nucleus tractus solitarii* a předpokládali, že smrt zvířete nastává na základě levostranného srdečního selhání při mimořádně těžké akutní hypertenzi.

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – cílem práce bylo vyhodnotit hemodynamické změny v průběhu neurogeního plicního edému na modelu balónkové kompresní míšní léze u laboratorního potkana. Předpokládali jsme výraznou systémovou tlakovou odpověď, korelující s okamžikem nafouknutí balónku v páteřním kanálu potkana.

METODIKA – ke studiu hemodynamické odpovědi jsme použili vlastní model neurogeního plicního edému (viz teze č. 2) a jako kontrolu zvířata narkotizovaná 3% isofluranem, kterým byla rovněž provedena balónková kompresní míšní léze (viz teze 1 a 3). Zvířatům byl po úvodu do anestezie zaveden katetr do *arteria carotis*, za účelem kontinuálního měření krevního tlaku a tepové frekvence (systém PowerLab, AD Instruments, Colorado Springs). Zvířata byla monitorována 5 minut před výkonem, v průběhu celého výkonu a 5 minut po skončení výkonu. Následně byl vyhodnocen stupeň neurogeního plicního edému, v souladu se zavedenou metodikou (více viz *publikace 1 a 2*).

VÝSLEDKY – kromě predikované výrazné odpovědi krevního tlaku na kompresi dolní hrudní míchy pomocí balónku uvnitř páteřního kanálu jsme rovněž pozorovali výrazné snížení tepové frekvence u zvířat narkotizovaných 1,5% isofluranem, u kterých se rozvinul neurogení plicní edém. Naopak u zvířat narkotizovaných 3% isofluranem, kde jsme pozorovali mírné zvýšení systémového krevního tlaku, avšak typická baroreflexní reakce chyběla (více viz *publikace 1*).

DISKUSE – zjištění baroreflexní bradykardie jako vyvolávajícího faktoru neurogenního plicního edému považujeme za jeden z klíčových bodů výzkumu neurogenního plicního edému. Již dříve bylo pozorováno, že bradykardie vzniká souběžně s vzestupem systémového tlaku (Blessing et al., 1981). Bradykardie také přímo následuje po zvýšení intrakraniálního tlaku. Jádra mozku kmene, odpovědná za tuto reakci, jsou patrně *nucleus tractus solitarii* a *nucleus ambiguus*. Bradykardii u neurogenního plicního edému je proto možné zvrátit pomocí bilaterální vagotomie nebo léze *nucleus dorsalis nervi vagi* (Bosso et al., 1990; Hashiba et al., 1989).

ZÁVĚR – základním spojovacím článkem poranění centrálního nervového systému a vzniku plicního edému je baroreflexní bradykardie.

8. Role oxidu dusnatého v rozvoji neurogenního plicního edému.

Oxid dusnatý (NO) je velmi účinný vazodilatační mediátor. Oxid dusnatý hraje mimo jiné roli i v regulaci ventilačně-perfuzních poměrů v plicích (Blanco et al., 2011). Anand et al. (1998) ukázali, že intravenózní aplikace L-argininu zabránila zvýšení plicní kapilární permeability u plicního edému vznikajícího ve vysokých nadmořských výškách.

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – cílem práce je posoudit vliv oxidu dusnatého na rozvoj neurogenního plicního edému. Některé studie totiž ukazují, že neurogenní plicní edém, který je rovněž charakterizován zvýšením permeability plicních cév, může být inhibován oxidem dusnatým produkovaným v *medulla oblongata* (Hamdy et al., 2000, 2001; Kondo et al., 2004), patrně v důsledku inhibice centrálního sympatiku. Naopak injekce inhibitorů NO synthasy do těsné blízkosti spouštěcích zón neurogenního plicního edému nebo do likvoru zvyšuje tonus sympatiku (Hironaga et al., 1998; Zanzinger et al., 1995), pravděpodobně v důsledku modulace arteriálního baroreflexu (Hironaga et al., 1998; Matsumura et al., 1998).

METODIKA – ke studiu vlivu NO jsme použili náš model neurogenního plicního edému (viz teze 2). Kompetitivní inhibitor NO synthasy L-NAME (N^G-nitro-L-arginin metyl ester, Sigma, St. Louis, MO) jsme podávali zvířatům před provedením balónkové kompresní míšní léze buď (1) v „akutním“ režimu, tedy v dávce 30 mg/kg intravenózně do *vena jugularis*, nebo (2) v „chronickém“ režimu, což odpovídalo příjmu 40 mg/kg/den L-NAME přidaného do vody na pití. V průběhu operačního výkonu jsme monitorovali krevní tlak a tepovou frekvenci. Po kompresi míchy byl vyhodnocen stupeň neurogenního plicního edému podle dříve popsané metodiky (více viz [publikace 4](#)).

VÝSLEDKY – akutní podání L-NAME zvýraznilo neurogenní plicní edém u laboratorního potkana, narkotizovaného 1,5% isofluranem a zvýšilo mortalitu zvířat z 33% u modelu edému na 83%, v průběhu 10 minut po nafouknutí balónku v páteřním kanálu. Naproti tomu, chronické podání L-NAME nemělo žádný vliv, zhoršující ani protektivní, na stupeň

neurogenního plicního edému ani mortalitu zvířat. Naše studie rovněž ukázala, že zhoršení neurogenního plicního edému na podkladě akutního podání L-NAME nebylo spojeno s dalším výrazným zvýšením krevního tlaku, nýbrž s prohloubením bradykardie. Podání gangliového blokátoru pentolinia zabránilo rozvoji neurogenního plicního edému u zvířat jak v akutním, tak v chronickém režimu podání L-NAME (více viz *publikace 4*).

DISKUSE – studie ukázala zásadní protektivní vliv NO na rozvoj neurogenního plicního edému a zároveň potvrdila klíčovou úlohu sympatiku v jeho rozvoji (viz také teze č. 9). Tyto výsledky jsou v souladu s předpoklady jiných autorů. Například Hamdy et al. (2000, 2001) ukázali, že injekce L-NAME do *cisterna magna* zhorší rozvoj neurogenního plicního edému, což je ve shodě s naším pozorováním. Mechanismus, který zprostředkuje negativní efekt nedostatku NO na rozvoj neurogenního plicního edému, je pravděpodobně podmíněn chyběním vasodilatačního působení NO, které by mohlo částečně vyrovnávat sympatikem spouštěnou vasokonstrikci a baroreflexně indukovanou bradykardii (Matsumura et al., 1998; Zanzinger et al., 1994, 1995). V naší studii je nejdůležitějším nálezem další prohloubení bradykardie u zvířat s akutně podaným L-NAME, které přesně koreluje s naším předchozím zjištěním o klíčové roli baroreflexní bradykardie ve vývoji neurogenního plicního edému (viz teze č. 7) (více viz *publikace 4*).

ZÁVĚR – oxid dusnatý má částečný protektivní efekt na rozvoj neurogenního plicního edému, neboť oslabuje sympatikem zprostředkovanou vasokonstrikci a následnou baroreflexem indukovanou bradykardii, vznikající v návaznosti na kompresivní poranění míchy.

9. Role sympatického nervového systému v rozvoji neurogenního plicního edému

Celá řada experimentálních prací i klinických pozorování přímo či nepřímo ukazuje na zásadní roli sympatického nervového systému v etiopatogenezi neurogenního plicního edému. Opakovaně bylo v experimentálních podmínkách i v klinické praxi prokázáno, že v návaznosti na poranění centrálního nervového systému dochází k akutní generalizované hyperaktivaci sympatického nervového systému (Baumann et al., 2007).

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – naším cílem bylo co nejdětalněji popsat úlohu sympatického nervového systému v etiopatogenezi neurogenního plicního edému na modelu balónkové kompresní míšní léze. Zatímco roli náhlé aktivace sympatiku v etiopatogenezi neurogenního plicního edému lze považovat za zřetelně dokumentovanou, není dosud jasné, jakým mechanismem je sympatikus aktivován a jakou roli hrají jeho jednotlivé složky, jmenovitě alfa-adrenergní a beta-adrenergní přenos.

METODIKA – v práci byl použit model neurogenního plicního edému (viz teze č. 2). Ke zjištění úlohy jednotlivých složek sympatického nervového systému byl bezprostředně před

nafouknutím balónku v míšním kanále do *vena jugularis* podán (1) gangliový blokátor pentolinium (5 mg/kg, i.v.), (2) alfa-1 adrenergní receptorový blokátor prazosin (1 mg/kg i.v.), (3) alfa-2 adrenergní receptorový blokátor yohimbin (1 mg/kg i.v.), a (4) beta-adrenergní receptorový blokátor propranolol (1, 2, nebo 4 mg/kg i.v.). Po výkonu byl vyhodnocen stupeň neurogenního plicního edému podle dříve popsané metodiky. Více viz publikace 5.

VÝSLEDKY – vyřazení sympatického nervového systému pomocí pentolinia zcela zabránilo rozvoji neurogenního plicního edému. Podání alfa blokátorů prazosinu a yohimbinu bezprostředně před poraněním míchy rovněž dokázalo zabránit rozvoji neurogenního plicního edému. Naopak beta-adrenergní blokáda měla pouze malý efekt. Preventivní efekt podání těchto látek se odrážel i v hemodynamické odpovědi na poranění míchy – u zvířat, kde bylo zabráněno rozvoji neurogenního plicního edému, byla snížena systémová tlaková odpověď a současně byla výrazně redukována až vyřazena baroreflexní bradykardie. S těmito výsledky korelovala dynamika změn plasmatické hladiny katecholaminů (více viz publikace 5).

DISKUSE – práce ukazuje zásadní roli sympatického nervového systému, zejména jeho alfa-adrenergní složky, v rozvoji neurogenního plicního edému. Ukazuje také, že zásadní součástí sympatické hyperaktivace je vyplavení endogenních katecholaminů. Role sympatického systému při rozvoji neurogenního plicního edému byla přímo i nepřímo prokázána celou řadou experimentů s využitím nejrůznějších experimentálních modelů. Příkladem je studie Novitzkyho et al. (1986), kteří na opičím modelu zabránili rozvoji neurogenního plicního edému, indukovaného nafouknutím balónku intrakraniálně, chirurgickou sympatektomií. Farmakologickým korelátem této studie je naše zjištění, že preventivní podání gangliového blokátoru pentolinia zcela zabránilo rozvoji neurogenního plicního edému u potkanů s poraněním míchy. Celkový pohled na tyto experimenty navíc ukazuje, že čím má pokusné zvíře více rozvinutý autonomní systém, tím pravděpodobněji a tím těžší se rozvine neurogenní plicní edém (Malik, 1985).

ZÁVĚR – závěrem lze říci, že v případě neurogenního plicního edému platí, že následkem hyperaktivace sympatiku jsou zvýšení systémového a plicního krevního tlaku, pokles tepové frekvence, centralizace krevního oběhu, zvýšený venózní návrat, zvýšení levostranného end-diastolického tlaku, zvýšení kapilárního hydrostatického tlaku a extravazace tekutiny, vedoucí k plicnímu edému.

10. Úloha náhlé hyperaktivace míšních drah v rozvoji neurogenního plicního edému

Epidemiologická data ukazují, že neurogenní plicní edém vzniká zejména při rozsáhlejších poškozeních centrálního nervstva, s výrazným podílem případů se zvýšeným intrakraniálním

tlakem. V experimentu bylo prokázáno, že při náhlém zvýšení intrakraniálního tlaku dochází ke zvýšení tlaku systémového a mírnému zpomalení srdeční frekvence během jedné minuty. Zvýšení systémového a plicního tlaku, spojené se zvýšeným žilním návratem, pozitivně inotropním účinkem na srdce a zvýšeným srdečním výdejem v závislosti na zvýšení intrakraniálního tlaku se označuje jako Cushingův reflex (Simmons et al., 1969a, 1969b). Cílem tohoto reflexního mechanismu je za každou cenu perfundovat otékající tkáň centrálního nervstva; jeho důsledkem je však plicní edém. Cushing (1901) vysvětlil tento reflexní mechanismus na základě skutečnosti, že se v prodloužené míše hodnoty intrakraniálního tlaku přiblíží hodnotám tlaku systémového a mozkový perfuzní tlak klesne pod prahovou hodnotu, při které je mozková cirkulace ještě schopna autoregulace a zajištění 100 % nutričních potřeb. Při injekci plné krve nebo roztoku albuminu do *cisterna magna* umírá 50 % pokusných zvířat na komplikace spojené se vznikem neurogenního plicního edému. Přitom množství vpravené tekutiny je mnohem důležitější než její složení. Někteří autoři prokázali, že role zvýšeného intrakraniálního tlaku při vzniku neurogenního plicního edému je dána zejména tlakovou ischemií jader prodloužené míchy a deformací mozkového kmene, které vedou ke Cushingově reflexu, zejména ve smyslu zvýšení krevního tlaku (sympatikus) a poklesu srdeční frekvence (parasympatikus) (Thompson a Malina, 1959). Dnes se ukazuje, že mechanická deformace mozkového kmene má mnohem větší vliv na rozvoj systémové odpovědi, jejíž součástí je i neurogenní plicní edém, než ischemická složka ve smyslu Cushingovy teorie.

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – základním cílem práce bylo vyhodnotit roli zvýšeného intrakraniálního tlaku a hyperaktivace nervových míšních drah, vedoucích do spouštěcích zón neurogenního plicního edému, na jeho etiopatogenezi.

METODIKA – ke studiu této problematiky jsme opět použili model neurogenního plicního edému (viz teze č. 2). Bezprostředně před nafouknutím balónku jsme zasunuli tenký katetr (PE10) do epidurálního prostoru na míšní úroveň Th₂, prostor hermeticky uzavřeli pomocí histoakrylu a do tohoto místa aplikovali 0,1 ml trimecainu (Mesocain, 10 mg/ml). Použitá dávka trimecainu byla stanovena na podkladě našich předchozích experimentů, kde byla schopná vyvolat paraplegii obou dolních končetin na dobu minimálně 30 minut. Druhým pokusem byla předchozí kompletní transekce míchy v úrovni míšní Th₄. Po zásahu byl vyhodnocen stupeň neurogenního plicního edému podle dříve popsané metodiky (více viz publikace 5).

VÝSLEDKY – studie ukázala, že jak epidurální anestezie, tak transekce míchy na úrovni Th₄ dokážou zcela zabránit rozvoji neurogenního plicního edému, což bylo provázeno chyběním typických hemodynamických změn i absencí histologického nálezu na plicích (více viz publikace 5).

DISKUSE – celá řada dat a klinických zkušeností ukazuje, že neurogení plicní edém může způsobit náhlá hyperaktivace většího množství drah, které vedou do center neurogeního plicního edému. Typicky nastává tato situace u subarachnoidálního krvácení (Fontes et al., 2003) nebo, jak ukazuje naše studie, i u kompresní léze v hrudní části míchy. Experimentální data ukazují, že anestezie, aplikovaná v naší studii epidurálně nad oblast léze, nebo intrathekálně do místa léze ve studii Hall et al. (2002) může rozvoji neurogeního plicního edému zabránit, což lze velmi dobře sledovat jako vymizení hemodynamické odpovědi. Experimenty na ventilovaných zvířatech ukázaly, že neurogenímu plicnímu edému můžeme zabránit, pokud provedeme transekcii krční míchy nad úrovní nebo přímo v úrovni míšní C₇ (Chen et al., 1973; Chen a Chai, 1976). V této oblasti se totiž nacházejí dráhy sympatiku, které převádějí tyto autonomní signály do oblasti plic. Vzato z opačného pohledu, rozvoj neurogeního plicního edému můžeme potencovat, pokud míšní dráhy v této úrovni stimulujeme. Klíčovou roli intrakraniálního tlaku se zatím v sérii našich experimentů prokázat nepodařilo.

ZÁVĚR – pro rozvoj neurogeního plicního edému je klíčová náhlá hyperaktivace množství drah, vedoucích do center neurogeního plicního edému v mozkovém kmeni. Role náhle zvýšeného intrakraniálního tlaku v rozvoji neurogeního plicního edému zatím přesvědčivě prokázána nebyla a bude předmětem dalších studií.

11. Snaha o identifikaci preventivně–terapeutických modalit, kterými by bylo možné v budoucnu minimalizovat nebo zvrátit rozvoj neurogeního plicního edému

Jak ukázaly naše předchozí studie, pro rozvoj neurogeního plicního edému je klíčová baroreflexem indukovaná bradykardie (viz teze č. 7 a 9). Dále jsme prokázali, že rozvoj a stupeň neurogeního plicního edému ovlivňuje celá řada neurohumorálních působků a farmak, přičemž mezi nejvýznamnější patří oxid dusnatý, adrenalin, noradrenalin resp. pentolinium, prazosin a yohimbin (viz teze 8 a 9).

CÍL PRÁCE A HYPOTÉZA – cílem práce bylo pokusit se zabránit vzniku neurogeního plicního edému cílenou eliminací baroreflexní odpovědi.

METODIKA – ke studiu této problematiky jsme opět použili model neurogeního plicního edému (viz teze č. 2). Jako farmakum schopné eliminovat baroreflexní odpověď jsme zvolili parasymptolytikum, blokátor muskarinových receptorů atropin (4 mg/kg iv; Sigma), který jsme aplikovali jak před, tak i po nafouknutí balónku v míšním kanále (více viz *publikace 4*).

VÝSLEDKY – zjistili jsme, že aplikace atropinu těsně před nafouknutím balónku v páteřním kanále dokáže zcela zabránit rozvoji neurogeního plicního edému. Zajímavým zjištěním bylo, že tento lék je nutné podávat v poměrně vysokých dávkách, neboť nižší dávky (1 nebo 2 mg/kg i.v.) měly pouze částečný efekt. Naproti tomu, když jsme atropin, byť ve vysokých

dávkách, aplikovali až po nafouknutí balónku, jeho protektivní efekt již nebyl pozorován (více viz [publikace 4](#)).

DISKUSE – preventivně–terapeutické podání atropinu se jeví jako velmi výhodné pro nízkou finanční náročnost a obecně širokou dostupnost tohoto léčiva na všech úrovních akutní péče. Rovněž podání jeho vysokých dávek je možné, neboť se jedná o lék široce a často používaný, s dokonale poznanými účinky a lékovými interakcemi. V klinické medicíně může mít lépe aplikovatelný preventivní efekt, neboť časové okno mezi inzultem a rozvojem neurogenního edému je u člověka výrazně delší než u experimentálních zvířat. Více o možném použití atropinu lze nalézt v diskusi u [publikace 8](#).

ZÁVĚR – atropin se jeví jako potenciálně výhodný farmakologický nástroj prevence rozvoje neurogenního plicního edému.

12. Příspěvek k diskusi o neurogenním plicním edému formulací vlastní hypotézy o etiopatogenetickém mechanismu nízkého stupně anestezie na rozvoj neurogenního plicního edému

Podkladem nastolení této diskuse je zjištění zcela zásadního významu stupně isofluranové anestezie na rozvoj neurogenního plicního edému (viz teze č. 1). Z tohoto důvodu považujeme za naprosto klíčovou i diskusi o působení ostatních anestetik na rozvoj neurogenního plicního edému, což může mít zásadní dopad v klinické medicíně, např. v případě neurochirurgických operací. Zevrubná diskuse na toto téma je v [publikaci 7](#). Práce, vycházející z naší laboratoře (Bencze et al., 2013) ukázala zásadně odlišnou roli jednotlivých typů anestezie na hemodynamické parametry, což může ovlivňovat i rozvoj neurogenního plicního edému.

13. Prezentace problematiky neurogenního plicního edému odborníkům v ČR formou přehledového článku a monografie.

Ukazuje se, že v domácím odborném písemnictví je stále problematika neurogenního plicního edému publikována velmi zřídka. Dle dostupných údajů eviduje autor k 20. 7. 2017 v ČR pouze 12 odborných článků dotýkajících se problematiky neurogenního plicního edému, přičemž žádný z nich (s výjimkou článku autora) se nezabývá výlučně touto problematikou. To je vysoce disproporční ve srovnání s 597 publikacemi věnovanými této problematice v databázi PubMed (www.pubmed.gov), nalezenými zde ke stejnému datu. I tak jsou však tato čísla, vzhledem ke klinické závažnosti a zejména (na poměry lékařské vědy 21. století) extrémně vysoké mortalitě této klinické jednotky, velmi malá. Situace je o to horší, že drtivá většina odborných prací (cca 80 %) jsou pouze kazuistiky, případně soubory několika kazuistik. Podíl experimentálních prací je tradičně velmi nízký (do 4 %). Náš příspěvek v podobě přehledového článku v tradiční platformě českých lékařů, *Časopisu lékařů českých* ([publikace 12](#)) a vydání monografie v českém jazyce ([publikace 13](#)) tak může pomoci ke

zlepšení informovanosti odborné veřejnosti v České republice o této závažné komplikaci. Do budoucna rovněž plánujeme i) zpracování této problematiky formou samostatné monografie v zahraničí (v anglickém jazyce na toto téma monografie není) a ii) zpracování přehledového článku společně s veterinárními lékaři, neboť znalost této problematiky u veterinárních lékařů v ČR je nedostatečná a terminologie není optimální (osobní korespondence – odb. as. MVDr. Tomáš Fichtel, Ph.D., Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, VFU, Brno).

4.2 VÝSLEDKY – VLASTNÍ PUBLIKACE AUTORA

- 1. Šedý J, Urdzíková L, Hejčl A, Burian M, Likavčanová K, Jendelová P, Zicha J, Kuneš J, Syková E.** Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma* 2007, 24: 1487–1501.
IF=3,640

Low Concentration of Isoflurane Promotes the Development of Neurogenic Pulmonary Edema in Spinal Cord Injured Rats

JIRÍ ŠEDÝ,^{1,2,3} LUCIA URDZÍKOVÁ,¹ KATARÍNA LIKAVCANOVÁ,¹
ALEŠ HEJČL,² MARTIN BURIAN,^{2,4} PAVLA JENDELOVÁ,^{1,2,3} JOSEF ZICHA,^{5,6}
JAROSLAV KUNEŠ,^{5,6} and EVA SYKOVÁ^{1,2,3}

ABSTRACT

Anesthetics can either promote or inhibit the development of neurogenic pulmonary edema (NPE) after central nervous system (CNS) injury. The influence of isoflurane was examined in male Wistar rats using 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, or 5% isoflurane in air. Epidural balloon compression of the thoracic spinal cord was performed. The development of NPE was examined *in vivo* and on histologic sections of lung tissue. Animals anesthetized with 1.5% or 3% isoflurane were behaviorally monitored using the BBB and plantar tests for 7 weeks post-injury. The spinal cord was examined using MRI and morphometry of the spared white and gray matter. All animals from the 1.5% and 2% groups developed NPE. Almost 42% of the animals in the 1.5% group died of severe pulmonary hemorrhage and suffocation; x-rays, the pulmonary index, and the histological picture revealed a massive NPE. More than 71% of the animals from the 2.5% and 3% groups did not develop any signs of NPE. Blood pressure after spinal cord compression rose more in the 1.5% group than in the 3% one. In the 1.5% group, the sympathetic ganglionic blockade prevented the neurogenic pulmonary edema development. Animals from the 3% group recovered behaviorally more rapidly than did the animals from the 1.5% group; morphometry and MRI of the lesions showed no differences. Thus, low levels of isoflurane anesthesia promote NPE in rats with a compressed spinal cord and significantly complicates their recovery. The optimal concentration of anesthesia for performing a spinal cord compression lesion is 2.5–3% isoflurane in air.

Key words: blood pressure; isoflurane; lesion; neurogenic pulmonary edema; rat; spinal cord injury

INTRODUCTION

RESPIRATORY COMPLICATIONS are still an important co-factor of morbidity and mortality in patients with

spinal cord or brain injuries (Urdaneta and Layon, 2003). Neurogenic pulmonary edema is an acute life-threatening complication following spinal cord or brain injury. It is characterized by marked pulmonary vascular conges-

¹Institute of Experimental Medicine, ASCR, Prague, Czech Republic.

²Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.

³Department of Neuroscience, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic.

⁴Magnetic Resonance Unit, Radiology Department, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic.

⁵Institute of Physiology, ASCR, Prague, Czech Republic.

⁶Center for Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic.

tion, extravasation of protein-rich edema fluid and intraalveolar hemorrhage (Kandatsu et al., 2005; Kondo et al., 2004; Leal Filho et al., 2005a,b).

Epidemiological data of neurogenic pulmonary edema are scarce; its morbidity in patients with severe central nervous system (CNS) injury has been reported to be 40–50% and its mortality around 9% (Fontes et al., 2003; Dragosavac et al., 1997; Antoniuk et al., 2001). To date, several data on the neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured patients has been reported (Karlsson, 2006; Stocker and Burgi, 1998; Troll and Dohrmann, 1975; Tsao et al., 1999). However, a comprehensive epidemiological study, systematically examining the occurrence of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured patients is still lacking.

Many pathophysiological mechanisms have been implicated in the development of neurogenic pulmonary edema, but the exact cascade leading to its development is still unclear (Leah Filho et al., 2005a,b). Both the release of vasoactive substances and a severe transient sympathetic discharge are thought to participate in this process (Taoka and Okajima, 1998; Urdaneta et al., 2003). These processes lead to the constriction of the pulmonary veins, an increase in pulmonary capillary hydrostatic pressure, damage to the alveolar wall, and the leakage of fluid into the intraalveolar space (Fontes et al., 2003).

Several authors have reported that different anesthetic drugs either promote or inhibit the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord or brain injured rats (Leah Filho, 2005a,b; Mesquita et al., 2002; Pandey et al., 2000). The influence of ketamine, xylazine and pentobarbital on the development of neurogenic pulmonary edema has been shown previously (Leah Filho, 2005a,b; Mesquita et al., 2002; Pandey et al., 2000). However, the possible role of isoflurane, one of the most prevalent anesthetics used in experimental spinal cord injury has not yet been examined in detail.

In preliminary experiments, we observed that some animals were dying due to bleeding from the airways and suffocation during balloon-induced spinal cord compression, when using lower levels of isoflurane anesthesia. To evaluate whether the anesthesia levels or other factors are responsible for such reactions, we undertook a comprehensive study of different doses of anesthesia using the balloon compression lesion model (Vanický et al., 2001). In addition, we monitored blood pressure, heart rate, the level of functional recovery and spinal cord tissue sparing in animals with or without neurogenic pulmonary edema. To demonstrate the role of the sympathetic nervous system, we also studied blood pressure and

heart rate in animals anesthetized by 1.5% isoflurane that were subjected to ganglionic blockade by pentolinium prior to balloon inflation.

METHODS

Animals

We used 148 male Wistar rats (Velaz, Prague, Czech Republic) with body weights of 300–330 g. This study was performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24th of November 1986 (86/609/EEC) regarding the use of animals in research and was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine ASCR, Prague, Czech Republic.

Design of the Study

In preliminary experiments, we determined the minimum safe concentration of isoflurane anesthesia, under which no corneal, tail pinch or interdigital toe reflexes occur, to be 1.5% isoflurane in air (flow of anesthetic mixture was 300 mL/min).

In the first part of our study, animals were anesthetized with 1.5% ($n = 12$), 2% ($n = 12$), 2.5% ($n = 12$), 3% ($n = 16$), 4% ($n = 3$), or 5% ($n = 3$) isoflurane in air, and a spinal cord balloon compression lesion was made (Fig. 1). Animals were sacrificed 10 min after lesioning, and the grade of neurogenic pulmonary edema was evaluated using macroscopic visual examination of subpleural bleeding, the p-index (lung weight/body weight), and histological examination of lung tissue sections. Routine paraffin embedding and hematoxylin-eosin staining of the spinal cord lesion sites were performed. In an additional 10 animals (two from each of the 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, and control groups), *in vivo* x-ray examination was performed. Moreover, blood pressure and heart rate were monitored in animals from the 3% ($n = 6$) and 1.5% ($n = 6$) groups. Controls were healthy noninjured animals, sacrificed immediately after the induction of anesthesia. To make sure that the observed pulmonary edema was “neurogenic,” we anesthetized 3 animals from each group with isoflurane (1.5%, 2%, 2.5%, or 3%) for 40 min, while no surgery was performed, and then examined their lungs.

In the second part of the study, we evaluated the level of functional recovery and spinal cord tissue sparing in animals with (1.5% group) or without (3% group) neurogenic pulmonary edema for 7 weeks following a balloon compression lesion. On the second day after the injury, *in vivo* MR images of the injured spinal cord were taken to verify the lesion procedure (Fig. 1). Animals

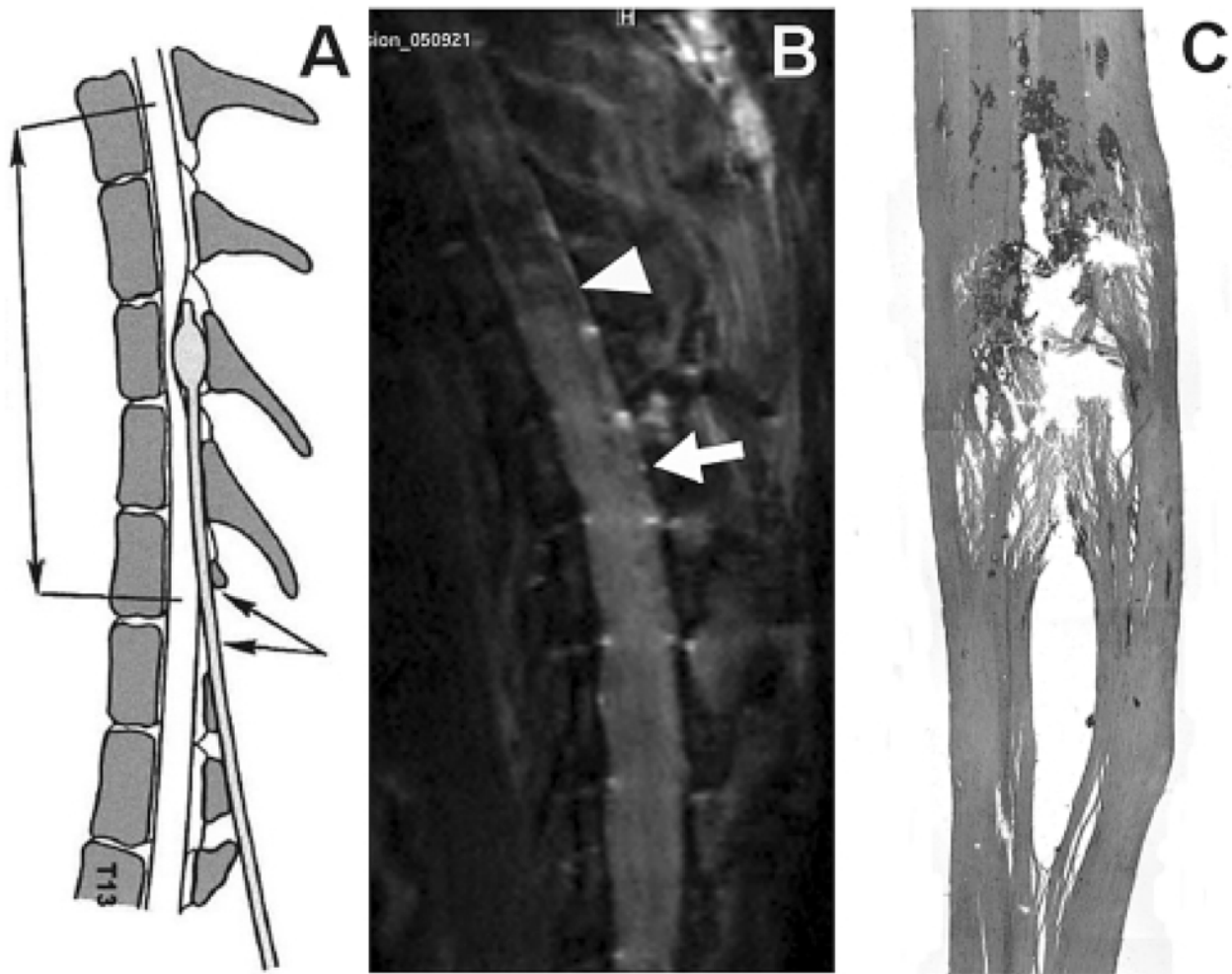


FIG. 1. Balloon compression lesion. (A) Schematic drawing of the injury procedure. The insertion site of the balloon is marked by two arrows on the right; the part of the spinal cord used for morphometric analysis is marked by the left arrow. (B) Sagittal magnetic resonance image of a spinal cord in which a balloon compression lesion (arrowhead) was performed one day earlier. Arrow, site of insertion of the catheter. (C) Hematoxylin-eosin-stained tissue section of a balloon compression spinal cord lesion.

were behaviorally tested using the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) locomotor test and the plantar test 24 h post-injury and then once per week. In addition, post mortem morphometric analysis of the volume of the spared white and gray matter was performed.

Balloon-Induced Spinal Cord Injury

After the induction of anesthesia with 5% isoflurane in room air (flow 300 mL/min), animals were maintained in 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, or 5% isoflurane anesthesia (flow 300 mL/min) via a face mask throughout the operation. All animals were heated to 37°C, and their body temperature was measured by a rectal thermometer to standardize the procedure and to exclude the influence

of hypo- or hyperthermia (Cambria et al., 1997; Urdzíkova and Vanický, 2006). For spinal cord injury, we used the model of an epidural balloon compression lesion, as described in detail previously (Vanický et al., 2001). Briefly, under aseptic conditions, a 2-cm median skin incision at the Th10-L1 level was made. The dorsal muscles were shifted laterally, and the Th10 and Th11 spinous processes were removed. A hole was drilled into the Th10 lamina with a dental drill. Then, a 2-F French Fogarty catheter (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA) was filled with distilled water and connected to a 50- μ L Hamilton syringe and inserted into the dorsal epidural space 10 mm rostrally, to reach the Th8-Th9 spinal level (Fig. 1). The balloon was rapidly inflated with 15 μ L of distilled water for 5 min, using a micro-

manipulator. Subsequently, the balloon was deflated and removed. Soft tissues and the skin were sutured.

To verify the injury procedure, the balloon was inflated before and immediately after the injury procedure to confirm the inflation of the balloon in the spinal channel. The inflation of a balloon to 15 μ L in the spinal channel produces an incomplete lesion, so after 7 weeks, the hindlimbs of the animals are able to support body weight and occasionally forelimb-hindlimb coordination is observed. This state corresponds to a BBB score of 9–11 at 7 weeks post-injury.

Evaluation of Neurogenic Pulmonary Edema

In the first part of the study, animals were sacrificed 10 min after the removal of the catheter; the lungs were immediately removed and weighed. Subsequently, selected organs (brain, heart, thymus, liver, intestine, kidney, spleen, and urinary bladder) were dissected to detect other possible sites of hemorrhage or other pathologic changes. In all cases, a mild hematoma, maximally 1 mm in diameter, was found in the hilus area due to the manipulation of the pulmonary vessels during lung removal (not taken into further account). The level of pulmonary subpleural bleeding was evaluated macroscopically as “Absent” (no bleeding on the lung surface), “Grade I” (small bleeding areas, occupying not more than 10% of the lung surface), “Grade II” (medium-sized bleeding areas, occupying 11–50% of the lung surface), and “Grade III” (massive bleeding areas, occupying more than 50% of the lung surface; Fig. 2). Each lung was evaluated separately. To estimate the liquid gain of the lungs, both lungs were weighed, and the relative pulmonary weight was calculated as the pulmonary index (lung weight/body weight \times 100), which has been previously considered to be very sensitive to the degree of pulmonary edema (Leal Filho et al., 2005a,b; Mesquita et al., 2002; Minnear and Connel, 1982). The lungs were immediately fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) for 2 days, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. Five-micron sections were cut, and the thickness of the alveolar walls measured using NeuroLucida software (MicroBrightField, Inc.). From each lung, three sections (from the inferior, middle, and superior parts of the lung) were taken, and all alveolar wall thicknesses in one representative field from each section were measured. A representative field was defined as a site in the non-subpleural lung parenchyma, without any large vessel or bronchus, outside of the hilus region.

Measurement of Blood Pressure and Heart Rate Changes

Systolic, diastolic and mean arterial blood pressure, together with heart rate, were monitored in animals from

the 3% and 1.5% groups using a PowerLab system (AD Instruments, Colorado Springs). Under isoflurane anesthesia, a catheter was inserted into the left carotid artery, exteriorized in the interscapular region, the animal put into a prone position and a balloon compression lesion performed. The systolic, diastolic, and mean arterial pressure (mm Hg), together with heart rate (bpm), were monitored for 5 min before the procedure, throughout the entire procedure and for 5 min after the procedure. The values obtained were (1) the baseline value, (2) the value during the skin incision (minimum), (3) the value during the muscle incision (minimum), (4) the value during the inflation of the balloon (maximum), (5) the value of inflated balloon (2-min interval from the beginning of inflation), and (6) the value after 5 min of recovery.

Ganglionic Blockade

To eliminate the influence of the sympathetic nervous system, we administered the ganglionic blocker pentolinium (5 mg/kg i.v., Sigma) to five animals anesthetized with 1.5% isoflurane at 3 min before the balloon inflation. Blood pressure and heart rate were monitored as described above.

X-Ray Imaging

To analyze the extent of neurogenic pulmonary edema *in vivo*, we used x-ray imaging employing the Image Station In-Vivo FX System (Eastman Kodak Company). Animals were anesthetized with 1.5%, 2%, 2.5%, or 3% isoflurane and a balloon compression lesion was made. Before awakening from the anesthesia, pentobarbital (30 mg/kg) was injected, the animals were placed in the Image Station, and routine x-ray images were taken (35 kVP, exposure time 5 min).

Postoperative Care

After the lesion procedure, the animals developed a complete paraplegia for 2–3 days post-injury, followed by a gradual recovery during 5 weeks after the injury. The animals were housed in pairs, to reduce stress from isolation, on a 12-h light-dark cycle with standard rat chow and water *ad libitum*. After lesioning, manual bladder expression was performed. Generally, the expression of the bladder was performed twice a day during the early postoperative period. With the improvement of the animal's condition, it was performed once a day until the end of the second week, by which time a reflex bladder was usually established.

Behavioral Testing of Animals

All animals included in the second part of the study were allowed to survive for 7 weeks post-injury.

PULMONARY EDEMA IN SPINAL CORD INJURED RAT

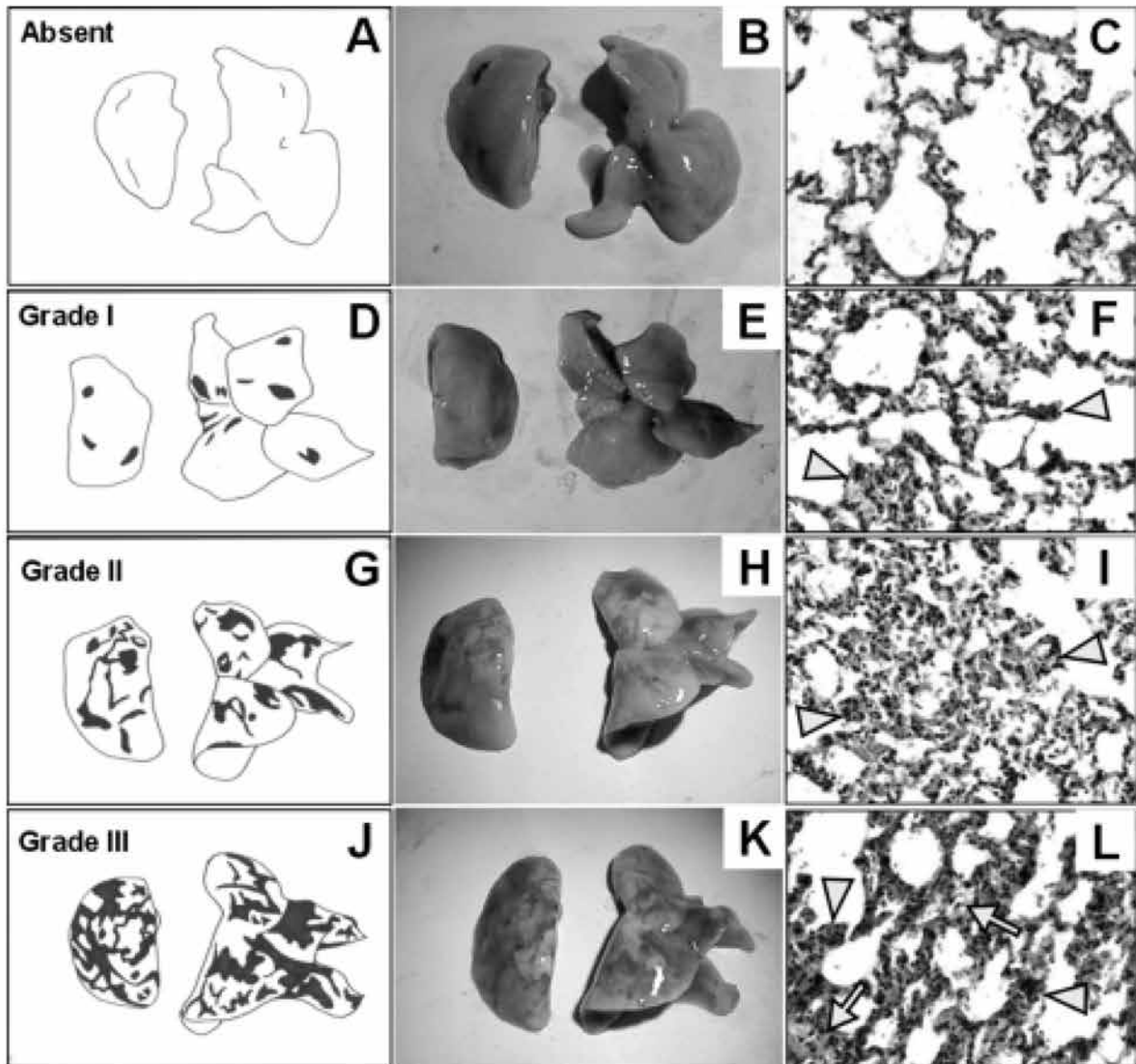


FIG. 2. The grading of subpleural hematoma (absent, grade I, II, III) and histological examination of lung tissue. (A–C) The absence of subpleural bleeding. The histology (C) corresponds to that of normal lungs. (D–F) Grade I subpleural bleeding in which no more than 10% of the lung surface is affected, with small hemorrhagic areas. The thickness of the alveolar wall indicates the beginning of interstitial edema (arrowheads in F), and occasional erythrocyte extravasation can be seen. (G–I) Grade II subpleural bleeding in which 11–50% of the lung surface is affected. Histology (I) reveals a thickening of the alveolar walls (arrowheads in I), and bleeding is apparent. (J–L) Grade III subpleural bleeding in which more than 51% of the lung surface is affected. A massive thickening of the alveolar wall (arrowheads in L), interstitial and intraalveolar edema (arrows in L), and a massive extravasation of erythrocytes are visible.

Hindlimb performance was evaluated using the BBB open field locomotor test developed by Basso et al. (1995). Sensation in the hindlimbs was determined according to the latency (in seconds) of hindlimb withdrawal from thermal stimulation using the plantar test

(Ugo Basil, Comerio, Italy), as described previously (Syková et al., 2005; Urdzиковá et al., 2006). Two observers performed the BBB and plantar tests before injury, at 24 h after injury, and then once a week throughout the survival period.

Histological Procedures and Assessment of Spinal Tissue Sparing

For routine hematoxylin-eosin staining, a 3-cm-long segment of spinal cord containing the lesioned site was dissected, put into 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) for at least 2 days, embedded in paraffin, cut into 30- μ m-thick sections, stained with hematoxylin and eosin and mounted.

At 7 weeks post-injury, animals were deeply anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg), and animals were transcardially perfused with saline, followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4). The entire spinal cord was left in the spinal canal overnight, and then carefully removed and postfixed in the same fixative and stored at 4°C until further processing. A 2-cm-long segment of the spinal cord containing the lesioned site was dissected and embedded in paraffin. The whole segment was serially cut, and series of 20 sections (thickness 5 μ m) were collected (2 mm distance between individual sections). The sections were stained with Luxol Fast Blue and Cresyl Violet. We used these stains to facilitate the discrimination between gray and white matter at low magnifications. Every section was imaged using a digital camera; high resolution images were used to delineate the spared white and gray matter, and their areas were measured using the image analysis software NeuroLucida (MicroBrightField, Inc.) For statistical analysis, 13 lesion-centered sections were used from each spinal cord. The volume of the spared tissue in this 11 mm long segment was calculated as the sum of cross-sectional areas multiplied by the distance between them (Vanický et al., 2001).

Magnetic Resonance Imaging

To verify the injury procedure and to evaluate the lesion development, we performed magnetic resonance (MR) imaging of the lesion site 1 day after injury (Fig. 1). Spinal cords were scanned *in vivo* on an MR spectrometer (Bruker Biospec 47/20, 4.7 Tesla, 20 cm room temperature bore) equipped with 200 mT/m gradient system and a home-made quasi TEM mode operating microstrip surface coil for spinal cord imaging (Burian and Hájek, 2004). Sagittal images (matrix 512 \times 160, FOV 10 \times 3 cm, slice thickness 0.5 mm, contiguous slices, TE/TR 70/2500 msec) and axial images (matrix 256 \times 128, FOV 4 \times 2 cm, slice thickness 0.5 mm, slice gap 0.5 mm, TE/TR = 70/2800 msec) were acquired using an ordinary RARE sequence with the RARE factor equal to 8.

Statistical Analysis

The mean p-index of each group, the thickness of the alveolar wall as well as blood pressure and heart rate val-

ues are reported as mean \pm SEM. Intergroup differences were analyzed using a non-paired Student's *t*-test. In individual animals, BBB scores were averaged across hindlimbs, and intergroup differences were analysed using the non-parametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U*-tests. Morphometric measurements were used to construct plots of consecutive cross-sectional areas of the spared tissue at individual levels of the spinal cord rostral and caudal to the epicenter. The differences at each level were analyzed using the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney *U*-tests. Body weights at individual survival time points and the calculated volumes of the spared tissue within the 11-mm-long segments were compared by a non-paired Student's *t*-test. Statistically significant differences ($p < 0.05$) are marked in figures and tables by asterisks.

RESULTS

Spinal Cord Injury

The spinal cord lesioning procedure was performed in all animals without any unexpected complications. The inflation of the balloon was accompanied by skeletal muscle contractions in all cases, which was considered as a normal reaction to injury and was in accordance with our previous observations (Syková et al., 2005, 2006a; Urdzůvková et al., 2006).

Respiratory failure, accompanying spinal cord compression, followed the onset of the injury procedure in 30% of cases (37 of 124 operated animals), independently of the concentration of isoflurane anesthesia used. The duration of respiratory arrest ranged from 5 to 40 sec, with a mean duration of 21.56 ± 9.11 sec. Although all the animals were subjected to an autopsy, no hemorrhage in any other examined organ (brain, heart, thymus, liver, intestine, kidney, spleen, and urinary bladder) was found.

According to our results, we divided the animals into a "low isoflurane group" (1.5–2% isoflurane), in which all animals developed neurogenic pulmonary edema, a "medium isoflurane group" (2.5–3% isoflurane), with a very low occurrence of neurogenic pulmonary edema, and a "high isoflurane group" (more than 4% isoflurane), in which all animals died due to anesthesia overdose (Table 1).

Neurogenic Pulmonary Edema in Groups Anesthetized with a Low Concentration of Isoflurane

All animals anesthetized with a low concentration of isoflurane (1.5% and 2% groups) developed neurogenic

PULMONARY EDEMA IN SPINAL CORD INJURED RAT

TABLE 1. IMPAIRMENT OF LUNG FUNCTION AFTER SPINAL CORD INJURY IN ANIMALS ANESTHETIZED WITH 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, OR 5% ISOFLURANE AND CONTROL GROUPS

| Isoflurane | N | Absent (% of 2N) | Grade I (% of 2N) | Grade II (% of 2N) | Grade III (% of 2N) | p-index | Died (% of 2N) |
|------------|----|---------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|--------------|-------------------|
| 1.5% | 12 | — | — | 1 (4.17%) | 23 (95.83%) | 0.92 ± 0.18* | 5 (41.67%) |
| 2% | 12 | — | 3 (12.50%) | 7 (29.17%) | 14 (58.33%) | 0.74 ± 0.11* | — |
| 2.5% | 12 | 15 (62.50%) | 6 (25.00%) | 3 (12.50%) | — | 0.51 ± 0.06 | — |
| 3% | 16 | 26 (81.25%) | 4 (12.50%) | 2 (6.25%) | — | 0.50 ± 0.06 | — |
| 4% | 3 | 6 (100.00%) | — | — | — | 0.48 ± 0.01 | 3 (100.00%) |
| 5% | 3 | 6 (100.00%) | — | — | — | 0.47 ± 0.02 | 3 (100.00%) |
| Control | 12 | 24 (100.00%) | — | — | — | 0.45 ± 0.02 | — |

The absence or presence of subpleural bleeding (evaluated as Grade I–III) in different groups (the total number of lungs in each group; the right and left lung were considered separately—and the percentage of all lungs in the corresponding group).

*A significant elevation ($p \pm 0.05$) of the p -index (mean values \pm SEM [standard error of the mean]).

The occurrence of death is shown as the total number of deaths in each group and as the percentage of all animals in the group. Control animals are animals without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia. N, number of rats; 2N, number of lungs.

pulmonary edema. Pulmonary subpleural bleeding developed in all animals anesthetized with 1.5% or 2% isoflurane. In 77% of lungs, Grade III subpleural bleeding was present. In the remaining lungs, either Grade II (17%) or Grade I (6%) subpleural bleeding occurred (Table 1, Figs. 2 and 3). In these animals, the pulmonary index differed significantly from controls: in the 2% isoflurane group, it was 64% higher in comparison with animals from the control group ($p = 0.0000005$), while in the 1.5% group it was even higher, at 101% ($p = 0.0000008$).

Five of 12 animals (42%) in the 1.5% group died in 7.50 ± 3.15 min (range from 5 to 12 minutes) after the beginning of balloon inflation (Table 1). A few minutes before death, their breathing frequency started to increase slowly, and they began to develop a so-called “death rattle.” Subsequently, their ventilation stopped and after several seconds, gaseous blood came out of their noses, followed by the cessation of their heart beat. In contrast, no animal from the 2% group died (Table 1).

Microscopic examination of the lungs showed that lower concentrations of isoflurane caused edema of the alveolar membrane, perforation of thin capillary walls, massive bleeding and the leakage of intravascular fluid into the alveoli. The combination of interstitial and intraalveolar leakage of transudate with intraparenchymal hemorrhage, consequent to spinal cord injury, was con-

sidered as the picture of neurogenic pulmonary edema (Figs. 2 and 3). In the 1.5% group, the thickness of the alveolar membrane was 264% larger in comparison with controls, in the 2% group, 199% larger than in controls ($p = 0.0004$ and $p = 0.006$, respectively; Table 2). In addition, *in vivo* x-ray imaging showed diffuse hyperintensive infiltrates in both lungs, mainly around the hilus regions (Fig. 3). Thus, lower concentrations of isoflurane are causative for the development of massive neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats.

Neurogenic Pulmonary Edema in Groups Anesthetized with a Medium Concentration of Isoflurane

More than 28% of animals anesthetized with a medium concentration of isoflurane in air (2.5% and 3% groups) developed lung hemorrhage, but none of these cases were Grade II or III, and in 72% of cases no subpleural hematoma was present (Table 1, Figs. 2 and 3). In addition, the pulmonary index values were slightly higher in both the 2.5% and 3% groups in comparison with controls (Table 1), but these differences did not reach statistical significance ($p = 0.07$ and $p = 0.06$, respectively).

Macroscopic evaluation of the occurrence of subpleural bleeding showed that animals anesthetized with

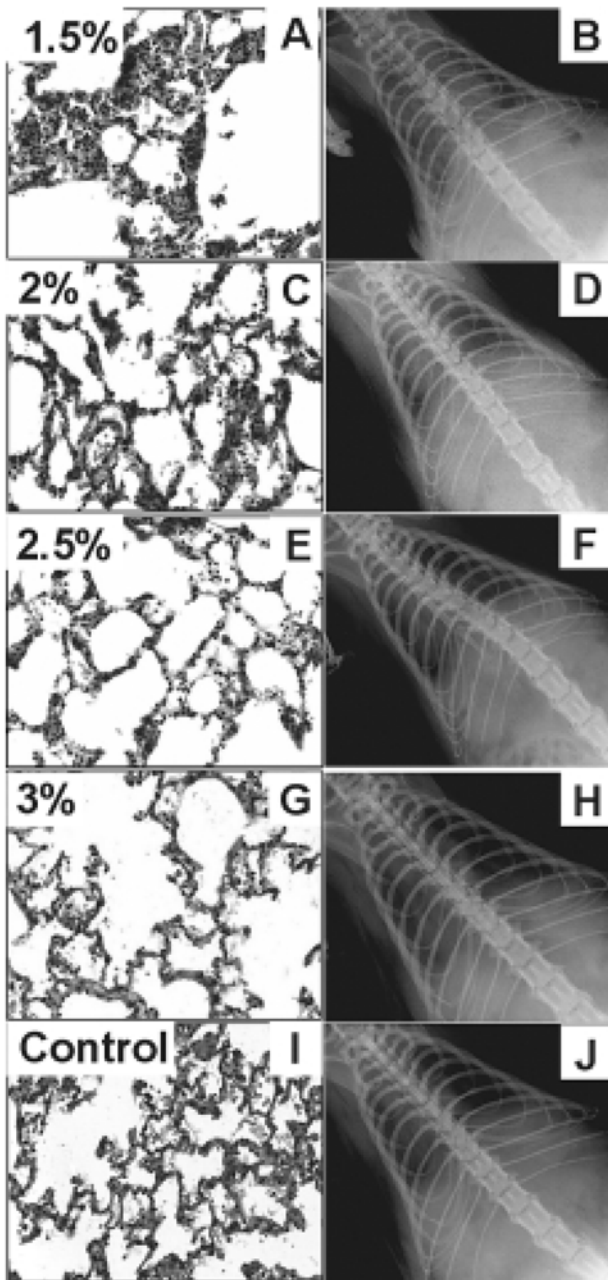


FIG. 3. Neurogenic pulmonary edema in groups anesthetized with 1.5%, 2%, 2.5%, or 3% isoflurane. (A) Histology showing a massive neurogenic pulmonary edema with a thickening of the alveolar walls, interstitial edema, and massive bleeding in a rat anesthetized with 1.5% isoflurane. (B) X-ray image showing a diffuse shadow in both lungs, mainly around the hilus regions, indicative of neurogenic pulmonary edema in a rat anesthetized with 1.5% isoflurane. (C) Histology showing a developed neurogenic pulmonary edema with a thickening of the alveolar walls and occasional bleeding areas in a rat anesthetized with 2% isoflurane. (D) X-ray image showing a diffuse shadow in both lungs, mainly around the hilus regions, indicative of neurogenic pulmonary edema in a rat anesthetized with 2% isoflurane. (E) Occasional bleeding areas without evident pulmonary edema in a rat anesthetized with 2.5% isoflurane. (F) X-ray image of normal lungs in a rat anesthetized with 2.5% isoflurane. (G) Occasional bleeding areas without evident pulmonary edema in a rat anesthetized with 3% isoflurane. (H) X-ray image of normal lungs in a rat anesthetized with 3% isoflurane. (I) Histology of the lungs of a control animal. (J) X-ray image of normal lungs in a control animal.

mal lung tissue, with a slightly increased thickness of the alveolar walls and limited extravasation of blood elements (Figs. 2 and 3). In the 2.5% group, the thickness was 30% larger and in the 3% group only 18% larger in comparison with controls (Table 2). Thus, only in the 2.5% group did the difference in alveolar wall thickness reach statistical significance ($p = 0.03$). *In vivo* x-ray examination showed lungs that were comparable to controls (Fig. 3). Thus, lesioned animals anesthetized with medium concentrations of isoflurane developed only a very low level of neurogenic pulmonary edema. In addition, 3% isoflurane can be considered as the safest concentration to use for balloon compression spinal cord lesioning.

Neurogenic Pulmonary Edema in Groups Anesthetized with a High Concentration of Isoflurane

All animals from the high anesthesia groups (4% or 5% isoflurane) died due to an overdose of anesthesia (Table 1). Animals from the 4% isoflurane group died in 15.33 ± 2.81 min and animals from the 5% group in 6.33 ± 2.52 min after the onset of anesthesia. There were no rattle or seizures present in these animals. Their breathing rate slowly decreased until it stopped. Post mortem examination of their lungs revealed no macroscopic or microscopic signs of neurogenic pulmonary edema (Tables 1 and 2, Fig. 2). In all cases, subpleural bleeding did not occur, and the mean pulmonary indexes were comparable with control animals (Table 1).

3% isoflurane developed neurogenic pulmonary edema less frequently than did animals from the 2.5% group: the difference in the occurrence of subpleural bleeding was almost 20% (19% in the 3% group vs. 38% in the 2.5% group; Table 1). However, the pulmonary index of both groups was comparable (0.50 vs. 0.51), and the difference between both groups and controls did not reach statistical significance ($p = 0.06$ and $p = 0.07$, respectively; Table 1).

Histological examination of animals anesthetized with a medium concentration of isoflurane showed almost nor-

PULMONARY EDEMA IN SPINAL CORD INJURED RAT

TABLE 2. THICKNESS OF THE ALVEOLAR WALL (μM) IN THE LUNGS OF ANIMALS WITH SPINAL CORD INJURY ANESTHETIZED WITH 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 4%, OR 5% ISOFLURANE AND CONTROL GROUPS

| Group | Thickness of alveolar wall (μm) |
|---------|----------------------------------------------|
| 1.5% | 119.78 \pm 32.30* |
| 2% | 98.30 \pm 39.24* |
| 2.5% | 42.69 \pm 21.00* |
| 3% | 38.67 \pm 18.54 |
| 4% | 38.00 \pm 12.06 |
| 5% | 28.57 \pm 11.02 |
| Control | 32.89 \pm 12.50 |

Statistical significance is denoted by an asterisk ($p < 0.05$).

Control animals are animals without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia.

No Pulmonary Edema in Rats without Spinal Cord Injury

We observed no signs of subpleural bleeding or pulmonary edema in animals without injury anesthetized for 40 min with 1.5%, 2%, 2.5%, or 3% isoflurane. No animal from any of these group showed the presence of subpleural bleeding (in every animal it was graded as Absent) or a significantly elevated p-index (0.45 ± 0.01 in the 1.5% group; 0.44 ± 0.02 in the 2% group; 0.49 ± 0.06 in the 2.5% group and 0.44 ± 0.02 in the 3% group). X-ray images, histological examination of lung tissue and the mean thickness of the alveolar wall were also normal (data not shown). No animal died.

The Grade of Subpleural Bleeding Corresponds to Edema Level

When we measured the thicknesses of the alveolar walls in different grades of subpleural bleeding (Absent, Grade I, Grade II, and Grade III), we found a correlation between subpleural bleeding level and alveolar wall thickness (Table 3, Fig. 2). When subpleural bleeding was absent, the average thickness of the alveolar wall was comparable with that of controls. In Grade I, the thickness was 81% greater than in controls ($p = 0.003$), in Grade II it was 105% greater ($p = 0.0007$) and in Grade III, 271% greater ($p = 0.00002$; Table 3). In addition, we observed an increase in blood cell numbers and the amount of interalveolar edema fluid with increasing grade of subpleural bleeding (Fig. 2).

Major Increase of Blood Pressure and Decrease of Heart Rate Associated with Pulmonary Edema

The baseline values of mean arterial pressure and heart rate differed significantly between animals with and with-

out neurogenic pulmonary edema (Table 4). The spinal cord injury procedure increased systolic and diastolic pressure in all animals, both with and without NPE. After an initial decrease of heart rate and blood pressure at the beginning of the surgical approach (during the muscle incision, the removal of spinous processes and the drilling of a hole into the vertebra), a rapid increase in both systolic and diastolic pressure followed the inflation of the balloon (Fig. 6, Table 4).

The mean arterial pressure decreased during the skin and muscle incisions, but rose over the baseline values during the spinal cord injury. After SCI, the mean arterial pressure decreased again under the baseline values (Table 4). Rats from the 1.5% isoflurane group exhibiting the presence of severe neurogenic pulmonary edema (p-index = 0.72 ± 0.13 ; subpleural bleeding absent) had significantly higher values of mean arterial pressure before, during, and after the procedure (Table 4) than rats from the 3% group without neurogenic pulmonary edema (p-index = 0.41 ± 0.05 ; subpleural bleeding grade II or III). The difference in mean arterial pressure between the 1.5% and 3% groups ranged from 5% (during the muscle incision) to 30% (during the 2-min period after balloon inflation). The maximal values of mean arterial pressure were observed after the inflation of the balloon. During the entire surgical procedure, the differences of the blood pressure readings from baseline values were greater in animals from the 1.5% group, indicating their greater sensitivity to all the procedures. Thus, higher values of mean arterial pressure predispose an animal to develop neurogenic pulmonary edema. Heart rate was higher in the 1.5% than in the 3% group unless the balloon was inflated in the epidural space. The major blood pressure rise in the 1.5% group was accompanied by a considerable fall in heart rate, but this was not observed in the 3% group (Table 4).

During blood pressure and heart rate monitoring, one animal from the 1.5% group died of neurogenic pul-

TABLE 3. THICKNESS OF THE ALVEOLAR WALL (μM) IN THE ABSENCE OR PRESENCE OF SUBPLEURAL BLEEDING, EVALUATED AS GRADE I-III IN ANIMALS WITH BALLOON COMPRESSION LESION

| Hemorrhage | Thickness of alveolar wall (μm) |
|------------|----------------------------------------------|
| Absent | 33.24 \pm 12.53 |
| Grade I | 59.66 \pm 21.70* |
| Grade II | 67.34 \pm 21.60* |
| Grade III | 122.06 \pm 30.87* |
| Control | 32.89 \pm 12.50 |

Statistical significance is denoted by an asterisk ($p < 0.05$).

Control animals are animals without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia.

QU1

TABLE 4. BASELINE MEAN ARTERIAL PRESSURE AND HEART RATE VALUES AS WELL AS THE VALUES FOUND AFTER PARTICULAR SURGICAL PROCEDURES IN THE 1.5% AND 3% GROUPS DURING THE PERFORMANCE OF A BALLOON COMPRESSION LESION

| | 3% group | 1.5% group | 1.5% group—pentolinium |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Mean arterial pressure (mm Hg) | | | |
| Baseline values | 78 ± 9 | 93 ± 13 [†] | 97 ± 3 [†] |
| Skin incision | 73 ± 8* (-6%) | 85 ± 11 [†] (-9%) | 77 ± 9* (-21%) |
| Muscle incision | 55 ± 3* (-29%) | 58 ± 3* [†] (-38%) | 66 ± 11* [†] (-32%) |
| Pentolinium injection | — | — | 55 ± 3* (-43%) |
| Balloon inflation, maximum | 127 ± 20* (+63%) | 155 ± 21* [†] (+67%) | 75 ± 10* [†] (-3%) |
| Balloon inflation, 2 min | 97 ± 15* (+24%) | 126 ± 21* [†] (+35%) | 67 ± 8* [†] (-31%) |
| Recovery | 60 ± 6* (-23%) | 77 ± 18* [†] (-17%) | 55 ± 4* (-43%) |
| Heart rate (bpm) | | | |
| Baseline values | 380 ± 27 | 433 ± 39 [†] | 402 ± 26 |
| Skin incision | 383 ± 24 (+1%) | 430 ± 31 [†] (-1%) | 438 ± 23* [†] (+9%) |
| Muscle incision | 355 ± 19* (7%) | 396 ± 30* [†] (9%) | 425 ± 34 [†] (6%) |
| Pentolinium injection | — | — | 313 ± 40* (-22%) |
| Balloon inflation, maximum | 359 ± 32 (-6%) | 283 ± 73* (-35%) | 386 ± 48 (-4%) |
| Balloon inflation, 2 min | 378 ± 16 (-1%) | 327 ± 48 [†] (-25%) | 370 ± 47 (-8%) |
| Recovery | 341 ± 30* (-10%) | 357 ± 38* (-18%) | 317 ± 47* [†] (-21%) |

*Statistically significant (paired Student's *t*-test, *p* < 0.05) in-group differences in comparison to baseline values are marked with an asterisk.

[†]Significant (non-paired Student's *t*-test, *p* < 0.05) differences from the 3% group are marked with a dagger. Relative changes from baseline values are shown in parentheses.

monary edema. Although its baseline mean arterial pressure (88 mm Hg) was essentially average for our study (the range in the 1.5% group was 67–105 mm Hg), its heart rate (472 bpm) was the highest observed in our study (the range of the other animals in the 1.5% group was 377–463 bpm). During the entire procedure, the animal's blood pressure and heart rate were within the range of the other animals: even the maximum value of mean arterial pressure observed while the balloon was inflated in the spinal channel (167 mm Hg) was not the highest in the 1.5% group (two animals reached 170 mm Hg). The animal's heart rate and blood pressure started to decrease towards the typical values seen in the 1.5% group approximately 4 min after the inflation of the balloon. The animal died during the second minute after the deflation of the balloon.

Ganglionic Blockade Prevents Blood Pressure Rise and Pulmonary Edema Development

The acute inhibition of the sympathetic nervous system abolished the blood pressure rise induced by the balloon compression procedure in rats from the 1.5% isoflurane group. The heart rate response of these animals were comparable to the animals from the 3% group (Fig. 6, Table 4). The *p*-index (0.42 ± 0.01) indicated the absence of pulmonary edema development, and no subpleural bleeding was observed in animals from the 1.5% group following ganglion blockade. Thus, the inhibition of the sympathetic system, induced by an injection of pentolinium prior to the inflation of the balloon, prevented the development of neurogenic pulmonary edema.

PULMONARY EDEMA IN SPINAL CORD INJURED RAT

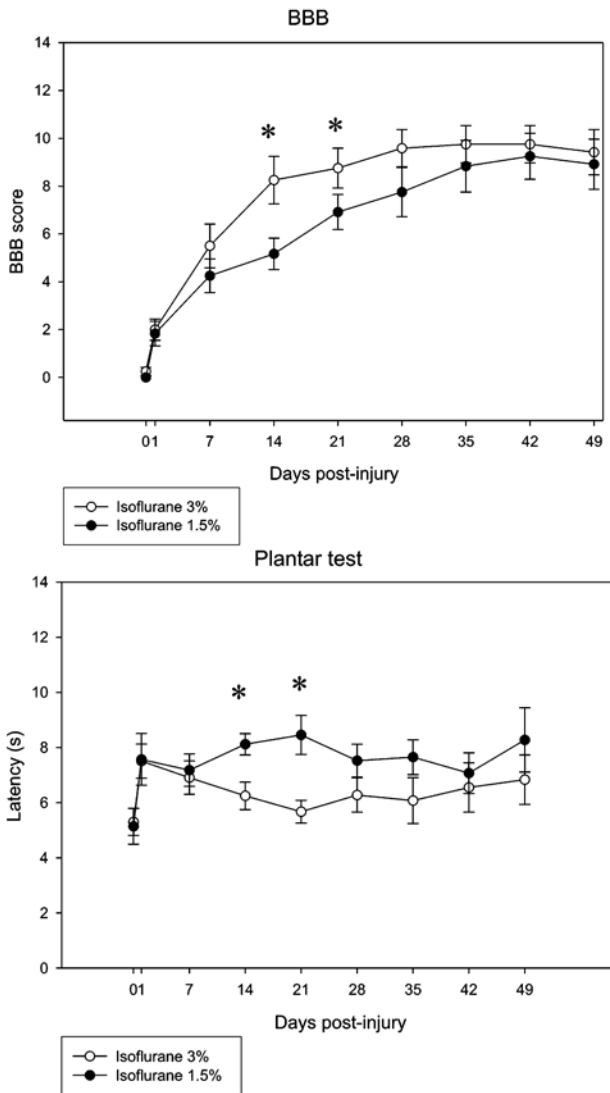


FIG. 4. Behavioral testing of rats with spinal cord injury anesthetized with 1.5% or 3% isoflurane. (A) Basso, Beattie, and Bresnahan (BBB) scores are significantly higher in rats anesthetized with 3% (without neurogenic pulmonary edema) than in rats anesthetized with 1.5% isoflurane. (B) The sensitivity of the hindlimbs is expressed by the latency of hindlimb withdrawal, which is significantly shorter in rats anesthetized with 3% isoflurane.

Behavioral Outcome, Morphometric Analysis, and Magnetic Resonance Imaging

All 24 animals (12 from the 1.5% group and 12 from the 3% group) developed complete paraplegia after the injury procedure, corresponding to a BBB score of 0–1. Throughout the entire recovery period, animals from the 3% group recovered locomotor functions, as shown by their BBB scores, faster than did the animals from the 1.5% group (Fig. 4). This difference reached statistical

significance two and three weeks after the injury ($p = 0.04$ at both time points; Fig. 4). It can also be noted that, for example, the same BBB score achieved by animals from the 3% group 14 days post-injury was reached by animals from the 1.5% group on the 31st day post-injury.

The recovery of sensory functions, estimated by the plantar test, had a similar course (Fig. 4). After the second week post-injury, the sensory functions of animals from the 3% group recovered more rapidly than did the sensory functions of animals from the 1.5% group. In the

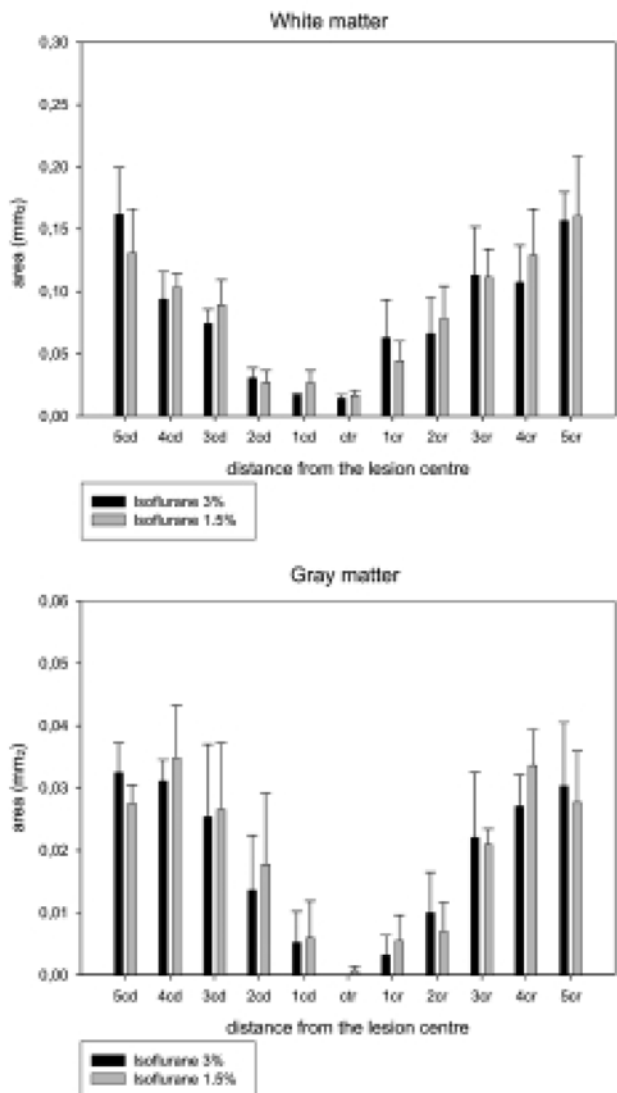


FIG. 5. Area (mm²) of the preserved gray and white matter in the lesion site of animals with spinal cord injury anesthetized with 1.5% or 3% isoflurane. Note that there are no significant differences in the areas of preserved white or gray matter between the 1.5% and 3% groups.

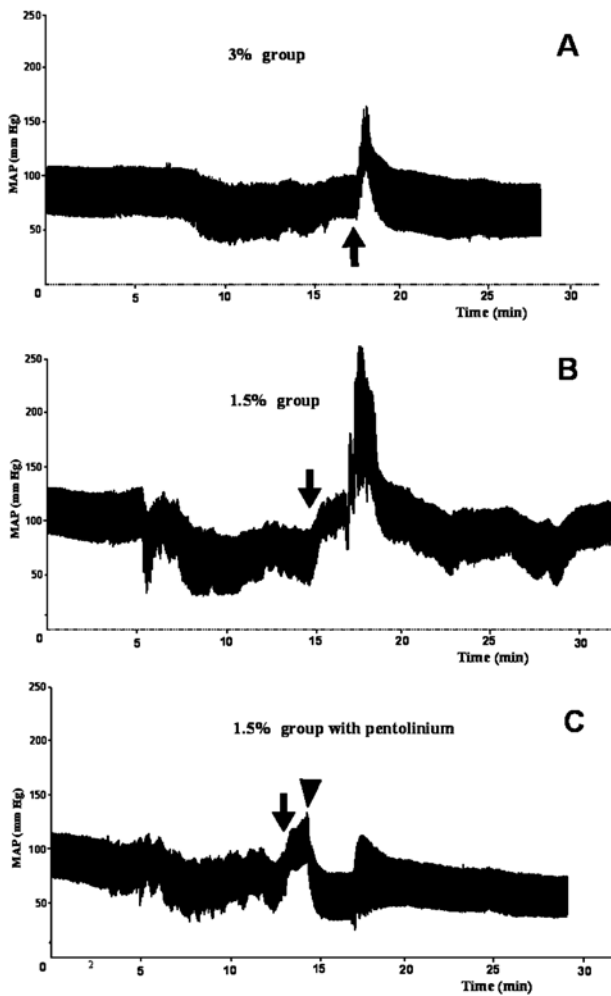


FIG. 6. The time course of blood pressure during the entire surgical procedure, balloon compression, and recovery period in animals from the 3% group (A), the 1.5% group (B), and the 1.5% group with ganglionic blockade (C). Arrow, inflation of the balloon; arrowhead, pentolinium injection.

2nd and 3rd weeks post-injury, the differences reached statistical significance ($p = 0.04$ and $p = 0.02$, respectively). Thus, animals from the 3% isoflurane group recovered more rapidly than did animals from the 1.5% isoflurane group. Interestingly, the difference in recovery course was accentuated mainly during the second and third weeks after injury, most likely due to the more impaired general health status of rats anesthetized with 1.5% isoflurane.

Morphometric analysis of the volume of spared white and gray matter in the lesion site revealed no significant differences between the 1.5% and 3% groups (Fig. 5). The lesions in both groups showed a hyperintense signal on T2W images, indicating the lesion site and pseudo-

cystic cavities (Fig. 1). *In vivo* assessment of the lesioned tissue revealed no major differences between the two groups (data not shown). Thus, in this case the functional effect of the injury did not correspond to its morphological effect.

DISCUSSION

Our results showed that lower concentrations of isoflurane anesthesia promote the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. In addition, rats with neurogenic pulmonary edema had a worse neurological outcome after the injury than did the rats without edema, mainly during the second and third week after injury. However, a morphological analysis of the volume of spared white and gray matter revealed no differences between groups. For experiments involving spinal cord injury, a concentration of 2.5–3% isoflurane in air (flow 300 mL/min) would be optimal. The observed differences between experimental groups indicate the necessity to keep the concentration of isoflurane constant in all animals of all experimental groups throughout a study. The presence or absence of subpleural bleeding according to our criteria (Fig. 2) might be useful for evaluating the presence/absence of neurogenic pulmonary edema.

Neurogenic pulmonary edema has been characterized as interstitial and intraalveolar edema together with intraalveolar hemorrhage, developed as a result of severe central nervous system injury (Fontes et al., 2003). These conditions include spinal cord injury, subarachnoid hemorrhage, primary spinal cord hemorrhage, brain trauma, intracerebral bleeding, severe epileptic grand mal seizure, intracranial tumor, or subdural hematoma (Fontes et al., 2003; Dragosavac et al., 1997).

There are several theories regarding the pathogenesis of neurogenic pulmonary edema (Dragosavac et al., 1997; Fontes et al., 2003; Leal Filho et al., 2005a,b). The most likely explanation is the severe systemic sympathetic discharge, called the “catecholamine storm” (Fontes et al., 2003; Taoka and Okajima, 1998; Urdaneta et al., 2003). This theory proposes the activation of the sympathetic centers in the medulla oblongata, leading to generalized vasoconstriction, an increase in systemic pressure and the augmentation of central blood volume. A rapid increase in blood volume in the pulmonary vascular bed leads to an increase in pulmonary capillary pressure and an imbalance in the Starling forces. Finally, the extravasation of intravascular fluid and microruptures of the capillary wall cause pulmonary edema and intraalveolar bleeding (Fontes et al., 2003; Leal Filho et al.,

2005a,b; Taoka and Okajima, 1998; Urdaneta et al., 2003). The greater increase in blood pressure and decrease in heart rate as a result of spinal cord injury observed in the animals anesthetized with lower concentrations of isoflurane, accompanied by the development of neurogenic pulmonary edema, support this assumption. To demonstrate the importance of the sympathetic nervous system, we inhibited its function by acute ganglionic blockade (pentolinium). Our data clearly demonstrate that neurogenic pulmonary edema does not develop in the absence of sympathetic vasoconstriction.

The role of a sudden increase of intracranial pressure in the development of neurogenic pulmonary edema should also not be underestimated. In the majority of clinical situations, in which neurogenic pulmonary edema develops, a rapid increase of intracranial pressure is the dominant pathophysiological mechanism (Fontes et al., 2003; Urdaneta et al., 2003). One of the locations most sensitive to the rapid elevation of intracranial pressure is the bottom of the fourth ventricle, where the centers of respiratory and vasomotor control are located. Thus, several authors have speculated that increased intracranial pressure plays a similar role in the altered function of these centers (Fontes et al., 2003; Taoka and Okajima, 1998; Urdaneta et al., 2003; Walder et al., 2002). Some clinical papers have provided support for such theories (Macmillan et al., 2002; Ochiai et al., 2001).

For spinal cord injury, we used an epidural balloon compression lesion model in which the lesion is caused by the rapid inflation of a balloon inside the spinal column (Fig. 1), without destabilization of a spine by the laminectomy, as in other models of spinal cord injury. This procedure must lead to a concomitant increase in intracranial pressure above the lesion site. It can thus activate the neurons in the centers on the bottom of the fourth ventricle. Our previous studies demonstrated the reproducibility of the epidural balloon compression model (Syková and Jendelová, 2005; Syková et al., 2005, 2006a; Urdzíkova et al., 2006;), so we believe that the amount of pressure increase elicited in the current series of experiments was comparable in all the tested groups.

Experimentally, neurogenic pulmonary edema can be developed by the injection of neuropeptide Y, veratrine, or fibrin (fibrinogen + thrombin) into the cisterna magna (Hirabayashi et al., 1996; Ishikawa et al., 1988; Lane et al., 1998; Maron, 1985). Similarly, an injection of excitotoxic glutamate into the fourth ventricle leads to the development of neurogenic pulmonary edema in experimental animals (Kondo et al., 2004). These experiments show the crucial role of medulla oblongata nuclei in the development of neurogenic pulmonary edema.

It has been shown that halogenated inhalation anesthetics, such as halothane or isoflurane, decrease alveolar epithelial liquid clearance and thus decrease the threshold for the development of pulmonary edema in rats (Rezaiguia-Delclaux et al., 1998; Laffon et al., 2002). In addition, isoflurane inhibits mitochondrial oxidation, leading to a decrease in the production of ATP in type II alveolar cells and thus stimulates the production of lactate in these cells. It also decreases the synthesis of phosphatidylcholine and induces the apoptosis of type II alveolar cells, so the surfactant is being damaged (Mollieux et al., 1999). Some authors have thus expressed their concern over the usage of halogenated inhalation anesthetics (Wiener-Kronisch and Gropper, 1998). This negative side effect is not observed with the use of intravenously injected anesthetics such as pentobarbital or ketamine-xylazine (Mollieux et al., 1999). The development of neurogenic pulmonary edema in our experiments can thus be caused by a combination of three factors: (i) the negative influence of isoflurane on type II alveolar cells (ii) increased intracranial pressure caused by the rapid inflation of the balloon and additional impairment of nuclei in the medulla oblongata, and (iii) most importantly, a low degree of anesthesia unable to fully suppress the stress of the animal and thus decreasing the threshold for the activation of the sympathetic system and the onset of a catecholamine storm. This latter possibility was supported by our finding that ganglionic blockade prevented the development of neurogenic pulmonary edema.

The worse neurological outcome of animals with neurogenic pulmonary edema (Fig. 4) is probably related to the generally worse health of these animals. It has been previously shown that patients with spinal cord injury who developed neurogenic pulmonary edema had a much worse prognosis than those who did not develop it, although the pulmonary edema is resolved either spontaneously or by using one of several treatment-supportive strategies within days (Fontes et al., 2003; Macleod, 2002). From spinal cord injury studies, it is known that the first hours after the injury are the most critical for the patient (Bracken et al., 1992; Syková et al., 2006b). When the initial stage after the injury is complicated by neurogenic pulmonary edema, it might thus slow down the recovery of the neural pathways, as reflected in our experiment by the BBB and plantar test scores.

We conclude that lower concentrations of isoflurane promote the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. For experiments involving balloon-induced spinal cord injury, a concentration of 2.5–3% isoflurane in air (flow 300 mL/min) would be optimal. In addition, it is necessary to keep the concentration of isoflurane constant in all animals of a study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dominika Dus[c]ková for excellent technical assistance and James Dutt for critical reading of the manuscript. We thank Ardy Arjomandi (International Business Manager, Molecular Imaging System, Eastman Kodak Company) for the opportunity to use the Image Station In-Vivo FX System. We acknowledge the support provided by grants AV0Z50390512, 1M0021620803, GACR309/06/1246, and 1A8697-5, and the EC FP6 project RESCUE (LSHB-CT-2005-518233).

REFERENCES

- ANTONIUK, S.A., OLIVA, A.V., BRUCK, I., MALUCELLI, M., YABUMOTO, S., and CASTELLANO, J.L. (2001). Sudden unexpected, unexplained death in epilepsy autopsied patients. *Arq. Neuropsiquiatr.* **59**, 40–45.
- BASSO, D.M., BEATTIE, M.S., and BRESNAHAN, J.C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma* **12**, 1–21.
- BRACKEN, M.B., SHEPARD, M.J., COLLINS, JR., W.F., et al. (1992). Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J. Neurosurg.* **76**, 23–31.
- BURIAN, M., and HÁJEK, M. (2004). Linear microstrip surface coil for MR imaging of the rat spinal cord at 4.7 T. *MAGMA* **17**, 359–362.
- CAMBRIA, R.P., DAVISON, J.K., and ZANNETTI, S. (1997). Clinical experience with epidural cooling for spinal cord protection during thoracic and thoracoabdominal aneurysm repair. *J. Vasc. Surg.* **25**, 234–241.
- DRAGOSAVAC, D., FALCAO, A.L.E., ARAÚJO, S., and TERZI, R.G.G. (1997). Neurogenic pulmonary edema: report of two cases. *Arq. Neuropsiquiatr.* **55**, 305–309.
- FONTES, R.B., AGUIAR, P.H., ZANETTI, M.V., ANDRADE, F., MANDEL, M., and TEIXEIRA, M.J. (2003). Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* **15**, 144–150.
- HIRABAYASHI, A., NISHIWAKI, K., SHIMADA, Y., and ISHIKAWA, N. (1996). Role of neuropeptide Y and its receptor subtypes in neurogenic pulmonary edema. *Eur. J. Pharmacol.* **296**, 297–305.
- ISHIKAWA, N., KAINUMA, M., FURUTA, T., and SATO, Y. (1988). Factors influencing fibrin-induced pulmonary edema. *Jpn. J. Pharmacol.* **46**, 255–260.
- KANDATSU, N., NAN, Y.S., FENG, G.G., et al. (2005). Opposing effects of isoflurane and sevoflurane on neurogenic pulmonary edema development in an animal model. *Anesthesiology* **102**, 1182–1189.
- KARLSSON, A.K. (2006). Autonomic dysfunction in spinal cord injury: clinical presentation of symptoms and signs. *Prog. Brain Res.* **152**, 1–8.
- KONDO, H., FENG, G.G., NISHIWAKI, K., et al. (2004). A role for L-glutamate ionotropic receptors in the development of rat neurogenic pulmonary edema. *Eur. J. Pharmacol.* **499**, 257–263.
- LANE, S.M., MAENDER, K.C., AWENDER, N.E., and MARON, M.B. (1998). Adrenal epinephrine increases alveolar liquid clearance in a canine model of neurogenic pulmonary edema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 760–768.
- LAFFON, M., JAYR, C., BARBRY, P., et al. (2002). Lidocaine induces a reversible decrease in alveolar epithelial fluid clearance in rats. *Anesthesiology* **96**, 392–399.
- LEAL FILHO, M.B., MORANDIN, R.C., DE ALMEIDA, A.R., et al. (2005a). Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq. Neuropsiquiatr.* **63**, 990–996.
- LEAL FILHO, M.B., MORANDIN, R.C., DE ALMEIDA, A.R., et al. (2005b). Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci. Lett.* **373**, 165–170.
- MACLEOD, A.D. (2002). Neurogenic pulmonary edema in palliative care. *J. Pain Symptom Manage.* **23**, 154–156.
- MACMILLAN, C.S., GRANT, I.S., and ANDREWS, P.J. (2002). Pulmonary and cardiac sequelae of subarachnoid haemorrhage: time for active management? *Intensive Care Med.* **28**, 1012–1023.
- MARON, M.B. (1985). A canine model of neurogenic pulmonary edema. *J. Appl. Physiol.* **59**, 1019–1025.
- MESQUITA, M.B., MORAES-SANTOS, T., and MORAES, M.F. (2002). Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats. *Neurosci. Lett.* **332**, 119–122.
- MINNEAR, F.L., and CONNELL, R.S. (1982). Prevention of aconitine-induced neurogenic pulmonary edema (NPE) with hypovolemia or methylprednisolone. *J. Trauma* **22**, 121–128.
- MOLLIEUX, S., CRESTANI, B., DUREUIL, B., ROLLAND, C., AUBIER, M., and DESMONTS, J.M. (1999). Differential effects of isoflurane and i.v. anesthetic agents on metabolism of alveolar type II cells. *Br. J. Anaesth.* **82**, 767–769.
- OCHIAI, H., YAMAKAWA, Y., and KUBOTA, E. (2001). Deformation of the ventrolateral medulla oblongata by subarachnoid hemorrhage from ruptured vertebral artery aneurysms causes neurogenic pulmonary edema. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **41**, 529–534.
- PANDEY, C.K., MATHUR, N., SINGH, N., and CHANDOLA, H.C. (2000). Fulminant pulmonary edema after intramuscular ketamine. *Can. J. Anaesth.* **47**, 894–896.
- REZAIGUIA-DELCLAUX, S., JAYR, C., LUO, D.F., SAIDI, N.E., MEIGNAN, M., and DUVALDESTIN, P. (1998).

PULMONARY EDEMA IN SPINAL CORD INJURED RAT

- Halothane and isoflurane decrease alveolar epithelial fluid clearance in rats. *Anesthesiology* **88**, 751–760.
- STOCKER, R., and BURGI, U. (1998). Respiratory problems after injuries of the cervical spine. *Schweiz Med. Wochenschr.* **128**, 1462–1466.
- SYKOVÁ, E., and JENDELOVÁ, P. (2005). Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1049**, 146–160.
- SYKOVÁ, E., URDZÍKOVÁ, L., JENDELOVÁ, P., BURIAN, M., GLOGAROVÁ, K., and HÁJEK, M. (2005). Bone marrow cells—a tool for spinal cord injury repair. *Exp. Neurol.* **193**, 261–262.
- SYKOVÁ, E., and JENDELOVÁ, P. (2006a). Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener. Dis.* **3**, 62–67.
- SYKOVÁ, E., HOMOLA, A., MAZANEC, R., et al. (2006b). Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell. Transplant.* **15**, 675–687.
- TAOKA, Y., and OKAJIMA, K. (1998). Spinal cord injury in the rat. *Prog. Neurobiol.* **56**, 341–358.
- TROLL, G.F., and DOHRMANN, G.J. (1975). Anaesthesia of the spinal cord-injured patient: cardiovascular problems and their management. *Paraplegia* **13**, 162–171.
- TSAO, C.M., YUAN, H.B., NEU, S.H., et al. (1999). Postoperative pulmonary edema after cervical spine surgery—a case report. *Acta Anaesthesiol. Sin.* **37**, 147–150.
- URDANETA, F., and LAYON, A.J. (2003). Respiratory complications in patients with traumatic cervical spine injuries: case report and review of the literature. *J. Clin. Anesth.* **15**, 398–405.
- URDZÍKOVÁ, L., and VANICKÝ, I. (2006). Post-traumatic moderate systemic hyperthermia worsens behavioural outcome after spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord* **44**, 113–119.
- URDZÍKOVÁ, L., JENDELOVÁ, P., GLOGAROVÁ, K., BURIAN, M., HÁJEK, M., and SYKOVÁ, E. (2006). Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte–colony stimulating factor promote recovery after spinal cord injury in rat. *J. Neurotrauma* **23**, 1379–1391.
- VANICKÝ, I., URDZIKOVÁ, L., SAGANOVÁ, K., ČÍŽKOVÁ, D., and GÁLIK, J. (2001). Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J. Neurotrauma* **18**, 1399–1407.
- WALDER, B., BRUNDLER, M.A., TOTSCH, M., ELIA, N., and MOREL, D.R. (2002). Influence of the type and rate of subarachnoid fluid infusion on lethal neurogenic pulmonary edema in rats. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* **14**, 194–203.
- WIENER-KRONISCH, J.P., and GROPPER, M.A. (1998). Halogenated anesthetics and the injured lung: clouds on the horizon? *Anesthesiology* **88**, 1435–1436.

Address reprint requests to:

Dr. Eva Syková

Institute of Experimental Medicine ASCR

Vídeňská 1083

142 20 Prague 4, Czech Republic

E-mail: sykova@biomed.cas.cz

2. Šedý J, Urdzíková L, Likavčanová K, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. Neurosci Lett 2007, 423: 167–171. IF=2,085

A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rat

Jiří Šedý^{a,b,c}, Lucia Urdzíkova^a, Katarína Likavčanová^a,
Aleš Hejčl^b, Pavla Jendelová^{a,b,c}, Eva Syková^{a,b,c,*}

^a Institute of Experimental Medicine, ASCR, Prague, Czech Republic

^b Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

^c Department of Neuroscience, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Received 12 May 2007; received in revised form 19 June 2007; accepted 20 June 2007

Abstract

We describe a new model of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured Wistar male rats. The pulmonary edema was elicited by an epidural thoracic balloon compression spinal cord lesion, performed under a low concentration of isoflurane (1.5 or 2%) in air. Anesthesia with 1.5% isoflurane promoted very severe interstitial and intraalveolar neurogenic pulmonary edema with a significantly increased thickness of the alveolar walls and massive pulmonary hemorrhage. In this group, 33% of animals died. Anesthesia with 2% isoflurane promoted severe interstitial and intraalveolar neurogenic pulmonary edema with less thickening of the alveolar walls and pulmonary hemorrhage. For evoking severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats, 2% isoflurane anesthesia would be more suitable. However, if very severe neurogenic pulmonary edema needs to be evoked, spinal cord injury under 1.5% isoflurane anesthesia could be used, but one-third of the animals will be lost.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Isoflurane; Neurogenic pulmonary edema; Spinal cord injury; Rat; Model

Neurogenic pulmonary edema is an acute, life threatening complication following spinal cord or brain injury. It has been characterized as marked pulmonary vascular congestion, extravasation of protein-rich edema fluid and intraalveolar hemorrhage [12,13,15,16]. Epidemiological data of neurogenic pulmonary edema are scarce; its morbidity in patients with severe central nervous system injury has been reported to be between 40 and 50% and its mortality around 9% [1,6,7].

Several models of neurogenic pulmonary edema have been proposed. In rats, the injection of fibrin (fibrinogen + thrombin) into the cisterna magna has been reported to induce pulmonary edema [11]. In dogs, the injection of veratrine [14,17], and in sheep, the injection of aconitine [19], both into the cisterna magna, are also able to induce neurogenic pulmonary edema. However, the development of neurogenic pulmonary edema in these types of models has been considered to result from a

cholinergic mediated increase in vascular permeability [2] rather than severe sympathetic discharge, the most suspected cause of neurogenic pulmonary edema development in human patients [7]. Another model of pulmonary edema in dog uses an intravenous injection of oleic acid [5].

Experimentally, neurogenic pulmonary edema should be induced by spinal cord injury. Leal Filho et al. [16] were the first who developed a model of neurogenic pulmonary edema in which the spinal cord is injured, thus mimicking the clinical situation. However, their model achieved a pulmonary index (the relative pulmonary weight) of only 0.639, presenting as a moderate neurogenic pulmonary edema, which might be insufficient if one wishes to test the treatment modalities of severe neurogenic pulmonary edema.

In preliminary experiments, we observed that lower concentrations of isoflurane anesthesia promote the development of neurogenic pulmonary edema in rats with balloon-induced spinal cord injury. The aim of the current study was to evaluate whether such an experimental design can be used as a model of severe neurogenic pulmonary edema, i.e. whether it is possible to achieve a pulmonary index above 0.7 in rats in which pulmonary edema develops as the result of spinal cord injury.

* Corresponding author at: Institute of Experimental Medicine ASCR, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic. Tel.: +420 241062230; fax: +420 241062782.

E-mail address: sykova@biomed.cas.cz (E. Syková).

We used 51 male Wistar rats (Velaz, Prague, Czech Republic) with body weights between 300 and 330 g. This study was performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24th November 1986 (86/609/EEC) regarding the use of animals in research and was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine ASCR, Prague, Czech Republic. Animals were anesthetized by 1.5 or 2% isoflurane in room air (flow 300 ml/min), and an epidural spinal cord balloon compression lesion at the Th10 level, using a 2F French Fogarty catheter filled with 15 μ l of distilled water for 5 min [26], was performed. To verify the injury procedure, the balloon was inflated before and immediately after the injury procedure to confirm inflation of the balloon in the spinal canal. To verify whether the pulmonary edema was of neurogenic origin, we performed the same procedure under 1.5 or 2% isoflurane anesthesia without the inflation of the balloon. Controls were healthy animals that did not undergo the injury procedure, sacrificed immediately after the induction of anesthesia.

Animals were sacrificed 10 min after the removal of the catheter. The lungs were immediately removed and weighed. The level of pulmonary subpleural bleeding was evaluated macroscopically as “Absent”, “Grade I”, “Grade II” or “Grade III”, as described previously [20]. Each lung was evaluated separately. To estimate the liquid gain of the lungs, both lungs were weighed and the pulmonary index (lung weight/body weight \times 100) calculated. The pulmonary index has been previously considered as a very sensitive indicator of the level of pulmonary edema [15,16,18,19]. The lungs were immediately fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) for 2 days, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. Sections (5 μ m) were cut, and the thickness of the alveolar walls was measured using Neurolucida software (MicroBrightField, Inc., USA), as described previously [20].

To estimate the time of onset of neurogenic pulmonary edema, we performed the whole procedure under conditions enabling visual inspection of the lung surface in three animals from the 1.5% group. After the skin incision, the superficial thoracic muscles were cut in anatomical layers and shifted aside. Then, all intercostal muscles and ribs were removed in segments T7-9 and the translucent pleura thus cleaned. Special care was taken not to cause a pneumothorax by disruption of the pleura. Subsequently, a balloon compression lesion was performed as described above. The time of the beginning of lung darkening and the time when hemorrhages became apparent were noted.

To estimate the level of development of neurogenic pulmonary edema *in vivo*, we used X-ray imaging with the Image Station In-Vivo FX System (Eastman Kodak Company, USA). Animals were anesthetized with 1.5 or 2% isoflurane and a balloon compression lesion was made. Before arousal, pentobarbital (30 mg/kg) was injected, the animals were put into the Image Station and routine X-ray images were taken.

Values of the group p-index and the diameter of the alveolar wall are reported as mean \pm S.E.M. Intergroup differences were analysed using a non-paired Student's *t*-test. Statistically significant differences are marked by an asterisk ($p < 0.05$).

The spinal cord lesioning procedure was performed in all animals without any unexpected complications. The inflation of the

balloon was accompanied by skeletal muscle contractions in all cases, which was considered as a normal reaction to injury and was in accordance with our previous results [22,23,25]. Respiratory arrest, accompanying spinal cord compression, followed the onset of the injury procedure in 30% of cases (9 of 30 operated animals), independently of the concentration of isoflurane anesthesia used. The duration of respiratory arrest ranged from 5 to 40 s, with a mean duration of 21.56 ± 9.11 s. Although all the animals were subjected to an autopsy, no hemorrhage in any other examined organ (brain, heart, thymus, liver, intestine, kidney, spleen and urinary bladder) was found.

All animals anesthetized with 1.5 or 2% isoflurane developed neurogenic pulmonary edema and marked pulmonary subpleural bleeding. In 77% of lungs, Grade III subpleural bleeding was present. In the remaining lungs, either Grade II (17%) or Grade I (6%) subpleural bleeding occurred (Table 1, Fig. 1). In these animals, the pulmonary index differed significantly from controls: in the 2% isoflurane group, it was 64% higher in comparison with animals from the control group, while in the 1.5% group it was even more elevated—89% higher.

Six of 18 animals (33%) in the 1.5% group died within 8.45 ± 2.82 min (range from 4 to 12 min) after the beginning of balloon inflation (Table 1). A few minutes before death, their breathing frequency started to increase slowly, and they began to develop a so-called “death rattle”. Subsequently, their ventilation stopped and after several seconds, gaseous blood came out of their noses, followed by the cessation of their heart beat. The p-index values of non-surviving animals from the 1.5% group (1.07 ± 0.12) were significantly higher than the p-index values from surviving animals from the 1.5% group (0.77 ± 0.14), both significantly higher than the p-index values of control animals. All lungs of these animals exhibited Grade III subpleural bleeding. In contrast, no animal from the 2% group in which the balloon compression procedure was performed, died (Table 1).

Microscopic examination of the lungs showed that lower concentrations of isoflurane caused edema of the alveolar wall, perforation of thin capillary walls, massive bleeding and the leakage of intravascular fluid into the alveoli. The combination of interstitial and intraalveolar leakage of transudate with intraparenchymal hemorrhage, consequent to spinal cord injury, was considered as the picture of neurogenic pulmonary edema (Fig. 1). In the 1.5% group, the thickness of the alveolar wall was 264% larger in comparison with controls, in the 2% group, 199% larger than in controls (Table 2). In addition, *in vivo* X-ray imaging showed diffuse hyperintensive infiltrates in both lungs, mainly around the hilus regions (Fig. 1). Thus, lower concentrations of isoflurane promote the development of massive neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats.

Neurogenic pulmonary edema developed rapidly in the 1.5% isoflurane group. The first darkening of the lung surface appeared in 6.67 ± 0.47 min, while apparent hemorrhages first appeared in 8.00 ± 0.82 min, both after the inflation of the balloon.

Animals anesthetized with 1.5 or 2% isoflurane but without the inflation of the balloon developed no signs of neurogenic pulmonary edema. Their mean pulmonary index was comparable to controls, and they exhibited no signs of subpleural bleeding.

Table 1

The impairment of lung function after spinal cord injury in animals anesthetized with 1.5 or 2% isoflurane (with/without inflation of the balloon) and control groups

| Isoflurane | N | Absent (% of 2N) | Grade I (% of 2N) | Grade II (% of 2N) | Grade III (% of 2N) | p-index | Died (% of N) |
|-------------|----|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------|---------------|
| 1.5% | 18 | – | – | 1 (3%) | 35 (97%) | 0.85 ± 0.19* | 6 (33%) |
| 1.5% no SCI | 3 | 6 (100%) | – | – | – | 0.45 ± 0.01 | – |
| 2% | 12 | – | 3 (13%) | 7 (29%) | 14 (58%) | 0.74 ± 0.11* | – |
| 2% no SCI | 3 | 6 (100%) | – | – | – | 0.44 ± 0.02 | – |
| Control | 12 | 24 (100%) | – | – | – | 0.45 ± 0.02 | – |

The absence or presence of subpleural bleeding (evaluated as Grade I–III) in different groups (the total number of lungs in each group – the right and left lung were considered separately – and the percentage of all lungs in the corresponding group). A significant elevation of the p-index (mean values ± S.E.M.) in comparison with controls is indicated by an asterisk (* $p < 0.05$). The occurrence of death is shown as the total number of deaths in each group and as the percentage of all animals in the group. Control animals are animals without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia. N—number of rats, 2N—number of lungs.

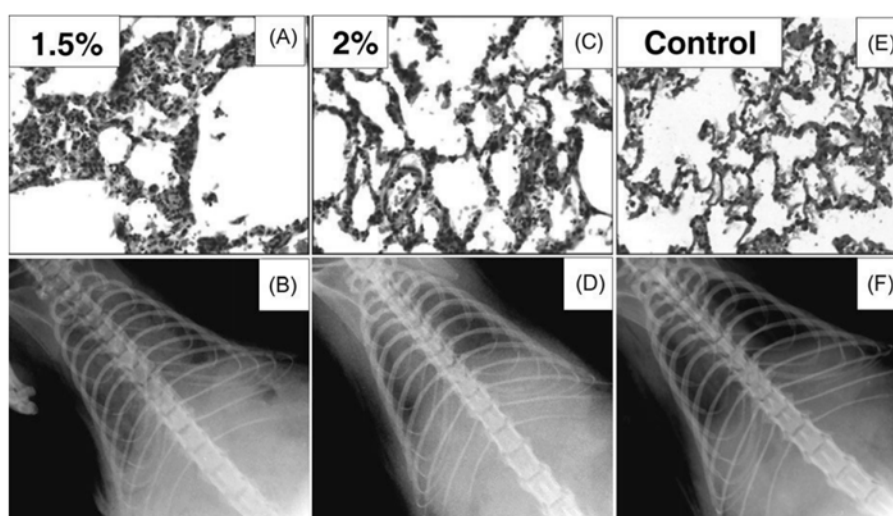


Fig. 1. Neurogenic pulmonary edema in groups anesthetized with 1.5 or 2% isoflurane. (A) Histology showing a massive neurogenic pulmonary edema with a thickening of the alveolar walls, interstitial edema and massive bleeding in a rat anesthetized with 1.5% isoflurane. (B) X-ray image showing a diffuse shadow in both lungs, mainly around the hilus regions, indicative of neurogenic pulmonary edema in a rat anesthetized with 1.5% isoflurane. (C) Histology showing a developed neurogenic pulmonary edema with a thickening of the alveolar walls and occasional bleeding areas in a rat anesthetized with 2% isoflurane. (D) X-ray image showing a diffuse shadow in both lungs, mainly around the hilus regions, indicative of neurogenic pulmonary edema in a rat anesthetized with 2% isoflurane. (E) Histology of the lungs of a control animal. (F) X-ray image of normal lungs in a control animal.

The thickness of their alveolar walls was comparable with that of controls. No animal from these groups died.

We have developed a new model of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. Although several models of neurogenic pulmonary edema have been proposed [11,14,16,17], a model of severe neurogenic pulmonary edema, in which its development is elicited by spinal cord injury,

Table 2

The thickness of the alveolar wall (μm) in the lungs of animals with SCI anesthetized with 1.5 or 2% isoflurane (with/without inflation of the balloon) and control groups

| Group | Diameter of alveolar wall (μm) |
|-------------|---------------------------------------------|
| 1.5% | 119.78 ± 32.30* |
| 1.5% no SCI | 33.42 ± 11.34 |
| 2% | 98.30 ± 39.24* |
| 2% no SCI | 34.12 ± 13.16 |
| Control | 32.89 ± 12.50 |

Statistical significance in comparison with controls is denoted by an asterisk (* $p < 0.05$). Control animals are animals without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia.

has not yet been published. Our model differs in the development of significantly more severe neurogenic pulmonary edema (pulmonary index above 0.7), which we elicited by balloon compression spinal cord injury under low levels of isoflurane anesthesia. The advantages of this model include the severity of the experimental neurogenic pulmonary edema and the better correlation with the clinical situation than the injection of an exogenous toxic substance next to the bottom of the fourth ventricle, which might also exhibit unexpected side-effects. The “neurogenic” origin of the pulmonary edema was also documented.

In the 1.5% isoflurane anesthesia model, severe edema develops, as the mean p-index of 0.85 documents. The fact that full edema develops in 10 min after experimental spinal cord injury supports the possibility to use this model as a model of severe acute-life threatening edema, often developing in patients with spinal cord injury [7]. However, the disadvantage of this model is the 33% mortality seen in the animals used. On the other hand, to decrease the mortality rate might be one of the experimental treatment goals.

When the 2% isoflurane model of neurogenic pulmonary edema is used, no animal dies and the severity of pulmonary

edema is still high (a mean pulmonary index of 0.74). Thus, this model might be more appropriate for larger studies where the 33% mortality of animals from the 1.5% group would not be optimal.

Neurogenic pulmonary edema has been characterized as interstitial and intraalveolar edema together with intraalveolar hemorrhage, developing as a result of severe central nervous system injury [7]. There are several theories about the pathogenesis of neurogenic pulmonary edema [6,7,15,16]. The most likely explanation is a severe systemic sympathetic discharge, called the “catecholamine storm” [7,24]. This theory proposes the activation of the sympathetic centers in the medulla oblongata, leading to generalized vasoconstriction, an increase in systemic pressure and the augmentation of central blood volume. A rapid increase in blood volume in the pulmonary vascular bed leads to an increase in pulmonary capillary pressure and an imbalance in the Starling forces. Finally, the extravasation of intravascular fluid and microruptures of the capillary wall cause pulmonary edema and intraalveolar bleeding [7,15,16,24]. The pathogenic role of severe sympathetic discharge in the development of neurogenic pulmonary edema in balloon-induced spinal cord injury has been shown in our previous study, in which blood pressure and heart rate were monitored. The animals with spinal cord injury and anesthetized with 1.5% isoflurane exhibited greater reactivity to all parts of the spinal cord intervention; for example, the peak mean arterial pressure after the inflation of the balloon was 67% higher than baseline values. In addition, sympathetic blockade with pentolinium prevented the development of neurogenic pulmonary edema in such animals. Our previous experiments thus clearly demonstrated that neurogenic pulmonary edema does not develop in the absence of sympathetic vasoconstriction [20].

One of the major characteristics of neurogenic pulmonary edema is the rapidity of its development. Leal Filho et al. [15,16] observed the first microscopic signs of edema within 2 min after the initiation of spinal cord compression. In extreme cases, the development of neurogenic pulmonary edema has been observed within seconds after a neurological injury in casualties from the Vietnam War [21]. In our study, we observed that these changes became morphologically apparent on the lung surface six minutes after lesioning. In addition, lung hemorrhages follow edema development in another 2 min. Both results correspond to data obtained from clinical studies [7,24] and indicate the potential malignancy of neurogenic pulmonary edema—the final edema picture can develop within minutes after central nervous system injury and thus it can rapidly change the clinical status of a patient with an already worsened general health status.

To date, many models of neurogenic pulmonary edema have been used in experimental studies. In these models, edema is induced either by central nervous system injury [15,16] or the administration of an exogenous substance into the cerebrospinal fluid or directly into the nervous tissue [8,9,27]. As extreme examples, pulmonary edema can be caused by the intravenous administration of epinephrine [3,4] or bilateral cervical vagotomy [10]. Although the sympathetic system is almost surely involved in the development of neurogenic pulmonary edema and although the administration of an exogenous substance leads

to pulmonary edema, we propose that in future experiments edema should be induced only by central nervous system injury.

The use of 1.5–2% isoflurane anesthesia promotes the development of neurogenic pulmonary edema in rats with a compressed thoracic spinal cord. When 1.5% isoflurane is used, a very severe pulmonary edema develops, and one-third of the animals die. In contrast, no animal dies, and pulmonary edema is still severe, when the rats are anesthetized with 2% isoflurane during balloon compression lesioning.

Acknowledgements

We thank Dominika Dušková for excellent technical assistance and James Dutt for critical reading of the manuscript. We thank Ardy Arjomandi, International Business Manager, Molecular Imaging System, Eastman Kodak Company, for the opportunity to use the Image Station In-Vivo FX System. We acknowledge the support provided by the grants AV0Z50390703, 1M0021620803, LC554, GACR309/06/1246, IGA MZ 1A8697-5, and the EC FP6 project RESCUE (LSHB-CT-2005-518233).

References

- [1] S.A. Antoniuk, V.A. Oliva, I. Bruck, M. Malucelli, S. Yabumoto, J.L. Castellano, Sudden unexpected, unexplained death in epilepsy autopsied patients, *Arq. Neuropsiquiatr.* 59 (2001) 40–45.
- [2] F.L. Bosso, S.A. Lang, M.B. Maron, Role of hemodynamics and vagus nerves in development of fibrin-induced pulmonary edema, *J. Appl. Physiol.* 69 (1990) 2227–2232.
- [3] S. Dai, S. Su, Y. Cao, R. Sun, Y. Fan, H. Zhang, Q. Si, Q. Xue, Hemodynamic and nonhemodynamic mechanism of experimental pulmonary edema in rats and the effect of anisodamine and tetramethylpyrazine—electron microscopic observation and measurement of pulmonary arterial, pulmonary arterial wedge and systemic arterial pressure (Part 2), *Chin. Med. Sci. J.* 8 (1993) 129–133.
- [4] S. Dai, Q. Xue, R. Sun, S. Wang, C. Li, Y. Wu, Q. Si, S. Hu, Hemodynamic and nonhemodynamic mechanisms of experimental pulmonary edema in rats and the effect of anisodamine and tetramethylpyrazine. Part 1: Survival rate, pulmonary index, pathological change and pulmonary vascular permeability, *Chin. Med. Sci. J.* 8 (1993) 72–76.
- [5] I.M. Dauber, J.V. Weil, Lung injury edema in dogs. Influence of sympathetic ablation, *J. Clin. Invest.* 72 (1983) 1977–1986.
- [6] D. Dragosavac, A.L.E. Falcao, S. Araújo, R.G.G. Terzi, Neurogenic pulmonary edema: report of two cases, *Arq. Neuropsiquiatr.* 55 (1997) 305–309.
- [7] R.B. Fontes, P.H. Aguiar, M.V. Zanetti, F. Andrade, M. Mandel, M.J. Teixeira, Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review, *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 15 (2003) 144–150.
- [8] O. Hamdy, H. Maekawa, Y. Shimada, G.G. Feng, N. Ishikawa, Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats, *Crit. Care Med.* 29 (2001) 1222–1228.
- [9] O. Hamdy, K. Nishiwaki, M. Yajima, H.O. Murakami, H. Maekawa, R.T. Moy, Y. Shimada, Y. Hotta, N. Ishikawa, Presence and quantification of neuropeptide Y in pulmonary edema fluids in rats, *Exp. Lung Res.* 26 (2000) 137–147.
- [10] P.E. Iazzetti, R.E. Maciel, Effects of hyperbaric oxygen on the rat neurogenic pulmonary edema, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21 (1988) 153–156.
- [11] N. Ishikawa, M. Kainuma, T. Furuta, Y. Sato, Factors influencing fibrin-induced pulmonary edema, *Jpn. J. Pharmacol.* 46 (1988) 255–260.
- [12] N. Kandatsu, Y.S. Nan, G.G. Feng, K. Nishawaki, K. Ishikawa, T. Komatsu, T. Yokochi, Y. Shimada, N. Ishikawa, Opposing effects of isoflurane and

- sevoflurane on neurogenic pulmonary edema development in an animal model, *Anesthesiology* 102 (2005) 1182–1189.
- [13] H. Kondo, G.G. Feng, K. Nishiwaki, Y. Shimada, M. Hirokawa, T. Komatsu, T. Yokochi, N. Ishikawa, A role for L-glutamate ionotropic receptors in the development of rat neurogenic pulmonary edema, *Eur. J. Pharmacol.* 499 (2004) 257–263.
- [14] S.M. Lane, K.C. Maender, N.E. Awender, M.B. Maron, Adrenal epinephrine increases alveolar liquid clearance in a canine model of neurogenic pulmonary edema, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158 (1998) 760–768.
- [15] M.B. Leal Filho, R.C. Morandin, A.R. de Almeida, E.C. Cambiucci, G. Borges, J.A. Gontijo, K. Metze, Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury, *Neurosci. Lett.* 373 (2005) 165–170.
- [16] M.B. Leal Filho, R.C. Morandin, A.R. de Almeida, E.C. Cambiucci, K. Metze, G. Borges, J.A. Gontijo, Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model, *Arq. Neuropsiquiatr.* 63 (2005) 990–996.
- [17] M.B. Maron, A canine model of neurogenic pulmonary edema, *J. Appl. Physiol.* 59 (1985) 1019–1025.
- [18] M.B. Mesquita, T. Moraes-Santos, M.F. Moraes, Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats, *Neurosci. Lett.* 332 (2002) 119–122.
- [19] F.L. Minnear, R.S. Connell, Increased permeability of the capillary-alveolar barriers in neurogenic pulmonary edema (NPE), *Microvasc. Res.* 22 (1981) 345–366.
- [20] J. Šedý, L. Urdzíkova, K. Likavčanová, A. Hejčl, M. Burian, P. Jendelová, J. Zicha, J. Kuneš, E. Syková, Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J. Neurotrauma*, in press.
- [21] R.L. Simmons, C.A. Heisterkamp 3rd, J.A. Collins, C.E. Bredenberg, D.E. Mills, A.M. Martin Jr., Respiratory insufficiency in combat casualties. IV. Hypoxemia during convalescence, *Ann. Surg.* 170 (1969) 53–62.
- [22] E. Syková, P. Jendelová, Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord, *Neurodegener. Dis.* 3 (2006) 62–67.
- [23] E. Syková, P. Jendelová, L. Urdzíkova, P. Lesný, A. Hejčl, Bone marrow stem cells and polymer hydrogels – two strategies for spinal cord injury repair, *Cell Mol. Neurobiol.* 26 (2006) 1113–1129.
- [24] F. Urdaneta, A.J. Layon, Respiratory complications in patients with traumatic cervical spine injuries: case report and review of the literature, *J. Clin. Anesth.* 15 (2003) 398–405.
- [25] L. Urdzíkova, P. Jendelová, K. Glogarová, M. Burian, M. Hájek, E. Syková, Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte—colony stimulating factor promote recovery after spinal cord injury in rat, *J. Neurotrauma* 23 (2006) 1379–1391.
- [26] I. Vanický, L. Urdzíkova, K. Saganová, D. Čížková, J. Gálik, Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat, *J. Neurotrauma* 18 (2001) 1399–1407.
- [27] B. Walder, M.A. Brundler, M. Totsch, N. Elia, D.R. Morel, Influence of the type and rate of subarachnoid fluid infusion on lethal neurogenic pulmonary edema in rats, *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 14 (2002) 194–203.

3. Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Rapid but not slow spinal cord compression elicits neurogenic pulmonary edema in the rat. *Physiol Res* 2009, 58: 269–277. IF=1,505

Rapid but not Slow Spinal Cord Compression Elicits Neurogenic Pulmonary Edema in the Rat

J. ŠEDÝ^{1,2,3,4}, J. ZICHA^{4,5}, J. KUNEŠ^{4,5}, P. JENDELOVÁ^{1,2,3}, E. SYKOVÁ^{1,2,3}

¹Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, ²Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Second Faculty of Medicine, Charles University, ³Department of Neuroscience, Second Faculty of Medicine, Charles University, ⁴Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, ⁵Center for Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic

Received January 14, 2008

Accepted February 9, 2008

On-line April 1, 2008

Summary

The development of neurogenic pulmonary edema (NPE) can be elicited by an immediate epidural balloon compression of the thoracic spinal cord. To evaluate whether a slower balloon inflation could prevent NPE development, we examined the extent of NPE in animals lesioned with a rapid (5 μ l - 5 μ l - 5 μ l) or slow rate (3 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l) of balloon inflation. These groups were compared with the NPE model (immediate inflation to 15 μ l) and with healthy controls. Slow balloon inflation prevented NPE development, whereas the pulmonary index and histology revealed a massive pulmonary edema in the group with a rapid rate of balloon inflation. Pulmonary edema was preceded by a considerable decrease in heart rate during the inflation procedure. Moreover, rapid inflation of balloon in spinal channel to either 5 μ l or 10 μ l did not cause NPE. Thus, a slow rate of balloon inflation in the thoracic epidural space prevents the development of neurogenic pulmonary edema, most likely due to the better adaptation of the organism to acute circulatory changes (rapid elevation of systemic blood pressure accompanied by profound heart rate reduction) during the longer balloon inflation period. It should be noted that spinal cord transection at the same level did not cause neurogenic pulmonary edema.

Keywords

Neurogenic pulmonary edema • Rat • Spinal cord injury • Blood pressure • Heart rate

Corresponding author

J. Šedý, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic. Fax: + 420-241062783. E-mail: jirisedy@hotmail.com

Introduction

Neurogenic pulmonary edema is an acute life-threatening complication following spinal cord or brain injury (Fontes *et al.* 2003). It is characterized by marked pulmonary vascular congestion, extravasation of protein-rich edema fluid and intraalveolar hemorrhage (Kandatsu *et al.* 2005, Kondo *et al.* 2004, Leal Filho *et al.* 2005a,b). Many pathophysiological mechanisms have been implicated in the development of neurogenic pulmonary edema, but the exact cascade leading to its development is still unclear (Leah Filho *et al.* 2005a,b). Both the release of vasoactive substances and a severe transient sympathetic discharge are thought to participate in this process (Taoka and Okajima 1998, Urdaneta and Layon 2003). These processes lead to the constriction of the pulmonary veins, an increase in pulmonary capillary hydrostatic pressure, damage to the alveolar wall and the leakage of fluid into the intraalveolar space (Fontes *et al.* 2003).

Our previous experiments showed that severe neurogenic pulmonary edema could be experimentally induced by immediate epidural balloon compression of the thoracic spinal cord in the rat, anesthetized by 1.5 % isoflurane in air (Šedý *et al.* 2007a,b). The aim of this study was to evaluate the extent of neurogenic pulmonary edema development in the case of a gradual inflation of the balloon in the spinal channel. For this purpose, the final balloon inflation volume of 15 μ l was reached by several greater or numerous smaller steps. In addition, the occurrence of neurogenic pulmonary edema was also

examined in animals with lower volumes of balloon inflation as well as in those with thoracic spinal cord transection.

Materials and Methods

Animals

We used 65 male Wistar rats (Velaz, Prague, Czech Republic) with body weight between 300-330 g. This study was performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24th of November 1986 (86/609/EEC) regarding the use of animals in research and was approved by the Ethics Committee of the Institute of Experimental Medicine ASCR, Prague, Czech Republic.

Design of the study

After the induction of anesthesia with 5 % isoflurane in room air (flow 300 ml/min), animals were maintained in 1.5 % isoflurane anesthesia (flow 300 ml/min) *via* a face mask throughout the operation. This concentration of isoflurane was previously shown to promote neurogenic pulmonary edema development in rats with immediate balloon compression of the thoracic spinal cord (Šedý *et al.* 2007a). All animals were heated to 37°C, and their body temperature was measured by a rectal thermometer to standardize the procedure and to exclude the influence of hypo- or hyperthermia (Cambria *et al.* 1997, Urdziková and Vanický 2006). A catheter was inserted into the common carotid artery to monitor blood pressure and heart rate changes. After the insertion of the catheter, an epidural balloon spinal cord compression lesion (Vanický *et al.* 2001) or complete Th8 transection was performed. The animal was left to recover for 10 min and then was sacrificed. The lungs were immediately removed and analyzed for the presence of neurogenic pulmonary edema. Controls were animals without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia.

Balloon compression spinal cord lesion

To induce a spinal cord injury we used the model of an epidural balloon compression lesion (Vanický *et al.* 2001), as described previously (Šedý *et al.* 2007a). Briefly, under aseptic conditions, a 2 cm median skin incision at the Th10-L1 level was made. The dorsal muscles were shifted laterally, and the Th10 and Th11 spinous processes were removed. A hole was drilled into the Th10 lamina with a dental drill. Then, a

2F French Fogarty catheter (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA, USA), which was filled with distilled water and connected to a 50- μ l Hamilton syringe, was inserted into the dorsal epidural space 10 mm rostrally, to reach the Th8-Th9 spinal level. Using a micromanipulator, the balloon was inflated with a rapid (5 μ l - 5 μ l - 5 μ l) or a slow rate of inflation (3 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l) or in the standard NPE model immediately to 15 μ l. In all cases, the final volume of the balloon was 15 μ l. The time window between each step of the inflation was 30 s. Thus, the entire balloon inflation procedure lasted one minute during rapid inflation and 3 min during slow inflation. As an additional experiment, we also inflated the balloon immediately to either 5 μ l or 10 μ l. After inflation to the final volume, the balloon was left in place for 5 min in all cases. Subsequently, the balloon was deflated and removed.

The immediate inflation of the balloon in the epidural space of the thoracic spinal channel with 15 μ l of distilled water under 1.5 % isoflurane anesthesia reliably and reproducibly produces severe neurogenic pulmonary edema (Šedý *et al.* 2007a,b). We therefore used this model for comparison with the other groups in this experiment. The inflation of a balloon to 15 μ l in the spinal channel produces an incomplete lesion, so that after 7 weeks, the hindlimbs of the animals are able to support body weight and occasionally forelimb-hindlimb coordination is observed. This state corresponds to a BBB locomotor score (Basso *et al.* 1995) of 9-11 at 7 weeks post-injury (Vanický *et al.* 2001; Šedý *et al.* 2007a). To verify the injury procedure, the balloon was inflated before and immediately after the injury procedure outside of the animal to confirm the inflation of the balloon in the spinal channel. The design of the study did not allow *in vivo* verification of the lesion by imaging or behavioral testing methods.

Spinal cord transection

A complete Th8 spinal cord transection was performed in animals anesthetized with 1.5 % isoflurane in order to evaluate the role of a thoracic spinal cord lesion *per se* in neurogenic pulmonary edema development. Briefly, under aseptic conditions, a 2 cm median skin incision at the Th6-8 level was made. The dorsal muscles were cut and shifted laterally, and the Th7 lamina was removed. After that, a rapid spinal transection was performed by a sharp razor blade.

Table 1. The impairment of lung function after spinal cord injury in the NPE model as well as in animals with a gradually compressed spinal cord, incompletely compressed spinal cord (5 or 10 μ l only) or a spinal transection.

| Group | N | Absent (% of 2N) | Grade I (% of 2N) | Grade II (% of 2N) | Grade III (% of 2N) | Pulmonary index |
|---------------------------------------|----|---------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|
| <i>NPE model</i> (15 μ l) | 19 | - | - | 1 (3 %) | 37 (97 %) | 0.86 \pm 0.09* |
| <i>5-5-5 μl</i> | 7 | - | - | 6 (43 %) | 8 (57 %) | 0.77 \pm 0.08* |
| <i>3-2-2-2-2-2 μl</i> | 14 | 18 (64 %) | 10 (36 %) | - | - | 0.49 \pm 0.03 |
| <i>Immediate 5 μl</i> | 3 | 6 (100 %) | - | - | - | 0.46 \pm 0.04 |
| <i>Immediate 10 μl</i> | 3 | 6 (100 %) | - | - | - | 0.46 \pm 0.03 |
| <i>Spinal transection</i> | 5 | 10 (100 %) | - | - | - | 0.43 \pm 0.06 |
| <i>Control</i> | 14 | 28 (100 %) | - | - | - | 0.45 \pm 0.02 |

The absence or presence of subpleural bleeding (evaluated as Grade I-III) in different groups is given as the total number of lungs in each group (the right and left lung were considered separately) and the percentage of all lungs examined in the respective group. A significant elevation ($p < 0.05$) of the pulmonary index (mean \pm S.E.M.) in comparison with controls is indicated by an asterisk. Control animals are animals without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia. N – number of rats, 2N – number of lungs.

Evaluation of neurogenic pulmonary edema

The lungs were immediately removed from sacrificed animals and weighed. In all cases, a mild hematoma, maximally 1 mm in diameter, was found in the hilus area due to the manipulation of the pulmonary vessels during lung removal (not taken into further account). The level of pulmonary subpleural bleeding was evaluated macroscopically as “Absent” (no bleeding on the lung surface), “Grade I” (small bleeding areas, occupying not more than 10 % of the lung surface), “Grade II” (medium-sized bleeding areas, occupying 11-50 % of the lung surface) and “Grade III” (massive bleeding areas, occupying more than 50 % of the lung surface), as described previously (Šedý *et al.* 2007a,b). Each lung was evaluated separately. To estimate the liquid accumulation in the lungs, both lungs were weighed, and the relative pulmonary weight was calculated as the pulmonary index (lung weight/body weight \times 100), which has been previously considered to be very sensitive indicator of the degree of pulmonary edema (Leal Filho *et al.* 2005a,b, Mesquita *et al.* 2002, Minnear and Connel 1982, Šedý *et al.* 2007a). The lungs were immediately fixed in 4 % paraformaldehyde in phosphate buffer (pH 7.4) for 2 days, embedded in paraffin, cut in 5 μ m sections and stained with hematoxylin and eosin. The thickness of the alveolar

walls was measured using NeuroLucida software (MicroBrightField, Inc., USA). From each lung, three sections (from the inferior, middle and superior parts of the lung) were taken, and alveolar wall thickness in one representative field from each section was measured. A representative field was defined as a site in the non-subpleural lung parenchyma, without any large vessel or bronchus, outside of the hilus region.

Measurement of blood pressure and heart rate changes

Mean arterial blood pressure and heart rate were monitored in all studied animals using a PowerLab system (ADInstruments, Colorado Springs, USA). Under isoflurane anesthesia, a catheter was inserted into the left common carotid artery and exteriorized in the interscapular region, the animal was put into a prone position and a balloon compression lesion or transection was performed. Mean arterial pressure (mm Hg) and heart rate (bpm) were monitored for 5 min before the spinal compression, throughout the entire injury procedure and for 10 min after spinal decompression. After the initial rise in blood pressure following the injury procedure, we observed a break point in the descending curve, which was termed the „turning point“.

The values obtained were: 1) the baseline value, i.e. the value before the inflation of the balloon,

Table 2. The thickness of the alveolar wall (μm) in the lungs of animals with either a balloon compression lesion (rapid or graded) or a spinal cord transection and control groups.

| Group | Thickness of alveolar wall (μm) |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <i>NPE model</i> (15 μl) | 94.18 \pm 4.37 * (+161 %) |
| 5-5-5 μl | 62.61 \pm 4.17 * (+71 %) |
| 3-2-2-2-2-2 μl | 38.62 \pm 2.12 (+5 %) |
| <i>Immediate 5 μl</i> | 37.32 \pm 2.94 (+2 %) |
| <i>Immediate 10 μl</i> | 35.99 \pm 1.95 (-2 %) |
| <i>Spinal transection</i> | 39.63 \pm 3.02 (+8 %) |
| <i>Control</i> | 36.71 \pm 2.57 |

Statistical significance from control rats is denoted by an asterisk ($p < 0.05$). Control animals are animals without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia. Relative changes from controls are shown in parentheses.

2) the maximum value after inflation with a particular volume with respect to the experimental group (3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 15 μl), 3) the average value between the peak after the inflation to 15 μl and the turning point, and 4) the average value between the turning point and deflation of the balloon.

Statistical analysis

The pulmonary index, mean arterial pressure and heart rate are reported as mean values \pm S.E.M. The statistical significance ($p < 0.05$) between groups was compared using the non-paired Student's t-test. The differences within the groups were examined using the paired Student's t-test ($p < 0.05$).

Results

The spinal cord lesioning procedure was performed in all animals without any unexpected complications. The inflation of the balloon to 15 μl was accompanied by skeletal muscle contractions in all cases, which was considered as a normal reaction to injury and was in accordance with our previous observations (Syková et al. 2005, Syková and Jendelová 2006, Urdziková et al. 2006). In addition, a blood pressure increase accompanied the balloon inflation in all cases (Šedý et al. 2007a).

Table 3. Baseline values of mean arterial pressure as well as the values found after a particular degree of balloon inflation in rats with different rate of induction of balloon compression lesion.

| | Mean arterial pressure (mm Hg) | | |
|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| | NPE model 15 | Rapid 5-5-5 | Slow 3-2-2-2-2-2 |
| <i>Baseline values</i> | 85 \pm 6 | 97 \pm 4 | 97 \pm 2 |
| 3 μl | - | - | 108 \pm 4* (+11 %) |
| 5 μl | - | 113 \pm 6* (+16 %) | 130 \pm 6* (+34 %) |
| 7 μl | - | - | 141 \pm 6* (+45 %) |
| 9 μl | - | - | 143 \pm 5* (+47 %) |
| 10 μl | - | 153 \pm 6* (+58 %) | - |
| 11 μl | - | - | 147 \pm 5* (+52 %) |
| 13 μl | - | - | 148 \pm 4* (+53 %) |
| 15 μl | 154 \pm 7* (+81 %) | 155 \pm 3* (+60 %) | 150 \pm 4* (+55 %) |
| 15 μl – turning point | 144 \pm 6* (+69 %) | 138 \pm 3* (+42 %) | 133 \pm 3* (+37 %) |
| Turning point – deflation | 86 \pm 5 (+1 %) | 90 \pm 4 (-7 %) | 97 \pm 3 (\pm 0 %) |

Statistically significant (paired Student's t-test, $p < 0.05$) differences from baseline values are marked with an asterisk. Relative changes as a percentage of baseline values are shown in parentheses.

The immediate inflation of the balloon in the spinal channel to 15 μl caused severe neurogenic pulmonary edema in all cases. The extent of subpleural bleeding, the pulmonary index, the thickness of the alveolar walls as well as the blood pressure and heart rate values (Tables 1, 2 and 3; Fig. 1) corresponded to the values observed previously for this model of severe neurogenic pulmonary edema (Šedý et al. 2007b).

Slow balloon inflation prevented neurogenic pulmonary edema development

When the balloon was slowly inflated in small

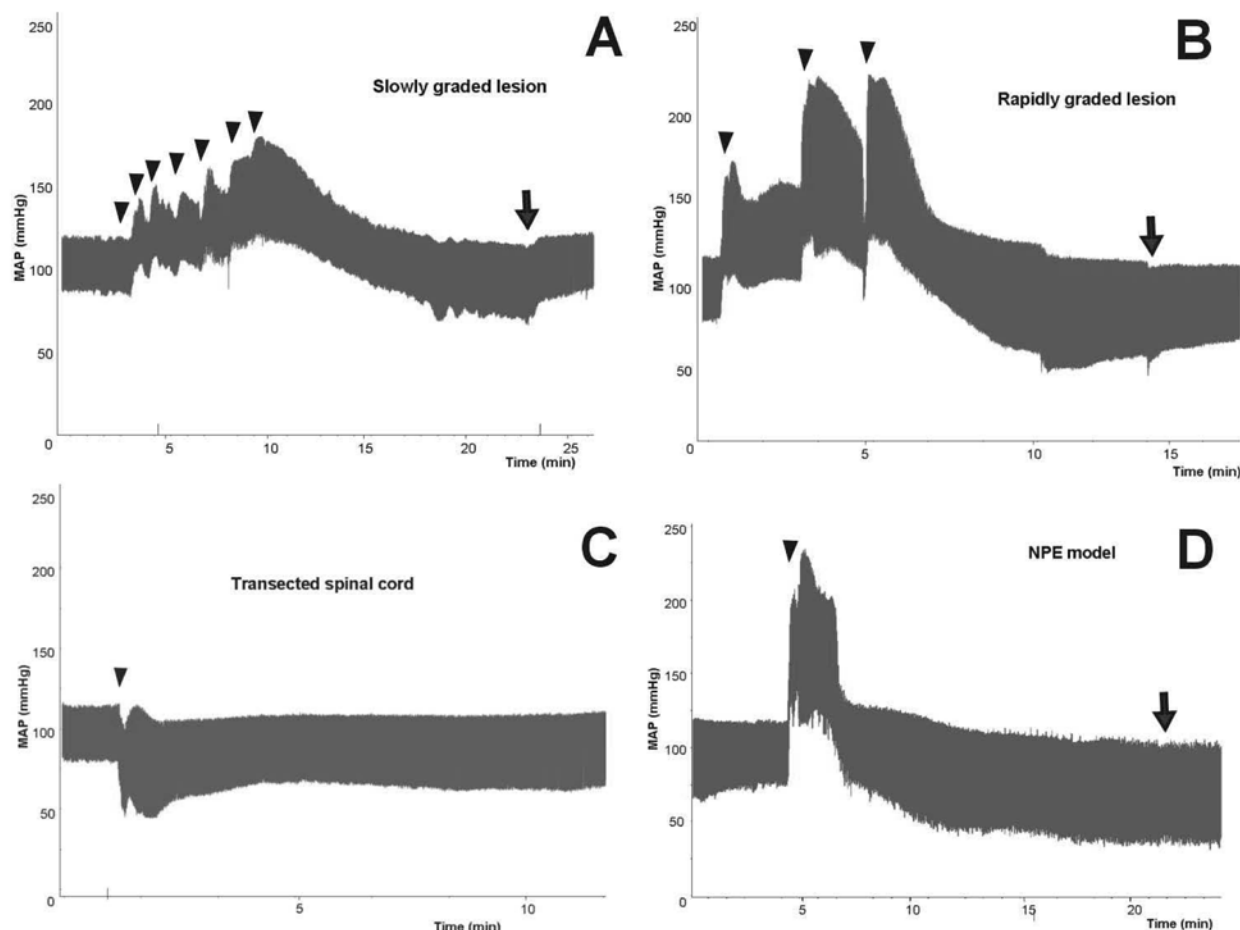


Fig. 1. The time course of blood pressure before, during and after the balloon inflation in the spinal channel to a final volume of 15 μ l. Each inflation step is indicated by an arrowhead in A,B and D. Arrows show the balloon deflation in A, B and D. **A.** Slowly graded balloon compression lesion. **B.** Rapidly graded balloon compression lesion. **C.** The time course of blood pressure before, during and after spinal cord transection (arrowhead). **D.** The time course of blood pressure in the model of neurogenic pulmonary edema (immediate balloon inflation).

steps (3 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l), neurogenic pulmonary edema did not develop. In 64 % of cases, subpleural bleeding was absent. In the remaining cases, there was Grade I subpleural bleeding (Table 1). In addition, the pulmonary index and the mean thickness of the alveolar walls did not differ significantly from control values (Tables 1 and 2). The histological appearance of the lung tissue was comparable to that of the controls – there were almost no signs of intraalveolar or interstitial edema or hemorrhage (Fig. 2). Moreover, the mean thickness of the alveolar wall was not significantly increased (Table 2).

Neurogenic pulmonary edema after rapid balloon inflation

Although the final volume of the inflated balloon was the same as in the previous case, the rapid inflation (5 μ l - 5 μ l - 5 μ l) of the balloon caused a severe neurogenic pulmonary edema, comparable to that seen in

the standard neurogenic pulmonary edema model. The occurrence of Grade III subpleural bleeding was not so frequent as in our neurogenic pulmonary edema model, but the extent of the bleeding was always at least Grade II (Table 1). Similarly, the pulmonary index values in the rapid inflation group did not differ significantly from the values obtained in our neurogenic pulmonary edema model. On the other hand, the pulmonary index values of rapid inflation group were significantly increased when compared with controls ($p < 0.0001$). Microscopic examination of the lungs showed that the rapid inflation of the balloon caused edema of the alveolar membrane, perforation of thin capillary walls, massive bleeding and the leakage of intravascular fluid into the alveoli – a typical picture of neurogenic pulmonary edema (Fig. 2C). Moreover, the mean thickness of the alveolar walls in the rapidly inflated group was significantly higher when compared to controls (Table 2).

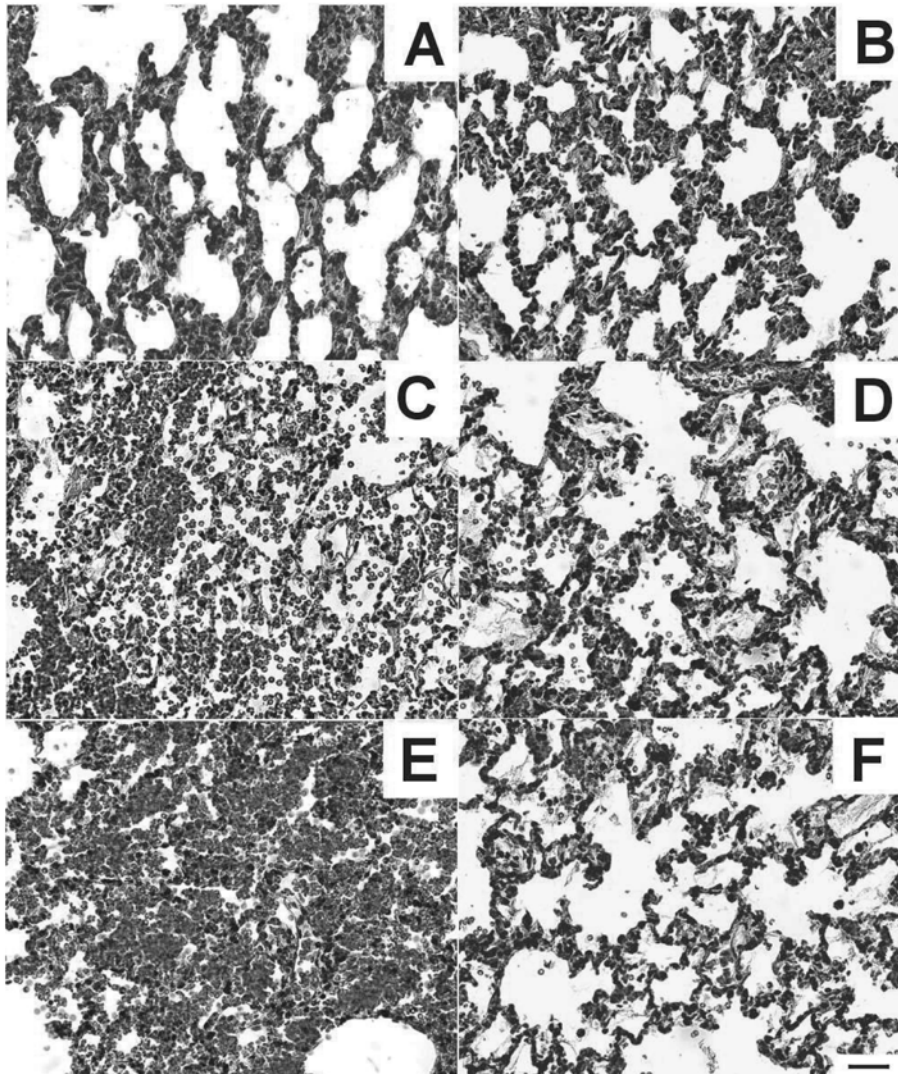


Fig. 2. Pulmonary histological changes in animals with graded compression lesions or spinal cord transection. **A.** Occasional bleeding areas without evident pulmonary edema in a rat with a slowly graded balloon compression lesion. **B.** Occasional bleeding areas without evident pulmonary edema in a rat with a moderately graded balloon compression lesion. **C.** Histology showing a massive neurogenic pulmonary edema with a thickening of the alveolar walls, interstitial edema and massive bleeding in a rat with a rapidly graded balloon compression lesion. **D.** Histology of lungs in animals with a spinal cord transection. No signs of pulmonary edema are present. **E.** Histology showing a massive neurogenic pulmonary edema with a thickening of the alveolar walls, interstitial edema and massive bleeding in a rat with neurogenic pulmonary edema. **F.** Histology of the lungs of a control animal. Scale bar in F = 200 μ m.

Blood pressure and heart rate changes during different rates of balloon inflation

All steps of the graded balloon inflation procedure were accompanied by a significant elevation of the mean arterial pressure (Table 3). The graded lesion was accompanied by a typical ascendently undulating mean arterial pressure curve (Fig. 1). No significant differences in mean arterial pressure values during and after the inflation of the balloon to the final volume of 15 μ l were observed among the slowly and rapidly inflated groups (Table 3), although the differences in the degree of neurogenic pulmonary edema were highly significant (Table 1).

The extent of neurogenic pulmonary edema was more reflected by the changes of heart rate. In the rapidly inflated group (with NPE), there was a pronounced decrease in heart rate during the whole balloon inflation procedure, whereas in the slowly and moderately inflated groups, a mild transient heart rate decrease was observed

(Table 4). Moreover, the heart rate changes after the maximum balloon inflation to 15 μ l were more prominent in the rapidly than in the slowly inflated groups (Table 4). Taken together, the more rapid the balloon inflation, the more pronounced the decrease in heart rate during and after the inflation.

Incomplete balloon inflation prevented neurogenic pulmonary edema

The inflation of the balloon to 10 μ l was accompanied by mild skeletal muscle contractions, the inflation to 5 μ l caused almost none reaction. The immediate inflation of the balloon in the spinal channel to either 5 μ l or 10 μ l did not cause neurogenic pulmonary edema. No animal from 5 μ l or 10 μ l group had subpleural bleeding (Table 1). Moreover, the mean pulmonary index and alveolar wall thickness of these animals were comparable to controls (Tables 1 and 2).

Table 4. Baseline values of heart rate as well as the values found after a particular degree of balloon inflation in three different groups with a graded balloon compression lesion during the induction of the lesion.

| | Heart rate (bpm) | | |
|---------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|
| | NPE model | Rapid 5-5-5 | Slow 3-2-2-2-2-2-2 |
| Baseline values | 385 ± 9 | 380 ± 14 | 410 ± 5 |
| 3 µl | - | - | 384 ± 11 (-6 %) |
| 5 µl | - | 364 ± 16* (-4 %) | 383 ± 7* (-7 %) |
| 7 µl | - | - | 394 ± 6 (-4 %) |
| 9 µl | - | - | 394 ± 8 (-4 %) |
| 10 µl | - | 322 ± 30* (-15 %) | - |
| 11 µl | - | - | 394 ± 8 (-4 %) |
| 13 µl | - | - | 391 ± 8 (-5 %) |
| 15 µl | 253 ± 30* (-34 %) | 222 ± 23* (-42 %) | 389 ± 11 [§] (-5 %) |
| 15 µl – turning point | 313 ± 21* (-19 %) | 282 ± 16* (-26 %) | 371 ± 10* [§] (-10 %) |
| Turning point – deflation | 361 ± 11 (-6 %) | 336 ± 15* (-12 %) | 387 ± 8 (-6 %) |

Statistically significant (paired Student's t-test, $p < 0.05$) differences from baseline values are marked with an asterisk. Significant differences (un-paired Student's t-test, $p < 0.05$) from the NPE model are marked with $\$$. Relative changes as a percentage of baseline values are shown in parentheses.

Spinal transection did not cause neurogenic pulmonary edema

Transection of the spinal cord at the same spinal level as the balloon compression lesion did not cause neurogenic pulmonary edema. Subpleural bleeding was absent in all animals and the pulmonary index was comparable to that of the controls. Histology of the lung tissue did not reveal any sign of neurogenic pulmonary edema (Fig. 2D, Table 2). Spinal cord transection did not cause any blood pressure or heart rate disturbances; in particular, there was no sharp increase in blood pressure as typically seen after balloon inflation (Fig. 1).

Discussion

We have shown that a slow rate of balloon inflation in the thoracic epidural space prevented the development of neurogenic pulmonary edema. This was indicated by the absence of significant subpleural bleeding as well as by an increase in the pulmonary index and mean alveolar wall thickness. Similarly, incomplete (5 or 10 µl) balloon inflation or spinal transection at the same level did not cause neurogenic pulmonary edema. The differences in NPE development were accompanied by characteristic changes of heart rate. Rats with NPE had a considerably decreased heart rate after the inflation of the balloon to the final 15 µl volume compared to rats without edema, in which heart rates were similar to baseline values (Table 4).

The development of neurogenic pulmonary edema seems to be based on the hyperactivity of the sympathetic system, in terms of a severe sympathetic discharge, also called a catecholamine storm (Dragosavac *et al.* 1997, Fontes *et al.* 2003, Leal Filho *et al.* 2005a,b). When a ganglionic blockade is performed by pentolinium, administered before spinal cord lesioning, neurogenic pulmonary edema does not develop (Šedý *et al.* 2007a). Our experiments indicate that slower inflation of the balloon in the epidural space is able to prevent NPE development, probably due to the easier adjustment of the organism to gradual hemodynamic changes over a longer time period. Poulat and Couture (1998) showed that the intrathecal injection of endothelin-1 causes the activation of the endothelin receptor in sympathetic spinal neurons. Their activation subsequently causes a sympathetic discharge, a massive release of catecholamines, intense pulmonary alpha-adrenergic vasoconstriction, an increase in pulmonary vascular permeability and pulmonary edema. One explanation of our results might be that a slowly graded spinal cord lesion leads to the release of small amounts of vasoactive substances to which the systemic and pulmonary circulation are able to adjust, whereas the release of these substances in the NPE model is so rapid that the circulation is unable to adjust.

Another hypothesis suggests that the inflation of the balloon in the epidural space causes a rapid increase in intracranial pressure, which leads to the stimulation of sympathetic “neurogenic pulmonary edema trigger zones” in the bottom of the fourth ventricle (Baumann *et al.* 2007, Leal Filho *et al.* 2005a, b, Šedý *et al.* 2008a,b). During the slow inflation of the balloon in the epidural

space, the intracranial space has a longer time to “adapt” to these changes. Moreover, after each of the subsequent balloon inflation steps, the cerebrospinal fluid might “leak” around the incompletely obstructed spinal channel. This probably does not happen when the balloon is inflated rapidly – from our previous studies we know that only 5 % of the spinal cord tissue is spared at the site of the lesion, while the rest of the spinal channel is obstructed by the balloon during the inflation, when the balloon is inflated to 15 μ l (Urdziková *et al.* 2006, Syková *et al.* 2005, Syková and Jendelová 2006, Šedý *et al.* 2007a). The lack of neurogenic pulmonary edema in animals with a transected thoracic spinal cord indirectly supports such a hypothesis.

Our results indicate that the final volume of the balloon is also very important for the development of neurogenic pulmonary edema. To induce neurogenic pulmonary edema in animals anesthetized with 1.5 % isoflurane, the balloon must be inflated to the final 15 μ l, because the inflation to 10 μ l or less does not cause it. Importantly, this volume-based impairment corresponds to the neurological deficit caused by Th8 epidural balloon inflation. Vanický *et al.* (2001), who developed the epidural balloon spinal cord compression model, reported that inflation of the balloon to 10 μ l caused mild neurological deficit, which recovered to normal values of BBB locomotor score in few weeks. We observed that the inflation of the balloon to 5 μ l caused almost no neurological deficit next day and it recovered to normal values of BBB next week after the surgery in all cases (Šedý, Jendelová, Syková, unpublished observation). On the other hand, during the experiments published in our first paper concerning the role of isoflurane anesthesia on NPE development (Šedý *et al.* 2007a), we also inflated the balloon to 20 μ l in both groups, anesthetized either with 1.5 % isoflurane or 3 % isoflurane. The results were comparable to those obtained in animals in which a final volume of the balloon was set to 15 μ l (Šedý, Urdziková, Jendelová, Syková, unpublished observation). This indicates that in 1.5 % isoflurane group (with NPE) the

neurogenic pulmonary edema can not be further augmented, even when we inflate the balloon to 20 μ l.

Rapid balloon inflation is associated with major sympathetic activation leading to blood redistribution from splanchnic vessels to the pulmonary vascular bed and with a pronounced rise of systemic blood pressure, causing a heart rate decrease due to baroreflex activation (Šedý *et al.* 2007a,c). In our experiments, the systemic blood pressure increase in rats with a slowly inflated balloon (without NPE) did not cause pronounced baroreflex activation. Conversely, in rats with a rapidly inflated balloon (causing NPE), the threshold was exceeded and the baroreflex turned on, so that the reduction in the heart rate could limit the capacity of the heart to pump blood from the pulmonary vascular bed to the systemic circulation.

Conclusions

A slow rate of balloon inflation in the thoracic epidural space prevents the development of neurogenic pulmonary edema, most likely due to the adaptation of the organism to enhanced sympathetic tone and consequent cardiovascular reactions (blood volume redistribution, blood pressure increase, baroreflex activation) during the longer balloon inflation period. Spinal cord transection at the same level does not cause neurogenic pulmonary edema.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dominika Dušková and Iva Nahodilová for their excellent technical assistance. We thank James Dutt for critical reading of the manuscript. We acknowledge the support provided by the grants AV0Z50390512, AV0Z50110509, 1M0538, LC554, GACR309/06/1246, IGA MZ 1A8697-5, IGA MZ NR/8339-3, 1M0510 and the EC FP6 project RESCUE (LSHB-CT-2005-518233).

References

- BASSO DM, BEATTIE MS, BRESNAHAN JC: A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* **12**: 1-21, 1995.
- BAUMANN A, AUDIBERT G, McDONNELL J, MERTES PM: Neurogenic pulmonary edema. *Acta Anaesthesiol Scand* **51**: 447-455, 2007.
- CAMBRIA RP, DAVISON JK, ZANNETTI S: Clinical experience with epidural cooling for spinal cord protection during thoracic and thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg* **25**, 234-241, 1997.

- DRAGOSAVAC D, FALCAO ALE, ARAÚJO S, TERZI RGG: Neurogenic pulmonary edema: report of two cases. *Arq Neuropsiquiatr* **55**: 305-309, 1997.
- FONTES RB, AGUIAR PH, ZANETTI MV, ANDRADE F, MANDEL M, TEIXEIRA MJ: Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesthesiol* **15**: 144-150, 2003.
- KANDATSU N, NAN YS, FENG GG, NISHAWAKI K, ISHIKAWA K, KOMATSU T, YOKOCHI T, SHIMADA Y, ISHIKAWA N: Opposing effects of isoflurane and sevoflurane on neurogenic pulmonary edema development in an animal model. *Anesthesiology* **102**: 1182-1189, 2005.
- KONDO H, FENG GG, NISHIWAKI K, SHIMADA Y, HIROKAWA M, KOMATSU T, YOKOCHI T, ISHIKAWA N: A role for L-glutamate ionotropic receptors in the development of rat neurogenic pulmonary edema. *Eur J Pharmacol* **499**: 257-263, 2004.
- LEAL FILHO MB, MORANDIN RC, DE ALMEIDA AR, CAMBIUCCI EC, METZE K, BORGES G, GONTIJO JA: Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* **63**: 990-996, 2005a.
- LEAL FILHO MB, MORANDIN RC, DE ALMEIDA AR, CAMBIUCCI EC, BORGES G, GONTIJO JA, METZE K: Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci Lett* **373**: 165-170, 2005b.
- MESQUITA MB, MORAES-SANTOS T, MORAES MF: Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats. *Neurosci Lett* **332**: 119-122, 2002.
- MINNEAR FL, CONNELL RS: Increased permeability of the capillary-alveolar barriers in neurogenic pulmonary edema (NPE). *Microvasc Res* **22**: 345-366, 1981.
- POULAT P, COUTURE R: Increased pulmonary vascular permeability and oedema induced by intrathecally injected endothelins in rat. *Eur J Pharmacol* **344**: 251-259, 1998.
- ŠEDÝ J, URDZIKOVÁ L, HEJČL A, BURIAN M, LIKAVČANOVÁ K, JENDELOVÁ P, ZICHA J, KUNEŠ J, SYKOVÁ E: Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma* **24**: 1487-1501, 2007a.
- ŠEDÝ J, URDZIKOVÁ L, LIKAVČANOVÁ K, HEJČL A, JENDELOVÁ P, SYKOVÁ E: A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neurosci Lett* **423**: 167-171, 2007b.
- ŠEDÝ J, URDZIKOVÁ L, HEJČL A, BURIAN M, LIKAVČANOVÁ K, JENDELOVÁ P, SYKOVÁ E: Low concentration of isoflurane causes neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Physiol Res* **56**: 34P, 2007c.
- ŠEDÝ J, LIKAVČANOVÁ K, URDZIKOVÁ L, ZICHA J, KUNEŠ J, HEJČL A, JENDELOVÁ P, SYKOVÁ E: Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* **70**: 308-313, 2008a.
- ŠEDÝ J, ZICHA J, KUNEŠ J, JENDELOVÁ P, SYKOVÁ E: Mechanism of neurogenic pulmonary edema development. *Physiol Res* **57**: 499-506, 2008b.
- SYKOVÁ E, JENDELOVÁ P: Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener Dis* **3**: 62-67, 2006.
- SYKOVÁ E, URDZIKOVÁ L, JENDELOVÁ P, BURIAN M, GLOGAROVÁ K, HÁJEK M: Bone marrow cells - A tool for spinal cord injury repair. *Exp Neurol* **193**: 261-262, 2005.
- TAOKA Y, OKAJIMA K: Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* **56**: 341-358, 1998.
- URDANETA F, LAYON AJ: Respiratory complications in patients with traumatic cervical spine injuries: case report and review of the literature. *J Clin Anesth* **15**: 398-405, 2003.
- URDZIKOVÁ L, VANICKÝ I: Post-traumatic moderate systemic hyperthermia worsens behavioural outcome after spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord* **44**: 113-119, 2006.
- URDZIKOVÁ L, JENDELOVÁ P, GLOGAROVÁ K, BURIAN M, HÁJEK M, SYKOVÁ E: Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte - colony stimulating factor promote recovery after spinal cord injury in rat. *J Neurotrauma* **23**: 1379-1391, 2006.
- VANICKÝ I, URDZIKOVÁ L, SAGANOVÁ K, ČÍŽKOVÁ D, GÁLIK J: Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J Neurotrauma* **18**: 1399-1407, 2001.

4. Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Syková E. The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats: the effect of preventive interventions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009, 297: R1111–R1117. **IF=3,272**

The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord-injured rats: the effect of preventive interventions

Jiří Šedý,^{1,2,3} Josef Zicha,^{2,4} Jaroslav Kuneš,^{2,4} Aleš Hejčl,¹ and Eva Syková^{1,5}

¹Institute of Experimental Medicine and ²Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic; ³Institute of Dental Research, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic; ⁴Center for Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic; and ⁵Center for Cell Therapy and Tissue Repair and Department of Neuroscience, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Submitted 11 May 2009; accepted in final form 6 August 2009

Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Syková E. The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord-injured rats: the effect of preventive interventions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1111–R1117, 2009. First published August 12, 2009; doi:10.1152/ajpregu.00251.2009.—Neurogenic pulmonary edema (NPE) is an acute life-threatening complication following an injury of the spinal cord or brain, which is associated with sympathetic hyperactivity. The role of nitric oxide (NO) in NPE development in rats subjected to balloon compression of the spinal cord has not yet been examined. We, therefore, pretreated Wistar rats with the NO synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) either acutely (just before the injury) or chronically (for 4 wk prior to the injury). Acute (but not chronic) L-NAME administration enhanced NPE severity in rats anesthetized with 1.5% isoflurane, leading to the death of 83% of the animals within 10 min after injury. Pretreatment with either the ganglionic blocker pentolinium (to reduce blood pressure rise) or the muscarinic receptor blocker atropine (to lessen heart rate decrease) prevented or attenuated NPE development in these rats. We did not observe any therapeutic effects of atropine administered 2 min after spinal cord compression. Our data indicate that NPE development is dependent upon a marked decrease of heart rate under the conditions of high blood pressure elicited by the activation of the sympathetic nervous system. These hemodynamic alterations are especially pronounced in rats subjected to acute NO synthase inhibition. In conclusion, nitric oxide has a partial protective effect on NPE development because it attenuates sympathetic vasoconstriction and consequent baroreflex-induced bradycardia following spinal cord injury.

blood pressure; heart rate; atropine

NEUROGENIC PULMONARY EDEMA (NPE) is an acute life-threatening complication following spinal cord or brain injury (4). It is characterized by marked pulmonary vascular congestion, extravasation of protein-rich edema fluid, and intra-alveolar hemorrhage (7–10). Many pathophysiological mechanisms have been implicated in the development of NPE, but the exact cascade leading to its development is still unclear (9, 10). Both the release of vasoactive substances and a severe transient sympathetic discharge are thought to participate in this process (23, 24). These processes lead to an increase in pulmonary capillary hydrostatic pressure, damage to the alveolar wall, and the leakage of fluid into the intra-alveolar space (4).

Our previous experiments showed that severe NPE could be experimentally induced by rapid epidural balloon compression of the thoracic spinal cord in rats anesthetized by 1.5% isoflu-

rane in air (18, 19). Moreover, particular procedures preventing the rapid activation of the sympathetic nervous system, such as ganglionic blockade by pentolinium, slow gradual inflation of the balloon, or transection of the spinal cord at the same level instead of spinal compression, prevented the development of NPE (18, 22).

Nitric oxide is generated from L-arginine by the enzyme nitric oxide synthase (NOS). Some data suggest that NO may play an important role during the development of NPE. Intravenous administration of L-arginine has been reported to prevent increased pulmonary capillary permeability in high-altitude pulmonary edema (1). NPE, which is also characterized by elevated pulmonary vascular permeability, may be inhibited by NO produced in the medulla oblongata (5, 8). In the nucleus tractus solitarius of the medulla oblongata, as well as in the rostroventrolateral medulla, there are blood pressure (BP)-controlling regulatory centers that are also called “NPE trigger zones.” The injection of NOS inhibitors into the close proximity of these centers or into the cerebrospinal fluid enhances sympathetic tone (6, 27), probably by the modulation of the arterial baroreflex (6, 13). On the basis of our previous experiments (20–22), we have proposed a hypothesis that NPE develops in rats in which a pronounced decrease of heart rate (HR) is elicited by a baroreflex activated by the early BP rise following a massive catecholamine discharge from the sympathetic nervous system.

The aim of this study was 1) to evaluate the role of NO in the development of NPE following balloon compression of the thoracic spinal cord, and 2) to test the above hypothesis of the importance of baroreflex-induced cardiac deceleration (occurring shortly after spinal cord compression) for further NPE development. To achieve this goal, we employed a competitive inhibitor of NOS—N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), which was administered either acutely (prior to spinal cord injury) or chronically (for 4 wk before the injury procedure) to Wistar rats. Acute pretreatment with pentolinium (ganglionic blocker) or atropine (competitive antagonist of muscarinic receptors) was used to prevent sympathetic nerve discharge or baroreflex-induced HR reduction, respectively.

MATERIALS AND METHODS

Animals. We used 94 male Wistar rats (Velaz, Prague, Czech Republic) with body weights between 300 and 330 g. This study was performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24th of November 1986 (86/609/EEC) regarding the use of animals in research and was approved by the Ethical Committee of the Institute of Experimental Medicine of the Academy of Sciences of

Address for reprint requests and other correspondence: J. Šedý, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, Prague 4, 142 20 (e-mail: jirisedy@hotmail.com).

the Czech Republic, Prague, Czech Republic. All efforts have been made to decrease the number of animals used in the study.

Design of the study. Animals were randomly divided into 14 experimental groups (Table 1) according to the following criteria: 1) presence of spinal cord injury, 2) dose of isoflurane anesthesia, 3) acute or chronic L-NAME administration, and 4) pentolinium or 5) atropine administration.

Animals were anesthetized with either 1.5% or 3% isoflurane in air (flow 300 ml/min), and an arterial catheter was inserted for the monitoring of BP and HR, and a venous catheter was inserted into the common carotid artery and internal jugular vein for the administration of L-NAME, pentolinium, or atropine; both catheters were exteriorized in the interscapular region. The animal was put in a prone position, and the balloon compression of spinal cord was performed. Rats were killed 10 min after lesioning (i.e., after balloon deflation), and the grade of NPE was independently evaluated using macroscopic visual examination of subpleural bleeding and the *P* index (lung weight/body weight × 100). Controls were healthy noninjured animals that were killed immediately after the induction of anesthesia. The possible role of isoflurane in inducing NPE per se was excluded in our previous study (18).

Balloon compression spinal cord lesion. To induce a spinal cord injury, we used the model of an epidural balloon compression lesion (25), as described previously (18). Briefly, under aseptic conditions, a 2-cm median skin incision at the Th10-L1 level was made. The dorsal muscles were shifted laterally, and the Th10 and Th11 spinous processes were removed. A hole was drilled into the Th10 lamina with a dental drill. Then, a 2F French Fogarty catheter (Baxter Healthcare, Irvine, CA), which was filled with distilled water and connected to a 50- μ l Hamilton syringe, was inserted into the dorsal epidural space 10 mm rostrally, to reach the Th8-Th9 spinal level. Using a micromanipulator, the balloon was rapidly inflated to 15 μ l, and the inflated balloon was left in place for 5 min. Subsequently, the balloon was deflated and removed.

The immediate inflation of the balloon in the epidural space of the thoracic spinal channel with 15 μ l water under 1.5% isoflurane anesthesia reliably and reproducibly produces severe neurogenic pulmonary edema (18, 19). On the other hand, animals that undergo the same procedure under 3% isoflurane anesthesia do not develop neurogenic pulmonary edema (18, 19). Therefore, in the present experiments, we used these two contrasting models, in which the role of NO, as well as the importance of early bradycardia, were studied.

Evaluation of NPE. The lungs were immediately removed from killed animal and weighed by an independent investigator. To estimate the liquid accumulation in the lungs, both lungs were weighed, and the relative pulmonary weight was calculated as the pulmonary index (lung weight/body weight × 100), which has been previously considered to be very sensitive to the degree of pulmonary edema (9, 10, 14, 15, 18). In all cases, a mild hematoma, maximally 1 mm in diameter, was found in the hilus area as a result of the manipulation of the pulmonary vessels during lung removal (not taken into further account). The level of pulmonary subpleural bleeding was evaluated macroscopically as "Absent" (no bleeding on the lung surface), "Grade I" (small bleeding areas, occupying not more than 10% of the lung surface), "Grade II" (medium-sized bleeding areas, occupying 11–50% of the lung surface), and "Grade III" (massive bleeding areas, occupying more than 50% of the lung surface), as described previously (18, 19). Each lung was evaluated separately. In our previous experiments, we documented that the pulmonary index and the extent of subpleural bleeding clearly correspond to the histological picture of the severity of lung edema (18, 19, 22); thus, the histology was not performed in the current experiments.

Measurement of BP and HR changes. Mean arterial pressure (MAP, mmHg) and HR [beats per minute (bpm)] were monitored for 5 min before the procedure, throughout the entire procedure and for 15 min after the balloon compression of the spinal cord in groups 1–13 of this study using a PowerLab system (ADInstruments, Colorado

Table 1. Lung impairment after spinal cord injury in individual experimental groups (anesthetized with 1.5% or 3% isoflurane) subjected to either acute or chronic L-NAME treatment with or without pentolinium or atropine pretreatment

| Group | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|------------------------------|------------|--------------|----------------|-------------|--------------------------|----------------------------|------------|-----------------------|-------------------------|------------|--------------|----------------|----------------------|-----------|
| Isoflurane | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 3% | 3% | 3% | 1.5% | control |
| Pharmacological intervention | — | acute L-NAME | chronic L-NAME | pentolinium | pentolinium acute L-NAME | pentolinium chronic L-NAME | atropine | atropine acute L-NAME | atropine chronic L-NAME | — | acute L-NAME | chronic L-NAME | Therapeutic atropine | — |
| N | 9 | 6 | 6 | 5 | 6 | 4 | 6 | 8 | 4 | 8 | 6 | 6 | 8 | 12 |
| <i>P</i> index | 0.77±0.05* | 1.00±0.02**† | 0.87±0.03* | 0.42±0.02† | 0.43±0.01‡ | 0.42±0.01§ | 0.45±0.01† | 0.78±0.07**‡ | 0.43±0.01‡ | 0.50±0.06† | 0.43±0.01‡ | 0.41±0.02§ | 0.78±0.04**† | 0.45±0.02 |
| Absent (% of 2N) | — | — | — | 10 (100%) | 12 (100%) | 8 (100%) | 12 (100%) | — | 8 (100%) | 13 (81%) | 12 (100%) | 12 (100%) | — | 24 (100%) |
| Grade I (% of 2N) | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 2 (13%) | — | — | 1 (6%) | — |
| Grade II (% of 2N) | 1 (6%) | — | — | — | — | — | — | 2 (13%) | — | 1 (6%) | — | — | 1 (6%) | — |
| Grade III (% of 2N) | 17 (94%) | 12 (100%) | 12 (100%) | — | — | — | — | 14 (88%) | — | — | — | — | 14 (88%) | — |
| Died (%) | 33* | 83**† | 33**‡ | 0† | 0‡ | 0§ | 0† | 38**‡ | 0§ | 0† | 0‡ | 0§ | 25**† | 0 |

Values are expressed as means ± SE (*P* index). The absence or presence of subpleural bleeding (evaluated as Grades I–III) in different groups is shown as the total number of lungs in each group (with the right and left lungs considered separately) and as the percentage of affected lungs (calculated in terms of all lungs in the corresponding group). One-way ANOVA with post hoc least significant difference (LSD) test ($F_{13,69} = 23.5$, $LSD = 0.19$) indicated the presence of significant differences ($P < 0.05$): *from controls (group 14), †significantly higher from the 1.5% model (group 1), ‡from the 1.5% model acutely treated with L-NAME (group 2), §from the 1.5% model chronically treated with L-NAME (group 3). The occurrence of death is shown as the total number of deaths in each group and as the percentage of all animals in the group. Control animals are animals without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia. N, number of rats; 2N, number of lungs.

Table 2. Baseline mean arterial pressure and heart rate values, as well as the values found after particular surgical procedures in rats anesthetized with 1.5% isoflurane and subjected to acute or chronic L-NAME treatment and preventive pentolinium or atropine treatment

| Group | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|-------------------------------------|--------|--------------|----------------|-------------|--------------------------|----------------------------|----------|-----------------------|-------------------------|
| Isoflurane | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% |
| Pharmacological intervention | | acute L-NAME | chronic L-NAME | pentolinium | pentolinium acute L-NAME | pentolinium chronic L-NAME | atropine | atropine acute L-NAME | atropine chronic L-NAME |
| <i>Mean arterial pressure, mmHg</i> | | | | | | | | | |
| Baseline values | 93±5 | 97±5 | 123±3† | 97±1 | 105±4 | 140±6‡§ | 103±3 | 102±2 | 140±5†§ |
| L-NAME | — | 117±5 | — | — | 122±6 | — | — | 116±3 | — |
| Balloon insertion | 99±10 | 125±7* | 128±4† | 114±8 | 131±5 | 154±10‡§ | 106±6 | 125±4 | 151±4†§ |
| Pentolinium injection | — | — | — | 55±2 | 62±3 | 62±4 | 77±3 | 114±4* | 117±12† |
| Atropine injection | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Balloon inflation, max | 155±8 | 163±6 | 181±6† | 75±5‡ | 146±6* | 66±2‡ | 161±9 | 180±4* | 179±7 |
| Atropine: therapeutic | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Recovery | 77±6 | 104±7* | 65±8 | 55±2‡ | 67±4‡ | 50±3† | 92±6 | 97±6 | 121±2†§ |
| <i>Heart rate, bpm</i> | | | | | | | | | |
| Baseline values | 433±16 | 421±17 | 362±16† | 402±11 | 397±6 | 397±15 | 379±18§ | 395±12 | 370±4 |
| L-NAME | — | 386±12 | — | — | 355±6 | — | — | 360±11 | — |
| Balloon insertion | 387±13 | 366±12 | 341±21 | 364±28 | 327±11 | 415±4‡§ | 412±14 | 342±17* | 385±14§ |
| Pentolinium injection | — | — | — | 313±18 | 290±12 | 344±11 | 399±13 | 361±12 | 383±9 |
| Atropine injection | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Balloon inflation, max | 283±30 | 190±34* | 169±25† | 386±21‡ | 421±48‡ | 439±23‡ | 434±7§ | 434±12§ | 416±4§ |
| Atropine: therapeutic | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Recovery | 357±19 | 328±11 | 294±32† | 317±21 | 313±16 | 292±5 | 399±9 | 339±22* | 366±4§ |

Data are presented as means ± SE. Significant difference ($P < 0.05$; one-way ANOVA with post hoc LSD test). All F ratios and LSD values are presented in Table 3. *Influence of acute L-NAME administration vs. corresponding control (groups 2 vs. 1; 5 vs. 4; 8 vs. 7; 11 vs. 10). †Influence of chronic L-NAME administration vs. corresponding control (groups 3 vs. 1; 6 vs. 4; 9 vs. 7; 12 vs. 10). ‡Influence of pentolinium administration vs. corresponding control (groups 4 vs. 1; 5 vs. 2; 6 vs. 3). §Influence of atropine administration vs. corresponding control (groups 7 vs. 1; 8 vs. 2; 9 vs. 3).

Springs, CO). The competitive inhibitor of NOS L-NAME (Sigma, St. Louis, MO) was administered either acutely before the spinal cord injury (30 mg/kg iv, reported as "acute") or for 4 wk before the injury procedure (40 mg·kg⁻¹·day⁻¹ in the drinking fluid, reported as "chronic"). To eliminate the influence of the sympathetic nervous system, we administered the ganglionic blocker pentolinium (5 mg/kg iv; Sigma) 2 min before balloon inflation. To limit the baroreflex-induced HR decrease, atropine (4 mg/kg iv; Sigma) was given 2 min before spinal cord injury. The hemodynamic values were obtained at the following time points: 1) the baseline value before the onset of surgery, 2) the maximum value after L-NAME administration, 3) the maximum value after balloon insertion, 4) the minimum value after pentolinium or atropine administration, 5) the maximum value after balloon inflation, 6) the value 2 min after balloon inflation, and 7) the value after 10 min of recovery. The BP rise and HR changes elicited by spinal cord compression were evaluated by subtracting the values found after balloon insertion (groups 1–3 and 10–12) from the peak values seen after balloon inflation. In groups subjected to pharmacological interventions (groups 4–6 and 7–9), we subtracted the values found after pentolinium or atropine administration from the corresponding peak values.

Statistical analysis. The pulmonary index, MAP, and HR are reported as mean values ± SE. One-way ANOVA with a post hoc least significant difference test was used for comparison among the individual groups.

RESULTS

Spinal cord injury under different degrees of isoflurane anesthesia. The rapid inflation of the balloon in the spinal channel of animals anesthetized with 1.5% isoflurane anesthesia caused a considerable BP elevation, HR decrease, and severe NPE in all cases. The pulmonary index and the extent of subpleural bleeding (Table 1), as well as the BP rise and HR decrease (Tables 2 and 3, Fig. 1A) corresponded to the values observed previously for this model of severe NPE (19). Conversely, the same procedure performed under 3% isoflurane anesthesia did not promote NPE.

Effect of L-NAME administration in rats anesthetized with 1.5% isoflurane (groups 1–3). Acute L-NAME injection before the spinal cord injury was associated with 83% mortality following spinal cord compression. All of the animals died within 10 min after balloon inflation due to a rapid development of NPE. A few minutes before death, their breathing frequency started to increase slowly, and they began to develop a so-called "death rattle." Subsequently, their ventilation stopped, and after several seconds, a large amount of gaseous blood came out of their nostrils, followed by the cessation of their heart beat. The amount of gaseous blood was substantially

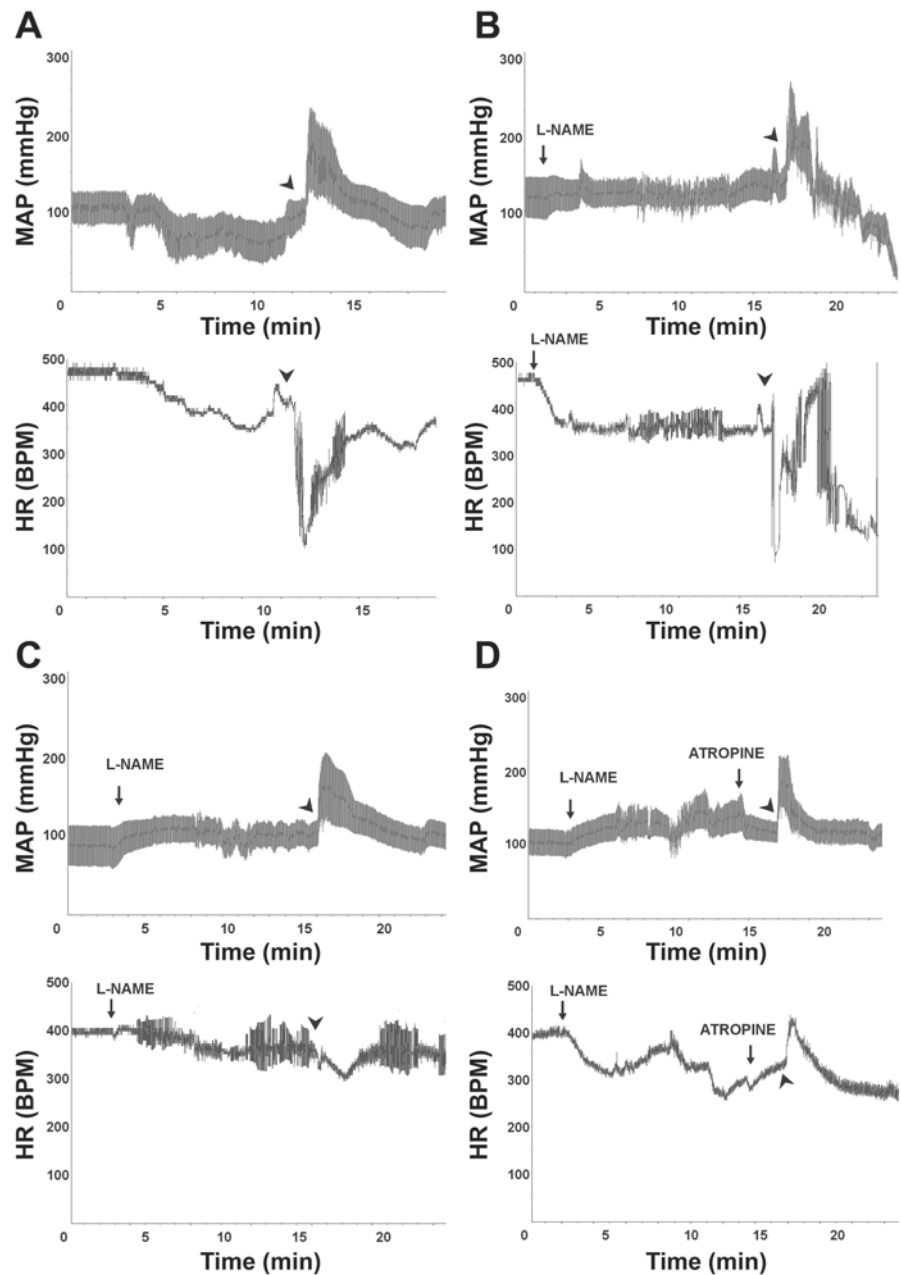


Fig. 1. The time course of mean arterial pressure (MAP; top) and heart rate (HR; bottom) during the entire surgical procedure, balloon compression lesion (arrowhead), and recovery period in representative animals from individual experimental groups. *A*: balloon compression spinal cord lesion in an animal anesthetized with 1.5% (model of neurogenic pulmonary edema) (*group 1*). *B*: balloon compression spinal cord lesion in an acutely L-NAME pretreated animal anesthetized with 1.5% isoflurane (*group 2*). *C*: balloon compression spinal cord lesion in an acutely L-NAME-pretreated animal anesthetized with 3% isoflurane (*group 11*). *D*: balloon compression spinal cord lesion in an acutely L-NAME-pretreated animal anesthetized with 1.5% isoflurane, pretreated with atropine (*group 8*).

larger than that observed in our 1.5% isoflurane model of severe NPE. The pulmonary index was significantly increased compared with the 1.5% isoflurane model (*group 1*) (Table 1). Acute L-NAME administration caused a moderate increase in BP (20 mmHg) accompanied by about a 10% decrease in HR in animals anesthetized with 1.5% isoflurane. In these rats (*group 2*), balloon insertion into the epidural space already caused a small BP elevation, which was seen not only in this group, but also in *groups 5* and *8* (prior to pentolinium or atropine injection). Acute L-NAME administration attenuated the BP rise but augmented the bradycardia accompanying the BP rise occurring shortly after spinal cord compression in rats anesthetized with 1.5% isoflurane (*group 2* vs. *group 1*) (Fig. 1B, Fig. 2).

Chronic L-NAME administration for 4 wk caused a moderate elevation of basal BP similar to that seen after acute

L-NAME injection, but it affected the development of neurogenic pulmonary edema less than did acute L-NAME administration. Only 33% of the chronically L-NAME-treated animals died as a result of NPE, and their *P* index was significantly lower compared with those in rats subjected to acute L-NAME treatment (*group 3* vs. *group 2*). However, the *P* index was not significantly increased compared with our 1.5% isoflurane model (*group 1*). BP elevation and HR decrease after spinal cord injury were comparable to that seen in the acutely L-NAME-treated rats (*group 2*) (Table 2). Nevertheless, the marked HR decrease accompanying BP elevation also promoted the development of severe NPE in chronically L-NAME-treated spinal cord-injured rats (*group 3*).

Effect of preventive pentolinium administration in rats anesthetized with 1.5% isoflurane (groups 4–6). Ganglionic blockade by pentolinium prevented the BP rise, bradycardia, and the

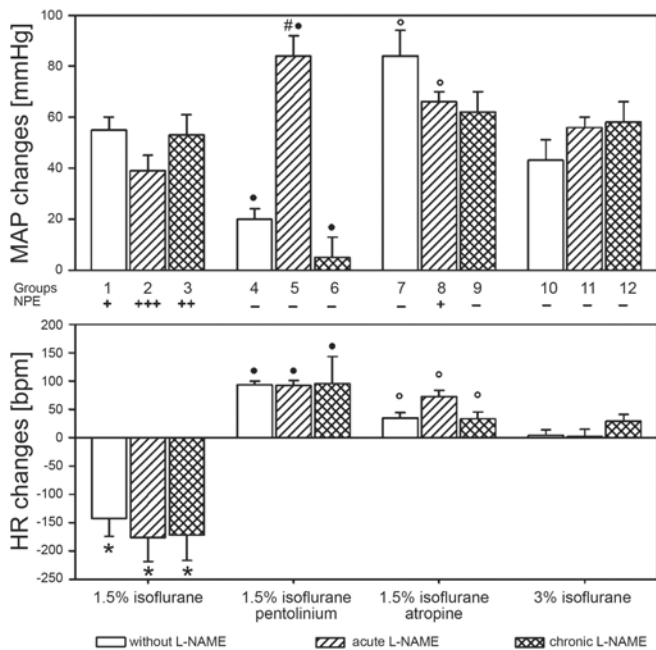


Fig. 2. The changes in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) elicited in individual experimental groups by spinal cord compression. Data are presented as means \pm SE. One-way ANOVA with a post hoc LSD test indicated the presence of significant differences in both MAP ($F_{11,62} = 10.7$, LSD = 19 mmHg) and HR ($F_{11,62} = 19.9$, LSD = 69 bpm). Significant differences ($P < 0.05$): *vs. respective group anesthetized with 3% isoflurane, #effect of acute L-NAME vs. respective group without L-NAME, \circ effect of pentolinium vs. respective group anesthetized with 1.5% isoflurane, \bullet effect of atropine vs. respective group anesthetized with 1.5% isoflurane.

development of neurogenic pulmonary edema in rats anesthetized with 1.5% isoflurane (group 4), as observed previously (18). Importantly, pretreatment with pentolinium also prevented NPE development and bradycardia in rats treated acutely or chronically with L-NAME (groups 5 and 6) (Tables 1 and 2). In fact, in pentolinium-pretreated rats, the spinal cord compression usually elicited a HR acceleration instead of the typical bradycardia (Fig. 2). These results show the importance of a HR decrease under the conditions of a BP increase for the development of NPE.

Effect of preventive atropine injection in rats anesthetized with 1.5% isoflurane (groups 7–9). The administration of atropine 2 min before balloon inflation caused a significant BP decrease prior to spinal cord injury without affecting the HR. This pharmacological intervention completely prevented the development of NPE in untreated animals (group 7), whereas it only attenuated NPE development in rats acutely treated with L-NAME (group 8), in which both mortality and the P index were significantly reduced compared with group 2 (Table 1). On the other hand, atropine pretreatment prevented NPE development in rats chronically treated with L-NAME (group 9). Importantly, in all of these groups atropine administration prevented the HR decrease, but not the BP elevation, occurring early after balloon inflation (Table 2). The BP rise elicited by spinal cord compression in atropine-pretreated rats tended to be higher than in nonpretreated rats (groups 7–9 vs. groups 1–3) (Fig. 2, Table 2). After atropine pretreatment, spinal cord compression did not elicit the characteristic bradycardia, but rather a borderline HR acceleration (Fig. 1D), which tended to

be smaller in atropine-pretreated animals (groups 7–9) than in rats pretreated with pentolinium (groups 4–6) (Fig. 2).

Effect of L-NAME administration in rats anesthetized with 3% isoflurane (groups 10–12). Neither acute nor chronic administration of L-NAME promoted neurogenic pulmonary edema in animals anesthetized with 3% isoflurane. In addition, the values of the pulmonary index in rats treated with L-NAME tended to be lower than those in animals without L-NAME administration (groups 11 and 12 vs. group 10) (Table 3). Although pulmonary edema did not develop in any animal from the 3% isoflurane groups (irrespective of L-NAME treatment), the magnitude of the BP increase after balloon inflation seen in particular 3% isoflurane groups was comparable to the changes seen in the corresponding 1.5% isoflurane groups. Nevertheless, HR did not decrease after balloon compression of the spinal cord in any of the 3% isoflurane groups (Table 2, Fig. 1C), indicating that baroreflex-induced bradycardia during the hypertensive reaction might be an important mechanism for the development of NPE.

Finally, we demonstrated that the development of NPE cannot be influenced by the therapeutic administration of atropine (4 mg/kg iv) 2 min after balloon compression of the spinal cord (group 13). The delayed atropine injection had no positive effect on NPE development in rats with spinal cord injury (P index 0.78 ± 0.04 , $n = 8$). In this group, there was a similar BP rise ($+51 \pm 4$ mmHg) and HR reduction (-138 ± 29 bpm) after the balloon compression lesion as in untreated rats subjected to spinal cord compression in 1.5% isoflurane anesthesia (Table 3).

DISCUSSION

The present study confirmed our original findings (18) that balloon compression of the thoracic spinal cord results in NPE development in rats anesthetized with 1.5% isoflurane but not in those anesthetized with 3% isoflurane. The inflation of a balloon to 15 μ l in the spinal channel caused a considerable BP increase in both groups, but this BP rise was accompanied by a HR reduction only in rats anesthetized with 1.5% isoflurane (Fig. 2). The proposed importance of the sympathetic nervous system (SNS) for the development of neurogenic pulmonary edema (12, 16) raised the question of whether the elimination of nitric oxide would enhance the deleterious effects of SNS activation on NPE development because NO is known to attenuate peripheral sympathetic vasoconstriction (26) and to inhibit central sympathetic tone (13).

Acute NOS inhibition worsened NPE development in the 1.5% isoflurane model (group 2 vs. group 1), whereas no significant effect of NOS inhibition on NPE development was observed in the 3% isoflurane model (groups 11 and 12 vs. group 10). A similar deleterious effect of L-NAME administration on the severity and occurrence of NPE was reported by Hamdy et al. (5), whereas increased NO production reduced the severity of NPE in a similar model (8). The worsening of NPE development in NO-deficient rats anesthetized with 1.5% isoflurane was not associated with a greater BP rise, but there was a clear-cut tendency toward a more pronounced HR reduction after balloon inflation (Fig. 2). The mechanism underlying the adverse effects of NO deficiency on NPE development is probably based upon the lack of vasodilator NO action counteracting a part of the sympathetic vasocon-

Table 3. Baseline mean arterial pressure and heart rate values, as well as the values found after particular surgical procedures in rats anesthetized with 3% isoflurane and subjected to acute or chronic L-NAME treatment or in rats anesthetized with 1.5% isoflurane subjected to therapeutic atropine administration

| Group | 10 | 11 | 12 | 13 | F ratio | LSD | df1/df2 |
|-------------------------------------|----------|--------------|----------------|------------|---------|-----|---------|
| Isoflurane | 3% | 3% | 3% | 1.5% | | | |
| Pharmacological intervention | | acute L-NAME | chronic L-NAME | T-atropine | | | |
| <i>Mean arterial pressure, mmHg</i> | | | | | | | |
| Baseline values | 78±4** | 85±7 | 115±7† | 96±2 | 15.3 | 13 | 12/69 |
| L-NAME | — | 103±8 | — | — | 2.0 | 16 | 3/22 |
| Balloon insertion | 84±4 | 90±5** | 97±10** | 102±4 | 9.2 | 20 | 12/69 |
| Pentolinium injection | — | — | — | — | 1.8 | 10 | 2/15 |
| Atropine injection | — | — | — | — | 15.0 | 20 | 2/15 |
| Balloon inflation, max | 127±8** | 147±4* | 155±6†** | 155±3 | 25.3 | 19 | 12/69 |
| Atropine: therapeutic | — | — | — | 90±3 | — | — | — |
| Recovery | 60±2** | 88±10* | 79±6† | 73±4 | 10.1 | 17 | 12/69 |
| <i>Heart rate, bpm</i> | | | | | | | |
| Baseline values | 380±11** | 402±10 | 387±9 | 390±13 | 2.2 | 40 | 12/69 |
| L-NAME | — | 398±13 | — | — | 3.4 | 32 | 3/22 |
| Balloon insertion | 356±9 | 363±15 | 374±14 | 410±10 | 3.6 | 44 | 12/69 |
| Pentolinium injection | — | — | — | — | 3.4 | 49 | 2/15 |
| Atropine injection | — | — | — | — | 2.7 | 43 | 2/15 |
| Balloon inflation, max | 359±13** | 373±23** | 403±21** | 272±29 | 12.4 | 78 | 12/69 |
| Atropine: therapeutic | — | — | — | 402±10 | — | — | — |
| Recovery | 341±12 | 364±24 | 396±20** | 364±14 | 2.9 | 56 | 12/69 |

Data are presented as means ± SE. Significant difference ($P < 0.05$; one-way ANOVA with post hoc LSD test is valid for groups 1–13 in Tables 2 and 3). *Influence of acute L-NAME administration vs. corresponding control (groups 2 vs. 1; 5 vs. 4; 8 vs. 7; 11 vs. 10). †Influence of chronic L-NAME administration vs. corresponding control (groups 3 vs. 1; 6 vs. 4; 9 vs. 7; 12 vs. 10). **Difference between 1.5% and 3% isoflurane anesthesia (groups 10 vs. 1; 11 vs. 2; 12 vs. 3).

striction, so that a more profound baroreflex-induced bradycardia might occur (13, 26, 27). The most striking difference between NO-deficient rats subjected to 1.5% or 3% isoflurane anesthesia was the presence of baroreflex-induced bradycardia in the former animals, whereas no significant HR changes were observed after balloon compression of the spinal cord in rats anesthetized with 3% isoflurane (Fig. 2). This is in accordance with earlier findings that higher isoflurane concentrations decrease the baroreflex gain in the control of HR and sympathetic nerve activity (2, 11, 17).

The above findings suggest that the mechanism(s) of NPE development might involve sympathetic vasoconstriction leading to blood mobilization from the systemic circulation into the pulmonary vessels. The concomitant activation of the arterial baroreflex, which is absent in rats anesthetized with 3% isoflurane, causes such a decrease in HR that prevents effective blood pumping into the systemic circulation. Bradycardia has been recognized as an important factor contributing to NPE development in animals with intracranial hypertension (for a review, see Ref. 12). Nevertheless, bradycardia occurring after intracranial hypertension appears to be initiated by the respective centers in the medulla oblongata rather than by peripheral baroreceptor feedback (3). To test the role of bradycardia and its mechanism in our NPE model, we have successfully employed two different interventions to prevent a baroreflex-induced HR reduction following spinal cord compression. First, a ganglionic blocker, pentolinium, was used to prevent a sympathetic discharge leading to a BP increase and the consequent activation of the arterial baroreflex.

Pentolinium pretreatment indeed abolished the BP rise and bradycardia in both rats with preserved NO synthesis (group 4) and also chronically NO-deficient rats (group 6). On the other

hand, a quite interesting response to spinal cord compression was found in pentolinium-pretreated rats subjected to acute NOS inhibition (group 5) (Fig. 2, Table 2). The mechanism of this surprising pressor response in acutely NO-deficient rats subjected to ganglionic blockade is not clear, but we can speculate about the involvement of other pressor agents (ANG II, endothelin-1, vasopressin) acting on the resistance vasculature in the absence of sympathetic vasoconstriction.

The second intervention used in our study was atropine pretreatment aimed at interrupting the cholinergic mechanisms mediating the baroreflex-induced bradycardia elicited after spinal cord compression. Preventive atropine administration not only abolished this bradycardia in both untreated and NO-deficient rats (groups 7–9) but also converted it into moderate tachycardia in both groups. This atropine pretreatment completely prevented the occurrence of NPE in both untreated and chronically NO-deficient animals anesthetized with 1.5% isoflurane (groups 7 and 9) and significantly attenuated NPE development in acutely NO-deficient rats subjected to the same anesthesia (group 8). Because therapeutic administration of atropine 2 min after balloon inflation (group 13) had no beneficial effect on NPE development, it is evident that an early bradycardic response after spinal cord compression is decisive for NPE pathogenesis.

Perspectives and Significance

Our data indicate that the development of neurogenic pulmonary edema in rats subjected to moderate anesthesia (1.5% isoflurane) is dependent upon a marked decrease of HR under the conditions of high BP elicited by the activation of the sympathetic nervous system. This vicious circle can be inter-

rupted either by ganglionic blockade (attenuating the sympathetic discharge) or by the blockade of cholinergic muscarinic receptors (eliminating the HR reduction). The above hemodynamic alterations are especially pronounced in rats subjected to acute NO synthase inhibition. Nitric oxide has a partial protective effect on NPE development because it attenuates sympathetic vasoconstriction, BP rise, and subsequent baroreflex-induced bradycardia following spinal cord injury. Further research should elucidate the therapeutic potential of atropine and/or other parasympatholytic agents in other (less severe or slowly developing) models of NPE.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Pavlína Macková for her excellent technical assistance. We thank James Dutt for critical reading of the manuscript.

GRANTS

We acknowledge the support provided by the Grants AV0Z50390512, AV0Z50110509, 1M0538, LC554, and 1M0510 by the Ministry of Education of the Czech Republic, Grants GACR309/06/1246 and GACR 305/08/0139 by Grant Agency of the Czech Republic, Grants IGA MZ 1A8697-5 and IGA MZ NR/8339-3 by Czech Ministry of Health, Grant IAA 500390902 by Internal Agency of the Academy of the Czech Republic and the European Commission FP6 project RESCUE (LSHB-CT-2005-518233).

REFERENCES

- Anand IS, Prasad BAK, Chung SS, Rao KRM, Cornfield DN, Milla CE, Singh N, Singh S, Selvamurthy W. Effects of inhaled nitric oxide and oxygen in high-altitude pulmonary edema. *Circulation* 98: 2441–2445, 1998.
- Bell LB, Wilson DJ, Quandt LM, Kampine JP. Renal sympathetic and heart rate baroreflex function in conscious and isoflurane anaesthetized normotensive and chronically hypertensive rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: 701–710, 1995.
- Chen HI, Chai CY. Integration of the cardiovagal mechanism in the medulla oblongata of the cat. *Am J Physiol* 231: 454–461, 1976.
- Fontes RB, Aguiar PH, Zanetti MV, Andrade F, Mandel M, Teixeira MJ. Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesthesiol* 15: 144–150, 2003.
- Hamdy O, Maekawa H, Shimada Y, Feng GG, Ishikawa N. Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats. *Crit Care Med* 29: 1222–1228, 2001.
- Hironaga K, Hirooka Y, Matsuo I, Shihara M, Tagawa T, Harasawa Y, Takeshita A. Effect of endogenous nitric oxide in the brain stem on the rapid adaptation of baroreflex. *Hypertension* 31: 27–31, 1998.
- Kandatsu N, Nan YS, Feng GG, Nishiwaki K, Ishikawa K, Komatsu T, Yokochi T, Shimada Y, Ishikawa N. Opposing effects of isoflurane and sevoflurane on neurogenic pulmonary edema development in an animal model. *Anesthesiology* 102: 1182–1189, 2005.
- Kondo H, Feng GG, Nishiwaki K, Shimada Y, Hirokawa M, Komatsu T, Yokochi T, Ishikawa N. A role of L-glutamate ionotropic receptors in the development of neurogenic pulmonary edema. *Eur J Pharmacol* 499: 257–263, 2004.
- Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, Cambiucci EC, Metzke K, Borges G, Gontijo JA. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* 63: 990–996, 2005.
- Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, Cambiucci EC, Borges G, Gontijo JA, Metzke K. Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci Lett* 373: 165–170, 2005.
- Lee JS, Morrow D, Andresen MC, Chang KS. Isoflurane depresses baroreflex control of heart rate in decerebrate rats. *Anesthesiology* 96: 1214–1222, 2002.
- Malik AB. Mechanisms of neurogenic pulmonary edema. *Circ Res* 57: 1–18, 1985.
- Matsumura K, Abe I, Tsuchihashi T, Fujishima M. Central nitric oxide attenuates the baroreflex in conscious rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R1142–R1149, 1998.
- Mesquita MB, Moraes-Santos T, Moraes MF. Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats. *Neurosci Lett* 332: 119–122, 2002.
- Minnear FL, Connell RS. Increased permeability of the capillary-alveolar barriers in neurogenic pulmonary edema (NPE). *Microvasc Res* 22: 345–366, 1981.
- Rassler B. The role of catecholamines in formation and resolution of pulmonary oedema. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 7: 27–35, 2007.
- Saeki Y, Hasegawa Y, Shibamoto T, Yamaguchi Y, Hayashi T, Tanaka S, Wang HG, Koyama S. The effects of sevoflurane, enflurane, and isoflurane on baroreceptor-sympathetic reflex in rabbits. *Anesth Analg* 82: 342–348, 1996.
- Šedý J, Urdziková L, Hejčl A, Burian M, Likavčanová K, Jendelová P, Zicha J, Kuneš J, Syková E. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma* 24: 1487–1501, 2007.
- Šedý J, Urdziková L, Likavčanová K, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neurosci Lett* 423: 167–171, 2007.
- Šedý J, Likavčanová K, Urdziková L, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 70: 308–313, 2008.
- Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Mechanism of neurogenic pulmonary edema development. *Physiol Res* 57: 499–506, 2008.
- Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Rapid but not slow spinal cord compression elicits neurogenic pulmonary edema in the rat. *Physiol Res* 58: 269–277, 2009.
- Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 56: 341–358, 1998.
- Urdaneta F, Layon AJ. Respiratory complications in patients with traumatic cervical spine injuries: case report and review of the literature. *J Clin Anesth* 15: 398–405, 2003.
- Vanický I, Urdziková L, Saganová K, Čížková D, Gálik J. Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J Neurotrauma* 18: 1399–1407, 2001.
- Zanzinger J, Czachurski J, Seller H. Inhibition of sympathetic vasoconstriction is a major principle of vasodilation by nitric oxide in vivo. *Circ Res* 75: 1073–1077, 1994.
- Zanzinger J, Czachurski J, Seller H. Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in RVLM by nitric oxide. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 268: R958–R962, 1995.

5. Šedý J, Zicha J, Nedvídková J, Kuneš J. The role of sympathetic nervous system in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Appl Physiol* 2012, 112:1–8. **IF=1,225**

The role of sympathetic nervous system in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord-injured rats

Jiří Šedý,¹ Josef Zicha,^{1,2} Jara Nedvídková,³ and Jaroslav Kuneš^{1,2}

¹*Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague;* ²*Center for Cardiovascular Research, Prague;* and ³*Institute of Endocrinology, Prague, Czech Republic*

Submitted 5 May 2011; accepted in final form 1 September 2011

Šedý J, Zicha J, Nedvídková J, Kuneš J. The role of sympathetic nervous system in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord-injured rats. *J Appl Physiol* 112: 1–8, 2012. First published September 8, 2011; doi:10.1152/jappphysiol.00574.2011.—The pronounced activation of sympathetic nervous system is a necessary prerequisite for the development of neurogenic pulmonary edema (NPE) in rats with balloon compression of spinal cord. In this study we examined whether this is a consequence of rapid activation of spinal pathways leading to sympathetic vasoconstriction, blood pressure rise, and reflex bradycardia. We found that NPE development can be prevented by epidural upper thoracic anesthesia or by transection of the upper spinal cord. This indicates an important role of spinal pathways activation. NPE development can also be prevented by moderate blood loss, supporting the role of blood redistribution to pulmonary circulation. In rats developing NPE the catecholamine surge following spinal cord compression involved not only a dramatic increase of circulating norepinephrine but also of epinephrine levels. The pretreatment of rats with α -1 adrenoceptor blocker prazosin, α -2 adrenoceptor blocker yohimbine, or calcium channel blocker nifedipine prevented NPE development, whereas the effect of β -adrenoceptor blockade with propranolol was less convincing. In conclusion, considerable activation of thoracic spinal pathways, followed by marked catecholamine secretion, play a major role in the development of NPE in spinal cord-injured rats. Enhanced α -adrenergic nifedipine-sensitive vasoconstriction is responsible for observed blood pressure changes, subsequent baroreflex bradycardia, and blood volume redistribution, which represent major pathogenetic mechanisms of NPE development.

α -adrenergic vasoconstriction; baroreflex bradycardia; epidural anesthesia; spinal pathways activation; blood volume redistribution

NEUROGENIC PULMONARY EDEMA (NPE) has been described as an acute life-threatening complication following several central nervous system injuries, including spinal cord injury, subarachnoid hemorrhage, primary spinal cord hemorrhage, brain trauma, intracerebral bleeding, severe epileptic grand mal seizure, or subdural hematoma (1, 4–6, 9, 14, 19, 28, 29). It develops rapidly following the injury and significantly complicates the overall clinical status of the patient. It is characterized by marked pulmonary vascular congestion with perivascular edema, extravasation and intra-alveolar accumulation of protein-rich edema fluid, and intra-alveolar hemorrhage (7, 11, 12). Both the release of vasoactive substances and a severe transient sympathetic discharge are thought to participate in this process. Several experimental studies have indicated that the neurons responsible for this severe sympathetic discharge are located in nuclei of hypothalamus and medulla

oblongata. These centers represent so-called NPE trigger zones (1). The overactivation of the sympathetic nervous system is associated with the enhanced secretion of catecholamines from peripheral sympathetic nerve endings, which leads to peripheral vasoconstriction, an increase in systemic vascular resistance and blood pressure together with the augmentation of central blood volume, and a reduction in the compliance of the left ventricle. In the periphery, these changes are followed by the constriction of the pulmonary veins, an increase in pulmonary capillary hydrostatic pressure, damage to the alveolar wall, and the leakage of fluid into the interstitium and intra-alveolar space, and hemorrhage resulting in the typical picture of NPE (1, 5). Despite these reports, the exact cascade leading to the development of NPE is still unclear (11, 12).

We have recently demonstrated (27) that major activation of sympathetic nervous system together with pronounced baroreflex-induced bradycardia are necessary prerequisites for the development of severe NPE, which is experimentally induced by rapid epidural balloon compression of the thoracic spinal cord in rats anesthetized by 1.5% isoflurane in air (21, 22). On contrary, the same procedure did not lead to NPE when deeper anesthesia with 3% isoflurane was employed (21). Our experiments also indicated that the prevention of any of these two decisive components—blood pressure elevation by ganglionic blocker pentolinium and/or reflex bradycardia by atropine pretreatment—abolished NPE development following spinal cord compression (27). This is in line with the fact that isoflurane exerts sympathoinhibitory effects (20) and attenuates baroreflex gain in the control of either sympathetic nerve activity (20) or heart rate (HR) (13).

The aim of the present study was to evaluate the importance of the activation of ascending spinal pathways, elicited by rapid compression of thoracic spinal cord, for sympathetic hyperactivity and NPE occurrence. To achieve this goal, we have used two different approaches: upper spinal cord transection and epidural anesthesia above the compression site to interrupt neural signal transmission. It should be mentioned that enhanced sympathetic vasoconstriction occurring after spinal cord compression is manifested not only by blood pressure elevation but also by increased venous return due to intensive visceral vasoconstriction redistributing blood to pulmonary circulation. This situation is further aggravated by the difficulties of the heart to pump the blood into systemic circulation during reflex bradycardia. Thus the second aim of our study was to evaluate whether moderate blood volume reduction just before spinal compression might have protective effects on NPE development.

The third aim of this study was to assess the contribution of particular components of sympathetic nervous system to NPE development. A special attention was paid to vasoconstriction

Address for reprint requests and other correspondence: J. Šedý, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, Prague 4, 142 20, Czech Republic (e-mail: jirisedy@hotmail.com).

mediated by α -adrenoceptors and subsequent calcium entry through voltage-dependent Ca^{2+} channels of L type (L-VDDC, sensitive to dihydropyridine Ca^{2+} antagonists). We were also interested to know whether the enhanced stimulation of β -adrenoceptors by released norepinephrine and/or epinephrine could attenuate NPE development through its vasodilatory and cardiac effects.

Finally, we examined the changes of circulating norepinephrine and epinephrine following spinal cord compression in animals subjected either to different degree of isoflurane anesthesia (1.5% vs. 3%) or to epidural anesthesia.

MATERIALS AND METHODS

Animals. We used 91 male Wistar rats (Velaz, Prague, Czech Republic) with body weights between 300 and 330 g. This study was performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24th of November 1986 (86/609/EEC) regarding the use of animals in research and was approved by the Ethical Committee of the Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic. All efforts have been made to decrease the number of animals used in the study.

Design of the study. Animals were anesthetized with either 1.5% or 3% isoflurane in air (flow 300 ml/min), and an arterial catheter for the monitoring of blood pressure and HR as well as a venous catheter for the administration of vasoactive drugs (prazosin, nifedipine, propranolol, or yohimbine) were inserted into the common carotid artery and internal jugular vein, respectively. In particular groups, different interventions were performed before spinal cord compression: 1) transection of the upper spinal cord, 2) the insertion of catheter into upper thoracic region for trimecaine epidural anesthesia, or 3) moderate blood loss (3 ml, i.e., ~15% of blood volume) from carotid artery. In four animals, the balloon was inserted into the lumbar (L) instead of the thoracic (T) spinal level. Thereafter the animal was put in a prone position, and the balloon compression was performed. Rats were euthanized 15 min after lesioning (i.e., 10 min after balloon deflation). The grade of NPE was independently evaluated using macroscopic visual examination of subpleural bleeding and the p-index (lung weight/body weight \times 100). Controls were healthy noninjured animals, euthanized immediately after the induction of anesthesia. The possible role of isoflurane per se in inducing NPE was excluded in our previous study (21). For the detailed list of experimental groups see Table 1.

Balloon compression spinal cord lesion. To induce a spinal cord injury, we used the model of an epidural balloon compression lesion

(32), as described previously (21). Briefly, under aseptic conditions, a 2-cm median skin incision at the T₁₀-L₁ level was made. The dorsal muscles were shifted laterally, and the T₁₀ and T₁₁ spinous processes were removed. A hole was drilled into the T₁₀ lamina with a dental drill. Then a 2F French Fogarty catheter (Baxter Healthcare, Irvine, CA), which was filled with distilled water and connected to a 50- μ l Hamilton syringe, was inserted into the dorsal epidural space 10 mm rostrally, to reach the T₈-T₉ spinal level. Using a micromanipulator, the balloon was rapidly inflated to 15 μ l, and the inflated balloon was left in place for 5 min. Subsequently, the balloon was deflated and removed. Rats were euthanized 10 min later.

The immediate inflation of the balloon in the epidural space of the thoracic spinal channel with 15 μ l water under 1.5% isoflurane anesthesia reliably and reproducibly produces severe NPE (21, 22). In the present experiments we therefore studied the effects of different surgical or pharmacological procedures on the development of NPE in this model (1.5% model).

Epidural anesthesia. After the induction of anesthesia and insertion of arterial catheter for the monitoring of blood pressure and HR, the animals were put into prone position. The spinal cord was reached by exactly the same procedure as described for balloon compression. A thin catheter (PE10) was inserted into epidural space to reach the spinal T₂ level. Subsequently, the wound site was hermetically closed by Histoacryl, with a particular care not to disturb the spinal cord tissue. Subsequently, 100 μ l of trimecaine (Mesocain, 10 mg/ml) was administered. This dose of trimecaine was chosen on the basis of our preliminary experiments, in which 100 μ l of trimecaine produced a temporary paraplegia of both hindlimbs for at least 30 min (unpublished data).

Upper thoracic spinal cord transection. After the induction of anesthesia and insertion of arterial catheter for the monitoring of blood pressure and HR, the animals were put into prone position. The upper thoracic spinal cord was reached by exactly the same procedure as described for balloon compression, but the targeted spinal level was T₄. After that, the surgical approach for the balloon compression lesion was prepared. First, sharp rapid spinal cord transection at the T₄ spinal level was performed, and 3 min later, balloon compression lesion at the T₈ level was performed as described previously.

Lumbar spinal cord compression. After the induction of anesthesia and insertion of arterial catheter for the monitoring of blood pressure and HR, the animals were put into prone position. The surgical approach to the spinal cord was performed as described for thoracic spinal cord compression. Subsequently, the 2F French Fogarty catheter was inserted into the dorsal epidural space 8 mm caudally, to

Table 1. Lung impairment after spinal cord injury in particular experimental groups subjected to particular spinal or pharmacological intervention

| Group | Intervention | Isoflurane | n | Absent (% of 2n) | Grade I (% of 2n) | Grade II (% of 2n) | Grade III (% of 2n) | p-index | Died (%) |
|-------|-------------------------------|------------|----|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------|----------|
| 1 | | 1.5% | 9 | | | 1 (6%) | 17 (94%) | 0.78 \pm 0.05* | 3* (33%) |
| 2 | | 3% | 8 | 16 (100%) | | | | 0.50 \pm 0.06 | |
| 3 | Epidural anesthesia | 1.5% | 10 | 20 (100%) | | | | 0.44 \pm 0.01 | |
| 4 | Upper spinal cord transection | 1.5% | 6 | 12 (100%) | | | | 0.46 \pm 0.04 | |
| 5 | Prazosin (1 mg/kg) | 1.5% | 6 | 12 (100%) | | | | 0.42 \pm 0.01 | |
| 6 | Yohimbine (1 mg/kg) | 1.5% | 6 | 12 (100%) | | | | 0.43 \pm 0.01 | |
| 7 | Nifedipine (0.4 mg/kg) | 1.5% | 4 | 8 (100%) | | | | 0.43 \pm 0.03 | |
| 8 | Propranolol (1–4 mg/kg) | 1.5% | 20 | 16 (80%) | 3 (15%) | 1 (5%) | | 0.52 \pm 0.02* | |
| 9 | Blood loss (3 ml) | 1.5% | 5 | 10 (100%) | | | | 0.47 \pm 0.03 | |
| 10 | Lumbar compression | 1.5% | 4 | 8 (100%) | | | | 0.43 \pm 0.01 | |
| 11 | Intact controls | 1.5% | 13 | 26 (100%) | | | | 0.45 \pm 0.02 | |

The p-index is given as mean values \pm SE; n = no. of rats and 2n = no. of lungs. Since there were no significant dose-dependent differences in hemodynamic or pulmonary effects of spinal cord compression, all 3 subgroups of propranolol-treated rats were merged together. The absence or presence of subpleural bleeding (evaluated as Grades I–III) in different groups are shown as follows. The total number of lungs in each group; the right and left lung were considered separately, and the percentage of affected lungs was calculated in terms of all lungs in the corresponding group. *Significant differences ($P < 0.05$) from control group. The occurrence of death is shown as the total number of deaths in each group and as the percentage of all animals in the group. Control animals are animals without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia. n = no. of rats and 2n = no. of lungs.

reach the L₂–L₅ spinal level. Using a micromanipulator, the balloon was rapidly inflated to 15 μ l, and the inflated balloon was left in place for 5 min. Subsequently, the balloon was deflated and removed. Rats were euthanized 10 min later.

Monitoring of circulating levels of epinephrine and norepinephrine. The immediate inflation of the balloon in the epidural space of the thoracic spinal channel with 15 μ l water under 1.5% isoflurane anesthesia reliably and reproducibly produces severe NPE, whereas the animals that undergo the same procedure under 3% isoflurane anesthesia do not develop NPE (21, 22). In the present experiments we therefore compared catecholamine surge in these two contrasting models. Blood samples were taken before spinal surgery, immediately after the inflation of the balloon in spinal channel, and at the end of the recovery period. Serum concentrations of epinephrine and norepinephrine were determined using commercial 2-CAT Research RIA kit (LDN, Hamburg, Germany) after extraction and acylation of samples. The sensitivity was 0.03 ng/ml for both epinephrine and norepinephrine. As a control group, we used animals where both adrenal glands were removed using extraperitoneal approach, i.e., through small incisions made in a midscapular line at the lumbar level.

Measurement of blood pressure and HR changes. Mean arterial pressure (MAP, mmHg) and HR (beats/min) were monitored for at least 5 min before the spinal surgical procedure, throughout the entire procedure, and for 15 min after the balloon compression of the spinal cord using a PowerLab system (ADInstruments, Colorado Springs, CO). In particular groups, we pretreated the rats with one of following drugs: 1) α -1 adrenergic receptor blocker prazosin (1 mg/kg iv), 2) α -2 adrenergic receptor blocker yohimbine (1 mg/kg iv), 3) β -adrenergic receptor blocker propranolol (1, 2, and 4 mg/kg iv), and 4) calcium channel blocker nifedipine (0.4 mg/kg iv). These drugs were given after balloon insertion, i.e., shortly before spinal cord compression, which was carried out after a temporary stabilization of blood pressure was achieved. The hemodynamic values were obtained at the following time points: 1) the baseline value before the onset of surgery, 2) the stabilized values before balloon inflation, 3) the maximum value after balloon inflation, 4) the value 2 min after balloon inflation, and 5) the value at the end of recovery (10 min after balloon deflation). MAP and HR changes elicited by spinal cord compression were evaluated by subtracting the values found after balloon insertion (groups 1–3 and 9–11) from the peak values seen after balloon inflation. In groups subjected to pharmacological interventions (groups 3 and 5–8), we subtracted the values found after drug administration from the corresponding peak values.

Evaluation of NPE. The lungs were immediately removed from euthanized animal and weighed by an independent investigator. To estimate the liquid accumulation in the lungs, the relative pulmonary weight was calculated as the pulmonary index (lung weight/body weight \times 100), which has been previously demonstrated to be a very sensitive indicator of the degree of pulmonary edema (11, 12, 16, 21, 22). In all cases, a mild hematoma, maximally 1 mm in diameter, was found in the hilus area due to the manipulation of the pulmonary vessels during lung removal (not taken into further account). The level of pulmonary subpleural bleeding was evaluated macroscopically as “absent” (no bleeding on the lung surface), “grade I” (small bleeding areas, occupying not more than 10% of the lung surface), “grade II” (medium-sized bleeding areas, occupying 11–50% of the lung surface) and “grade III” (massive bleeding areas, occupying more than 50% of the lung surface), as described previously (21, 22). Each lung was evaluated separately. In our previous experiments, we documented that the pulmonary index and the extent of subpleural bleeding clearly correspond to the histological picture of the severity of lung edema (21, 22, 25); thus the histology was not performed in the current experiments.

Statistical analysis. The pulmonary index, MAP, HR, and catecholamine levels are reported as mean values \pm SE. One-way ANOVA with a post hoc least significant difference (LSD) test was used for the comparison among individual groups.

RESULTS

The effect of various spinal procedures and blood loss on NPE development. The rapid inflation of the balloon in the spinal channel of rats anesthetized with 1.5% isoflurane anesthesia (Table 1, group 1) caused a considerable blood pressure elevation, baroreflex-induced HR decrease, and severe NPE in all cases (Table 1 and Figs. 1 and 2). The pulmonary index and the extent of subpleural bleeding as well as the blood pressure rise and HR decrease corresponded to the values observed previously for this model of severe NPE. Conversely, the same procedure performed under 3% isoflurane anesthesia (group 2) did not promote NPE. In this group, the changes elicited by spinal cord compression were Δ MAP = 72 ± 9 mmHg and Δ HR = 4 ± 3 beats/min. These findings also confirmed our previous results (21).

None of the animals pretreated with upper thoracic transection or epidural anesthesia developed NPE. Neither p-index nor the extent of subpleural bleeding differed significantly from intact controls (Table 1, groups 3 and 4). The epidural anesthesia prevented the blood pressure rise as well as HR decrease in these animals (Figs. 1 and 2). Similar protection against NPE was also observed in animals subjected to a moderate preventive blood loss (Table 1, group 9). Blood loss caused a

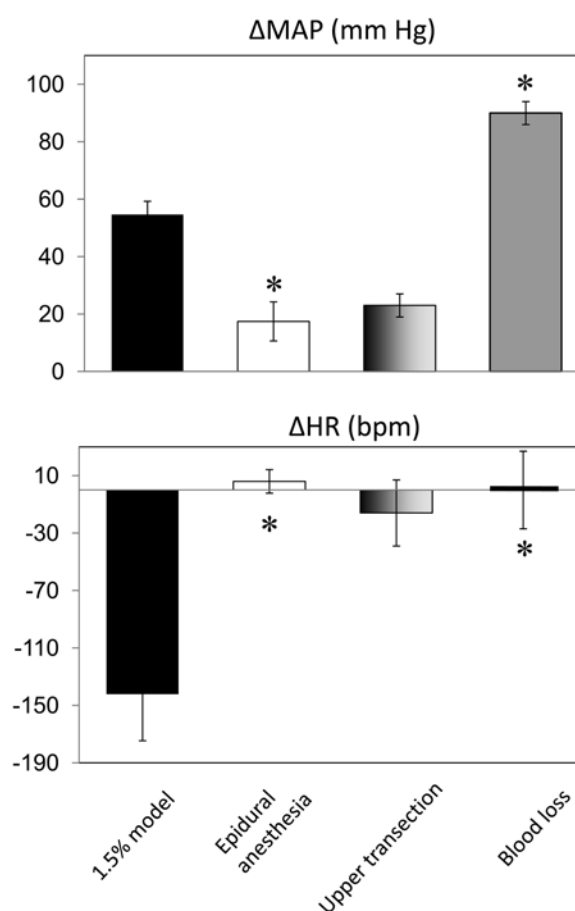


Fig. 1. Changes in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) elicited by spinal cord compression in rats anesthetized with 1.5% isoflurane and subjected to either epidural anesthesia (group 3), upper thoracic spinal cord transection (group 4), or blood loss (group 9). Data are presented as means \pm SE. Significant differences ($P < 0.05$) vs. control group [1.5% model of neurogenic pulmonary edema (NPE), group 1] are marked by asterisks.

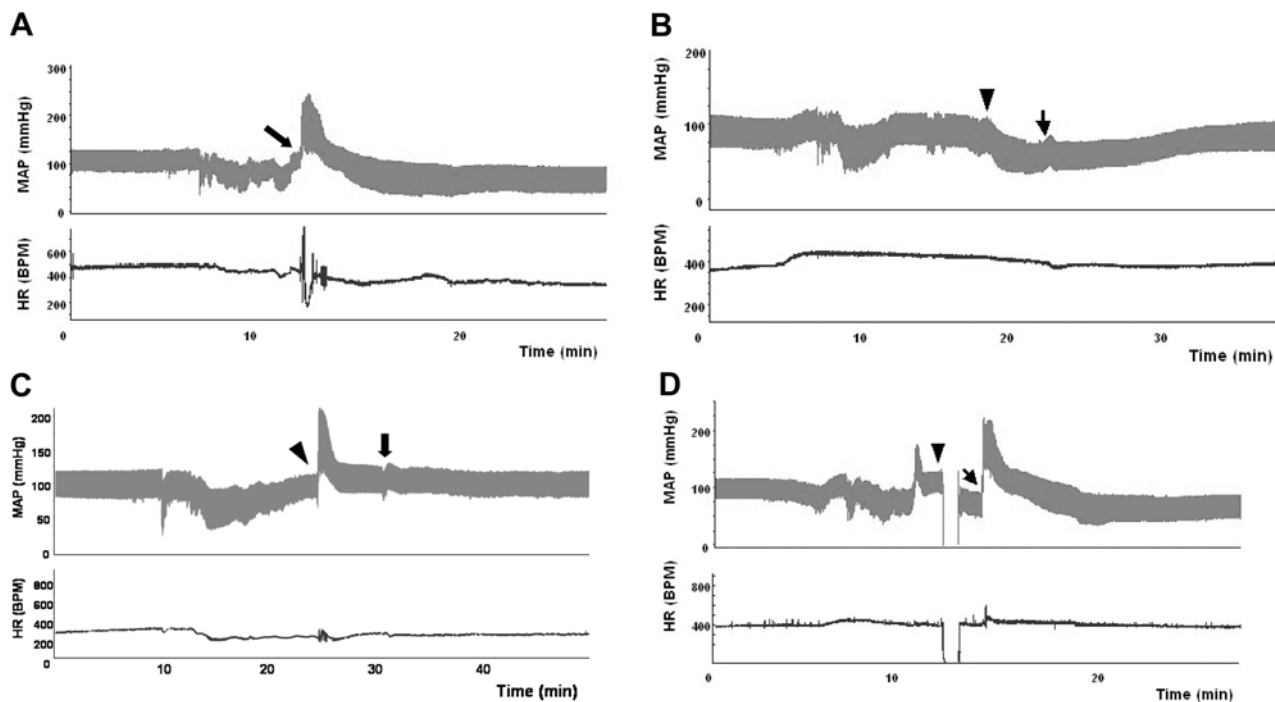


Fig. 2. Time course of MAP (above) and HR (below) during the entire surgical procedure, balloon compression lesion (arrows), and recovery period in representative animals from individual experimental groups. Arrowheads indicate particular experimental interventions mentioned below. A: animal anesthetized with 1.5% isoflurane (*group 1*). B: epidural anesthesia in rat anesthetized with 1.5% isoflurane (*group 3*). C: upper thoracic spinal cord transection in rat anesthetized with 1.5% isoflurane (*group 4*). D: blood loss in rat anesthetized with 1.5% isoflurane (*group 9*).

considerable blood pressure reduction before balloon inflation (Table 2). In these animals spinal cord compression elicited exaggerated blood pressure rise but no significant change in HR (Figs. 1 and 2).

NPE did not occur in rats in which spinal cord was compressed at the lumbar level (Table 1, *group 10*; Δ MAP -25 ± 8 mmHg; Δ HR -4 ± 13 beats/min; *p*-index = 0.43 ± 0.01). This is in accordance with our previous findings that different types of spinal cord lesion, such as lower thoracic spinal transection at the T₈ level (Δ MAP 23 ± 4 mmHg; Δ HR -16 ± 14 beats/min; *p*-index = 0.46 ± 0.04) or slow spinal compression (Δ MAP 0 ± 2 mmHg; Δ HR -23 ± 7 beats/min; *p*-index = 0.49 ± 0.03), did not induce NPE (25, 27). Hemodynamic data from these experiments clearly demonstrate that only such spinal cord interventions, which cause a marked rapid baroreflex-induced bradycardia, have a potential to promote the development of neurogenic edema.

Table 2. The changes of mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) induced by a moderate blood loss (3 ml) or pharmacological pretreatment before spinal cord compression in rats anesthetized with 1.5% isoflurane

| Intervention | <i>n</i> | Δ MAP, mmHg | Δ HR, beats/min |
|------------------------|----------|--------------------|------------------------|
| Blood loss | 5 | -36 ± 10 | 11 ± 4 |
| Prazosin (1 mg/kg) | 6 | -40 ± 4 | 24 ± 13 |
| Yohimbine (1 mg/kg) | 6 | -49 ± 5 | 24 ± 15 |
| Nifedipine (0.4 mg/kg) | 5 | -24 ± 4 | 12 ± 10 |
| Propranolol (1 mg/kg) | 7 | 0 ± 3 | -50 ± 9 |
| Propranolol (2 mg/kg) | 8 | -14 ± 4 | -60 ± 5 |
| Propranolol (4 mg/kg) | 5 | -34 ± 5 | -72 ± 8 |

Data are means \pm SE; *n* = no. of rats.

Circulating catecholamines and NPE development. To examine the role of sympathetic nervous system in NPE, we measured serum levels of epinephrine and norepinephrine before, during, and after the balloon compression spinal cord lesion (Fig. 3). In animals with severe NPE, which were anesthetized with 1.5% isoflurane (*group 1*: 1.5% model), we have observed an 18-fold increase in serum epinephrine concentration and a 64-fold increase in serum norepinephrine concentration immediately after balloon compression. This increase of circulating catecholamine levels was normalized at the end of the recovery period. In rats anesthetized with 3% isoflurane (*group 2*), which did not develop NPE, there was a 40-fold increase in the level of serum norepinephrine but no significant change in epinephrine level after balloon compression of the spinal cord (Fig. 3). It is important to note that the levels of catecholamines were not increased during spinal cord compression in animals pretreated with upper thoracic epidural anesthesia (Fig. 3).

The contribution of α - and β -adrenergic mechanisms to the development of NPE. The pretreatment of rats with a competitive inhibitor of α -1 adrenergic receptors prazosin (*group 5*), a competitive inhibitor of α -2 adrenergic receptors yohimbine (*group 6*), or calcium channel blocker nifedipine (*group 7*) prevented the NPE development, as indicated by unaltered *p*-index values (Table 1). All three blockers lowered blood pressure before spinal cord compression without significant changes in HR (Table 2). Figure 4 shows that all these pharmacological interventions prevented significant HR reduction, whereas blood pressure rise was attenuated by prazosin pretreatment only. These results suggest that α -adrenergic neurotransmission and consequent calcium influx through volt-

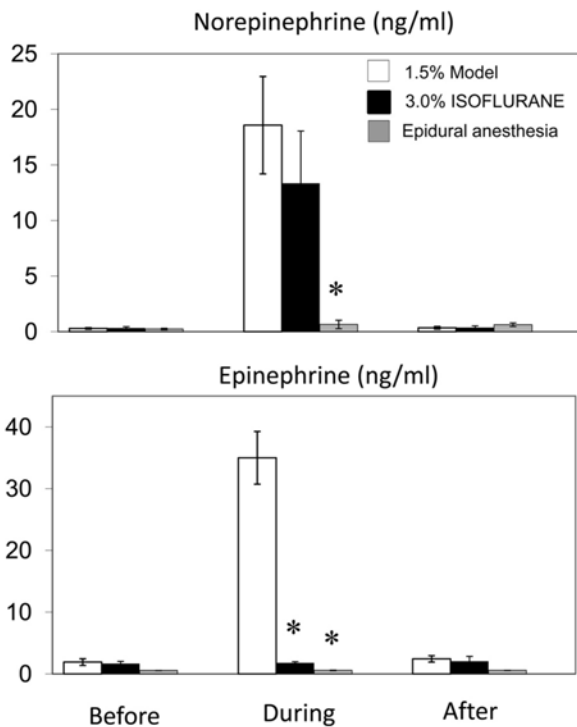


Fig. 3. Levels of circulating norepinephrine (top panel) and epinephrine (bottom panel) before, during, and after spinal cord compression in rats anesthetized with 1.5% isoflurane (1.5% model of NPE, group 1) or 3% isoflurane, as well as in animals anesthetized with 1.5% isoflurane and subjected to epidural anesthesia. Data are presented as means \pm SE. Significant differences ($P < 0.05$) vs. 1.5% model of NPE (group 1) are marked by asterisks.

age-dependent calcium channels play a crucial role in NPE development. Moreover, the data presented in Fig. 4 clearly confirm our above mentioned results from experiments with different spinal cord manipulations that marked rapid HR decrease, but not blood pressure rise, induced by spinal cord compression is essential for the development of NPE.

On the other hand, a β -blockade induced with propranolol administered before spinal cord compression had only a partial protective effect on NPE development (Table 1, group 8) that was independent of propranolol dose used (p-index: 1 mg/kg group 0.55 ± 0.04 , 2 mg/kg group 0.54 ± 0.04 , and 4 mg/kg group 0.46 ± 0.03 , not significant). This was a reason to merge all three subgroups together. The pretreatment of rats with propranolol before spinal cord compression caused a moderate dose-dependent blood pressure decrease but a considerable HR reduction, which was similar at all three doses used (Table 2). Spinal cord compression in propranolol-pretreated rats was followed by a blood pressure rise, which was similar to that seen in untreated rats of group 1, but we have still observed a significant reduction of HR, which was, however, diminished to 40% of the response found in group 1 (Fig. 4). These hemodynamic changes elicited by spinal cord compression were similar at all three propranolol doses (data not shown). It is evident that the degree of protection against NPE induced by different interventions on sympathetic nervous system clearly corresponds to the extent of attenuation of HR rate decrease occurring after spinal cord injury.

DISCUSSION

The pronounced activation of sympathetic nervous system is a necessary prerequisite for the development of NPE in rats with the balloon compression of spinal cord. In this study we found that NPE development can be prevented by epidural upper thoracic anesthesia or by upper transection of the thoracic spinal cord. This indicates an important role of rapid activation of spinal pathways for the enhancement of the sympathetic outflow. NPE development can also be prevented by a moderate blood loss, supporting the role of blood redistribution to pulmonary circulation. In rats developing NPE the catecholamine surge following spinal cord compression involved not only a dramatic rise of circulating norepinephrine but also a major increase of epinephrine levels. The pretreatment of rats with α -1 adrenoceptor blocker prazosin, α -2 adrenoceptor blocker yohimbine, or calcium channel blocker nifedipine prevented NPE development, whereas the effect of β -adrenoceptor blockade with propranolol was less convincing. Thus a considerable activation of thoracic spinal pathways leading to enhanced α -adrenergic vasoconstriction (mediated by calcium entry via L-VDCC) plays a major role in the development of NPE in spinal cord-injured rats. Our experiments confirmed the decisive role of baroreflex-induced bradycardia in the pathogenesis of NPE following spinal cord

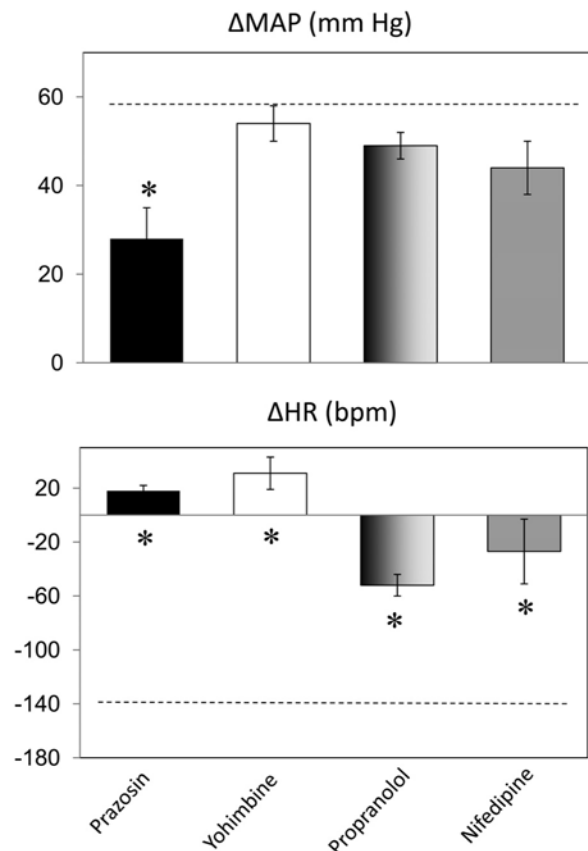


Fig. 4. Changes in MAP and HR elicited by spinal cord compression in particular experimental groups (prazosin, yohimbine, propranolol, nifedipine) of rats anesthetized with 1.5% isoflurane. Data are presented as means \pm SE. Broken lines represent MAP and HR changes found in 1.5% model of NPE (group 1). Significant differences ($P < 0.05$) vs. control group are marked by asterisks.

compression, because all experimental procedures eliminating HR reduction after spinal cord compression also abolished NPE development.

Pronounced rapid activation of thoracic spinal pathways is essential for NPE occurrence. Our study showed that NPE development can be prevented by preceding epidural upper thoracic anesthesia with trimecaine. In human medicine, this intervention is routinely used to completely anesthetize the central as well as peripheral spinal neural pathways to perform particular surgical approaches, such as hip joint surgery or obstetric operations. We used this procedure in our NPE model to examine the effect of complete abolishing of the activation of spinal neural pathways. Our results indicate that rapid balloon compression of anesthetized lower thoracic spinal cord completely prevented the massive activation of NPE trigger zone afferent pathways (for review on NPE trigger zone see Refs. 1, 23, 24). In our study this was reflected by the lack of characteristic hemodynamic response associated with NPE development as well as by the absence of catecholamine surge. Moreover, the balloon compression of anesthetized thoracic spinal cord was not accompanied by skeletal muscle contractions typical for NPE model (21, 22), indirectly supporting the efficiency of epidural anesthesia. Similar preventive effects on NPE development were achieved by transection of the spinal cord at the T₄ level.

Interestingly, the hyperactivation of spinal neural pathways, supposed in the compressive model, does not seem to have a role in other spinal cord injury models, such as spinal transection or hemisection (22, 24, 25). Moreover, only rapid but not slow compression of spinal cord elicited NPE under otherwise same experimental design (25). Many clinical experiences indicate that the moment of sudden severe hyperactivity of spinal or cerebral pathways clearly corresponds to the time when the NPE was elicited (for review see Refs. 1, 5). Thus both the extent as well as the rate of spinal neural hyperactivation might be crucial for the development of NPE. It has been published previously that cerebral compression elicited systemic arterial hypertension and pulmonary edema. These responses were prevented by spinal transection at C₇ level, but not by decerebration (2, 3). On the other hand, we observed that NPE did not develop when the balloon compression was performed at the lumbar instead of lower thoracic spinal level. This is probably the result of absence of sympathetic nerve fibers at the lumbar level of the spinal cord.

Blood volume redistribution plays an important role in NPE development. The redistribution of blood from splanchnic regions to pulmonary circulation due to pronounced sympathetic vasoconstriction seems to be the mechanism of the increase of central blood volume in NPE, which is characterized not only by vascular congestion but also by blood extravasation. To evaluate the contribution of this hemodynamic factor in the pathogenesis of NPE we have induced a moderate blood loss (~15% volume of circulating blood) before spinal cord compression. It is evident that this intervention successfully prevented NPE development, indicating the importance of augmented venous return and overfilling of pulmonary circulation during early stages of NPE development, when baroreflex-induced reduction of HR impairs actual cardiac performance (27).

Moreover, it should be considered whether a higher degree of isoflurane anesthesia (3% instead of 1.5%) might be asso-

ciated with a greater blood deposition in splanchnic vessels, because isoflurane was reported to attenuate also the tone of capacitance-regulating mesenteric veins (30). Thus the protective effects exerted by moderate blood loss on NPE development might share similar mechanisms with those of a more pronounced isoflurane anesthesia.

Norepinephrine-induced L-VDCC opening is a necessary prerequisite for NPE development. Balloon compression of the spinal cord is accompanied by a major catecholamine surge, which can be prevented not only by epidural anesthesia (Fig. 3) but also by bilateral adrenalectomy (Šedý J, Zicha J, unpublished data). The elevation of circulating norepinephrine was associated with high epinephrine levels only in rats anesthetized with 1.5% isoflurane, which developed NPE, but not in those anesthetized with 3% isoflurane (Fig. 3). The crucial role of high epinephrine levels in the development of pulmonary edema has been previously shown in experiments of Maron and coworkers, who observed dose-dependent relationship between epinephrine plasma levels and alveolar liquid clearance, leading to pulmonary edema (10, 15).

We have earlier demonstrated that blood pressure rise caused by the activation of sympathetic nervous system after spinal cord compression can be successfully prevented by ganglionic blockade (using pentolinium pretreatment) (21). In this study we have tried to evaluate the importance of particular components of adrenergic vasoconstriction in the pathogenesis of NPE. To achieve this goal we have pretreated our rats with either α_1 -adrenoceptor blocker prazosin or α_2 -adrenoceptor blocker yohimbine. Our data (Fig. 4, Table 1) indicate that both types of α -adrenoceptor blockade were able to prevent not only NPE occurrence but also HR reduction which is a hemodynamic change essential for NPE development (26, 27). The similar effects of α_1 - and α_2 -adrenoceptor blockade are not so surprising if we consider that an extensive catecholamine stimulation of these two different types of α -adrenoceptors always leads to a major augmentation of calcium entry through L type voltage-dependent Ca²⁺ channels (L-VDCC) (8, 17, 18). In the first case, the activation of α_1 -adrenoceptors causes severe depletion of intracellular calcium stores via inositol trisphosphate stimulation of its receptors on sarcoplasmic reticulum. Subsequent opening of store-operated Ca²⁺ channels (SOC) to replete calcium stores is associated with enhanced Na⁺ entry leading to membrane depolarization followed by L-VDCC opening. In the second case, the activation of α_2 -adrenoceptors stimulates the inhibitory influence of Gi proteins on adenylate cyclase leading to decreased cAMP formation. Reduction of cAMP levels is associated with the opening of L-VDCC (probably due to diminished activity of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels the function of which is to hyperpolarize cell membrane).

The fundamental importance of calcium entry *via* L-VDCC for the development of NPE was demonstrated in our experiments in which the pretreatment of rats with nifedipine (dihydropyridine antagonist of L-VDCC) before spinal cord compression completely prevented the above mentioned HR reduction and NPE development (Fig. 4, Table 1). It should be pointed out that in our study nifedipine pretreatment had very similar effects as the pretreatment with either α_1 - or α_2 -adrenoceptor blockers.

Our results are also fully compatible with the earlier findings on isoflurane-induced hyperpolarization of smooth muscle

cells in small resistance arterioles or capacitance venules of the rat (30, 31). The in situ superfusion of small mesenteric vessels with isoflurane caused membrane hyperpolarization through both neural (inhibition of sympathetic neural input) and non-neural mechanisms (inhibition of cAMP pathways and K⁺ channels). This hyperpolarization helps to close L-VDCC opened by sympathetic stimulation. Thus the deeper isoflurane anesthesia attenuated both blood pressure rise (by decreasing arterial constriction) and pulmonary venous return (by increasing splanchnic capacity to deposit circulating blood).

On the other hand, our attempt to aggravate NPE development by β -adrenergic blockade with propranolol was not successful (Table 2). Our idea was to attenuate β -adrenergic vasodilatation (to increase blood pressure rise) and to diminish cardiac contractility (to reduce cardiac pumping of blood through the lungs). Surprisingly, our experiments with propranolol pretreatment revealed a moderate attenuation of NPE development instead of its exacerbation. This partial protective effect could be explained by HR reduction induced by propranolol administration before spinal cord compression (Table 2) that consequently elicited a substantially smaller HR decrease (Table 1).

Conclusions. Our study demonstrated that the rapid activation of ascendent spinal pathways is responsible for sympathetic hyperactivation occurring after spinal cord compression. Our data indicate that the blockade of enhanced α -adrenergic vasoconstriction (mediated by increased calcium entry through L-type of voltage-dependent Ca²⁺ channels) prevents NPE development. The present findings also support the essential role of baroreflex-induced HR reduction for the induction of NPE.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants AV0Z 50110509 and 1M0510 (Ministry of Education of the Czech Republic) and by research grants GA CR 305/08/0139 and IGA AVCR IAA 500110902.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.S., J.Z., and J.K. conception and design of research; J.S., J.Z., J.N., and J.K. performed experiments; J.S., J.Z., and J.N. analyzed data; J.S., J.Z., and J.N. interpreted results of experiments; J.S. and J.K. prepared figures; J.S. and J.Z. drafted manuscript; J.S. edited and revised manuscript; J.S., J.Z., J.N., and J.K. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Baumann A, Audibert G, McDonnell J, Mertes PM. Neurogenic pulmonary edema. *Acta Anaesthesiol Scand* 51: 447–455, 2007.
- Chen HI. Hemodynamic mechanisms of neurogenic pulmonary edema. *Biol Signals* 4: 186–192, 1995.
- Chen HI, Sun SC, Chai CY. Pulmonary edema and hemorrhage resulting from cerebral compression. *Am J Physiol* 224: 223–229, 1973.
- Dragosavac D, Falcao ALE, Araújo S, Terzi RGG. Neurogenic pulmonary edema: report of two cases. *Arq Neuropsiquiatr* 55: 305–309, 1997.
- Fontes RB, Aguiar PH, Zanetti MV, Andrade F, Mandel M, Teixeira MJ. Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesthesiol* 15: 144–150, 2003.
- Hall SR, Wang L, Milne B, Ford S, Hong M. Intrathecal lidocaine prevents cardiovascular collapse and neurogenic pulmonary edema in a rat model of acute intracranial hypertension. *Anesth Analg* 94: 948–953, 2002.
- Kandatsu N, Nan YS, Feng GG, Nishawaki K, Ishikawa K, Komatsu T, Yokochi T, Shimada Y, Ishikawa N. Opposing effects of isoflurane and sevoflurane on neurogenic pulmonary edema development in an animal model. *Anesthesiology* 102: 1182–1189, 2005.
- Kazda S, Garthoff B, Knorr A. Interference of the calcium antagonist nisoldipine with the abnormal response of vessels from hypertensive rats to α -adrenergic stimulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 7, Suppl 6: S61–S65, 1985.
- Kondo H, Feng GG, Nishiwaki K, Shimada Y, Hirokawa M, Komatsu T, Yokochi T, Ishikawa N. A role of L-glutamate ionotropic receptors in the development of neurogenic pulmonary edema. *Eur J Pharmacol* 499: 257–263, 2004.
- Lane SM, Maender KC, Awender NE, Maron MB. Adrenal epinephrine increases alveolar liquid clearance in a canine model of neurogenic pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 760–768, 1998.
- Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, Cambiucci EC, Metzke K, Borges G, Gontijo JA. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* 63: 990–996, 2005.
- Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, Cambiucci EC, Borges G, Gontijo JA, Metzke K. Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci Lett* 373: 165–170, 2005.
- Lee JS, Morrow D, Andresen MC, Chang KSK. Isoflurane depresses baroreflex control of heart rate in decerebrate rats. *Anesthesiology* 96: 1214–1222, 2002.
- Macleod AD. Neurogenic pulmonary edema in palliative care. *J Pain Symptom Manage* 23: 154–156, 2002.
- Maron MB. Dose-response relationship between plasma epinephrine concentration and alveolar liquid clearance in dogs. *J Appl Physiol* 85: 1702–1707, 1998.
- Mesquita MB, Moraes-Santos T, Moraes MF. Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats. *Neurosci Lett* 332: 119–122, 2002.
- Nelson MT, Standen NB, Brayden JE, Worley JF 3rd. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* 336: 382–385, 1988.
- Paulis L, Lišková S, Pintérová M, Dobešová Z, Kuneš J, Zicha J. Nifedipine-sensitive noradrenergic vasoconstriction is enhanced in spontaneously hypertensive rats: the influence of chronic captopril treatment. *Acta Physiol (Oxf)* 191: 255–266, 2007.
- Ochiai H, Yamakawa Y, Kubota E. Deformation of the ventrolateral medulla oblongata by subarachnoid hemorrhage from ruptured vertebral artery aneurysms causes neurogenic pulmonary edema. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 41: 529–534, 2001.
- Saeki Y, Hasegawa Y, Shibamoto T, Yamaguchi Y, Hayashi T, Tanaka S, Wang HG, Koyama S. The effects of sevoflurane, enflurane, and isoflurane on baroreceptor-sympathetic reflex in rabbits. *Anesth Analg* 82: 342–348, 1996.
- Šedý J, Urdziková L, Hejčl A, Burian M, Likavčanová K, Jendelová P, Zicha J, Kuneš J, Syková E. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma* 24: 1487–1501, 2007.
- Šedý J, Urdziková L, Likavčanová K, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neurosci Lett* 423: 167–171, 2007.
- Šedý J, Likavčanová K, Urdziková L, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 70: 308–313, 2008.
- Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Mechanism of neurogenic pulmonary edema development. *Physiol Res* 57: 499–506, 2008.
- Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Rapid but not slow spinal cord compression elicits neurogenic pulmonary edema in the rat. *Physiol Res* 58: 269–277, 2009.
- Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Syková E. Atropine may prevent the neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 73: 42–44, 2009.
- Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Syková E. The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats: the effect of preventive interventions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1111–R1117, 2009.
- Seric V, Roje-Bedekovic M, Demarin V. Neurogenic pulmonary edema. *Acta Clin Croat* 43: 389–395, 2004.

29. **Simmons RL, Martin AM, Heisterkamp CA, Ducker TB.** Respiratory insufficiency in combat casualties. II. Pulmonary edema following head injury. *Ann Surg* 170: 39–44, 1969.
30. **Stekiel TA, Kokita N, Yamazaki M, Bosnjak ZJ, Kampine JP, Stekiel WJ.** Effect of isoflurane on in situ vascular smooth muscle transmembrane potential in spontaneous hypertension. *Anesthesiology* 91: 207–214, 1999.
31. **Stekiel TA, Contney SJ, Kokita N, Bosnjak ZJ, Kampine JP, Stekiel WJ.** Mechanisms of isoflurane-mediated hyperpolarization of vascular smooth muscle in chronically hypertensive and normotensive conditions. *Anesthesiology* 94: 496–506, 2001.
32. **Vanický I, Urdziková L, Saganová K, Čížková D, Gálik J.** Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J Neurotrauma* 18: 1399–1407, 2001.



6. Šedý J, Zicha J, Kuneš J. Neurogenic pulmonary edema induced by spinal cord injury in spontaneously hypertensive and Dahl salt hypertensive rats. *Physiol Res* 2011, 60: 975–979. IF=1,653.

Neurogenic Pulmonary Edema Induced by Spinal Cord Injury in Spontaneously Hypertensive and Dahl Salt Hypertensive Rats

J. ŠEDÝ¹, J. KUNEŠ^{1,2}, J. ZICHA^{1,2}

¹Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic,

²Cardiovascular Research Center, Prague, Czech Republic

Received November 1, 2011

Accepted November 10, 2011

Summary

Neurogenic pulmonary edema (NPE), which is induced by acute spinal cord compression (SCC) under the mild (1.5 %) isoflurane anesthesia, is highly dependent on baroreflex-mediated bradycardia because a deeper (3 %) isoflurane anesthesia or atropine pretreatment completely abolished bradycardia occurrence and NPE development in rats subjected to SCC. The aim of the present study was to evaluate whether hypertension-associated impairment of baroreflex sensitivity might exert some protection against NPE development in hypertensive animals. We therefore studied SCC-induced NPE development in two forms of experimental hypertension – spontaneously hypertensive rats (SHR) and salt hypertensive Dahl rats, which were reported to have reduced baroreflex sensitivity. SCC elicited NPE in both hypertensive models irrespective of their baroreflex sensitivity. It is evident that a moderate impairment of baroreflex sensitivity, which was demonstrated in salt hypertensive Dahl rats, does not exert sufficient protective effects against NPE development.

Key words

Hypertension • Rat • Neurogenic pulmonary edema • SHR • Dahl rats

Corresponding author

J. Zicha, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic.
E-mail: zicha@biomed.cas.cz

Neurogenic pulmonary edema (NPE) is an acute life-threatening complication following spinal cord or brain injury (Fontes *et al.* 2003). It is characterized by marked pulmonary vascular congestion, extravasation of protein-

rich edema fluid and intraalveolar hemorrhage (Kondo *et al.* 2004, Kandatsu *et al.* 2005, Leal Filho *et al.* 2005a,b). Many pathophysiological mechanisms have been implicated in the development of neurogenic pulmonary edema, but the exact cascade leading to its development is still unclear (Leal Filho *et al.* 2005a,b). Both the release of vasoactive substances and a severe transient sympathetic discharge are thought to participate in this process (Taoka and Okajima 1998, Urđaneta and Layon 2003). These processes lead to the constriction of the pulmonary veins, an increase in pulmonary capillary hydrostatic pressure, damage to the alveolar wall and the leakage of fluid into the intraalveolar space (Fontes *et al.* 2003).

Our recent studies (Šedý *et al.* 2009a, 2011) confirmed the importance of major sympathetic discharge in the pathogenesis of severe NPE elicited by rapid epidural balloon compression of the thoracic spinal cord of rats, which were anesthetized by 1.5 % isoflurane (Šedý *et al.* 2007). Particular procedures preventing the rapid activation of the sympathetic nervous system (SNS) such as ganglionic blockade (Šedý *et al.* 2007, 2009a), slow gradual inflation of the balloon (Šedý *et al.* 2009b) as well as epidural anesthesia or transection of the spinal cord above the level of spinal cord compression (Šedý *et al.* 2011) prevented NPE development. Blood pressure rise occurring after spinal cord compression (SCC) is followed by a pronounced baroreflex-mediated bradycardia, which is of critical importance for NPE development. Indeed, bradycardia prevention by atropine pretreatment (Šedý *et al.* 2009a) or deeper anesthesia (3 % isoflurane) (Šedý *et al.* 2007, 2009a) abolished NPE development in Wistar rats subjected to rapid SCC.

Chronic hypertension is usually accompanied by a substantial reduction of baroreflex sensitivity as it was demonstrated in spontaneously hypertensive rats (SHR) (Andresen *et al.* 1980, Struyker-Boudier *et al.* 1982) and salt hypertensive Dahl rats (Miyjima and Bunag 1987, Andresen 1989, Brown *et al.* 1989, Nedvídek and Zicha 2000). The aim of the present study was to evaluate whether hypertension-associated impairment of baroreflex sensitivity might attenuate reflex bradycardia following SCC and thus exert some protection against NPE development in hypertensive animals.

Animals

We used 38 adult male rats (Institute of Physiology AS CR, Prague, Czech Republic) with body weights between 300-330 g. Animals were divided in the following groups: (1) Wistar rats (NPE model), (2) spontaneously hypertensive rats SHR, (3) salt-resistant Dahl rats fed a low-salt diet (DR-LS), (4) salt-resistant Dahl rats fed a high-salt diet (DR-HS), (5) salt-sensitive Dahl rats fed a low-salt diet (DS-LS), (6) salt-sensitive Dahl rats fed a high-salt diet for 4 weeks in adulthood (DS-HS). The low-salt diet contained 0.3 % NaCl, whereas there was 8 % NaCl in the high-salt diet. Animals were anesthetized with 1.5 % isoflurane in air (flow 300 ml/min) and arterial catheter for the monitoring of blood pressure and heart rate was inserted and exteriorized in the interscapular region. The animal was put in a prone position and the balloon compression of spinal cord was performed. Animals were sacrificed 10 min after lesioning, and the grade of neurogenic pulmonary edema was evaluated using macroscopic visual examination of subpleural bleeding and p-index (lung weight/body weight). Controls were healthy non-injured Wistar rats, sacrificed immediately after the induction of anesthesia. The possible role of isoflurane to induce neurogenic pulmonary edema *per se* was excluded in our previous study (Šedý *et al.* 2007). This study was performed in accordance with the European Communities Council Directive of 24th of November 1986 (86/609/EEC) regarding the use of animals in research and was approved by the Ethics Committee of the Institute of Physiology AS CR, Prague, Czech Republic.

Balloon-induced spinal cord injury

After the induction of anesthesia with 5 % isoflurane in room air (flow 300 ml/min), animals were maintained in 1.5 % isoflurane anesthesia (flow 300 ml/min) *via* a face mask throughout the operation.

This concentration of isoflurane was shown to promote the severe neurogenic pulmonary edema in normal Wistar rats subjected to balloon-induced spinal cord injury (Šedý *et al.* 2007). For spinal cord injury, we used the model of an epidural balloon compression lesion, as described in detail previously (Vanický *et al.* 2001). Briefly, under aseptic conditions, a 2 cm median skin incision at the Th10-L1 level was made. The dorsal muscles were shifted laterally, and the Th10 and Th11 spinous processes were removed. A hole was drilled into the Th10 lamina with a dental drill. Then, a 2F French Fogarty catheter (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA, USA) was filled with distilled water and connected to a 50- μ l Hamilton syringe and inserted into the dorsal epidural space 10 mm rostrally, to reach the Th8-Th9 spinal level. The balloon was rapidly inflated with 15 μ l of distilled water for 5 min, using a micromanipulator. Subsequently, the balloon was deflated and removed.

Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR)

were monitored in all animals using a PowerLab system (AD Instruments, Colorado Springs, USA). MAP (mm Hg) and HR (bpm) were monitored for 5 min before the procedure, throughout the entire procedure and for 10 min after the procedure. Baroreflex sensitivity was estimated from the changes of pulse interval (PI=60/HR) divided by MAP changes observed following SCC.

Evaluation of neurogenic pulmonary edema

The lungs were immediately removed from sacrificed animals and weighed. The level of pulmonary subpleural bleeding was evaluated macroscopically as "Absent" (no bleeding on the lung surface), "Grade I" (small bleeding areas, occupying not more than 10 % of the lung surface), "Grade II" (medium-sized bleeding areas, occupying 11-50 % of the lung surface) and "Grade III" (massive bleeding areas, occupying more than 50 % of the lung surface), as described previously (Šedý *et al.* 2007). Each lung was evaluated separately. To estimate the liquid accumulation in the lungs, both lungs were weighed, and the relative pulmonary weight was calculated as the pulmonary index (lung weight/body weight \times 100), which has been previously considered to be very sensitive to the degree of pulmonary edema (Šedý *et al.* 2007).

Statistical analysis

The pulmonary index values, mean arterial pressure values and heart rate values are reported as mean

Table 1. The impairment of lung function after spinal cord injury in Wistar rats and SHR as well as in Dahl rats anesthetized by 1.5 % isoflurane.

| Group | N | Absent (% of 2N) | Grade I (% of 2N) | Grade II (% of 2N) | Grade III (% of 2N) | Pulmonary index | Died (%) |
|------------------------|----|---------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|--------------------|-------------|
| <i>Wistar</i> | 9 | - | - | 1 (6 %) | 17 (94 %) | 0.77 ± 0.05* | 3 (33 %) |
| <i>SHR</i> | 8 | - | 4 (25 %) | 4 (25 %) | 8 (50 %) | 0.73 ± 0.05* | - |
| <i>DR-LS</i> | 4 | 2 (25 %) | 2 (25 %) | 4 (50 %) | - | 0.56 ± 0.05* | - |
| <i>DR-HS</i> | 4 | - | 2 (25 %) | 6 (75 %) | - | 0.62 ± 0.03* | - |
| <i>DS-LS</i> | 5 | - | 2 (20 %) | 6 (60 %) | 2 (20 %) | 0.69 ± 0.05* | - |
| <i>DS-HS</i> | 8 | - | 4 (25 %) | 6 (38 %) | 6 (38 %) | 0.66 ± 0.03* | - |
| <i>Intact controls</i> | 13 | 26 (100 %) | - | - | - | 0.45 ± 0.02 | - |

The absence or presence of subpleural bleeding (evaluated as Grade I-III) in different groups is given as the total number of lungs in each group (the right and left lung were considered separately) and the percentage of all lungs examined in the respective group. A significant elevation ($p < 0.05$) of the pulmonary index (mean values ± S.E.M.) in comparison with controls is indicated by an asterisk. Control animals are Wistar rats without spinal cord injury, sacrificed immediately after the onset of anesthesia. N – number of rats, 2N – number of lungs.

± S.E.M. The statistical significance between groups was compared using the non-paired Student's t-test, the differences within the groups by the paired Student's t-test.

Neurogenic pulmonary edema in Wistar rats and SHR

Balloon inflation in the spinal channel of Wistar rats caused considerable blood pressure elevation, heart rate decrease and severe neurogenic pulmonary edema in all cases. Moreover, 33 % of animals died due to pulmonary edema (Tables 1 and 2). SHR, which were characterized by higher MAP even under 1.5 % isoflurane anesthesia, responded to SCC with a comparable MAP increase and slightly enhanced HR reduction (Table 2). We did not observe impaired baroreflex sensitivity in SHR (3.74±1.05 vs. 2.42±0.72 ms/mm Hg in Wistar). Although no death occurred in SHR group, the degree of NPE (indicated by pulmonary index and the grade of subpleural bleeding) was not significantly attenuated as compared to normotensive Wistar rats (Table 1).

Neurogenic pulmonary edema in Dahl rats

High salt intake elicited hypertension in DS-HS

rats which was comparable to that seen in SHR. Salt-resistant rats were characterized by higher baroreflex sensitivity compared to salt-sensitive ones ($\Delta HR/\Delta MAP$: DR-LS 5.34±1.33, DR-HS 5.79±1.82 vs. DS-LS 2.82±0.81, DS-HS 1.24±0.26 ms/mm Hg) because their HR reduction was relatively greater compared to salt-sensitive animals (Table 2). However, SCC elicited NPE in all groups of Dahl rats irrespective of the genotype or salt intake (Table 1).

Our experiments indicate that spinal cord compression induces neurogenic pulmonary edema even in rats with genetic or salt hypertension (SHR, salt-sensitive Dahl rats). Moderate attenuation of baroreflex sensitivity, which we have confirmed in salt hypertensive Dahl rats anesthetized with 1.5 % isoflurane, had no significant protective effects against NPE development. In fact, acute spinal cord compression produced considerable reduction of heart rate in both hypertensive groups (SHR -110 bpm; DS-HS -65 bpm). It should be noted that SCC did not induce any bradycardia in Wistar rats subjected to 3 % isoflurane anesthesia or atropine pretreatment (Šedý *et al.* 2009). In both cases a pronounced blood pressure rise after acute SCC did not elicit significant heart rate reduction.

It can be concluded that neurogenic pulmonary edema induced by acute spinal cord compression can occur even in hypertensive rats because their impairment

of baroreflex sensitivity does not preclude significant bradycardia which is an essential prerequisite for this form of neurogenic pulmonary edema.

Table 2. Mean arterial pressure and heart rate: baseline values as well as the values found after particular surgical procedures and balloon compression in Wistar rats and SHR as well as in Dahl rats anesthetized by 1.5 % isoflurane.

| Mean arterial pressure (mm Hg) | | | | | | |
|---------------------------------------|---------------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | Wistar | SHR | DR-LS | DR-HS | DS-LS | DS-HS |
| <i>Baseline values</i> | 101 ± 2 | 165 ± 3 | 99 ± 8 | 115 ± 1 | 117 ± 3 | 150 ± 6 |
| <i>Skin incision</i> | 89 ± 4* | 118 ± 6* | 96 ± 4 | 103 ± 2* | 107 ± 4* | 127 ± 7* |
| | (-12%) | (-28%) | (-3%) | (-10%) | (-9%) | (-15%) |
| <i>Muscle incision</i> | 59 ± 4* | 108 ± 6* | 70 ± 7* | 87 ± 1* | 94 ± 8* | 89 ± 8* |
| | (-42%) | (-35%) | (-29%) | (-24%) | (-20%) | (-31%) |
| <i>Balloon insertion</i> | 109 ± 8 | 153 ± 11 | 98 ± 4 | 112 ± 4 | 124 ± 6 | 139 ± 7 |
| | (+8%) | (-7%) | (-1%) | (-3%) | (+6%) | (-7%) |
| <i>Balloon inflation – max</i> | 162 ± 4* | 203 ± 5* | 140 ± 5* | 151 ± 6* | 175 ± 3* | 196 ± 4* |
| | (+60%) | (+23%) | (+41%) | (+31%) | (+50%) | (+31%) |
| <i>Balloon inflation – 2 min</i> | 135 ± 5* | 188 ± 4* | 111 ± 6 | 126 ± 3* | 139 ± 5* | 157 ± 6 |
| | (+34%) | (+14%) | (+12%) | (+10%) | (+19%) | (+5%) |
| <i>Recovery</i> | 83 ± 6* | 134 ± 4* | 87 ± 5 | 97 ± 2* | 99 ± 2* | 100 ± 6* |
| | (-18%) | (-19%) | (-12%) | (-16%) | (-15%) | (-33%) |
| Heart rate (bpm) | | | | | | |
| | Wistar | SHR | DR-LS | DR-HS | DS-LS | DS-HS |
| <i>Baseline values</i> | 436 ± 16 | 358 ± 9 | 358 ± 17 | 360 ± 13 | 366 ± 12 | 366 ± 6 |
| <i>Skin incision</i> | 443 ± 9 | 326 ± 9 | 375 ± 17 | 394 ± 13 | 392 ± 17 | 373 ± 9 |
| | (+2%) | (-9%) | (+5%) | (+9%) | (+7%) | (+2%) |
| <i>Muscle incision</i> | 403 ± 9 | 302 ± 6* | 373 ± 13 | 386 ± 11 | 374 ± 14 | 357 ± 22 |
| | (-8%) | (-16%) | (+4%) | (+7%) | (+2%) | (-2%) |
| <i>Balloon insertion</i> | 395 ± 12 | 295 ± 14* | 334 ± 11 | 339 ± 16 | 311 ± 11* | 289 ± 11* |
| | (-9%) | (-18%) | (-7%) | (-6%) | (-15%) | (-21%) |
| <i>Balloon inflation – max</i> | 240 ± 19* | 182 ± 18* | 172 ± 39* | 174 ± 24* | 196 ± 10* | 223 ± 16* |
| | (-41%) | (-49%) | (-52%) | (-52%) | (-46%) | (-39%) |
| <i>Balloon inflation – 2 min</i> | 311 ± 21* | 267 ± 13* | 272 ± 15* | 277 ± 8* | 282 ± 13* | 282 ± 15* |
| | (-29%) | (-25%) | (-24%) | (-23%) | (-23%) | (-23%) |
| <i>Recovery</i> | 367 ± 15* | 254 ± 10* | 350 ± 20 | 386 ± 30 | 322 ± 7* | 308 ± 14* |
| | (-16%) | (-29%) | (-2%) | (+7%) | (-22%) | (-16%) |

Statistically significant (paired Student's t-test, $p < 0.05$) in-group differences in comparison to baseline values are marked with an asterisk. Relative changes from baseline values are shown in parentheses.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants AV0Z 50110509,

1M0510 (Ministry of Education of the Czech Republic), 305/09/0336 (Czech Science Foundation) and IAA500110902 (Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic).

References

- ANDRESEN MC: High-salt diet elevates baroreceptor pressure thresholds in normal and Dahl rats. *Circ Res* **64**: 695-702, 1989.
- ANDRESEN MC, KURAOKA S, BROWN AM: Baroreceptor function and changes in strain sensitivity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* **47**: 821-828, 1980.
- BROWN DR, MORGAN DA, PEULER JD, THOREN P: 24-hour blood pressure recordings in Dahl rats on high- and low-salt diets. *Am J Physiol* **257**: R1225-R1231, 1989.
- FONTES RB, AGUIAR PH, ZANETTI MV, ANDRADE F, MANDEL M, TEIXEIRA MJ: Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesthesiol* **15**: 144-150, 2003.
- KANDATSU N, NAN YS, FENG GG, NISHIWAKI K, HIROKAWA M, ISHIKAWA K, KOMATSU T, YOKOCHI T, SHIMADA Y, ISHIKAWA N: Opposing effects of isoflurane and sevoflurane on neurogenic pulmonary edema development in an animal model. *Anesthesiology* **102**: 1182-1189, 2005.
- KONDO H, FENG GG, NISHIWAKI K, SHIMADA Y, HIROKAWA M, KOMATSU T, YOKOCHI T, ISHIKAWA N: A role for L-glutamate ionotropic receptors in the development of rat neurogenic pulmonary edema. *Eur J Pharmacol* **499**: 257-263, 2004.
- LEAL FILHO MB, MORANDIN RC, DE ALMEIDA AR, CAMBIUCCI EC, METZE K, BORGES G, GONTIJO JA: Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* **63**: 990-996, 2005a.
- LEAL FILHO MB, MORANDIN RC, DE ALMEIDA AR, CAMBIUCCI EC, BORGES G, GONTIJO JA, METZE K: Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci Lett* **373**: 165-170, 2005b.
- MIYAJIMA E, BUÑAG RD: Exacerbation of central baroreflex impairment in Dahl rats by high-salt diets. *Am J Physiol* **252**: H402-H409, 1987.
- NEDVÍDEK J, ZICHA J: Baroreflex control of heart rate in young and adult salt hypertensive inbred Dahl rats. *Physiol Res* **49**: 323-330, 2000.
- ŠEDÝ J, URDZÍKOVÁ L, LIKAVČANOVÁ K, HEJČL A, BURIAN M, JENDELOVÁ P, ZICHA J, KUNEŠ J, SYKOVÁ E: Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma* **24**: 1487-1501, 2007.
- ŠEDÝ J, ZICHA J, KUNEŠ J, HEJČL A, SYKOVÁ E: The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord-injured rats: the effect of preventive interventions. *Am J Physiol* **297**: R1111-R1117, 2009a.
- ŠEDÝ J, ZICHA J, KUNEŠ J, JENDELOVÁ P, SYKOVÁ E: Rapid but not slow spinal cord compression elicits neurogenic pulmonary edema in the rat. *Physiol Res* **58**: 269-277, 2009b.
- ŠEDÝ J, ZICHA J, NEDVÍDKOVÁ J, KUNEŠ J: The role of sympathetic nervous system in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Appl Physiol* 2011 (in press).
- STRUYKER-BOUDIER HA, EVENWEL RT, SMITS JF, VAN ESSEN H: Baroreflex sensitivity during the development of spontaneous hypertension in rats. *Clin Sci (Lond)* **62**: 589-594, 1982.
- TAOKA Y, OKAJIMA K: Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* **56**: 341-358, 1998.
- URDANETA F, LAYON AJ: Respiratory complications in patients with traumatic cervical spine injuries: case report and review of literature. *J Clin Anesth* **15**: 398-405, 2003.
- VANICKÝ I, URDZÍKOVÁ L, SAGANOVÁ K, ČÍŽKOVÁ D, GÁLIK J: Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J Neurotrauma* **18**: 1399-1407, 2001.

7. **Šedý J**, Likavčanová K, Urdzíková L, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 2008, 70: 308–313. **IF=1,416**



Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development

J. Šedý^{a,b,c}, K. Likavčanová^a, L. Urdziková^a, J. Zicha^{d,e}, J. Kuneš^{d,e},
A. Hejčl^b, P. Jendelová^{a,b,c}, E. Syková^{a,b,c,*}

^a Institute of Experimental Medicine, ASCR, Prague, Czech Republic

^b Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

^c Department of Neuroscience, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

^d Institute of Physiology, ASCR, Prague, Czech Republic

^e Center for Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic

Received 10 May 2007; accepted 22 May 2007

Summary Neurogenic pulmonary edema is an acute life-threatening complication following central nervous system injury. The exact pathogenic mechanism leading to its development is still unclear. We introduce a new hypothesis that high levels of anesthesia might protect the organism against the development of neurogenic pulmonary edema due to a more pronounced inhibition of the hypothalamic, brainstem and spinal vasoactive sympathetic centers. On the basis of a more pronounced neuronal inhibition of the vasoactive centers, a severe sympathetic discharge does not occur and neurogenic pulmonary edema does not develop. In contrast, an insufficient anesthesia level is not able to inhibit the sympathetic nervous system during an injury of the central nervous system and thus neurogenic pulmonary edema develops. During experiments with central nervous system injury, low-anesthesia-induced neurogenic pulmonary edema might negatively influence the overall recovery of the animal. More importantly, during a neurosurgical intervention, insufficient anesthesia might similarly lead to neurogenic pulmonary edema development in operated patients. Our hypothesis indicates the necessity of precisely monitoring of the level anesthesia during experimental manipulations of the central nervous system in animals or neurosurgical interventions in humans.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Neurogenic pulmonary edema is an acute life-threatening complication following central nervous

system damage, such as spinal cord injury, sub-arachnoid hemorrhage, primary spinal cord hemorrhage, brain trauma, intracerebral bleeding, severe epileptic grand mal seizure or subdural haematoma [1,2]. The occurrence of neurogenic pulmonary edema in patients with multiple sclerosis with medullary involvement, nonhemorrhagic strokes, bulbar poliomyelitis, cerebral gas embolism, electroconvulsive therapy, intracranial

* Corresponding author. Address: Institute of Experimental Medicine, ASCR, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic. Tel.: +420 241062230; fax: +420 241062782.

E-mail address: sykova@biomed.cas.cz (E. Syková).

tumour, enterovirus encephalitis or bacterial meningitis have also been reported [1,2]. The epidemiological data on neurogenic pulmonary edema are scarce; its morbidity in patients with severe central nervous system injury has been stated between 40% and 50%, its mortality around 9% [1–3].

Neurogenic pulmonary edema usually appears within minutes to hours after a severe central nervous system insult. It is characterized by the rapid onset of dyspnea, chest pain, hemoptysis, tachypnea, tachycardia, bilateral basal pulmonary crackles, respiratory distress or failure, pulmonary edema with normal jugular venous pressure, the absence of cardiac gallop and occasionally a fever [4]. The chest radiograph shows a bilateral alveolar filling process and a normal-sized heart. In lung tissue sections, marked pulmonary vascular congestion with perivascular edema, extravasation and intraalveolar accumulation of protein-rich edema fluid and intraalveolar hemorrhage can be observed [5–9].

Many pathophysiological mechanisms have been implicated in the development of neurogenic pulmonary edema, but the exact cascade leading to its development is still unclear [5,6]. Both the release of vasoactive substances and a rapid, transient, and severe sympathetic discharge are thought to participate in this process [10,11].

Hypothesis

We hypothesize that the degree of anesthesia is inversely proportional to the level of the development of neurogenic pulmonary edema. The deeper the inhibition of the hypothalamic, brainstem and spinal vasoactive sympathetic centers (trigger zones), the smaller the extent of neurogenic pulmonary edema development because the excitation of the sympathetic nervous system is primarily responsible for the initiation and development of neurogenic pulmonary edema.

Evaluation of the hypothesis

Why is the pulmonary edema “neurogenic”

Pulmonary edema has many different causes, mostly belonging to two groups – cardiogenic and non-cardiogenic. The group of non-cardiogenic pulmonary edemas include neurogenic pulmonary edema, where an association with the central nervous system has been empirically proven and other causes, such as left heart failure or the reaction

to an exogenic toxic substance, have been excluded. The direct connection of the edema to CNS injury presumes that the neuronal damage directly or indirectly involves the pulmonary vascular bed. The most probable mechanisms of such influence are temporary neural commotion or the mechanical or electrophysiological disconnection of the central nervous system vasomotor centers, which leads to destabilization of the pulmonary autonomic nervous system. Also, the overstimulation of vasomotor centers might be involved. This statement is supported by the fact that severe central nervous system injury is always associated with significant changes in autonomic nervous system function. On the basis of our [9] and other’s previous experiments [5,6], we hypothesize that the function of specific neurons of the central nervous system must be impaired during brain or spinal cord injury to destabilize the autonomic system balance so that an imbalance of Starling forces in the pulmonary vascular bed occurs and neurogenic pulmonary edema may develop.

Why is neuronal damage involved

Numerous experiments showed that some interventions in the brain or spinal cord are able to stimulate the peripheral sympathetic nervous system and to produce changes in blood pressure (for review see [12]). These data indicate that the central nervous system sympathetic centers (including trigger zones for neurogenic pulmonary edema) might be influenced by such manipulations. It has been observed that experimental brainstem distortion or ischemia might cause changes in sympathetic vasomotor tone and an increase in blood pressure (for review see [12]). In addition, the elevation of blood pressure and the subsequent development of neurogenic pulmonary edema are prevented by the intrathecal administration of lidocaine [13].

Why is the origin of pulmonary edema in the central nervous system vasomotor nuclei

Several experimental studies indicated that the neurons responsible for severe sympathetic discharge, the most probable cause of neurogenic pulmonary edema, are located in the hypothalamic, brainstem and cervical spinal cord nuclei. These centers represent so called neurogenic pulmonary edema trigger zones [4] and their arrangement corresponds to the organotopy hypothesis (for review see [12]). The most impor-

tant vasomotor centers for its development are thought to be the A1 and A5 groups of neurons, the nuclei of the solitary tract, area postrema, medial reticulated nucleus and dorsal motor vagus nucleus in the medulla oblongata. The hypothalamic centers, i.e. paraventricular and dorsomedial nuclei, also seem to be of some importance. It should also be noted that C1 adrenaline-synthesizing neurons, definitely identified as a key blood pressure center (for review see [12]), might also be involved. Interestingly, casualties from the Vietnam war who had concomitant brain injury and cervical spinal cord injury did not develop neurogenic edema, whereas the majority of casualties with brain injury developed edema [14]. In the first group, the trigger zones were probably disconnected from the rest of the body by cervical spinal cord transection.

Experimentally, bilateral lesions of the nuclei in the medulla produce profound pulmonary and systemic hypertension and pulmonary edema [4]. The intracranial pressure, as well as toxic or ischemic injury of inhibitory neurons, leads to excessive sympathetic neuronal activity, the release of vasoactive substances such as epinephrine, norepinephrine, endothelins or neuropeptide Y and thus to a severe sympathetic discharge followed by neurogenic pulmonary edema development [4,15,16]. For example, neuropeptide Y has been found in alveolar macrophages and edema fluid in the case of neurogenic pulmonary edema, but not in hydrostatic edema or controls [15]. Alpha-adrenergic blockade (with phentolamine) and spinal cord transection at the C7 level prevent the formation of neurogenic pulmonary edema, suggesting an important role for sympathetic activation [17]. On the other hand, the inhibition of central nervous system nitric oxide has a protective role in the development of neurogenic pulmonary edema [18].

Why might an intracranial pressure increase be involved

After CNS injury, prominent hemorrhage into different compartments that correspond to the epidural, subdural, subarachnoid, and intramedullary (intracerebral) spaces and consequent damage of the blood–brain barrier occurs. In clinical situations such as subdural or subarachnoid hemorrhage, the extravasation of blood into the corresponding compartments is even the major mechanism. Walder et al. [19] showed that the amount, but not the type, of fluid injected intrathecally had a significant impact on hemodynamic

and respiratory parameters. The main disadvantage of any intracranial or intraspinal hemorrhage is the very rapid increase of intracranial pressure inside the non-expandable bony space with rather limited mechanisms to decrease it. This pressure increase leads to the compression of central nervous system tissue, resulting in a brainstem distortion or ischemia and later in cerebral herniation. It has been shown in experiments in sheep, that elevation of intracranial pressure increases pulmonary artery pressure, cardiac output, lung lymph flow, permeability-surface area product and extravascular lung water volume [20]. This seems to be due to elevated venous return due to excess sympathetic venoconstriction. In addition, when the intracranial pressure is suddenly elevated by subdural balloon inflation, neurogenic pulmonary edema develops [13].

Why is inflammation not involved

The most frequent form of neurogenic pulmonary edema, the so called “early form”, usually develops within minutes or, at most, hours after the injury [4,12,14,21]. In our experiments with spinal cord-injured rats, the full picture of neurogenic pulmonary edema developed within 8 min from the onset of our intervention on the spinal cord [9]. In contrast, the cascade of the inflammatory response, which would be able to cause such extravasation of intravascular fluid together with the damage of blood vessel walls leading to intra-alveolar hemorrhage, would most likely take a longer time, such as in acute respiratory distress syndrome [22]. It is true that some exogenic substances causing the initiation of an allergic reaction cascade might induce a rapid inflammatory reaction leading to the extravasation of fluid and the development of edema, but neurogenic pulmonary edema is not such a case. In addition, spinal cord injury does not initiate any systemic inflammatory response, as demonstrated by the lack of any damage to other organs except the lungs.

Central nervous system injury is associated with the enhanced production of free oxygen radicals, mainly originating from extravasated blood [23]. If the free oxygen radicals originating from CNS injury would be responsible for the development of neurogenic pulmonary edema, the picture of neurogenic stunned myocardium, known to be caused by free oxygen radicals [24], would probably appear concomitantly, at least in some patients. This is, however, not the case in neurogenic pulmonary edema [1].

Why the sympathetic nervous system transduces the signal

Many direct or indirect experiments have shown that the sympathetic nervous system has a major responsibility for neurogenic pulmonary edema development. It has been shown in animal models of neurogenic pulmonary edema that changes of systolic and diastolic pressure together with heart rate alterations indicate rapid systemic activation of the sympathetic nervous system, which was termed "severe sympathetic discharge" or "catecholamine storm" [1,10,11]. The most likely mechanism of the overactivation of the sympathetic nervous system (sympathoexcitatory reflexes) is the secretion of vasoactive substances from peripheral sympathetic endings, which leads to the sudden increase of systemic blood pressure, generalized peripheral vasoconstriction, a decrease in systemic vascular resistance, augmentation of central blood volume and a reduction of the compliance of the left ventricle. These changes further lead to the constriction of the pulmonary veins, an increase in pulmonary capillary hydrostatic pressure, damage to the alveolar wall and the leakage of fluid into the interstitium and intralveolar space and hemorrhage – taken together – the typical picture of neurogenic pulmonary edema.

Why is the dose of anesthesia important

Systemic anesthesia is accompanied by the inhibition of the spontaneous and evoked activity of neurons. The first phase of systemic anesthesia is characterized by the inhibition of the activity of cortical neurons, whereas deep anesthesia leads to partial inhibition of subcortical neurons, probably including the sympathetic ones. For example, when we used 1.5% isoflurane (where severe neurogenic edema develops) instead of 3% isoflurane (where no edema develops) for performing a spinal cord lesion in rats, the baseline mean arterial pressure and heart rate values were significantly increased. In addition, animals operated under lower isoflurane anesthesia doses exhibited higher "reactivity", in terms of blood pressure and heart rate changes, to all parts of the surgical intervention [9]. Leal Filho et al. [5,6] performed a similar experiment, but they used pentobarbital or a ketamine–xylazine mixture for the anesthesia of rats, in which a balloon compression lesion was made. They observed severe neurogenic pulmonary edema in pentobarbital-anesthetized rats and borderline neurogenic edema in rats anesthetized with

ketamine–xylazine. The systolic blood pressure in pentobarbital-anesthetized rats rose to twice the baseline values, whereas it was only 13% higher in ketamine–xylazine-anesthetized rats [5,6], indicating that the pentobarbital-anesthetized rats responded more reactively to spinal compression. However, these authors did not perform dose–response experiments and used only one concentration of each type of anesthesia (pentobarbital 60 mg/kg; ketamine–xylazine 75 and 10 mg/kg, respectively). We can therefore hypothesize that lower doses of ketamine–xylazine would also be able to promote severe neurogenic pulmonary edema and vice versa with pentobarbital. Extreme differences in different doses of isoflurane (3% – no edema vs. 1.5% – massive edema) in our experiments strongly support such a hypothesis [9].

Consequences of the hypothesis and discussion

Our hypothesis might help to understand the pathophysiology of neurogenic pulmonary edema. First, it highlights the crucial role of the connection between the dose of anesthesia and sympathetic excitation in the pathogenesis of neurogenic pulmonary edema. Second, it focuses on the mechanism by which the anesthesia level might influence the neurogenic pulmonary edema trigger zones in the central nervous system.

Our hypothesis indicates the necessity of maintaining precisely the same level of anesthesia during experimental central nervous system manipulations, such as the preparation of brain or spinal cord injury models [25,26], the injection of particular substances into the central nervous system parenchyma [27,28], neurosurgical manipulations such as implantation of hydrogel scaffolds [29], the preparation of animal models of epilepsy [30] and many others. For these purposes, the anesthesia should be precisely and reproducibly dosed. Although this is quite simple with volatile anesthetics such as isoflurane or sevoflurane [7,9], it might be more difficult when intravenous anesthetics such as pentobarbital or ketamine–xylazine are used [5,6]. If possible, intravenous anesthetics should be avoided in experiments where central nervous system tissue is surgically manipulated or the intracranial pressure is changed. If this is not possible, the infusion rate of the anesthetic solution should be carefully controlled.

Today, many models of neurogenic pulmonary edema have been used in experimental studies. In

these models, pulmonary edema is induced either by central nervous system injury [5,6] or the administration of an exogenic substance into the cerebrospinal fluid or directly into the nervous tissue [15,18,19]. Pulmonary edema can also be caused by the intravenous administration of epinephrine, which stimulates vasoconstriction [31,32], or bilateral cervical vagotomy, which inhibits vasodilatation [33]. Although the sympathetic nervous system is almost surely involved in the development of pulmonary edema after the administration of an exogenic substance, we propose that neurogenic pulmonary edema should always be induced by central nervous system injury in future experiments, to be sure of its "neurogenic" origin.

In clinical practice, our hypothesis might also be important. On the basis of our hypothesis and previous experimental data we propose that if, accidentally, the level of anesthesia decreases during a neurosurgical operation, neurogenic pulmonary edema might develop and this might negatively influence the course and the result of the operation. Our previous experiments [9] indicate that the reduction of the anesthesia level to where neurogenic pulmonary edema develops need not be to the arousal stage – in our experiment, all rats were anesthetized so deeply that no corneal, tail pinch or interdigital toe reflexes occurred.

In the future, clinical studies might show that during the acute phase (minutes to hours) after central nervous system injury, the maintenance of the patient under anesthesia might be helpful in preventing the development of neurogenic pulmonary edema. Today, no intervention to prevent the development of neurogenic pulmonary edema is known. For example, the blockade of the sympathetic nervous system [9] or an intrathecal injection of lidocaine [13], which are used in experiments to prevent the development of neurogenic pulmonary edema, would probably not be advisable in human medicine. In addition, any other total or partial modulation of the sympathetic nervous system which would positively influence neurogenic pulmonary edema development, might also significantly worsen the general health status of the patient.

Thus, the major message from our hypothesis to all scientists and medical doctors dealing with the neurogenic pulmonary edema is to be aware of the usage of anesthesia in their animals or patients. This hypothesis might also help us to explain the role of anesthesia in the development of neurogenic pulmonary edema in the future.

Acknowledgements

We thank Dominika Dušková for excellent technical assistance and James Dutt for critical reading of the manuscript. We acknowledge the support provided by the Grants AV0Z50390512, 1M0021-620803, GACR309/06/1246, IGA MZ 1A8697-5, AV0Z50110509, 1M0510, LC 554 and the EC FP6 project RESCUE (LSHB-CT-2005-518233).

References

- [1] Fontes RB, Aguiar PH, Zanetti MV, Andrade F, Mandel M, Teixeira MJ. Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesthesiol* 2003;15:144–50.
- [2] Dragosavac D, Falcao ALE, Araújo S, Terzi RGG. Neurogenic pulmonary edema: report of two cases. *Arq Neuropsiquiatr* 1997;55:305–9.
- [3] Antoniuk SA, Oliva AV, Bruck I, Malucelli M, Yabumoto S, Castellano JL. Sudden unexpected, unexplained death in epilepsy autopsied patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:40–5.
- [4] Baumann A, Audibert G, McDonnel J, Mertes PM. Neurogenic pulmonary edema. *Acta Anaesthesiol Scand* 2007;51:447–55.
- [5] Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, et al. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* 2005;63:990–6.
- [6] Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, et al. Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci Lett* 2005;373:165–70.
- [7] Kandatsu N, Nan YS, Feng GG, et al. Opposing effects of isoflurane and sevoflurane on neurogenic pulmonary edema development in an animal model. *Anesthesiology* 2005;102:1182–9.
- [8] Kondo H, Feng GG, Nishiwaki K, et al. A role for L-glutamate ionotropic receptors in the development of rat neurogenic pulmonary edema. *Eur J Pharmacol* 2004;499:257–63.
- [9] Šedý J, Urdzíkóvá L, Likavčanová K, et al. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma*, in press.
- [10] Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998;56:341–58.
- [11] Urdaneta F, Layon AJ. Respiratory complications in patients with traumatic cervical spine injuries: case report and review of the literature. *J Clin Anesth* 2003;15:398–405.
- [12] Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:335–46.
- [13] Hall SR, Wang L, Milne B, Ford S, Hong M. Intrathecal lidocaine prevents cardiovascular collapse and neurogenic pulmonary edema in a rat model of acute intracranial hypertension. *Anesth Analg* 2002;94:948–53.
- [14] Simmons RL, Heisterkamp III CA, Collins JA, Bredenberg CE, Mills DE, Martin Jr AM. Respiratory insufficiency in combat casualties. IV. Hypoxemia during convalescence. *Ann Surg* 1969;170:53–62.

- [15] Hamdy O, Nishiwaki K, Yajima M, et al. Presence and quantification of neuropeptide Y in pulmonary edema fluids in rats. *Exp Lung Res* 2000;26:137–47.
- [16] Poulat P, Couture R. Increased pulmonary vascular permeability and oedema induced by intrathecally injected endothelins in rat. *Eur J Pharmacol* 1998;344:251–9.
- [17] Nathan MA, Reis DJ. Fulminating arterial hypertension with pulmonary edema from release of adrenomedullary catecholamines after lesions of the anterior hypothalamus in rat. *Circ Res* 1975;37:226–35.
- [18] Hamdy O, Maekawa H, Shimada Y, Feng GG, Ishikawa N. Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats. *Crit Care Med* 2001;29:1222–8.
- [19] Walder B, Brundler MA, Totsch M, Elia N, Morel DR. Influence of the type and rate of subarachnoid fluid infusion on lethal neurogenic pulmonary edema in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 2002;14:194–203.
- [20] Peterson BT, Ross JC, Brigham KL. Effect of naloxone on the pulmonary vascular responses to graded levels of intracranial hypertension in anesthetized sheep. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:1024–9.
- [21] Seric V, Roje-Bedekovic M, Demarin V. Neurogenic pulmonary edema. *Acta Clin Croat* 2004;43:389–95.
- [22] Gattinoni L, D'Andrea L, Pelosi P, Vitale G, Pesenti A, Fumagalli R. Regional effects and mechanism of positive end-expiratory pressure in early adult respiratory distress syndrome. *JAMA* 1993;269:2122–7.
- [23] Bullock R, Fujisawa H. The role of glutamate antagonists for the treatment of CNS injury. *J Neurotrauma* 1992;9:443–73.
- [24] Jain R, Deveikis J, Thompson BG. Management of patients with stunned myocardium associated with subarachnoid hemorrhage. *Am J Neuroradiol* 2004;25:126–9.
- [25] Vanický I, Urdziková L, Saganová K, Čížková D, Gálik J. Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J Neurotrauma* 2001;18:1399–407.
- [26] Syková E, Urdziková L, Jendelová P, Burian M, Glogarová K, Hájek M. Bone marrow cells – a tool for spinal cord injury repair. *Exp Neurol* 2005;193:261–2.
- [27] Syková E, Jendelová P. Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Ann NY Acad Sci* 2005;1049:146–60.
- [28] Syková E, Jendelová P. Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener Dis* 2006;3:62–7.
- [29] Lesný P, De Croos J, Příkladný M, et al. Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. *J Chem Neuroanat* 2002;23:243–7.
- [30] Bender RA, Dube C, Baram TZ. Febrile seizures and mechanisms of epileptogenesis: insights from an animal model. *Adv Exp Med Biol*. 2004;548:213–25.
- [31] Dai S, Xue Q, Sun R, et al. Hemodynamic and nonhemodynamic mechanisms of experimental pulmonary edema in rats and the effect of anisodamine and tetramethylpyrazine. Part 1: Survival rate, pulmonary index, pathological change and pulmonary vascular permeability. *Chin Med Sci J* 1993;8:72–6.
- [32] Dai S, Su S, Cao Y, et al. Hemodynamic and nonhemodynamic mechanism of experimental pulmonary edema in rats and the effect of anisodamine and tetramethylpyrazine – electron microscopic observation and measurement of pulmonary arterial, pulmonary arterial wedge and systemic arterial pressure (Part 2). *Chin Med Sci J* 1993;8:129–33.
- [33] Iazzetti PE, Maciel RE. Effects of hyperbaric oxygen on the rat neurogenic pulmonary edema. *Braz J Med Biol Res* 1988;21:153–6.

Available online at www.sciencedirect.com



8. Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Syková E. Atropine prevents the neurogenic pulmonary edema development. Med Hypotheses 2009, 73: 42–44. IF=1,276



Contents lists available at ScienceDirect

Medical Hypotheses

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mehy

Atropine may prevent the development of neurogenic pulmonary edema

 Jiří Šedý^{a,b,c,d,*}, Josef Zicha^{c,e}, Jaroslav Kuneš^{c,e}, Eva Syková^{a,b}
^a Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

^b Center for Cell Therapy and Tissue Repair and Department of Neuroscience, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

^c Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

^d Institute of Dental Research, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital, Prague, Czech Republic

^e Center for Cardiovascular Research, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 November 2008

Accepted 4 December 2008

SUMMARY

Neurogenic pulmonary edema is an acute life-threatening complication of central nervous system injury. We introduce a hypothesis that early i.v. administration of high-dose atropine can prevent neurogenic pulmonary edema development on the basis of the prevention of baroreflex-induced bradycardia, which was recognized as a major factor in neurogenic pulmonary edema formation. To validate this hypothesis, a clinical trial in patients suffering from subarachnoid haemorrhage should be performed, with atropine administered i.v. immediately after the maintenance of the living functions, intubation and ability to monitor patient.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Neurogenic pulmonary edema (NPE) is an acute life-threatening complication occurring after central nervous system (CNS) damage, such as spinal cord injury, subarachnoid haemorrhage, spinal cord haemorrhage, brain trauma, intracerebral bleeding or subdural haematoma [1]. The epidemiological data on NPE are scarce; its morbidity in patients with severe CNS injury has been stated between 40% and 50%, its mortality around 9% [1,2].

Neurogenic pulmonary edema usually appears within minutes to hours after a severe CNS insult. It is characterized by rapid onset of dyspnoea, chest pain, haemoptysis, tachypnea, bilateral basal pulmonary crackles, respiratory distress or failure and normal jugular venous pressure [3]. In severe cases of NPE, patient often produces voluminous amounts of frothy pulmonary edema transudate, with the same levels of colloid osmotic pressure, total protein and albumin content as patient's serum [4]. The chest radiograph shows a bilateral alveolar filling process and a normal-sized heart. In lung tissue sections, marked pulmonary vascular congestion with perivascular edema, extravasation and intra-alveolar accumulation of protein-rich edema fluid and intra-alveolar haemorrhage can be observed [5,6].

Many pathophysiological mechanisms have been implicated in the development of neurogenic pulmonary edema, but the exact cascade leading to its development is still unclear [5,6]. Both the release of vasoactive substances and a severe transient sympathetic discharge are thought to participate in this process [7]. These

processes lead to the constriction of the pulmonary veins, an increase in pulmonary capillary hydrostatic pressure, damage to the alveolar wall and the leakage of fluid into the intra-alveolar space [1]. Before the onset of NPE, both rapid elevation of systemic blood pressure and pronounced heart rate decrease have been observed in different experimental models of NPE [8,9]. The altered function of certain brain vasomotor centres (trigger zones for NPE) following CNS injury leads to sympathoexcitation, systemic vasoconstriction, blood pressure elevation and baroreflex bradycardia. All these changes have been observed in our experiments on NPE [9–13] using a model of spinal cord compression elicited by balloon inflation [14].

Therapy of NPE is based upon the solving its CNS cause and symptomatic treatment. The latter consists of continuous monitoring of circulatory and respiratory parameters, elevation of the patient's head, administration of higher concentrations of inspired oxygen, positive-end expiratory pressure (PEEP) ventilation, administration of diuretics and analgetics. In the early stages, alpha-blockers and corticoids might be administered, the results are but controversial. Beta-blockers should be avoided. Generally, the treatment is currently rather supportive than causal, based upon general support of the patient to fight the edema itself. For the prognosis, first 48–72 h after the onset of NPE are crucial [3].

Hypothesis

We hypothesize that NPE development might be prevented by administration of high-dose atropine in a short time period after CNS insult. This would prevent a baroreflex-induced heart rate decrease accompanying the blood pressure elevation. The elimination of profound bradycardia might improve cardiac pumping ability

* Corresponding author. Address: Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic. Tel.: +420 241062717; fax: +420 241062782.

E-mail address: jirisedy@hotmail.com (J. Šedý).

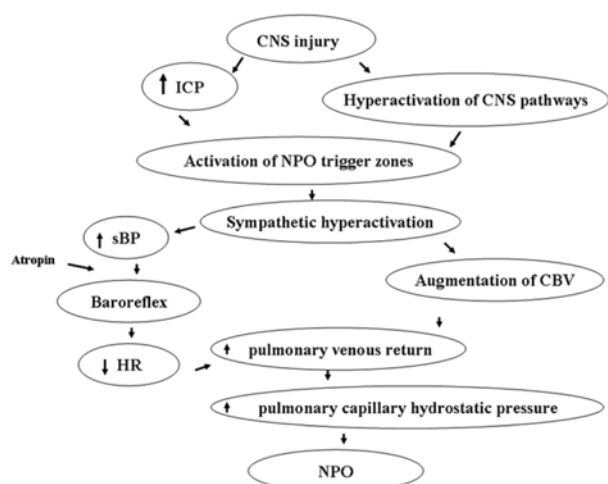


Fig. 1. Schematic drawing of the mechanism of neurogenic pulmonary edema development and atropine function. CNS – central nervous system. ICP – intracranial pressure. NPE – neurogenic pulmonary edema. sBP – systemic blood pressure. HR – heart rate. CBV – central blood volume.

which is necessary to decrease the enlarged blood volume transiently deposited in pulmonary vascular bed following generalized systemic venoconstriction induced by severe sympathetic discharge (Fig. 1).

consequences of the hypothesis and discussion

Numerous experiments indicate that the sympathetic nervous system has a major responsibility for the NPE development. It has been shown in animal models of NPE that changes of blood pressure together with heart rate decrease indicate rapid systemic activation of sympathetic nervous system, which is partially compensated by the enhancement of parasympathetic influence on circulatory homeostasis [1,3,7,9,11,12].

The overactivation of sympathetic nervous system leads to the sudden increase of systemic vascular resistance and blood pressure, generalized venoconstriction, augmentation of central blood volume and reduction in the compliance of left ventricle. These changes are further leading to the constriction of the pulmonary veins, an increase in pulmonary capillary hydrostatic pressure, damage to the alveolar wall and the leakage of fluid into the interstitium and intra-alveolar space and haemorrhage which represent a typical picture of neurogenic pulmonary edema [15]. We have demonstrated that ganglionic blockade by pentolinium prevents sympathoexcitation, blood pressure rise and NPE development in a spinal cord-injured rat [9,13].

Heart rate decrease primarily develops as a baroreflex response to systemic blood pressure elevation. In several studies, the periods of concomitant heart rate decrease and blood pressure elevation have been observed before and during NPE development [4]. In our previous studies on spinal cord injured-rats, we clearly demonstrated the dependence of the severity of NPE development on previous heart rate decrease. Whereas immediate performance of balloon-induced spinal cord injury promoted NPE with previous significant decrease in heart rate values, the same procedure performed gradually did not induce heart rate decrease or NPE development [13]. Bradycardia accompanying blood pressure elevation leads to reduced cardiac output and further elevation of pulmonary venous pressure. The subsequent elevation of pulmonary capillary hydrostatic pressure causes the extravasation of the fluid. These findings indicate that bradycardia following CNS injury might be a more important factor for NPE development than blood elevation *per se*.

Previous studies have shown that atropine administration or bilateral vagotomy might prevent the development of NPE in different animal models [3,16]. The acute administration of atropine might prevent or reverse the heart rate decrease and thus prevent the NPE development in patients with severe CNS injury. It should be noted that atropine causes the vocal cord paralysis so that this procedure should be performed in already intubated patient. However, majority of patients with severe CNS injury are intubated or tracheostomy performed. Moreover, when the severe NPE develops, the intubation is absolutely necessary *per se*.

The major reason why atropine might work better in humans than in rats is that NPE develops in minutes in small laboratory animals, whereas its development in humans frequently takes hours. The dose of the atropine is also important. Our experiences in experimental rats indicate that high atropine dose (4 mg/kg) is able to prevent NPE development, whereas its low-dose (1 mg/kg) does not.

Testing of the hypothesis

To validate this hypothesis, we propose to perform a clinical trial in patients suffering from subarachnoid haemorrhage, which is recognized as the most often cause of the NPE [17]. Atropine should be administered i.v. immediately after the maintenance of the life functions, intubation and monitoring of the patient. Atropine should be administered in a relatively high-dose (1 mg/kg) to prevent ineffective under-dosing. Besides bradycardia prevention, bronchial dilatation and pulmonary venous relaxation can be obtained following atropine administration. Atropine should be administered after intubation or tracheostomy to prevent the narrowing of the glottis which would increase the respiratory resistance, leading to the elevation of pulmonary venous pressure.

Conclusions

We introduce a hypothesis that early administration of high atropine doses can prevent the NPE development on the basis of the attenuation of heart rate decrease, which was recognized as an important factor of neurogenic pulmonary edema formation.

Acknowledgements

We thank to James Dutt for critical reading of the manuscript. We acknowledge the support provided by the Grants AV0Z50390512, 1M0021620803, GACR309/06/1246, 1A8697-5, EC FP6 project RESCUE (LSHB-CT-2005-518233), AV0Z50110509, 1M0510, 1M0538 AV0Z50390703, LC554, GACR309/09/1430, and IGA MZ 1A8697-5.

References

- [1] Fontes RB, Aguiar PH, Zanetti MV, Andrade F, Mandel M, Teixeira MJ. Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesth* 2003;15:144–50.
- [2] Antoniuik SA, Oliva AV, Bruck I, Malucelli M, Yabumoto S, Castellano JL. Sudden unexpected, unexplained death in epilepsy autopsied patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2001;59:40–5.
- [3] Baumann A, Audibert G, McDonnell J, Mertes PM. Neurogenic pulmonary edema. *Acta Anaesth Scand* 2007;51:447–55.
- [4] Fein IA, Rackow EC. Neurogenic pulmonary edema. *Chest* 1982;81:318–20.
- [5] Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, et al. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* 2005;63:990–6.
- [6] Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, et al. Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci Lett* 2005;373:165–70.
- [7] Urdaneta F, Layon AJ. Respiratory complications in patients with traumatic cervical spine injuries: case report and review of the literature. *J Clin Anesth* 2003;15:398–405.

- [8] Blessing WW, West MJ, Chalmers J. Hypertension, bradycardia, and pulmonary edema in the conscious rabbit after brainstem lesions coinciding with the A1 group of catecholamine neurons. *Circ Res* 1981;49:949–58.
- [9] Šedý J, Urdzíkova L, Hejčl A, et al. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma* 2007;24:1487–501.
- [10] Šedý J, Urdzíkova L, Likavčanová K, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neurosci Lett* 2007;423:167–71.
- [11] Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Mechanism of neurogenic pulmonary edema development. *Physiol Res* 2008;57:499–506.
- [12] Šedý J, Likavčanová K, Urdzíkova L, et al. Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 2008;70:308–13.
- [13] Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Rapid but not slow spinal cord compression elicits neurogenic pulmonary edema in the rat. *Physiol Res*, in press.
- [14] Vanický I, Urdzíkova L, Saganová K, Čížková D, Gálik J. Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J Neurotrauma* 2001;18:1399–407.
- [15] Dauber IM, Weil JV. Lung injury edema in dogs. Influence of sympathetic ablation. *J Clin Invest* 1983;72:1977–86.
- [16] Luisada AA, Contro S. Experimental pulmonary edema following rapid carotid infusion: mechanism and therapy. *Circ Res* 1953;1:179–83.
- [17] Solenski NJ, Haley Jr EC, Kassell NF, et al. Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. Participants of the multicenter cooperative aneurysm study. *Crit Care Med* 1995;23:1007–17.

9. Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Mechanism of neurogenic pulmonary edema development. *Physiol Res* 2008, 57: 499–506. **IF=1,653**

Mechanisms of Neurogenic Pulmonary Edema Development

J. ŠEDÝ^{1,2,3}, J. ZICHA^{4,5}, J. KUNEŠ^{4,5}, P. JENDELOVÁ^{1,2,3}, E. SYKOVÁ^{1,2,3}

¹Institute of Experimental Medicine, ASCR, Prague, ²Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, ³Department of Neuroscience, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, ⁴Institute of Physiology, ASCR, Prague and ⁵Center for Cardiovascular Research, Prague, Czech Republic

Received September 18, 2007

Accepted October 19, 2007

On-line November 30, 2007

Summary

Neurogenic pulmonary edema is a life-threatening complication, known for almost 100 years, but its etiopathogenesis is still not completely understood. This review summarizes current knowledge about the etiology and pathophysiology of neurogenic pulmonary edema. The roles of systemic sympathetic discharge, central nervous system trigger zones, intracranial pressure, inflammation and anesthesia in the etiopathogenesis of neurogenic pulmonary edema are considered in detail. The management of the patient and experimental models of neurogenic pulmonary edema are also discussed.

Key words

Neurogenic pulmonary edema • Rat • Model • Lung • Spinal cord injury

Corresponding author

E. Syková, Institute of Experimental Medicine ASCR, Vídeňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic. FAX: +420-241062782. E-mail: sykova@biomed.cas.cz

Introduction

Neurogenic pulmonary edema is an acute life-threatening complication of severe central nervous system injury. Although long neglected in clinical practice, it has been recognized scientifically for many years; the first report comes from Shanahan (1908). Neurogenic pulmonary edema develops rapidly following the injury and significantly complicates the overall

clinical status of the patient. It is characterized by marked pulmonary vascular congestion with perivascular edema, extravasation and intra-alveolar accumulation of protein-rich edema fluid and intraalveolar hemorrhage (Kandatsu *et al.* 2005, Leal Filho *et al.* 2005a, b). Although several pathophysiological mechanisms have been proposed, the exact cascade leading to the development of neurogenic pulmonary edema remains unclear (Leal Filho *et al.* 2005a, b). Both the release of vasoactive substances and a rapid, transient, and severe sympathetic discharge are thought to participate in this process (Urdaneta and Layon 2003). The aim of this review is to summarize the known data about the pathophysiology of neurogenic pulmonary edema and also highlight the importance of some new data, recently obtained from experimental research of neurogenic pulmonary edema.

Epidemiology of neurogenic pulmonary edema

Although epidemiological data of neurogenic pulmonary edema are scarce and often based on case reports or epidemiological studies with low numbers of enrolled patients or different diagnostic criteria, we can assume its morbidity in patients with severe central nervous system injury to be 40-50 % and its mortality around 7 % (Dragosavac *et al.* 1997, Antoniuk *et al.* 2001, Fontes *et al.* 2003). The main reason for the low number of published epidemiological studies is probably the generally poor clinical status of the patient, caused by the primary central nervous system injury, and the

necessity of rapid and often complex treatment when neurogenic pulmonary edema develops.

Management of patients with neurogenic pulmonary edema

The signs of neurogenic pulmonary edema are quite non-specific. It presents subjectively with a sudden onset of dyspnea, chest pain, worsening of expectoration, nausea, vomiting, weakness and an awareness of the patient's own life. During the clinical examination, one finds tachypnoe, tachycardia, basal bilateral pulmonary crackles, respiratory distress or failure, expectoration of sanguinolent sputum or even hemoptysis, hypoxemia, increased systemic blood pressure and decreased heart rate, consciousness disturbances, and pulmonary edema with normal jugular venous pressure (Baumann *et al.* 2007). Some authors describe a so-called "death rattle" (Fontes *et al.* 2003). Importantly, no or very few signs of inflammation are present. The most relevant imaging method is the chest X-ray examination, where diffuse hyperintensive infiltrates in both lungs are apparent. The transient increase in pulmonary artery occlusion pressure is usually not found due to the very short duration of its increase and the delay in measurement (Ganter *et al.* 2006). Although the levels of some substances such as brain natriuretic peptide, blood C-reactive protein and IL-6 are increased, unfortunately none of these can be used as a marker specific for neurogenic pulmonary edema (Baumann *et al.* 2007). Treatment is based primarily on ventilation with positive end-expiratory pressure and support of the patient's general health status. Other treatment modalities are still under debate among clinicians and scientists (Baumann *et al.* 2007).

Role of central nervous system damage or injury in the development of neurogenic pulmonary edema

Neurogenic pulmonary edema has been described following several central nervous system injuries, including spinal cord injury, subarachnoid hemorrhage, primary spinal cord hemorrhage, brain trauma, intracerebral bleeding, severe epileptic grand mal seizure or subdural hematoma (Simmons *et al.* 1969, Dragosavac *et al.* 1997, Ochiai *et al.* 2001, Macleod *et al.* 2002, Fontes *et al.* 2003, Seric *et al.* 2004, Baumann *et al.* 2007). There are two possible explanations for the association of the edema with central nervous system

injury. One presumes that the neuronal damage directly or indirectly involves the pulmonary vascular bed. The most probable mechanisms of such involvement are a temporary neural commotion or either a mechanical or electrophysiological disconnection of the central nervous system vasomotor centres, which leads to the destabilization of the pulmonary autonomic nervous system (Fontes *et al.* 2003, Baumann *et al.* 2007). The overstimulation of the vasomotor centres might be an alternative explanation. This is supported by the fact that severe central nervous system injury is always associated with significant changes in autonomic nervous system function (Leal Filho *et al.* 2005a,b, Šedý *et al.* 2007a,c). The function of specific neurons of the central nervous system must be impaired during brain or spinal cord injury to destabilize the autonomic system balance so that an imbalance of Starling forces in the pulmonary vascular bed occurs and neurogenic pulmonary edema may develop (Šedý *et al.* 2008).

Numerous experiments have shown that some interventions in the brain or spinal cord are able to stimulate the peripheral sympathetic nervous system and to produce changes in blood pressure (Guyenet 2006). These data indicate that the central nervous system sympathetic centers (including trigger zones for neurogenic pulmonary edema) might be influenced by such manipulations. It has been observed that experimental brainstem distortion or ischemia can cause changes of sympathetic vasomotor tone and an increase of blood pressure. Moreover, the elevation of blood pressure and the subsequent development of neurogenic pulmonary edema can be prevented by the intrathecal administration of lidocaine (Guyenet 2006, Hall *et al.* 2002).

Trigger zones of neurogenic pulmonary edema

Several experimental studies have indicated that the neurons responsible for the severe sympathetic discharge, the most probable cause of neurogenic pulmonary edema, are located in the hypothalamic, brainstem and cervical spinal cord nuclei. These centers represent so-called neurogenic pulmonary edema trigger zones (Baumann *et al.* 2007), and their arrangement corresponds to the organotopy hypothesis (for review see Guyenet 2006). The most important vasomotor centers for neurogenic pulmonary edema development are thought to be the A1 and A5 groups of neurons, nuclei of

the solitary tract, the area postrema, the medial reticulated nucleus and the dorsal motor vagus nucleus in the medulla oblongata. Some hypothalamic centers (paraventricular and dorsomedial nuclei) also seem to be of some importance. It can be assumed that C1 adrenaline-synthesizing neurons, definitely identified as a key blood pressure centre (for review see Guyenet 2006), are responsible for the observed sympathetic activation. Interestingly, casualties from the Vietnam war who had concomitant brain injury and cervical spinal cord injury did not develop neurogenic edema, whereas the majority of casualties with brain injury alone developed edema (Simmons *et al.* 1969). In the first group, the trigger zones were probably disconnected from the rest of the body by cervical spinal cord transection.

In experiments on rabbits, bilateral lesions of the nuclei in the medulla oblongata produced profound pulmonary and systemic hypertension and pulmonary edema (Blessing *et al.* 1981). The increased intracranial pressure as well as toxic or ischemic injury of inhibitory neurons cause excessive sympathetic neuronal activity (severe sympathetic discharge) and the release of vasoactive substances such as epinephrine, norepinephrine, endothelins or neuropeptide Y into the circulation, leading to the development of neurogenic pulmonary edema (Poulat *et al.* 1998, Hamdy *et al.* 2000, Baumann *et al.* 2007). For example, neuropeptide Y has been found in alveolar macrophages and edema fluid in the case of neurogenic pulmonary edema, but not in rats with hydrostatic edema (Hamdy *et al.* 2000). Alpha-adrenergic blockade (with phentolamine) or spinal cord transection at the C7 level prevents the formation of neurogenic pulmonary edema, suggesting an important role for sympathetic activation (Nathan *et al.* 1975). In addition, the inhibition of central nervous system nitric oxide by the injection of a competitive inhibitor of NO synthase, NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), into the cisterna magna worsened the extent of development of neurogenic pulmonary edema (Hamdy *et al.* 2001).

Neurogenic pulmonary edema develops on the basis of intracranial pressure increase

After central nervous system injury, a prominent hemorrhage into different compartments that correspond to the epidural, subdural, subarachnoid and intramedullary (intracerebral) spaces and consequent damage to the blood-brain barrier occur. In clinical situations such as

subdural or subarachnoid hemorrhage, the extravasation of blood into the corresponding compartments is the major mechanism. Walder *et al.* (2002) showed that the amount but not the type of fluid injected intrathecally had a significant impact on hemodynamic and respiratory parameters. The main disadvantage of any intracranial or intraspinal hemorrhage is the very rapid increase of intracranial pressure inside a non-expandable bony space with rather limited mechanisms to decrease it. This pressure increase leads to the compression of nervous tissue, resulting in a brainstem distortion or ischemia and later even in cerebral herniation. It has been shown in experiments on sheep that the elevation of intracranial pressure increases pulmonary artery pressure, cardiac output, lung lymph flow, permeability-surface area product and extravascular lung water volume (Peterson *et al.* 1983). This seems to be due to elevated venous return due to excess sympathetic vasoconstriction. In addition, when the intracranial pressure is suddenly elevated by subdural balloon inflation, neurogenic pulmonary edema develops (Hall *et al.* 2002).

Our experiments with a model of severe neurogenic pulmonary edema, elicited by an epidural balloon compression spinal cord lesion under lower concentrations of isoflurane anesthesia, strongly support the crucial role of intracranial hypertension in the development of neurogenic pulmonary edema (Šedý *et al.* 2007b). When the balloon is rapidly inflated in the enclosed space of the thoracic part of the spinal channel, the rapid increase in intracranial pressure apparently has an etiopathogenic role in the development of neurogenic pulmonary edema (Šedý *et al.* 2007a,c). This suggestion is supported by our recent findings that other types of thoracic spinal cord lesions such as transection, hemisection or contusion do not lead to the development of neurogenic pulmonary edema (Šedý *et al.* unpublished data).

Inflammation is not involved in the development of neurogenic pulmonary edema

The most frequent form of neurogenic pulmonary edema, the so-called “early form”, usually develops within minutes or, at the most, hours after the injury (Simmons *et al.* 1969, Seric *et al.* 2004, Guyenet 2006, Baumann *et al.* 2007). In our experiments with spinal cord-injured rats, the full picture of neurogenic pulmonary edema developed within 5-12 minutes from

the onset of our intervention on the spinal cord (Šedý *et al.* 2007a,b,c). It should be pointed out that the cascade of the inflammatory response, which would be able to cause such extravasation of intravascular fluid together with the damage of blood vessel walls leading to intraalveolar hemorrhage, will take a longer time, as in acute respiratory distress syndrome (Gattinoni *et al.* 1993). It is true that some exogenous substances causing the initiation of an allergic reaction cascade might induce a rapid inflammatory reaction leading to the extravasation of fluid and the development of edema, but neurogenic pulmonary edema is not such a case. In addition, spinal cord injury does not initiate any systemic inflammatory response, as demonstrated by the lack of any damage to other organs except the lungs (Šedý *et al.* 2007a).

Role of the sympathetic system in the development of neurogenic pulmonary edema

Many experiments have shown, directly or indirectly, that the sympathetic nervous system has a major responsibility for neurogenic pulmonary edema development. It has been shown using animal models of neurogenic pulmonary edema that changes in systolic and diastolic pressure together with heart rate alterations indicate a rapid systemic activation of the sympathetic nervous system, which has been termed “severe sympathetic discharge” or “catecholamine storm” (Taoka and Okajima 1998, Fontes *et al.* 2003, Urdaneta and Layon 2003). The catecholamine storm has its parallel in the older “blast theory” of Theodore and Robin (1976), which proposes that a neurally induced transient rise in intravascular pressure may damage the endothelium, causing protein-rich plasma to escape into the interstitial and alveolar spaces. The overactivation of the sympathetic nervous system is associated with the enhanced secretion of catecholamines from peripheral sympathetic nerve endings, which leads to peripheral vasoconstriction, an increase in systemic vascular resistance and subsequently to an increase in systemic blood pressure together with the augmentation of central blood volume and a reduction in the compliance of the left ventricle. These changes are followed by the constriction of the pulmonary veins, an increase in pulmonary capillary hydrostatic pressure, damage to the alveolar wall and the leakage of fluid into the interstitium and intraalveolar space and hemorrhage resulting in the typical picture of neurogenic pulmonary edema.

Dose-dependent influence of anesthesia on the development of neurogenic pulmonary edema

Systemic anesthesia is accompanied by the inhibition of both spontaneous and evoked activity of neurons. The first phase of systemic anesthesia is characterized by the inhibition of the activity of cortical neurons, whereas deep anesthesia leads to the partial inhibition of subcortical neurons, probably also including the sympathetic ones. When we used 1.5 % isoflurane (when severe neurogenic edema develops) instead of 3 % isoflurane (where no edema develops) for performing a spinal cord lesion in rats, the baseline mean arterial pressure and heart rate values were significantly increased. In addition, animals anesthetized with lower concentration of isoflurane anesthesia exhibited higher “cardiovascular reactivity”, in terms of blood pressure and heart rate changes, to any of the particular procedures during the whole surgery (Šedý *et al.* 2007a,c). Leal Filho *et al.* (2005a,b) performed similar experiments, but they used pentobarbital or a ketamine-xylazine mixture for anesthetising rats in which a balloon compression lesion was made. They observed severe neurogenic pulmonary edema in pentobarbital-anesthetized rats and borderline neurogenic edema in rats anesthetized with ketamine-xylazine. The systolic blood pressure in pentobarbital-anesthetized rats rose to twice the baseline values, whereas it was only 13 % higher in ketamine-xylazine rats (Leal Filho *et al.* 2005a, b), indicating that the pentobarbital-anesthetized rats responded more strongly to spinal compression. However, these authors did not perform dose-response experiments and used only one concentration of each type of anesthetic (pentobarbital 60 mg/kg; ketamine-xylazine 75 mg/kg and 10 mg/kg, respectively). Perhaps lower doses of ketamine-xylazine would be able to promote severe neurogenic pulmonary edema also. Similarly, higher doses of pentobarbital would be able to prevent its development. The extreme differences in response to different concentrations of isoflurane (3 % - no edema vs. 1.5 % - massive edema) seen in our experiments strongly support such hypothesis (Šedý *et al.* 2007a,c).

The above data indicate the necessity to maintain precisely the same level of anesthesia during experimental central nervous system manipulations, such as brain or spinal cord injury models (Vanický *et al.* 2001, Syková *et al.* 2005a), the injection of particular substances into the central nervous system parenchyma

(Syková *et al.* 2005b, 2006), neurosurgical manipulations such as the implantation of hydrogel scaffolds (Lesný *et al.* 2002), the preparation of animal models of epilepsy (Bender *et al.* 2004) and many others. For these purposes, the anesthesia should be precisely and reproducibly dosed. Although this is quite simple with volatile anesthetics such as isoflurane or sevoflurane (Kandatsu *et al.* 2005, Šedý *et al.* 2007a), it might be more difficult when intravenous anesthetics such as pentobarbital or ketamine-xylazine are used (Leal Filho *et al.* 2005a,b). If possible, intravenous anesthetics should be avoided in experiments in which central nervous system tissue is surgically manipulated or the intracranial pressure is changed. If this is not possible, the infusion rate of the anesthetic solution should be carefully controlled.

In the future, clinical studies might show that during the acute phase (minutes to hours) after central nervous system injury, the maintenance of patients under anesthesia might be helpful in preventing the development of neurogenic pulmonary edema. Presently, no intervention to prevent the development of neurogenic pulmonary edema is known. For example, the blockade of the sympathetic nervous system (Šedý *et al.* 2007a) or the intrathecal injection of lidocaine (Hall *et al.* 2002), which are used in experiments to prevent the development of neurogenic pulmonary edema, would probably not be advisable in human medicine. In addition, any other total or partial modulation of the sympathetic nervous system that would positively influence neurogenic pulmonary edema development might also significantly worsen the clinical status of the patient.

Experimental models of neurogenic pulmonary edema

Today, many models of neurogenic pulmonary edema are used in experimental studies. In these models, the pulmonary edema is induced either by central nervous system injury (Leal Filho *et al.* 2005a,b, Šedý *et al.* 2007b) or by the administration of exogenous substances into the cerebrospinal fluid or directly into the nervous tissue (Hamdy *et al.* 2000, 2001, Walder *et al.* 2002). In rats, the injection of fibrin (fibrinogen + thrombin) into the cisterna magna has been reported to induce pulmonary edema (Ishikawa *et al.* 1988). In dogs, the injection of verathrin (Lane *et al.* 1998, Maron 1985), and in sheep, the injection of aconitine (Minnear and Connell 1981), both into the cisterna magna, are also able to

induce neurogenic pulmonary edema. However, the development of neurogenic pulmonary edema in these types of models has been considered to result from a cholinergic-mediated increase in vascular permeability (Bosso *et al.* 1990) rather than from severe sympathetic discharge, the most suspected cause of neurogenic pulmonary edema development in human patients (Fontes *et al.* 2003). Another model of pulmonary edema in dogs uses an intravenous injection of oleic acid (Dauber and Weil 1983). Pulmonary edema can also be caused by the intravenous administration of epinephrine, which stimulates vasoconstriction (Dai *et al.* 1993a,b), or bilateral cervical vagotomy, which inhibits vasodilatation (Iazzetti *et al.* 1988). Although the sympathetic nervous system is almost surely involved in the development of pulmonary edema after the administration of an exogenous substance, we propose that neurogenic pulmonary edema should always be induced by central nervous system injury in future experiments in order to ensure that the edema is, in fact, “neurogenic” in origin.

Conclusions

Neurogenic pulmonary edema is a rapidly developing, life-threatening complication of central nervous system injuries. It significantly worsens the general health status of the patient. For neurogenic pulmonary edema, the rapid onset of dyspnea and several other non-specific signs are typical. Most valuable for diagnosis is a chest X-ray, while the most valuable modality in treatment is ventilation with positive-end expiratory pressure. A specific marker for neurogenic pulmonary edema has not yet been found, and a specific treatment protocol has not yet been developed. Most probably, such edema develops on the basis of a rapid systemic sympathetic discharge, leading to pulmonary vascular congestion with perivascular edema, extravasation and the intra-alveolar accumulation of protein-rich edema fluid and intraalveolar hemorrhage. There exists evidence that intracranial pressure is also of some importance. The level of anesthesia might be crucial for the extent of neurogenic pulmonary edema development. There are several models of neurogenic pulmonary edema; however, those in which neurogenic pulmonary edema is induced by central nervous system injury should be preferred.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank James Dutt for critical reading of the manuscript. We acknowledge the support provided by the grants AV0Z50390512, AV0Z50110509, 1M0538,

LC554, GACR309/06/1246, IGA MZ 1A8697-5, IGA MZ NR/8339-3, 1M0510 and the EC FP6 project RESCUE (LSHB-CT-2005-518233).

References

- ANTONIUK SA, OLIVA AV, BRUCK I, MALUCELLI M, YABUMOTO S, CASTELLANO JL: Sudden unexpected, unexplained death in epilepsy autopsied patients. *Arq Neuropsiquiatr* **59**: 40-45, 2001.
- BAUMANN A, AUDIBERT G, McDONNELL J, MERTES PM: Neurogenic pulmonary edema. *Acta Anaesthesiol Scand* **51**: 447-455, 2007.
- BENDER RA, DUBE C, BARAM TZ: Febrile seizures and mechanisms of epileptogenesis: insights from an animal model. *Adv Exp Med Biol* **548**: 213-225, 2004.
- BLESSING WW, WEST MJ, CHALMERS J: Hypertension, bradycardia, and pulmonary edema in the conscious rabbit after brainstem lesions coinciding with the A1 group of catecholamine neurons. *Circ Res* **49**: 949-958, 1981.
- BOSSO FL, LANG SA, MARON MB: Role of hemodynamics and vagus nerves in development of fibrin-induced pulmonary-edema. *J Appl Physiol* **69**: 2227-2232, 1990.
- BULLOCK R, FUJISAWA H: The role of glutamate antagonists for the treatment of CNS injury. *J Neurotrauma* **9**: 443-473, 1992.
- DAI S, XUE Q, SUN R, WANG S, LI C, WU Y, SI Q, HU S: Hemodynamic and nonhemodynamic mechanisms of experimental pulmonary edema in rats and the effect of anisodamine and tetramethylpyrazine. Part 1: Survival rate, pulmonary index, pathological change and pulmonary vascular permeability. *Chin Med Sci J* **8**: 72-76, 1993a.
- DAI S, SU S, CAO Y, SUN R, FAN Y, ZHANG H, SI Q, XUE Q: Hemodynamic and nonhemodynamic mechanism of experimental pulmonary edema in rats and the effect of anisodamine and tetramethylpyrazine--electron microscopic observation and measurement of pulmonary arterial, pulmonary arterial wedge and systemic arterial pressure (Part 2). *Chin Med Sci J* **8**: 129-133, 1993b.
- DAUBER IM, WEIL JV: Lung injury edema in dogs. Influence of sympathetic ablation. *J Clin Invest* **72**: 1977-1986, 1983.
- DRAGOSAVAC D, FALCAO ALE, ARAÚJO S, TERZI RGG: Neurogenic pulmonary edema: report of two cases. *Arq Neuropsiquiatr* **55**: 305-309, 1997.
- FONTES RB, AGUIAR PH, ZANETTI MV, ANDRADE F, MANDEL M, TEIXEIRA MJ: Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesthesiol* **15**: 144-150, 2003.
- GANTER BG, JAKOB SM, TAKALA J: Pulmonary capillary pressure. A review. *Minerva Anesthesiol* **72**: 21-36, 2006.
- GATTINONI L, D'ANDREA L, PELOSI P, VITALE G, PESENTI A, FUMAGALLI R: Regional effects and mechanism of positive end-expiratory pressure in early adult respiratory distress syndrome. *JAMA* **269**: 2122-2127, 1993.
- GUYENET PG: The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* **7**: 335-346, 2006.
- HALL SR, WANG L, MILNE B, FORD S, HONG M: Intrathecal lidocaine prevents cardiovascular collapse and neurogenic pulmonary edema in a rat model of acute intracranial hypertension. *Anesth Analg* **94**: 948-953, 2002.
- HAMDY O, NISHIWAKI K, YAJIMA M, MURAKAMI HO, MAEKAWA H, MOY RT, SHIMADA Y, HOTTA Y, ISHIKAWA N: Presence and quantification of neuropeptide Y in pulmonary edema fluids in rats. *Exp Lung Res* **26**: 137-147, 2000.
- HAMDY O, MAEKAWA H, SHIMADA Y, FENG GG, ISHIKAWA N: Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats. *Crit Care Med* **29**: 1222-1228, 2001.
- IAZZETTI PE, MACIEL RE: Effects of hyperbaric oxygen on the rat neurogenic pulmonary edema. *Braz J Med Biol Res* **21**: 153-156, 1988.

- ISHIKAWA N, KAINUMA M, FURUTA T, SATO Y: Factors influencing fibrin-induced pulmonary edema. *Jpn J Pharmacol* **46**: 255-260, 1988.
- JAIN R, DEVEIKIS J, THOMPSON BG: Management of patients with stunned myocardium associated with subarachnoid hemorrhage. *AJNR Am J Neuroradiol* **25**: 126-129, 2004.
- KANDATSU N, NAN YS, FENG GG, NISHAWAKI K, ISHIKAWA K, KOMATSU T, YOKOCHI T, SHIMADA Y, ISHIKAWA N: Opposing effects of isoflurane and sevoflurane on neurogenic pulmonary edema development in an animal model. *Anesthesiology* **102**: 1182-1189, 2005.
- LANE SM, MAENDER KC, AWENDER NE, MARON MB: Adrenal epinephrine increases alveolar liquid clearance in a canine model of neurogenic pulmonary edema, *Am J Respir Crit Care Med* **158**: 760-768, 1998.
- LEAL FILHO MB, MORANDIN RC, DE ALMEIDA AR, CAMBIUCCI EC, METZE K, BORGES G, GONTIJO JA: Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* **63**: 990-996, 2005a.
- LEAL FILHO MB, MORANDIN RC, DE ALMEIDA AR, CAMBIUCCI EC, BORGES G, GONTIJO JA, METZE K: Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci Lett* **373**: 165-170, 2005b.
- LESNÝ P, DE CROOS J, PŘÁDNÝ M, VACÍK J, MICHÁLEK J, WOERLY S, SYKOVÁ E: Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. *J Chem Neuroanat* **23**: 243-247, 2002.
- MACLEOD AD: Neurogenic pulmonary edema in palliative care. *J Pain Symptom Manage* **23**: 154-156, 2002.
- MARON MB: A canine model of neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol* **59**: 1019-1025, 1985.
- MARON MB: Analysis of airway fluid protein concentration in neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol* **62**: 470-476, 1987.
- MESQUITA MB, MORAES-SANTOS T, MORAES MF: Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats. *Neurosci Lett* **332**: 119-122, 2002.
- MINNEAR FL, CONNELL RS: Increased permeability of the capillary-alveolar barriers in neurogenic pulmonary edema (NPE). *Microvasc Res* **22**: 345-366, 1981.
- NATHAN MA, REIS DJ: Fulminating arterial hypertension with pulmonary edema from release of adrenomedullary catecholamines after lesions of the anterior hypothalamus in rat. *Cir Res* **37**: 226-235, 1975.
- OCHIAI H, YAMAKAWA Y, KUBOTA E: Deformation of the ventrolateral medulla oblongata by subarachnoid hemorrhage from ruptured vertebral artery aneurysms causes neurogenic pulmonary edema. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **41**: 529-534, 2001.
- PETERSON BT, ROSS JC, BRIGHAM KL: Effect of naloxone on the pulmonary vascular responses to graded levels of intracranial hypertension in anesthetized sheep. *Am Rev Respir Dis* **128**: 1024-1029, 1983.
- POULAT P, COUTURE R: Increased pulmonary vascular permeability and oedema induced by intrathecally injected endothelins in rat. *Eur J Pharmacol* **344**: 251-259, 1998.
- ŠEDÝ J, URDŽÍKOVÁ L, HEJČL A, BURIAN M, LIKAVČANOVÁ K, JENDELOVÁ P, ZICHA J, KUNEŠ J, SYKOVÁ E: Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma* **24**: 1487-1501, 2007a.
- ŠEDÝ J, URDŽÍKOVÁ L, LIKAVČANOVÁ K, HEJČL A, JENDELOVÁ P, SYKOVÁ E: A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neurosci Lett* **423**: 167-171, 2007b.
- ŠEDÝ J, URDŽÍKOVÁ L, HEJČL A, BURIAN M, LIKAVČANOVÁ K, JENDELOVÁ P, SYKOVÁ E: Low concentration of isoflurane causes neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Physiol Res* **56**: 34P, 2007c.
- ŠEDÝ J, LIKAVČANOVÁ K, URDŽÍKOVÁ L, ZICHA J, KUNEŠ J, HEJČL A, JENDELOVÁ P, SYKOVÁ E: Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* **70**: 307-313, 2008.
- SERIC V, ROJE-BEDEKOVIC M, DEMARIN V: Neurogenic pulmonary edema. *Acta Clin Croat* **43**: 389-395, 2004.
- SHANAHAN WT: Acute pulmonary edema as a complication of epileptic seizures. *NY Med J* **37**: 54-56, 1908.
- SIMMONS RL, HEISTERKAMP CA, COLLINS JA, BREDENBERG CE, MILLS DE, MARTIN AM: Respiratory insufficiency in combat casualties. IV. Hypoxemia during convalescence. *Ann Surg* **170**: 53-62, 1969.

-
- SMITH WS, MATTHAY MA: Evidence for a hydrostatic mechanism in human neurogenic pulmonary edema. *Chest* **111**: 1326-1333, 1997.
- SYKOVÁ E, URDŽÍKOVÁ L, JENDELOVÁ P, BURIAN M, GLOGAROVÁ K, HÁJEK M: Bone marrow cells - A tool for spinal cord injury repair. *Exp Neurol* **193**: 261-262, 2005a.
- SYKOVÁ E, JENDELOVÁ P: Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Ann N Y Acad Sci* **1049**: 146-160, 2005b.
- SYKOVÁ E, JENDELOVÁ P: Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener Dis* **3**: 62-67, 2006.
- TAOKA Y, OKAJIMA K: Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* **56**: 341-358, 1998.
- THEODORE J, ROBIN ED: Speculations on neurogenic pulmonary edema (NPE). *Am Rev Respir Dis* **113**: 405-411, 1976.
- URDANETA F, LAYON AJ: Respiratory complications in patients with traumatic cervical spine injuries: case report and review of the literature. *J Clin Anesth* **15**: 398-405, 2003.
- VANICKÝ I, URDŽÍKOVÁ L, SAGANOVÁ K, ČÍŽKOVÁ D, GÁLIK J. Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J Neurotrauma* **18**: 1399-1407, 2001.
- WALDER B, BRUNDLER MA, TOTSCH M, ELIA N, MOREL DR: Influence of the type and rate of subarachnoid fluid infusion on lethal neurogenic pulmonary edema in rats. *J Neurosurg Anesthesiol* **14**: 194-203, 2002.
-

10. Šedý J, Zicha J, Kuneš J. Pathogenetic mechanisms of neurogenic pulmonary edema. J Neurotrauma 2015, 32: 1135–1145. IF=1,653

Pathogenetic Mechanisms of Neurogenic Pulmonary Edema

Jiří Šedý, Jaroslav Kuneš, and Josef Zicha

Abstract

Neurogenic pulmonary edema (NPE) is a life-threatening complication of central nervous system (CNS) injuries. This review summarizes current knowledge about NPE etiology and pathophysiology with an emphasis on its experimental models, including our spinal cord compression model. NPE may develop as a result of activation of specific CNS trigger zones located in the brainstem, leading to a rapid sympathetic discharge, rise in systemic blood pressure, baroreflex-induced bradycardia, and enhanced venous return resulting in pulmonary vascular congestion characterized by interstitial edema, intra-alveolar accumulation of transudate, and intra-alveolar hemorrhages. The potential etiological role of neurotransmitter changes in NPE trigger zones leading to enhanced sympathetic nerve activity is discussed. Degree of anesthesia is a crucial determinant for the extent of NPE development in experimental models because of its influence on sympathetic nervous system activity. Sympathetic hyperactivity is based on the major activation of either ascending spinal pathways by spinal cord injury or NPE trigger zones by increased intracranial pressure. Attenuation of sympathetic nerve activity or abolition of reflex bradycardia completely prevent NPE development in our experimental model. Suggestions for future research into NPE pathogenesis as well as therapeutic potential of particular drugs and interventions are discussed.

Key words: baroreflex-induced bradycardia; blood pressure rise; blood volume redistribution; central nervous system; neurogenic pulmonary edema, spinal cord injury, sympathetic nervous system

Introduction

NEUROGENIC PULMONARY EDEMA (NPE) is a serious and often acute life-threatening complication of severe injuries of the central nervous system (CNS).¹ Although it was recognized many years ago, it has been rather neglected in clinical practice for a long time. Its pathophysiology and differential diagnosis are incompletely understood, and thus NPE is frequently misdiagnosed. This serious clinical problem has been overlooked by most clinicians because 1) the attention on the brain problem always supercedes the lung condition and 2) the dramatic, fulminating, and fatal outcomes often result in sudden death before any emergent intervention.^{2,3} Although epidemiological data concerning NPE are scarce and often based on studies with low numbers of enrolled patients and different diagnostic criteria, high NPE morbidity in patients with severe CNS injury is associated with 7% mortality.^{1,4,5}

Particular types of CNS injuries represent well-known causes of NPE.^{4,6} Elevated intracranial pressure (ICP) is often associated with NPE, but it is not a necessary precondition for its development.^{7,8} NPE frequently complicates subdural (SDH), subarachnoid (SAH), or intracerebral hemorrhage (ICH) and is present more often in patients with a severe hemorrhage.^{9–11} NPE has also been described after spinal cord injury (SCI) in both humans and experimental animals.^{12–15}

NPE represents a unique clinical entity. The two basic mechanisms of pulmonary edema development—increased intravascular and interstitial pressure as well as increased permeability of pulmonary capillaries—occur concomitantly in NPE, whereas they may be separated in other types of pulmonary edema.¹⁶ In NPE, CNS injury induces a major sympathetic discharge, leading to pronounced hemodynamic changes, which modify the Starling forces governing fluid movement between the capillaries and pulmonary interstitium and/or increase the permeability of pulmonary capillaries.^{17–19} NPE is typically characterized by a marked pulmonary vascular congestion with perivascular edema, fluid extravasation, and intra-alveolar accumulation of both edema transudate and erythrocytes.^{13,20,21} Figure 1 outlines the possible organ participation in NPE development as discussed in detail below.

Neurogenic Pulmonary Edema Pathogenesis

Central nervous system injury

There are two possible explanations for the association of pulmonary edema with CNS injury. First, the neuronal damage in the central regulatory centers may affect the pulmonary vascular bed through alterations of the pulmonary autonomic nervous system (ANS).^{1,7} Excessive stimulation of the vasomotor centers in the

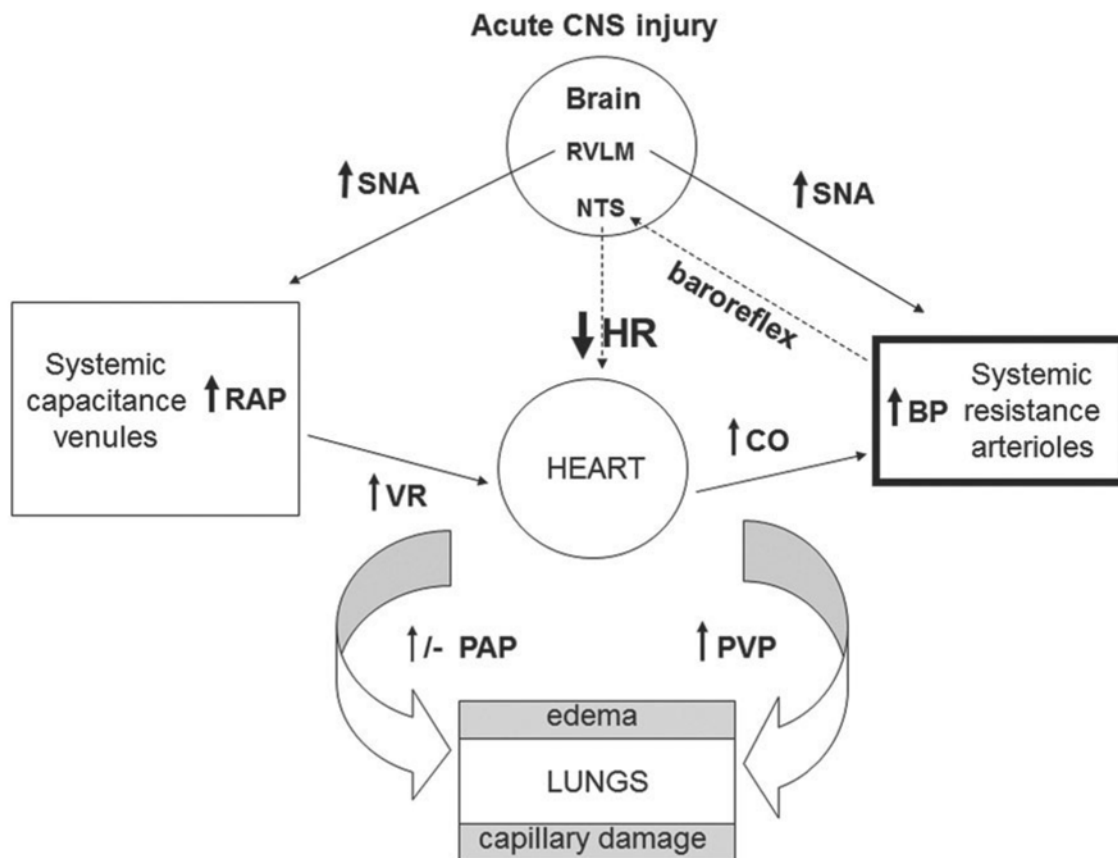


FIG. 1. Organs and pathophysiological mechanisms involved in neurogenic pulmonary edema development. BP, blood pressure; CNS, central nervous system; CO, cardiac output; HR, heart rate; NTS, nucleus tractus solitarius; PAP, pulmonary arterial pressure; PVP, pulmonary venous pressure; RAP, right atrial pressure; RVLM, rostral ventrolateral medulla; SNA, sympathetic nervous activity; VR, venous return.

CNS may represent an alternative explanation. This is supported by the fact that severe CNS injury is always associated with significant changes in ANS function.^{13,14,20,22} Activation of particular CNS neurons during brain injury or SCI leads to hyperactivation of the sympathetic nervous system (SNS). Subsequently, an imbalance of the Starling forces in the pulmonary vascular bed occurs and NPE may develop.^{23,24}

Numerous experiments have shown that particular CNS centers that regulate sympathetic outflow (including trigger zones for NPE) are able to stimulate the peripheral SNS and produce changes in blood pressure (BP), as reviewed by Guyenet.²⁵ Indeed, experimental brainstem distortion or ischemia can cause changes of sympathetic vasomotor tone and BP increase (for review, see a previous work²⁶).

Sympathetic overactivation leads to peripheral vasoconstriction, an increase in systemic vascular resistance (SVR), and, subsequently, to a rise of the systemic BP together with augmentation of central blood volume resulting from a generalized systemic venoconstriction, leading to a massive blood shift from capacitance vessels into low-resistance pulmonary circulation. These changes are followed by an increase in pulmonary capillary hydrostatic pressure (PCP), damage to the alveolar wall, and leakage of fluid and erythrocytes into the interstitium and intra-alveolar space, resulting in a typical picture of NPE.²³

Trigger zones for neurogenic pulmonary edema

Several experimental studies have indicated that neurons responsible for increased sympathetic outflow (leading to a pro-

nounced peripheral sympathetic discharge) are located in so-called NPE trigger zones.⁷ One of the earliest description of NPE trigger zones indicated that NPE developed only in those patients afflicted by poliomyelitis who had pathological changes in the region of the dorsal nucleus of vagus and medial reticular nuclei of the medulla oblongata.²⁷ Mid-collumnar decerebration does not prevent NPE induced by cerebral compression, suggesting that the hypothalamus and higher CNS centers are not involved in NPE development.^{23,28} The crucial role in the development of NPE is played by the main regulator of sympathetic activity, called rostral ventrolateral medulla (RVLM), which is also important for baroreflex function. Other important vasomotor centers for NPE development located in the medulla oblongata are thought to be the A1 and A5 groups of neurons, nuclei of the solitary tract, the area postrema, the medial reticulated nucleus, and the dorsal motor vagus nucleus. Indeed, bilateral lesions in the medulla oblongata produced profound pulmonary and systemic hypertension and pulmonary edema in rabbits.²⁹ The C1 epinephrine-synthesizing neurons, which were identified as key regulators of BP (for review, see a previous work²⁵), are responsible for the observed sympathetic activation. Of note, casualties from the Vietnam War who had concomitant brain injury and cervical SCI did not develop NPE, whereas the majority of those with a brain injury alone developed NPE.³⁰ In the first group, NPE trigger zones were probably disconnected from the rest of the body by the cervical spinal cord transection. In our experiments, NPE development was prevented when the spinal cord was transected before the spinal cord lesion, thus

disconnecting the site of the lesion from the NPE trigger zones.³¹ Similarly, NPE induced by cerebral compression in experimental animals was also prevented by the spinal transection at the C7 level, which prevented systemic vasoconstriction resulting from sympathetic hyperactivity.^{23,32}

Neurotransmitter changes in neurogenic pulmonary edema trigger zones

Little is known about changes of brain neurotransmitters during the activation of NPE trigger zones after an acute injury of brain or spinal cord. Nevertheless, fulminating hypertension and NPE were observed in rats subjected to electrolytic or chemical lesions of nucleus tractus solitarius (NTS).^{33,34} Changes in sympathetic tone and hemodynamics accompanying BP rise and pulmonary edema in these animals were remarkably similar to those we have observed after rapid spinal cord compression.^{14,31,35} Talman and colleagues microinjected kainic acid, an analog of excitatory amino acid L-glutamate, into NTS in doses that stimulate, but do not damage, NTS neurons.³⁴ Kainic acid caused a cardiovascular baroreflex blockade and a dose-dependent BP rise, which led to hemorrhagic pulmonary edema and death after termination of halothane anesthesia. Nondestructive perturbations of neurochemical transmission in the brain might explain the increased vasoconstriction caused by augmented sympathetic discharge in response to central deafferentation of baroreceptor reflexes.^{33,34} Further research was focused on C1 epinephrine-synthesizing neurons in RVLM, which play an important role in the control of sympathetic outflow and BP.³⁶ Electrical stimulation of this brain area leads to a pronounced sympathetic discharge and BP elevation, which was often followed by fatal pulmonary edema. Stimulation of this area by L-glutamate or kainic acid also caused a major BP elevation. In contrast, microinjection of inhibitory gamma-aminobutyric acid (GABA) into RVLM elicited a dose-dependent BP fall, whereas administration of bicuculline, an antagonist of GABA_A receptors, produced a marked BP elevation.³⁶

Endogenous L-glutamate may facilitate NPE development because rats pretreated with MK-801, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, or with 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, an α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid/kainic acid receptor antagonist, showed an attenuated degree of fibrin-induced NPE.³⁷ On the other hand, intravenous (i.v.) bicuculline administration to mechanically ventilated rats caused not only recurrent seizure activity, but also NPE.³⁸ Endogenous nitric oxide (NO) present in RVLM is known to attenuate sympathetic outflow, and this effect is mediated by GABA_A receptors.^{39,40} This is in good agreement with the findings that endogenous brain NO attenuated development of fibrin-induced NPE.^{41,42}

Experimental data thus suggest that enhanced activation of NMDA receptors and/or attenuated inhibition of GABA_A receptors in NPE trigger zone post-CNS injury may play an important role in facilitation of severe sympathetic discharge, which participates in the pathogenesis of NPE (Fig. 2).

Neural pathways connected with neurogenic pulmonary edema trigger zones

Both experimental and clinical research indicate that NPE is caused by a sudden hyperactivation of CNS neural pathways connected with NPE trigger zones. Typically, this situation occurs during SAH or thoracic spinal cord compression.^{1,14,22} Interestingly, hyperactivation of the spinal neural pathways underlying

NPE, caused by compression of thoracic spinal cord, does not occur in other types of SCI, such as spinal transection or hemisection, which do not elicit NPE.^{22,31,35} Moreover, only rapid, but not slow, step-wise compression of the spinal cord elicits NPE under otherwise comparable experimental conditions.³⁵ Similarly, a rapid compression of the rat brain causes a more severe NPE than its slow compression.²³ Numerous clinical reports indicate that onset of sudden severe hyperactivity of spinal or cerebral pathways clearly corresponds to the time when NPE is elicited (for review, see previous works^{1,7}). Thus, both the extent as well as the rate of spinal neural hyperactivation might be crucial for development of NPE. Cerebral compression in rats elicited systemic arterial hypertension and pulmonary edema and these responses were prevented by spinal cord transection at the C7 level, but not by decerebration carried out as brainstem transection at the mid-collicular level, interrupting the CNS sympathetic outflow to systemic and pulmonary blood vessels.^{23,32} Such a high spinal cord transection also interrupts the ascending spinal pathways necessary for activation of the central mechanisms mediating enhanced sympathetic outflow, which is essential for NPE development.

Moreover, NPE did not develop when the balloon compression was performed at the lumbar, instead of lower, thoracic spinal cord level. This is probably owing to a failure to activate ascending spinal pathways connected with NPE trigger zones.³¹ Experimental data show that anesthesia, applied epidurally or intrathecally into or above the lesion site, could prevent the NPE development—this can be documented by the abolition of hemodynamic changes associated with NPE development.^{23,43,44}

Increased intracranial pressure in neurogenic pulmonary edema development

Epidemiological data show that NPE develops mainly under conditions of severe CNS injuries, especially in patients having increased ICP. Experimental data indicate that a sudden increase of ICP leads to an increase in systemic BP and decrease of heart rate (HR), called the Cushing reflex or Cushing response.^{6,45} The primary aim of this reflex mechanism is to secure brain perfusion under conditions of elevated ICP by means of increased BP, but it might concomitantly result in pulmonary edema. Indeed, NPE develops if ICP is suddenly elevated by subdural balloon inflation.⁴³

Severe CNS injury may cause a major hemorrhage into different CNS compartments, such as the epidural, subdural, subarachnoid and intramedullary (intracerebral) spaces, and a consequent damage of the blood-brain barrier. In anesthetized rats, rapid extradural compression of the brain caused systemic hypertension as well as pulmonary arterial and venous pressure elevation, which was followed by severe NPE.^{23,24} In clinical situations, such as SDH or SAH, extravasation of blood into their respective compartment is a major cause of NPE. Walder and colleagues showed that the amount, but not the type, of fluid injected intrathecally had a significant impact on hemodynamic and respiratory parameters.⁴⁶ The main problem of any intracranial or -spinal hemorrhage is the very rapid increase of ICP inside a nonexpandable bony space with limited mechanisms to accommodate it. This pressure increase leads to compression of nervous tissue, resulting in brainstem distortion or ischemia and later even in cerebral herniation. Experiments in sheep indicated that elevation of ICP increased pulmonary artery pressure (PAP), cardiac output, lung lymph flow, permeability-surface area product, and extravascular lung water volume.⁴⁷ This seems to be caused by the elevated venous return resulting from the excess sympathetic venoconstriction.⁴⁷

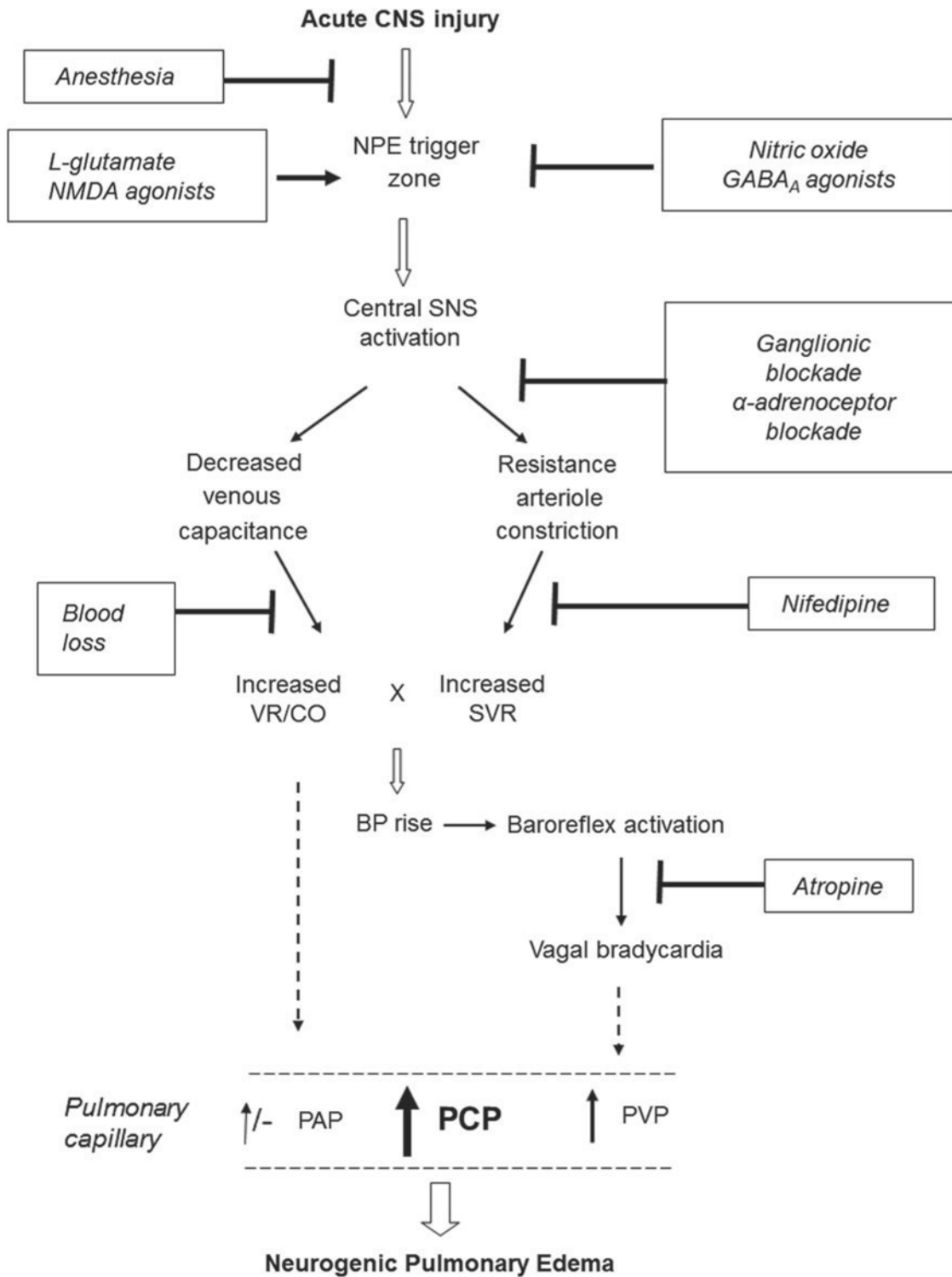


FIG. 2. Sequences of hemodynamic events leading to NPE development. Rectangles with horizontal bars depicts the sites where the experimental interventions influence NPE development. CNS, central nervous system; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NPE, neurogenic pulmonary edema; GABA, gamma-aminobutyric acid; SNS, sympathetic nervous system; VR, venous return; CO, cardiac output; SVR, systemic vascular resistance; BP, blood pressure; PAP, pulmonary arterial pressure; PCP, pulmonary capillary pressure; PVP, pulmonary venous pressure.

Injection of whole blood or albumin solution into cisterna magna results in the death of approximately 50% of animals owing to the complications stemming from development of NPE. However, the amount of injected fluid was more important than its composition.^{48,49} Thompson and Malina demonstrated

that the pathogenetic role of increased ICP in development of NPE is mediated by pressure-induced ischemia of medulla oblongata and deformation of brainstem.⁵⁰ These changes lead to BP increase and concomitant baroreflex-induced bradycardia.^{31,44,50}

Hemodynamic changes during neurogenic pulmonary edema development

Experiments in laboratory animals demonstrate that NPE development is preceded by a significant increase in systemic BP. Blessing and colleagues reported that BP increased by 40 mm Hg in rabbits with experimentally induced NPE using bilateral destruction of A1 neurons in medulla oblongata.²⁹ Reis and colleagues induced NPE by lesioning the nucleus tractus solitarius in rats, which resulted in the left heart failure during fulminant hypertension.⁵¹ Moreover, Blessing and colleagues demonstrated a significant increase in SVR during NPE development.²⁹ Similar hemodynamic changes have been observed after balloon-induced compression of thoracic spinal cord; they were accompanied by a marked baroreflex-induced decrease in HR.^{14,31} The sequence of hemodynamic events occurring during NPE development (Fig. 2) is further discussed in this review.

Capillary hydrostatic pressure in neurogenic pulmonary edema development

Autonomic visceromotor innervation of the pulmonary vascular bed influences the tone of local blood vessels. Changes in efferent autonomic activity may thus increase or decrease PCP.⁵² There is no doubt that changes in capillary hydrostatic pressure are involved in NPE development. Enhanced sympathetic activity causes an increase in systemic BP and venous return, leading to augmentation of central blood volume. Both right ventricular pressure and pulmonary venous pressure (PVP) are several fold increased in rats subjected to rapid cerebral compression.²⁴ The heart, mainly the left ventricle, does not have a capacity to compensate for such rapidly increased demands, so that the amount of pumped blood by the left heart decreases and blood congestion in the pulmonary vascular bed develops. Indeed, cardiac output was decreased in a cerebral compression model of NPE. Moreover, blood accumulation was demonstrated in the lungs during NPE development, and there was a correlation between PVP and degree of NPE.^{53,54} Such changes lead to an enormous increase in the PCP and extreme imbalance of the Starling forces influencing the capillary walls. Thus, elevation of PVP above 25 mm Hg causes transudation of fluid from pulmonary capillaries, whereas its elevation above 50 mm Hg leads to a damage, or even disruption, of capillary and alveolar walls and development of alveolar hemorrhage.²⁴ This is often a concomitant sign of NPE and could be the cause of a patient's death. The role of sympathetic system-activated pulmonary vasoconstriction leading to an additional increase in capillary hydrostatic pressure could not be underestimated as well.⁵⁵ The hypothesis of a crucial role of the increased PCP is supported by the finding of a low edema fluid-to-serum protein ratio in subjects with NPE.⁵⁶

Role of the sympathetic nervous system

Hyperactivity of the SNS in the course of NPE development is revealed by many experiments using different animal models. Using a monkey model, Novitzky and colleagues showed that NPE induced by intracranial balloon inflation could be prevented by surgical sympathectomy.⁵⁷ A pharmacological correlate is represented by administration of the ganglionic blocker, pentolinium, which prevented development of NPE in rats with brain or spinal cord compression.^{14,24} Changes in BP, together with HR, alterations in rats and animal NPE models indicate a rapid systemic activation of the SNS, which has been termed "severe sympathetic discharge" or "catecholamine storm."^{1,58,59} Rapid

i.v. infusion of high norepinephrine doses to intact rats lead to the same hemorrhagic pulmonary changes as a rapid cerebral compression.^{23,24,60} On the other hand, direct deleterious effects of high doses of vasoconstrictors on the pulmonary vascular bed (namely, its endothelium) can be hardly considered as a probable cause of NPE development, because the administration of these vasoconstrictors into heart-lung preparations had no significant effect on lung weight.^{24,61} Overactivation of the SNS is associated with enhanced release of catecholamines from peripheral sympathetic nerve endings. Several classes of sympathoadrenergic blocking agents, which target the SNS at the level of ganglion, neuron, transmitter, or receptor site, are effective in preventing NPE development.^{14,23,24,31,48,49,62,63}

Regional sympathectomy has revealed that the splanchnic vascular bed is the major site of systemic vasoconstriction, although the direct sympathetic pulmonary vasoconstriction also partly contributes to NPE development.^{64,65} Recordings of pulmonary and aortic blood flows, both in intact animals and in heart bypass preparations, have demonstrated vasoconstriction of resistance and capacitance vessels in the systemic and pulmonary circulation. Shift of blood volume from the systemic vascular beds to the lungs and/or reduction in cardiac output might be the main causes of pressure and volume loading in the pulmonary circulation.⁵⁴ Systemic vasoconstriction is pivotal in NPE development, whereas adrenal glands, bronchial circulation, and pulmonary innervation play a small role.⁶⁶

Role of parasympathetic nervous system

The vagus nerve represents the only source of parasympathetic nerve fibers in lungs. Stimulation of the vagus nerve or acetylcholine (ACh) administration induces lung vasodilatation and decreases PCP. ACh administration has two effects: 1) binding to muscarinic receptors of pulmonary vascular smooth muscle causing its relaxation and 2) inhibition of catecholamine secretion.⁵² On the other hand, secretion of vasoactive intestinal polypeptide from vagus nerve represents an alternative, noncholinergic, non-adrenergic vasodilatory pathway.⁶⁷

There was a considerable debate on the causal role of acute reflex bradycardia consequent to vagal activation in the pathogenesis of NPE elicited by cerebral compression. Several investigators suggested its high importance because bilateral vagotomy or atropine administration prevented or reduced both bradycardia and NPE development.^{68,69} On the other hand, Chen and coworkers abolished bradycardia, but not NPE, development by these two interventions.^{23,24} This research group therefore concluded that reflex bradycardia is an accessory, but not an essential, factor in NPE pathogenesis.

Experiments in rabbits and rats have shown that bilateral vagotomy is able to induce pulmonary edema on its own. Although this type of edema has been attributed to analogous pathophysiological mechanisms such as NPE (i.e., an excessive activation of the SNS), the following experiments did not support this theory.⁷⁰ First, bilateral vagotomy below the site where the recurrent laryngeal nerve emerges from the main trunk does not cause pulmonary edema. It shows that this type of edema is likely caused by airway obstruction resulting from laryngeal as well as bronchial spasms. Obstruction of airways leads to increased air suction and storage of air in affected lung segments. On the other hand, the negative interstitial pressure in the nonaffected lung segments is caused by the reflex mechanism, leading to increase in transcapillary filtration pressure in overfilled parts of lungs, thus causing pulmonary edema. Second, bilateral vagotomy below the site where the recurrent

laryngeal nerve emerges from the main trunk did not have a stimulating or protective effect on NPE development.⁴⁸ Importantly, Blanco and colleagues observed that pretreatment with a high dose of the NO synthase inhibitor, N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 40 mg/kg) reduced pulmonary edema and prolonged survival in vagotomized rats.⁷¹ This is in contrast with L-NAME-induced potentiation of NPE elicited by spinal cord compression.⁴⁴

Role of nitric oxide

NO produced in lungs participates in pulmonary vasodilatation.⁷² Importantly, NO plays a critical role in ventilation-perfusion coupling in the lungs.⁷¹ Moreover, i.v. administration of L-arginine prevents the increase of pulmonary capillary permeability in high-altitude pulmonary edema.⁷³ Several experimental studies disclosed that NO has a partial protective effect on NPE development because it attenuates sympathetic vasoconstriction and consequent baroreflex-induced bradycardia post-CNS injury. Moreover, large doses of vasodilators, such as sodium nitroprusside or nitroglycerine, are capable of reducing NPE.⁷⁴

NPE development may also be inhibited by NO produced in the medulla oblongata.^{41,75} Injection of NO synthase (NOS) inhibitors into the close proximity of NPE trigger zones or into the cerebrospinal fluid (CSF) enhanced sympathetic tone, probably by a modulation of the arterial baroreflex.^{76–78} Hamdy and colleagues reported that the inhibition of NO synthesis in the CNS by injecting L-NAME into the cisterna magna worsened NPE development.⁴¹ On the other hand, oxidant scavengers are ineffective in the prevention of NPE, thus indicating that oxidative stress is not involved in NPE development.⁷⁴

Neuropeptide Y and endogenous opioids

An increase in ICP as well as toxic or ischemic injury of inhibitory neurons may cause severe sympathetic discharge and release of vasoactive substances, such as epinephrine, norepinephrine, endothelins, or neuropeptide Y into the circulation, leading thus to the development of NPE.^{7,79,80} Neuropeptide Y is a neurohumoral agent that has antinociceptive, anxiolytic, and orexigenic effects.⁸¹ Moreover, neuropeptide Y, which is secreted by sympathetic nerves together with norepinephrine, causes dilatation of pulmonary vessels and increases pulmonary vascular permeability. Experimentally administered neuropeptide Y causes pulmonary edema, mainly resulting from an increase in vascular permeability, because this peptide acts directly on the endothelial cells.⁸² Neuropeptide Y has been found in alveolar macrophages and edema fluid in rats with NPE, but not in rats with hydrostatic edema.⁷⁹ Moreover, neuropeptide Y is able to affect the degree of anesthesia at the level of the CNS through its action on GABAergic, glutamatergic, as well as dopaminergic neurotransmission.⁸² Moreover, different types of anesthetics, such as pentobarbital or ketamine, are able to influence the receptors for neuropeptide Y and thus to modulate the development of NPE.^{13,20}

Endogenous opioids, such as endorphins, are responsible for the increase in pulmonary vascular permeability and the amount of extravascular fluid in the lungs of animals with elevated ICP.⁴⁷ These findings are based on the observed protective role of naloxone (opioid receptor antagonist) during NPE development.

Experimental models of neurogenic pulmonary edema

At present, multiple models of NPE are used in experimental studies.^{7,48} In these models, NPE is induced either by CNS injury or

by the administration of exogenous substances into the CSF or directly into the nervous tissue.^{13,20,22,41,46,79} In rats, injection of fibrin (fibrinogen + thrombin) into the cisterna magna has been reported to induce pulmonary edema.⁸³ In dogs, injection of verathrin, and in sheep, injection of aconitine into the cisterna magna, are also able to induce NPE.^{49,84,85} However, development of NPE in these models has been considered to result from a cholinergic-mediated increase in vascular permeability, rather than from a severe sympathetic discharge.⁸⁶ Another model of pulmonary edema in dogs used the i.v. injection of oleic acid.⁵⁵ Pulmonary edema can also be caused by i.v. administration of epinephrine, which stimulates vasoconstriction, or bilateral cervical vagotomy, which inhibits vasodilatation.^{87–89} Thus, the SNS is almost certainly involved in development of pulmonary edema after administration of exogenous substances mentioned above. However, it is our opinion that, in future experiments, NPE should always be induced by CNS injury in order to ensure that the edema is really “neurogenic” in origin.

Spinal Cord Compression and Neurogenic Pulmonary Edema

Novel tool for the study of neurogenic pulmonary edema

Recently, we have developed a new model of NPE using spinal-cord-injured Wistar male rats.²² In this model, pulmonary edema is elicited by spinal cord lesion after epidural thoracic balloon compression.^{22,90} When this procedure is performed under a low concentration of isoflurane (1.5%) in inhaled air, the spinal cord compression induces severe interstitial and intra-alveolar NPE with a significantly increased thickness of the alveolar walls and massive pulmonary hemorrhage, resulting in death of 33% of animals. In contrast, epidural balloon compression of the thoracic spinal cord performed under deeper anesthesia (3% isoflurane) does not promote NPE development. Thus, rats subjected to surgery and spinal cord compression under 3% isoflurane anesthesia could be used as a control group because, under these circumstances, the SCI did not cause NPE.²² The model is helpful in normal as well as in genetically modified rats, such as rat models of hypertension.⁹¹

Influence of anesthesia on the development of neurogenic pulmonary edema

Systemic anesthesia results in inhibition of both spontaneous and evoked activity of neurons. The first phase of systemic anesthesia is characterized by inhibition of activity of cortical neurons, whereas deeper anesthesia leads to a partial inhibition of activity of subcortical neurons, including the sympathetic ones. Baseline BP and HR values were increased more when we used a lower concentration of isoflurane. The anesthesia with 1.5% isoflurane permits development of severe NPE, whereas a higher concentration (3% isoflurane) prevents NPE development when performing a spinal cord lesion in rats. In addition, animals anesthetized with a lower concentration of isoflurane exhibited higher “cardiovascular reactivity” (in terms of BP and HR changes) to any of the particular procedures during the whole surgery.^{14,22,92} Leal Filho and colleagues performed similar experiments, but they used pentobarbital or ketamine-xylazine for anesthetizing rats in which a balloon compression lesion was made.^{13,20} They observed severe NPE in pentobarbital-anesthetized rats and borderline NPE in rats anesthetized with ketamine-xylazine. Systolic BP in pentobarbital-anesthetized rats rose to twice the baseline values, whereas it was elevated by only 13% in rats anesthetized with ketamine-xylazine,

indicating that pentobarbital-anesthetized rats responded more strongly to spinal cord compression.^{13,20} The differences between particular anesthetics correspond to their impact on sympathetic nervous activity because ketamine-xylazine, but not pentobarbital, lowered sympathetic nerve activity in the rat.⁹³ The contrasting responses, which were observed at the particular concentrations of isoflurane (3% [no edema] vs. 1.5% [massive edema]), were also strongly dependent on their different impact on sympathetic nerve activity.^{14,22} The underlying mechanism of isoflurane action might be the blunting of transmission of noxious inputs from the spinal cord to the thalamus.⁹⁴

Role of sympathetic nervous system in neurogenic pulmonary edema development

In rats subjected to the compression of thoracic spinal cord, NPE is induced mainly by hyperactivation of ascending spinal cord pathways as well as by increased ICP.^{14,31} BP elevation and subsequent development of NPE can be prevented by an epidural administration of trimecaine.³¹ This intervention, which blocks the ascending as well as descending spinal neural pathways, was, in our NPE model, used to examine the effect of complete abolition of activation of spinal afferent pathways and NPE trigger zones. Our results indicated that epidural anesthesia prevented the massive sympathetic discharge and subsequent BP rise induced by rapid compression of the lower thoracic spinal cord. Moreover, compression of the thoracic spinal cord in epidurally anesthetized rats was not accompanied by skeletal muscle contractions typical for the NPE model, indirectly supporting the efficiency of epidural anesthesia.^{14,22,31}

The crucial role of high epinephrine levels in development of pulmonary edema has already been shown by Maron and coworkers, who observed a dose-dependent relationship between increased epinephrine plasma levels and reduced alveolar fluid clearance, thus leading to pulmonary edema.^{84,95} To examine the role of catecholamines in NPE development, we measured serum levels of epinephrine and norepinephrine before, during, and after balloon compression of the spinal cord.³¹ In animals with severe NPE, which were anesthetized with 1.5% isoflurane, we observed a 64-fold increase in serum norepinephrine concentration and 18-fold increase in serum epinephrine concentration immediately after balloon compression. In rats anesthetized with 3% isoflurane, which did not develop NPE, there was a 40-fold increase in serum norepinephrine level, but no significant change in epinephrine level, after balloon compression of the spinal cord. It is important to note that levels of catecholamines were not increased during spinal cord compression in animals pretreated with upper thoracic epidural anesthesia.³¹ Circulating catecholamine levels returned to control values at the end of the recovery period (i.e., 15 min after spinal cord compression).

Pretreatment of rats with a competitive inhibitor of α_1 -adrenergic receptors (prazosin) or α_2 -adrenergic receptors (yohimbine) prevented NPE development in our spinal cord compression model.^{22,31} Both α -adrenergic blockers lowered BP before spinal cord compression, attenuated BP rise after spinal cord compression, and prevented baroreflex-induced bradycardia. The similar effects of α_1 - and α_2 -adrenoceptor blockade are not surprising if we consider that an extensive catecholamine stimulation of these two different types of α -adrenoceptors always leads to a major augmentation of calcium entry through L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels (L-VDCC).⁹⁶⁻⁹⁸ The fundamental importance of calcium entry through L-VDCC to smooth muscle of resistance vessels in systemic circulation for development of NPE was demonstrated in our experiments, in which

pretreatment of rats with nifedipine (dihydropyridine antagonist of L-VDCC) attenuated BP rise induced by spinal cord compression and completely prevented the above-mentioned bradycardia and NPE development.³¹ Our results are also fully compatible with the effects of isoflurane-induced hyperpolarization of smooth muscle cells in small resistance arterioles or capacitance venules of the rat.^{99,100} *In situ* superfusion of small mesenteric vessels with isoflurane caused membrane hyperpolarization through both neural (inhibition of sympathetic neural input) and non-neural mechanisms (inhibition of cyclic adenosine monophosphate pathways and K^+ channels). This hyperpolarization helps to close L-VDCC opened by sympathetic stimulation. Thus, the deeper anesthesia (3% isoflurane) prevented NPE development by attenuation of both BP rise (by decreasing arterial constriction) and venous return (by increasing splanchnic capacity to deposit circulating blood).

Role of blood volume redistribution in neurogenic pulmonary edema development

Hoff and colleagues designed an NPE model in which BP was maintained at normal values by blood loss during the critical period for NPE development.¹⁰¹ Despite this intervention, NPE was developed, but to a lesser extent. Redistribution of blood from splanchnic regions to the pulmonary circulation resulting from the pronounced sympathetic vasoconstriction seems to be responsible for the increase of venous return and augmentation of central blood volume in NPE. To evaluate the contribution of this hemodynamic factor to the pathogenesis of NPE, we induced a moderate blood loss by withdrawing 15% of the volume of circulating blood before spinal cord compression. This intervention successfully prevented NPE development, indicating the importance of augmented venous return and overfilling of pulmonary circulation during the early stages of NPE development, when baroreflex-induced reduction of HR impairs actual cardiac performance.^{31,44} It should also be considered that a higher degree of isoflurane anesthesia (3% instead of 1.5%) may be associated with a greater blood deposition in splanchnic vessels, because isoflurane was reported to attenuate the tone of mesenteric capacitance veins.⁹⁹ Thus, the protective effects exerted by moderate blood loss on NPE development might share similar mechanisms with those of a more intensive isoflurane anesthesia.

Role of nitric oxide in neurogenic pulmonary edema development

We have shown that pretreating rats with NOS inhibitor L-NAME (30 mg/kg i.v.) enhanced NPE severity, leading to the death of 83% of animals within 10 min post-SCI.⁴⁴ Moreover, pretreatment of NO-deficient rats with either ganglionic blocker pentolinium (to reduce BP rise) or muscarinic ACh receptor blocker atropine (to lessen HR decrease) prevented or attenuated NPE development in these animals.⁴⁴ Worsening of NPE development in NO-deficient rats was not associated with a greater BP rise, but there was a more pronounced HR reduction after balloon inflation.⁴⁴ Mechanisms underlying the adverse effects of NO deficiency on NPE development are probably based upon the lack of NO-mediated counteraction of the sympathetic vasoconstriction, so that a more profound baroreflex-induced bradycardia occurs.^{77,78,102} This baroreflex-induced bradycardia was present in NO-deficient rats developing NPE under 1.5% isoflurane anesthesia, whereas no significant HR changes were observed after balloon compression of the spinal cord in NO-deficient rats anesthetized with 3% isoflurane, which did not develop NPE.⁴⁴ Bradycardia has been recognized as an important factor contributing to NPE development also in animals

with intracranial hypertension (for a review, see a previous work⁴⁸). Nevertheless, bradycardia occurring after NTS lesions appears to be initiated by the respective centers in the medulla oblongata, rather than by the peripheral baroreceptor feedback.^{33,34,103}

Role of baroreflex in neurogenic pulmonary edema development

Blocking the parasympathetic nervous system with atropine is known to prevent HR responses elicited by sudden BP changes.¹⁰⁴ As far as the old discussion (Campbell and colleagues vs. Chen and colleagues) on prevention of NPE development by atropine administration is concerned, our data support the beneficial effects of parasympathetic blockade.^{24,44,69} Atropine pretreatment interrupted the cholinergic mechanisms mediating baroreflex-induced bradycardia elicited after spinal cord compression. Baroreflex-induced bradycardia is characteristic for our NPE model elicited by SCI under light (1.5%) isoflurane anesthesia. Pretreatment of rats with a high dose (but not with a low dose) of atropine 2 min pre-SCI prevented HR decrease, but not BP elevation, occurring early after balloon inflation.⁴⁴ BP rise elicited by spinal cord compression in atropine-pretreated rats tended to be of a higher magnitude than in nonpretreated rats. After atropine pretreatment, spinal cord compression did not elicit the characteristic bradycardia, but rather a moderate tachycardia. This pharmacological intervention completely prevented development of NPE in control rats and considerably attenuated NPE development in NO-deficient rats.⁴⁴ On the basis of these results, we hypothesize that NPE development might be prevented by administration of high-dose atropine in a short time period post-CNS insult in human medicine.¹⁰⁵

The Future

Experimental studies concerning the role of anesthesia in NPE development indicate the necessity to maintain precisely the same level of anesthesia during neurosurgical operations.¹⁰⁶ The same is true for experimental CNS manipulations, such as brain injury or SCI, injection of stem cells into CNS parenchyma, neurosurgical manipulations, such as implantation of hydrogel scaffolds, preparation of animal models of epilepsy, and many others.^{90,107–112}

In these situations, level of anesthesia should be precisely and reproducibly dosed and monitored. Although this is quite simple with volatile anesthetics, such as sevoflurane or isoflurane, it might be more difficult when other anesthetics, such as pentobarbital or ketamine-xylazine, are used.^{13,14,20,21}

The ideal drug for anesthesia used in animals or patients with CNS injury should attenuate sympathetic nerve activity in order to prevent constriction of arterial and venous vascular beds, which leads to high BP and augmented venous return. Such a drug should also substantially decrease baroreflex efficiency to avoid the bradycardia elicited by a possible BP rise. One of the promising drugs is propofol, which not only lowers sympathetic vasoconstriction, but also attenuates efficiency of arterial baroreflex.^{113–115} Propofol, which also lowers sympathetic nerve activity in humans, is already a well-established drug in clinical practice, including treatment of patients with CNS injury.¹¹⁶

In the future, clinical studies might show that, during the acute phase (minutes to hours) after a CNS injury, maintenance of patients under anesthesia might be helpful in preventing development of NPE. Actually, an active intervention aimed at preventing development of NPE remains to be established. Blockade of the SNS used in experiments to prevent development of NPE would not be

advisable in human medicine because any modulation of the SNS that would attenuate NPE occurrence might concomitantly worsen the clinical status of the patient.¹⁴ However, stellate ganglionic blockade or epidural block with lidocaine or trimecaine may have some clinical potential.^{31,43,117,118}

NPE characteristically appears within minutes to hours after a severe CNS insult. Occasionally, a more rapid or delayed onset can also be observed.^{6,119} When the experimental studies in laboratory animals and clinical data on the time interval between CNS injury and NPE onset are compared, it is evident that NPE development is more rapid in experimental animals, in which it occurs within a few minutes.^{13,14,20,22,23,32,35,44,120} This time discrepancy offers an important therapeutic possibility in human medicine—treatment options partially successful in experimental animals might be more successful in human patients owing to a considerably longer time lag window available for treatment.

Conclusions

NPE is a rapidly developing, life-threatening complication of CNS injuries and disturbances. It significantly worsens the general health status of the patient. For NPE, rapid onset of dyspnea and several other nonspecific symptoms are typical. Very likely, the edema develops on the basis of a rapid systemic sympathetic discharge, leading to pronounced pulmonary vascular congestion with perivascular edema, extravasation of fluid, and intra-alveolar accumulation of transudate associated with intra-alveolar hemorrhage (Figs. 1 and 2). Sympathetic overactivity might result from the associated hyperactivation of ascending spinal pathways or activation of NPE trigger zones by increased ICP. The resulting BP rise and consequent baroreflex-induced bradycardia seem to play an essential role in the pathogenesis of NPE. The depth of anesthesia is crucial for the extent of NPE development in experimental models because it modulates the activity of the SNS.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Jan Kucera, MD, PhD, Prof. Bohuslav Ošťádal, MD, DSc, Dr. Ivana Vaněčková, PhD, and Dr. Michal Behuliak, PhD, for critical reading of the manuscript. The authors acknowledge the support provided by grants GAČR 304/12/0259 and RVO:67985823.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Fontes, R.B., Aguiar, P.H., Zanetti, M.V., Andrade, F., Mandel, M., and Teixeira, M.J. (2003). Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 15, 144–150.
2. Simon, R.P. (1993). Neurogenic pulmonary edema. *Neurol. Clin.* 11, 309–323.
3. Su, C.F., Kao, S.J., and Chen, H.I. (2012). Acute respiratory distress syndrome and lung injury: pathogenetic mechanism and therapeutic implication. *World J. Crit. Care Med.* 1, 50–60.
4. Dragosavac, D., Falcao, A.L.E., Araújo, S., and Terzi, R.G.G. (1997). Neurogenic pulmonary edema: report of two cases. *Arq. Neuropsiquiatr.* 55, 305–309.
5. Antoniuk, S.A., Oliva, A.V., Bruck, I., Malucelli, M., Yabumoto, S., and Castellano, J.L. (2001). Sudden unexpected, unexplained death in epilepsy autopsied patients. *Arq. Neuropsiquiatr.* 59, 40–45.
6. Simmons, R.L., Martin, A.M., Jr., Heisterkamp, C.A. 3rd, and Ducker, T.B. (1969). Respiratory insufficiency in combat casualties. II. Pulmonary edema following head injury. *Ann. Surg.* 170, 39–44.

7. Baumann, A., Audibert, G., McDonnell, J., and Mertes, P.M. (2007). Neurogenic pulmonary edema. *Acta Anaest. Scand.* 51, 447–455.
8. Popp, A.J., Shah, D.M., Berman, R.A., Paloski, W.H., Newell, J.C., Cooper, J.A., Rahm, R.L., Gottlieb, M.E., Bourke, R.S., and Malik, A.B. (1982). Delayed pulmonary dysfunction in head-injured patients. *J. Neurosurg.* 57, 784–790.
9. Weir, B.K. (1978). Pulmonary edema following fatal aneurysm rupture. *J. Neurosurg.* 49, 502–507.
10. Muroi, C., Keller, M., Pangalu, A., Fortunati, M., Yonekawa, Y., and Keller, E. (2008). Neurogenic pulmonary edema in patients with subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 20, 188–192.
11. Friedman, J.A., Pichelmann, M.A., Piegras, D.G., McIver, J.I., Toussaint, L.G. 3rd, McClelland, R.L., Nichols, D.A., Meyer, F.B., Atkinson, J.L., and Wijdicks, E.F. (2003). Pulmonary complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 52, 1025–1031.
12. Poe, R.H., Reisman, J.L., and Rodenhouse, T.G. (1978). Pulmonary edema in cervical spinal cord injury. *J. Trauma* 18, 71–73.
13. Leal Filho, M.B., Morandin, R.C., de Almeida, A.R., Cambiucci, E.C., Metzke, K., Borges, G., and Gontijo, J.A. (2005). Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq. Neuropsiquiatr.* 63, 990–996.
14. Šedý, J., Urdzíkova, L., Hejčl, A., Burian, M., Likavčanová, K., Jendelová, P., Zicha, J., Kuneš, J., and Syková, E. (2007). Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J. Neurotrauma* 24, 1487–1501.
15. Schmitt, J., Midha, M., and McKenzie, N. (1991). Medical complications of spinal cord disease. *Neurol. Clin.* 9, 779–795.
16. Colice, G.L. (1984). Neurogenic pulmonary edema. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130, 941–948.
17. Theodore J., and Robin, E.D. (1975). Pathogenesis of neurogenic pulmonary oedema. *Lancet* 2, 749–751.
18. Su, I.C., Li, C.H., Wang, K.C., Lai, D.M., Huang, S.J., Shieh, J.S., and Tu, Y.K. (2009). Prediction of early secondary complications in patients with spontaneous subarachnoid hemorrhage based on accelerated sympathovagal ratios. *Acta Neurochir. (Wien)* 151, 1631–1637.
19. Seric, V., Roje-Bedekovic, M., and Demarin, V. (2004). Neurogenic pulmonary edema. *Acta Clin. Croat.* 43, 389–395.
20. Leal Filho, M.B., Morandin, R.C., de Almeida, A.R., Cambiucci, E.C., Borges, G., Gontijo, J.A., and Metzke, K. (2005). Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci. Lett.* 373, 165–170.
21. Kandatsu, N., Nan, Y.S., Feng, G.G., Nishiwaki, K., Ishikawa, K., Komatsu, T., Yokochi, T., Shimada, Y., and Ishikawa, N. (2005). Opposing effects of isoflurane and sevoflurane on neurogenic pulmonary edema development in an animal model. *Anesthesiology* 102, 1182–1189.
22. Šedý, J., Urdzíkova, L., Likavčanová, K., Hejčl, A., Jendelová, P., and Syková, E. (2007). A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neurosci. Lett.* 423, 167–171.
23. Chen, H.I., Sun, S.C., and Chai, C.Y. (1973). Pulmonary edema and hemorrhage resulting from cerebral compression. *Am. J. Physiol.* 224, 223–229.
24. Chen, H.I., and Chai, C.Y. (1974). Pulmonary edema and hemorrhage as a consequence of systemic vasoconstriction. *Am. J. Physiol.* 227, 144–151.
25. Guyenet, P.G. (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 335–346.
26. Kamel, M.H., Mansour, N.H., Mascott, C., Aquilina, K., and Young, S. (2006). Compression of the rostral ventrolateral medulla by a vagal schwannoma of the cerebellomedullary cistern presenting with refractory neurogenic hypertension: case report. *Neurosurgery* 58, E1212.
27. Baker, A.B. (1957). Poliomyelitis. 16. A study of pulmonary edema. *Neurology* 7, 743–751.
28. Chen, H.I. (2009). From neurogenic pulmonary edema to fat embolism syndrome: a brief review of experimental and clinical investigations of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Chin. J. Physiol.* 52, 339–344.
29. Blessing, W.W., West, M.J., and Chalmers, J. (1981). Hypertension, bradycardia, and pulmonary edema in the conscious rabbit after brainstem lesions coinciding with the A1 group of catecholamine neurons. *Circ. Res.* 49, 949–958.
30. Simmons, R.L., Heisterkamp, C.A. 3rd, Collins, J.A., Bredenberg, C.E., Mills, D.E., and Martin, A.M., Jr. (1969). Respiratory insufficiency in combat casualties. IV. Hypoxemia during convalescence. *Ann. Surg.* 170, 53–62.
31. Šedý, J., Zicha, J., Nedvídková, J., and Kuneš, J. (2012). The role of sympathetic nervous system in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J. Appl. Physiol.* 112, 1–8.
32. Chen, H.I. (1995). Hemodynamic mechanisms of neurogenic pulmonary edema. *Biol. Signals* 4, 186–192.
33. Doba, N., and Reis, D.J. (1973). Acute fulminating neurogenic hypertension produced by brainstem lesions in the rat. *Circ. Res.* 32, 584–593.
34. Talman, W.T., Perrone, M.H., and Reis, D.J. (1981). Acute hypertension after the local injection of kainic acid into the nucleus tractus solitarii of rats. *Circ. Res.* 48, 292–298.
35. Šedý, J., Zicha, J., Kuneš, J., Jendelová, P., and Syková, E. (2009). Rapid but not slow spinal cord compression elicits neurogenic pulmonary edema in the rat. *Physiol. Res.* 58, 269–277.
36. Ross, C.A., Ruggiero, D.A., Park, D.H., Joh, T.H., Sved, A.F., Fernandez-Pardal, J., Saavedra, J.M., and Reis, D.J. (1984). Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenergic neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. *J. Neurosci.* 4, 474–494.
37. Kondo, H., Feng, G.G., Nishiwaki, K., Shimada, Y., Hirokawa, M., Komatsu, T., Yokochi, T., and Ishikawa, N. (2004). A role for L-glutamate ionotropic receptors in the development of rat neurogenic pulmonary edema. *Eur. J. Pharmacol.* 499, 257–263.
38. Herbst, C., Tippler, B., Shams, H., and Simmet, T. (1995). A role for endothelin in bicuculline-induced neurogenic pulmonary oedema in rats. *Br. J. Pharmacol.* 115, 753–760.
39. Kishi, T., Hirooka, Y., Sakai, K., Shigematsu, H., Shimokawa, H., and Takeshita, A. (2001). Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release. *Hypertension* 38, 896–901.
40. Shinohara, K., Hirooka, Y., Kishi, T., and Sunagawa, K. (2012). Reduction of nitric oxide-mediated γ -amino butyric acid release in rostral ventrolateral medulla is involved in superoxide-induced sympathoexcitation of hypertensive rats. *Circ. J.* 76, 2814–2821.
41. Hamdy, O., Maekawa, H., Shimada, Y., Feng, G.G., and Ishikawa, N. (2001). Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats. *Crit. Care Med.* 29, 1222–1228.
42. Feng, G.G., Nishiwaki, K., Kondo, H., Shimada, Y., and Ishikawa, N. (2002). Inhibition of fibrin-induced neurogenic pulmonary edema by previous unilateral left-vagotomy correlates with increased levels of brain nitric oxide synthase in the nucleus tractus solitarii of rats. *Auton. Neurosci.* 102, 1–7.
43. Hall, S.R., Wang, L., Milne, B., Ford, S., and Hong, M. (2002). Intrathecal lidocaine prevents cardiovascular collapse and neurogenic pulmonary edema in a rat model of acute intracranial hypertension. *Anesth. Analg.* 94, 948–953.
44. Šedý, J., Zicha, J., Kuneš, J., Hejčl, A., and Syková, E. (2009). The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats: the effect of preventive interventions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1111–R1117.
45. Cushing, H. (1901). Concerning a definitive regulatory mechanism of the vasomotor center which controls blood pressure during cerebral compression. *Bull. John Hopkins Hosp.* 12, 290–292.
46. Walder, B., Brundler, M.A., Totsch, M., Elia, N., and Morel, D.R. (2002). Influence of the type and rate of subarachnoid fluid infusion on lethal neurogenic pulmonary edema in rats. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* 14, 194–203.
47. Peterson, B.T., Ross, J.C., and Brigham, K.L. (1983). Effect of naloxone on the pulmonary vascular responses to graded levels of intracranial hypertension in anesthetized sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 1024–1029.
48. Malik, A.B. (1985). Mechanisms of neurogenic pulmonary edema. *Circ. Res.* 57, 1–18.
49. Maron, M.B. (1985). A canine model of neurogenic pulmonary edema. *J. Appl. Physiol.* 59, 1019–1025.
50. Thompson, R.K., and Malina, S. (1959). Dynamic axial brainstem distortion as a mechanism explaining the cardiorespiratory

- changes in increased intracranial pressure. *J. Neurosurg.* 16, 664–675.
51. Reis, D.J., Doba, N., Snyder, D.W., and Nathan, M.A. (1977). Brain lesions and hypertension: chronic lability and elevation of arterial pressure produced by electrolytic lesions and 6-hydroxydopamine treatment of nucleus tractus solitarii (NTS) in rats and cats. *Prog. Brain Res.* 47, 169–188.
 52. Bergofsky, E.H. (1980). Humoral control of the pulmonary circulation. *Annu. Rev. Physiol.* 42, 221–233.
 53. Chen, H.I., Shih, W.J., and Chen, T.P. (1976). A scintiphographic study of pulmonary edema and hemorrhage induced by cerebral compression and norepinephrine. *Chin. J. Physiol.* 22, 65–72.
 54. Chen, H.I., Liao, T.F., Kuo, L., and Ho, S.T. (1980). Centrogenic pulmonary hemorrhagic edema induced by cerebral compression in rats: mechanism of pressure and volume loading in the pulmonary circulation. *Circ. Res.* 47, 366–373.
 55. Dauber, I.M., and Weil, J.V. (1983). Lung injury edema in dogs. Influence of sympathetic ablation. *J. Clin. Invest.* 72, 1977–1986.
 56. Smith, W.S., and Matthay, M.A. (1997). Evidence for a hydrostatic mechanism in human neurogenic pulmonary edema. *Chest* 111, 1326–1333.
 57. Novitzky, D., Wicomb, W.N., Cooper, D.K., Rose, A.G., and Reichart, B. (1986). Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon. *Ann. Thorac. Surg.* 41, 520–524.
 58. Taoka, Y., and Okajima, K. (1998). Spinal cord injury in the rat. *Prog. Neurobiol.* 56, 341–358.
 59. Urdaneta, F., and Layon, A.J. (2003). Respiratory complications in patients with traumatic cervical spine injuries: case report and review of the literature. *J. Clin. Anesth.* 15, 398–405.
 60. Rassler, B., Barth, W., and Zimmer, H.G. (2001). Transient pleural effusion in norepinephrine-stimulated rats. *Basic Res. Cardiol.* 96, 471–477.
 61. Theodore, J., and Robin, E.D. (1976). Speculations on neurogenic pulmonary edema. *Am. Rev. Respir. Dis.* 113, 405–411.
 62. Hakim, T.S., van der Zee, H., and Malik, A.B. (1979). Effects of sympathetic nerve stimulation on lung fluid and protein exchange. *J. Appl. Physiol.* 47, 1025–1030.
 63. Maron, M.B., and Dawson, C.A. (1980). Pulmonary venoconstriction caused by elevated cerebrospinal fluid pressure in the dog. *J. Appl. Physiol.* 49, 73–78.
 64. Chen, H.I., Yeh, F.C., Kuo, L., and Tzeng, D. (1979). Effects of regional sympathetomy on the cardiovascular responses and pulmonary changes induced by cerebral compression. *Chin. J. Physiol.* 23, 7–16.
 65. Chen, H.I., Lin, J.D., and Liao, T.F. (1981). Participation of regional sympathetic outflows in the centrogenic pulmonary pathology. *Am. J. Physiol.* 240, H109–H115.
 66. Chen, H.I., Wang, Y.C., and Chai, C.Y. (1987). The Cushing responses in the systemic and pulmonary circulation: the role of adrenal glands, bronchial circulation and pulmonary innervation. *Chin. J. Physiol.* 30, 87–103.
 67. Fischer, A., and Hoffmann, B. (1996). Nitric oxide synthase in neurons and nerve fibers of lower airways and in vagal sensory ganglia of man. Correlation with neuropeptides. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 209–216.
 68. Campbell, G.S., and Visscher, M.B. (1949). Pulmonary lesions in guinea pigs with increased intracranial pressure, and the effect of bilateral cervical vagotomy. *Am. J. Physiol.* 157, 130–134.
 69. Campbell, G.S., Haddy, F.J., Adams, W.L., and Visscher, M.B. (1949). Circulatory changes and pulmonary lesions in dogs following increased intracranial pressure, and the effect of atropine upon such changes. *Am. J. Physiol.* 158, 96–102.
 70. Schmitt, G.H., and Meyers, F.H. (1957). Characterization of the acute pulmonary edema that follows vagal section in the guinea pig. *Am. J. Physiol.* 190, 89–92.
 71. Blanco, E., Martins-Pinge, M., Oliveira-Sales, E., and Busnardo, C. (2011). Involvement of nitric oxide pathways in neurogenic pulmonary edema induced by vagotomy. *Clinics* 66, 1061–1066.
 72. Sakakibara, H., Hashiba, Y., Taki, K., Kawanishi, M., Shimada, Y., and Ishikawa, N. (1992). Effects of sympathetic nerve stimulation on lung vascular permeability in the rat. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145, 685–692.
 73. Anand, I.S., Prasad, B.A.K., Chugh, S.S., Rao, K.R.M., Cornfield, D.N., Milla, C.E., Singh, N., Singh, S., and Selvamurthy, W. (1998). Effects of inhaled nitric oxide and oxygen in high-altitude pulmonary edema. *Circulation* 98, 2441–2445.
 74. Chen, H.I., Huang, H.S., Yang, J.G., and Wang, D. (1992). Vasodilator and oxidant scavenger in the neurogenic pulmonary edema induced by cerebral compression. *Chin. J. Physiol.* 35, 123–131.
 75. Kondo, K., Yokoyama, A., Nakajima, M., and Kohno, N. (2004). Pulmonary edema in pheochromocytoma. *Intern. Med.* 43, 1101–1102.
 76. Hironaga, K., Hirooka, Y., Matsuo, I., Shihara, M., Tagawa, T., Harasawa, Y., and Takeshita, A. (1998). Effect of endogenous nitric oxide in the brain stem on the rapid adaptation of baroreflex. *Hypertension* 31, 27–31.
 77. Zanzinger, J., Czachurski, J., and Seller, H. (1995). Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in RVLM by nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 268, R958–R962.
 78. Matsumura, K., Tsuchihashi, T., and Fujishima, M. (1998). Central nitric oxide attenuates the baroreceptor reflex in conscious rabbits. *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 43, R1142–R1149.
 79. Hamdy, O., Nishiwaki, K., Yajima, M., Murakami, H.O., Maekawa, H., Moy, R.T., Shimada, Y., Hotta, Y., and Ishikawa, N. (2000). Presence and quantification of neuropeptide Y in pulmonary edema fluids in rats. *Exp. Lung Res.* 26, 137–147.
 80. Poulat, P., and Couture, R. (1998). Increased pulmonary vascular permeability and oedema induced by intrathecally injected endothelins in rat. *Eur. J. Pharmacol.* 344, 251–259.
 81. Naveilhan, P., Canals, J.M., Arenas, E., and Ernfors, P. (2001). Distinct roles of the Y1 and Y2 receptors on neuropeptide Y-induced sensitization to sedation. *J. Neurochem.* 78, 1201–1207.
 82. Naveilhan, P., Canals, J.M., Valjakka, A., Vartiainen, J., Arenas, E., and Ernfors, P. (2001). Neuropeptide Y alters sedation through a hypothalamic Y1-mediated mechanism. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2241–2246.
 83. Ishikawa, N., Kainuma, M., Furuta, T., and Sato, Y. (1988). Factors influencing fibrin-induced pulmonary edema. *Jpn. J. Pharmacol.* 46, 255–260.
 84. Lane, S.M., Maender, K.C., Awender, N.E., and Maron, M.B. (1998). Adrenal epinephrine increases alveolar liquid clearance in a canine model of neurogenic pulmonary edema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, 760–768.
 85. Minnear, F.L., and Connell, R.S. (1982). Prevention of aconitine-induced neurogenic pulmonary edema (NPE) with hypovolemia or methylprednisolone. *J. Trauma* 22, 121–128.
 86. Bosso, F.J., Lang, S.A., and Maron, M.B. (1990). Role of hemodynamics and vagus nerves in development of fibrin-induced pulmonary edema. *J. Appl. Physiol.* 69, 2227–2232.
 87. Dai, S., Xue, Q., Sun, R., Wang, S., Li, C., Wu, Y., Si, Q., and Hu, S. (1993). Hemodynamic and nonhemodynamic mechanisms of experimental pulmonary edema in rats and the effect of anisodamine and tetramethylpyrazine. Part I: survival rate, pulmonary index, pathological change and pulmonary vascular permeability. *Chin. Med. Sci. J.* 8, 72–76.
 88. Dai, S., Su, S., Cao, Y., Sun, R., Fan, Y., Zhang, H., Si, Q., and Xue, Q. (1993). Hemodynamic and nonhemodynamic mechanism of experimental pulmonary edema in rats and the effect of anisodamine and tetramethylpyrazine—electron microscopic observation and measurement of pulmonary arterial, pulmonary arterial wedge and systemic arterial pressure (part 2). *Chin. Med. Sci. J.* 8, 129–133.
 89. Iazzetti, P.E., and Maciel, R.E. (1988). Effects of hyperbaric oxygen on the rat neurogenic pulmonary edema. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 153–156.
 90. Vanický, I., Urdžiková, L., Saganová, K., Čížková, D., and Gálik, J. (2001). Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J. Neurotrauma* 18, 1399–1407.
 91. Šedý, J., Zicha, J., and Kuneš, J. (2011). Neurogenic pulmonary edema induced by spinal cord injury in spontaneously hypertensive and Dahl salt hypertensive rats. *Physiol. Res.* 60, 975–979.
 92. Šedý, J., Likavčanová, K., Urdžiková, L., Zicha, J., Kuneš, J., Hejčl, A., Jendelová, P., and Syková, E. (2008). Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med. Hypotheses* 70, 308–313.
 93. Bencze, M., Behuliak, M., and Zicha, J. (2013). The impact of four different classes of anesthetics on the mechanisms of blood pressure regulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol. Res.* 62, 471–478.

94. Antognini, J.F., Carstens, E., Sudo M., and Sudo, S. (2000). Isoflurane depresses electroencephalographic and medial thalamic responses to noxious stimulation via an indirect spinal action. *Anesth. Analg.* 91, 1282–1288.
95. Maron, M.B. (1998). Dose-response relationship between plasma epinephrine concentration and alveolar liquid clearance in dogs. *J. Appl. Physiol.* 85, 1702–1707.
96. Kazda, S., Garthoff, B., and Knorr, A. (1985). Interference of the calcium antagonist nisoldipine with the abnormal response of vessels from hypertensive rats to alpha-adrenergic stimulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7, Suppl. 6, S61–S65.
97. Nelson, M.T., Standen, N.B., Brayden, J.E., and Worley, J.F. 3rd. (1988). Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. *Nature* 336, 382–385.
98. Paulis, L., Líšková, S., Pintérová, M., Dobešová, Z., Kuneš, J., and Zicha, J. (2007). Nifedipine-sensitive noradrenergic vasoconstriction is enhanced in spontaneously hypertensive rats: the influence of chronic captopril treatment. *Acta Physiol. (Oxford)* 191, 255–266.
99. Stekiel, T.A., Kokita, N., Yamazaki, M., Bosnjak, Z.J., Kampine, J.P., and Stekiel, W.J. (1999). Effect of isoflurane on in situ smooth muscle transmembrane potential in spontaneous hypertension. *Anesthesiology* 91, 207–214.
100. Stekiel, T.A., Contney, S.J., Kokita, N., Bosnjak, Z.J., Kampine, J.P., and Stekiel, W.J. (2001). Mechanisms of isoflurane-mediated hyperpolarization of vascular smooth muscle in chronically hypertensive and normotensive conditions. *Anesthesiology* 94, 496–506.
101. Hoff, J.T., Nishimura, M., Garcia-Uria, J., and Miranda, S. (1981). Experimental neurogenic pulmonary edema. Part I: the role of systemic hypertension. *J. Neurosurg.* 54, 627–631.
102. Zanzinger, J., Czachurski, J., and Seller, H. (1994). Inhibition of sympathetic vasoconstriction is a major principle of vasodilation by nitric oxide in vivo. *Circ. Res.* 75, 1073–1077.
103. Chen, H.L., and Chai, C.Y. (1976). Integration of the cardiovagal mechanism in the medulla oblongata of the cat. *Am. J. Physiol.* 231, 454–461.
104. Pickering, T.G., Gribbin, B., Petersen, E.S., Cunningham, D.J., and Sleight, P. (1972). Effects of autonomic blockade on the baroreflex in man at rest and during exercise. *Circ. Res.* 30, 177–185.
105. Šedý, J., Zicha, J., Kuneš, J., and Syková, E. (2009). Atropine prevents the neurogenic pulmonary edema development. *Med. Hypotheses* 73, 42–44.
106. Kim, J.E., Park, J.H., Lee, S.H., and Lee, Y. (2012). Neurogenic pulmonary edema following intracranial coil embolization for subarachnoid hemorrhage—a case report. *Korean J. Anesthesiol.* 63, 368–371.
107. Syková, E., Urdziková, L., Jendelová, P., Burian, M., Glogarová, K., and Hájek, M. (2005). Bone marrow cells—a tool for spinal cord injury repair. *Exp. Neurol.* 193, 261–262.
108. Šedý, J., Urdziková, L., Jendelová, P., and Syková, E. (2008). Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 550–580.
109. Syková, E., and Jendelová, P. (2005). Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1049, 146–160.
110. Syková, E., and Jendelová, P. (2006). Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener. Dis.* 3, 62–67.
111. Lesný, P., De Croos, J., Přádný, M., Vacík, J., Michálek, J., Woerly, S., and Syková, E. (2002). Polymer hydrogels usable for nervous tissue repair. *J. Chem. Neuroanat.* 23, 243–247.
112. Bender, R.A., Dube, C., and Baram, T.Z. (2004). Febrile seizures and mechanisms of epileptogenesis: insights from an animal model. *Adv. Exp. Med. Biol.* 548, 213–225.
113. Hoka, S., Yamaura, K., Takenaka, T., and Takahashi, S. (1998). Propofol-induced increase in vascular capacitance is due to inhibition of sympathetic vasoconstrictive activity. *Anesthesiology* 89, 1495–1500.
114. Akine, A., Suzuka, H., Hayashida, Y., and Kato Y. (2001). Effects of ketamine and propofol on autonomic cardiovascular function in chronically instrumented rats. *Auton. Neurosci.* 87, 201–208.
115. Rocchiccioli, C., Saad, M.A., and Elghozi, J.L. (1989). Attenuation of the baroreceptor reflex by propofol anesthesia in the rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 14, 631–635.
116. Ebert, T.J., Muzi, M., Berens, R., Goff, D., and Kampine, J.P. (1992). Sympathetic response to induction of anesthesia in humans with propofol or etomidate. *Anesthesiology* 76, 725–733.
117. Bell, S.D., Ingram, C., Santora, A.H., and Rodziewicz, T.L. (1986). Stellate ganglion block in neurogenic pulmonary edema. *South Med. J.* 79, 262.
118. Zhang, L., Yao, J., Zhang, T., Jin, J., Zeng, X., and Yue, Z. (2013). Stellate ganglion block may prevent the development of neurogenic pulmonary edema and improve the outcome. *Med. Hypotheses* 80, 158–161.
119. Mackersie, R.C., Christensen, J.M., Pitts, L.H., and Lewis, F.R. (1983). Pulmonary extravascular fluid accumulation following intracranial injury. *J. Trauma* 23, 968–975.
120. Šedý, J., Zicha, J., Kuneš, J., Jendelová, P., and Syková, E. (2008). Mechanism of neurogenic pulmonary edema development. *Physiol. Res.* 57, 499–506.

Address correspondence to:
Jiří Šedý, MD, DMD, PhD, FADI
Institute of Physiology
Academy of Sciences of the Czech Republic
Václavská 1083
Prague 4, 142 20
Czech Republic
E-mail: info@graydent.cz

11. Šedý J, Urdzíková L, Jendelová P, Syková E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev* 2008, 32: 550–580. **IF=7,804.**



Review

Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats

Jiří Šedý^{a,b}, Lucia Urdzík^{a,b}, Pavla Jendelová^{a,b}, Eva Syková^{a,b,*}

^a*Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic*

^b*Department of Neuroscience and Center for Cell Therapy and Tissue Repair, Charles University, Second Medical Faculty, Prague, Czech Republic*

Received 15 March 2007; received in revised form 9 August 2007; accepted 3 October 2007

Abstract

Behavioral outcome in rats with spinal cord injury (SCI) is the most important factor for evaluating the extent of injury and treatment efficacy. For this purpose, a number of behavioral testing methods can be used. In this review, 35 individual locomotor, motor, sensory, sensory–motor, autonomic or electrophysiological behavioral tests, their weaknesses and strengths, testing conditions, the need for habituation, pre-training and/or food deprivation, methods for increasing the animals' skills, systematic testing protocols and methods for selecting the proper behavioral tests for particular injury models are discussed on the basis of a retrospective analysis of scientific studies published from 1995 to 2007. This review is primarily targeted towards researchers outside the field or to researchers new to the field of SCI.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Behavioral testing; Spinal cord injury; Rat; Method

Contents

| | |
|-----------------------------------------------------|-----|
| 1. Introduction | 551 |
| 2. Data analysis | 552 |
| 3. Testing conditions | 552 |
| 3.1. Environment | 552 |
| 3.2. Animals | 554 |
| 3.3. Housing of the animals | 554 |
| 3.4. Handling animals | 556 |
| 3.5. Animal's behavior during testing | 556 |
| 3.6. Video-monitoring | 557 |
| 3.7. Pre-training | 557 |
| 3.8. Lab diet, motivators and attractants | 557 |
| 3.9. Pharmacological treatment | 557 |
| 3.10. Time factors | 558 |
| 3.11. Role of the scientist | 559 |
| 3.12. Overall recovery of the animal | 559 |
| 3.13. Experimental design of the study | 559 |
| 4. Locomotor tests | 560 |
| 4.1. Primary open-field tests | 560 |

*Corresponding author. Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videňská 1083, 142 20 Prague 4, Czech Republic. Tel.: +420 241062230; fax: +420 241062782.

E-mail addresses: jirisedy@hotmail.com (J. Šedý), urdzikl@saske.sk (L. Urdzík), pavla.jendelova@lfmotol.cuni.cz (P. Jendelová), sykova@biomed.cas.cz (E. Syková).

| | | |
|-------|------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2. | BBB test | 560 |
| 4.3. | BBB sub-scoring scale | 561 |
| 4.4. | Open-field activity test | 561 |
| 4.5. | Automated walkway test | 562 |
| 4.6. | Footprint analysis test | 562 |
| 4.7. | Kinematic analysis | 562 |
| 4.8. | Thoracolumbar height test | 563 |
| 4.9. | Swim tests | 564 |
| 4.10. | Eshkol–Wachmann notation | 564 |
| 5. | Motor tests | 564 |
| 5.1. | Inclined plane | 565 |
| 5.2. | Limb hanging test | 565 |
| 5.3. | Limb grip strength test | 565 |
| 5.4. | Forelimb asymmetry test | 565 |
| 5.5. | Rearing test | 565 |
| 5.6. | Food pellet reaching test | 566 |
| 6. | Sensory tests | 566 |
| 6.1. | Hot plate-based tests | 566 |
| 6.2. | Cold sensitivity-based tests | 566 |
| 6.3. | Von Frey filaments | 567 |
| 6.4. | Paw compression test | 567 |
| 6.5. | Withdrawal reflexes | 567 |
| 7. | Sensory–motor tests | 567 |
| 7.1. | Rope walk testing | 567 |
| 7.2. | Narrow beam test | 567 |
| 7.3. | Grooming test | 568 |
| 7.4. | Foot slip test | 568 |
| 7.5. | Grid walking test | 568 |
| 8. | Reflex response-based tests | 569 |
| 8.1. | Toe spread reflex | 569 |
| 8.2. | Contact placing response test | 569 |
| 8.3. | Righting reflex | 570 |
| 9. | Autonomic tests | 570 |
| 9.1. | Urinary bladder function | 570 |
| 9.2. | Erection-based tests | 570 |
| 9.3. | Telemetric monitoring | 571 |
| 9.4. | Autonomic dysreflexia testing | 571 |
| 10. | Increasing the skills of the animals | 571 |
| 10.1. | Enriched environment | 572 |
| 10.2. | Treadmill and running wheel training | 572 |
| 10.3. | Swimming | 573 |
| 10.4. | Robot-assisted hindlimb extension | 573 |
| 11. | Electrophysiology and fMRI | 573 |
| 11.1. | Evoked potentials—transcranial | 573 |
| 11.2. | Motor evoked potentials—intracranial–intraspinal | 574 |
| 11.3. | Contact electrode recording | 574 |
| 11.4. | Functional MRI | 574 |
| 12. | Systematic protocols | 574 |
| 12.1. | Combined behavioral score | 574 |
| 13. | Conclusions | 575 |
| | Acknowledgments | 575 |
| | References | 575 |

1. Introduction

Spinal cord injury (SCI) is a severe, often life-threatening and debilitating clinical condition, with an incidence of 40 new cases per million people throughout the world each year, affecting mainly young people with a mean age of

28.6 years (Basso, 2004; Grill, 2005; Kwon et al., 2002). It is characterized by a complex of motor, sensory and autonomic dysfunctions, the degree of which is characteristic for the severity of the SCI. In experiments, the most often used experimental animal is the rat (*Rattus norvegicus*), in which several models of complete or incomplete

SCI can be performed, such as transection, hemisection, contusion, compression, ischemia, excitotoxic lesions or crush injuries of the spinal cord (for review, see Grill, 2005; Kwon et al., 2002). Ideally, the behavioral responses in animal models should be relevant to the clinical signs of SCI in human patients (Muir and Webb, 2000; Syková et al., 2006b).

The final functional status of the animal depends upon the extent of neuronal damage in the gray matter at the injury site, the loss of ascending and descending axons in the white matter, and the reorganization of the remaining nervous system. A proper evaluation of the regenerating nervous tissue at the site of injury can be done using several morphological methods, including immunohistochemical staining of regenerating neurons and axons or retrograde and anterograde staining. The most important factor for future clinical studies is, however, the functional outcome, evaluated experimentally by a number of behavioral tests (Basso, 2004) (Table 1). They are used to determine the lesion severity and location, to document the extent of recovery following SCI and to identify the integrity of specific motor and sensory pathways that may be the substrate of recovery after SCI. Some tests are simple, not requiring any special training or equipment, while others are more sophisticated and require specialized and/or expensive equipment (Table 2). According to the type of data collected, these tests can be categorized as: (i) endpoint measures, in which behavior is scored according to some goal to be reached, e.g. the time to cross a beam or the number of pellets eaten; (ii) kinematic measurements, which can range from a qualitative description of movement, such as weight support or toe clearance in the BBB test, to continuous kinematic measurements, such as distances, angles or velocities of body parts during movement; (iii) kinetic measurements, which quantify or describe the force produced by a limb or limbs, for example, during weight support; and (iv) electrophysiological measurements, where muscle or sensory system activity is detected and measured (Muir and Webb, 2000). It should be noted that one test could fall into more than one category. For example, in the limb hanging test, the grasping itself can be evaluated as an endpoint measure, while hanging can be considered as a kinetic measurement (Table 1).

In this review, we have categorized the behavioral tests as: (i) locomotor tests, testing the locomotor apparatus of the animal; (ii) motor tests, analyzing the strength, coordination and other abilities of the skeletal muscles; (iii) sensory tests, evaluating proprioception, touch, pain or temperature sensing; (iv) sensory–motor tests, testing the proper connection between the sensory and motor systems; and (v) autonomic tests, evaluating the function of the sympathetic and parasympathetic systems. In addition, (vi) reflex-response based tests are considered separately (Tables 1 and 3). It should be noted that the categorization into particular groups is not absolute; for example, the limb hanging test mainly analyzes motor function, but

proper grasping is not possible without the sensory signals from the skin of the paws.

This review was designed to discuss a range of testing methods suitable for the behavioral testing of rats with SCI. Testing conditions, the strengths and limitations of each test and methods for preparing an appropriate study, based on the authors' own experiences, are discussed. Moreover, the review contains recommendations for the use of different behavioral testing methods in different injury models and describes the particular advantages and disadvantages of each testing method.

To date, only a few papers have focused on these questions, even though the call for a comprehensive overview to help in the appropriate selection of tests for individual studies, together with the standardization of behavioral testing methods across labs, remains strong (Basso, 2004; Muir and Webb, 2000; Wahlsten, 2001). Although this review is primarily designed to provide researchers outside the field of SCI or researchers new to the field with a quick orientation to this broad and often controversial topic, it might also help specialists with a heretofore somewhat narrow focus to expand the horizon of their knowledge (Tables 1, 3, 4 and 5).

2. Data analysis

All recommendations are based on an analysis of 553 original papers or short communications, published in the English language from January 1995 to July 2007 in journals with a defined impact factor. A particular publication was included in the analysis when the experiment was performed on rats with any type of SCI, which were subsequently tested behaviorally. The search for such papers was performed using Medline, Web of Science, OVID and Google Scholar. The parameters studied were the strain of the rats, their gender, the type of injury and the behavioral testing methods used. Data were analyzed using MS Excel. Any discussion related to the behavioral testing method was taken into account, if appropriate for this review.

3. Testing conditions

To obtain reliable, reproducible and worthwhile data, the testing procedure must follow several rules that are established before beginning the study or in preliminary experiments. These rules are often described as testing conditions. Once established, they must not be changed throughout the study.

3.1. Environment

Behavioral testing should be done in a quiet, warm and ventilated room with minimal distractions, where both sufficient light and the possibility of darkening are available. The temperature of the room should be the same as in the animal care facility. The relative humidity

Table 1
A list of the main behavioral methods for testing spinal cord injured rats

| Test | Type | Reflects | S/O | Range of scale | Scale | Reference |
|------------------------------------|--------------------|----------------------------|-----|--------------------------|---------------------|----------------------------------------|
| <i>Locomotor tests</i> | | | | | | |
| Primary open-field | Kinematic | Locomotion | S | Different | Ordinal | Tarlov (1954) Bohlman et al. (1981) |
| BBB | Kinematic | Locomotion | S | 0–21 | Ordinal | Basso et al. (1995) |
| Open field activity | Endpoint | Locomotion | O | 1–5 | Ordinal | Bignami (1996) |
| | Kinematic | Exploring activity | | | | |
| Automated walkway | Kinematic | Locomotion | O | Complex | Ordinal | Hamers et al. (2001) |
| Footprint analysis | Kinematic | Motor coordination | O | % | Ordinal | Chan et al. (2005) |
| Kinematic analysis | Kinematic | Locomotion | O | % | Ordinal | Metz et al. (1998) |
| Thoracolumbal height | Kinematic | Weight support | O | % | Ordinal | van de Meent et al. (1996) |
| Swim test | Kinematic | Swimming ability | S | 0–17 | Ordinal | Smith et al. (2006a) |
| E–W notation | Kinematic | Locomotion | O | Complex | Ordinal | Eshkol and Wachmann (1958) |
| <i>Motor tests</i> | | | | | | |
| Inclined plane | Kinetic | Muscle strength | O | Angle | Ordinal | Gale et al. (1985) |
| Limb hanging | Endpoint | Grasping | O | Yes/no | Ordinal | Diener and Bregman (1998) |
| | Kinetic | Muscle strength | | Time (s) | Continuous | |
| Limb grip strength | Kinetic | Muscle strength | O | Time (s) | Continuous | Pearse et al. (2005) |
| Forelimb asymmetry | Kinematic | Paw preference | O | % | Ordinal | Schallert et al. (1986) |
| Rearing | Kinematic | Paw preference | S | No. of rears | Ordinal | Arvanian et al. (2006) |
| Foot pellet reaching | Kinematic | Motor coordination | O | 0–9 | Ordinal | Whishaw (2000) |
| | Endpoint | | | Time (s) | Continuous | |
| <i>Sensory tests</i> | | | | | | |
| Hot plate | Endpoint | Temperature | O | Up to 60 s | Continuous | Gale et al. (1985) |
| Cold spray | Kinematic | Temperature | S | 0–3 | Ordinal | Yu et al. (1998) |
| Von Frey | Kinematic | Mechanical allodynia | O | 0.008–300 N or 2.5–125 g | Ordinal | Liebscher et al. (2005) |
| Paw compression | Endpoint | Pain | O | Force (N) | Continuous | Randall and Selitto (1957) |
| Withdrawal reflexes | Endpoint | Reflex | O | Time | Continuous | Gale et al. (1985) |
| <i>Sensory–motor tests</i> | | | | | | |
| Rope walk | Endpoint | Balance | O | % or 0–4 | Ordinal | Kim et al. (2001) |
| Narrow beam | Endpoint | Balance | O | 0–6 | Ordinal | Hicks and D’Amato (1975) |
| Grooming | Kinematic | S–M connections | S | 0–5 | Ordinal | Bertelli and Mira (1993) |
| Foot slip | Endpoint | S–M coordination | O | % | Ordinal | Metz and Whishaw (2002) |
| | Kinematic | Motor function | S | 0–6 | | |
| Grid walking | Kinematic | Sensory–motor coordination | O | 0–20 | Ordinal | Behrmann et al. (1992) |
| | Endpoint | | | | | |
| <i>Reflex-response based tests</i> | | | | | | |
| Toe spread reflex | Endpoint | Reflex | S | Absent–normal–abnormal | Ordinal | von Euler et al. (1997) |
| Contact placing response | Endpoint | Reflex | S | % | Ordinal | Kunkel et al. (1993) |
| Righting reflex | Kinematic | Reflex | S | 0–3 | Ordinal | Gale et al. (1985) |
| | Endpoint | | | | | |
| <i>Autonomic tests</i> | | | | | | |
| Ex copula erection | Kinematic | Erection | S | 1–5 | Ordinal | Holmes et al. (1988) |
| Non-contact erection | Kinematic | Erection | S | 1–3 | Ordinal | Sachs et al. (1994) |
| Mating | Kinematic | Erection | S | 1–6 | Ordinal | Nout et al. (2007) |
| Telemetric monitoring | Electro-physiology | Micturition erection | O | | – | Nout et al. (2005) |
| Autonomic dysreflexia | Endpoint | Autonomic dysreflexia | O | BPM and mmHg | Continuous (yes/no) | Cameron et al. (2006) |
| <i>Special tests</i> | | | | | | |
| Evoked potentials | Electro-physiology | Sensory and motor pathways | O | – | – | Fehlings et al. (1987) |
| fMRI | Imaging | Neural pathway function | O | – | – | Hofstetter et al. (2003) |

The table shows the method name, the type of the test, the neurological function it reflects, whether it is subjective (S) or objective (O), the range of the scale, the type of the scale, when the test was developed and the primary reference(s). BPM—beats per minute.

Table 2
Categorization of behavioral testing methods according to complexity

| Simple | Moderate | Complex |
|--------------------------|----------------------|------------------------|
| Primary open field | BBB | E–W notation |
| Rope walk | Open field activity | Automated walkway test |
| Beam walk | Thoracolumbal height | Footprint analysis |
| Inclined plane | Swim test | Kinematic analysis |
| Limb hanging | Limb grip strength | Foot pellet reaching |
| Rearing | Forelimb asymmetry | Ex copula erection |
| Cold spray | Hot plate | Non-contact erection |
| Paw compression | Von Frey | Telemetric monitoring |
| Grooming | Foot slip | Autonomic dysreflexia |
| Toe spread reflex | Grid walk | Electrophysiology |
| Contact placing response | Mating | fMRI |
| Withdrawal reflexes | | |
| Righting reflex | | |

should be maintained in a range between 45% and 65%; values outside this range can favor the proliferation of certain airborne pathogens resulting in health problems. An air change rate of at least 15 times per hour is important for the animal, but also for the scientist to help reduce staff exposure to harmful allergens present in rat fur. Generally, noise in the testing room should be minimized, including high-frequency noises undetectable by the human ear; noise levels should never exceed 50 dB. In several laboratory animals, the use of a constant noise, such as background music, whenever the animals are in the testing environment, has been described to assist in masking other loud and/or unexpected sounds. In contrast, there is no scientific evidence for the need to use such constant noise with rats (Tatlisumak and Fisher, 2006). It is very important to avoid excessive light, which might cause retinal damage to the animals and thus impair their health, abilities and behavioral performance. Albino rats are more sensitive to light than other strains of rats (Tatlisumak and Fisher, 2006). Appropriate behavioral testing apparatuses should be installed and their reliability checked before the experiment starts. All parts of the equipment should be frequently cleaned, but without the use of any cleaning materials that could impair the behavior of the animal. If a startled animal emits a fear scent onto the testing apparatus, other animals can easily detect it, and a marked decline in the behavioral performance of subsequent animals might result (Basso, 2004; Wahlsten, 2001).

3.2. Animals

Several kinds of rat inbred strains, such as Wistar, Louis, Long-Evans, Fisher or Sprague-Dawley, are suitable for SCI studies. In the past 12 years, the most favored rat strain in SCI studies has been Sprague-Dawley, followed by Wistar (Table 4). In any given study, only one strain should be used if differences between the different strains are not the subject of the study, because there exists

considerable variability in locomotor and sensory recovery rates between strains. For example, the locomotor recovery of Sprague-Dawley rats is quicker than that of Wistar rats, while the recovery of Wistar rats is quicker than that of Long-Evans rats (Mills et al., 2001). The animals should be of the same age or, even better for SCI studies, of the same weight. Differences in the capacity for behavioral recovery between young and aged animals are well known (Brailowsky and Knight, 1987). For example, in motor function differences in recovery may be due in part to an increase in age-related impairments in balance and coordination (Wallace et al., 1980) that correlate with the loss of cerebellar noradrenergic function (Bickford, 1993). The weight of the animal is more important for the type of injury than for the behavioral testing procedure. For SCI studies, on adult animals the weight is usually set between 300 and 350 g. In addition, the temperature of the animal during the injury procedure should be maintained at 37°C, to prevent hypo- or hyperthermia (Urdziková and Vanický, 2006; Vanický et al., 2001).

Both male and female rats are used in SCI studies worldwide; both have advantages and disadvantages. Our analysis showed that females were used in 39% of SCI studies, males in 33% and animals of any gender in the remaining 28%. The main reasons for the more frequent use of females are the easier urinating procedure, the more rapid onset of an automatic urinary bladder and the lower occurrence of lower urinary tract infections. All these advantages are based on the presence of a significantly shorter and straighter urethra in female rats in comparison with males. On the other hand, female rats exhibit hormonal instability, thus for SCI studies, the performance of the lesioning procedure during the same part of the estrous cycle should be required (Chaovipoch et al., 2006; Tatlisumak and Fisher, 2006). This requirement stems from reports of the neuroprotective effects of estrogen and progesterone (Chaovipoch et al., 2006; Roof and Hall, 2000). However, new reports have indicated that estrogen (Hall et al., 2005; Swartz et al., 2007) and progesterone (Fee et al., 2007) do not, in fact, have any neuroprotective effects.

3.3. Housing of the animals

We prefer to house the animals in cages of two, because separation might increase the stress of the rat. For some behavioral tests, a known room-mate in the home cage might be used as an attractant. On the other hand, housing three or more spinal cord injured rats in one standard-sized cage would not be reasonable because of the increased risk of transferring infections, a shortage of space for movement and an increased need for cleaning and maintenance. Nevertheless, increasing the number of animals in one cage is the easiest way of enriching the environment (Tatlisumak and Fisher, 2006). The substrate in the cages of the animals should be soft, smooth, and absorbent to avoid complications

Table 3

A list of the main behavioral tests showing the necessity of previous habituation and/or pre-training, the most popular type of spinal cord injury for which the behavioral method was used in the previous 12 years, spinal cord injury severity for which the test is applicable (L—low, M—moderate, S—severe) and the main advantages and disadvantages of each method

| Test | Habituation/ training | Most popular injury type | Lesion severity | Advantages | Disadvantages |
|------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------|
| <i>Locomotor tests</i> | | | | | |
| Primary open-field | +/- | Contusion | M, S | Simple, cheap | Low sensitivity |
| BBB | +/- | Contusion | L, M, S | Simple, cheap | Subjective |
| Open field activity | +/- | Contusion | L, M | Unique data are obtained | Depends on the rats' motivation |
| Automated walkway | +/+ | Hemisection | L, M | Precise | Equipment |
| Footprint analysis | +/+ | Cervical | L, M | Precise | Environment-dependent |
| Kinematic analysis | +/+ | Contusion | L, M | Detailed | Equipment |
| Thoracolumbal height | +/- | Contusion | M | Examines only one characteristic | Equipment |
| Swim test | +/+ | Contusion | L, M | Spontaneous locomotion | Subjective |
| E–W notation | -/- | Cervical | L, M | Detailed | Requires training of the scientist |
| <i>Motor tests</i> | | | | | |
| Inclined plane | -/- | Compression | L, M, S | Simple, cheap | Not standard among laboratories |
| Limb hanging | +/- | Contusion | L, M | Unique data | Not for severely injured animals |
| Limb grip strength | +/- | Contusion | L, M | Precise | Requires equipment |
| Forelimb asymmetry | +/+ | Cervical | L, M | Sensitive to chronic deficits | Not for severely injured animals |
| Rearing | +/+ | Contusion | L, M | Sensitive to selective limb use | Not for severely injured animals |
| Foot pellet reaching | +/+ | Cervical | L | Testing of fine motor function | Food deprivation |
| <i>Sensory tests</i> | | | | | |
| Hot plate | -/- | Contusion | L, M, S | Simple | Risk of injury False positivity |
| Cold spray | -/- | Excitotoxic | L, M, S | Simple | Low sensitivity |
| Von Frey | -/- | Contusion | L, M, S | Simple | High chance of mistakes |
| Paw compression | -/- | Transection | L, M, S | Simple, cheap | Low sensitivity |
| Withdrawal reflexes | -/- | Contusion | L, M, S | Simple | Low sensitivity |
| <i>Sensory–motor tests</i> | | | | | |
| Rope walk | +/+ | Cervical | L | Simple, cheap | Requires training |
| Narrow beam | +/+ | Contusion | L | Uncovers discrete changes | Requires training |
| Grooming | +/- | Cervical | L, M | Simple, cheap | Subjectivity |
| Foot slip | +/+ | Contusion | L, M | Uncovers discrete changes | Requires training |
| Grid walking | +/+ | Contusion | L, M | Uncovers discrete changes | False-positives or negatives |
| <i>Reflex-response based tests</i> | | | | | |
| Toe spread reflex | -/- | Contusion | L, M, S | Simple, cheap | Low sensitivity |
| Contact placing response | -/- | Hemisection | L, M, S | Simple, cheap | False positivity |
| Righting reflex | -/- | Contusion | L, M | Simple, cheap | Low sensitivity |
| <i>Autonomic tests</i> | | | | | |
| Ex copula erection | +/- | Contusion | L, M, S | Unique data | Subjectivity |
| Non-contact erection | -/- | Contusion | L, M, S | Unique data | Low sensitivity |
| Mating | -/- | Contusion | L, M, S | Unique data | Subjectivity |
| Telemetric monitoring | -/- | Contusion | M, S | Precise | Equipment |
| Autonomic dysreflexia | -/- | Compression | M, S | Unique data | Equipment |
| <i>Special tests</i> | | | | | |
| Evoked potentials | -/- | Contusion | L, M, S | Precise | Equipment |
| fMRI | -/- | Hemisection | L, M, S | Precise | Expensive |
| CBS | Different | Contusion | L, M, S | Complex | The same score might reflect different recoveries |

The lesion severity corresponds to the BBB scale (severe—BBB 0-7; moderate—BBB 8-14; low—BBB 15-21). If not specified as “Cervical”, the type of injury is thoracic.

of the skin, joints and bones. Washing the animals might also be helpful to prevent infections (Santos-Benito et al., 2006). The bedding should be changed periodically. Too frequent changes of bedding might result in the long-term

removal of scent markers, which might impair the psychological and social comfort of the animal. Cages should have sufficient bedding to prevent decubiti or pressure sores (Kim et al., 2002).

Table 4
The five most commonly used behavioral testing methods, strains and lesion types in the past 12 years

| No. | Test | Strain | Lesion type |
|-----|-------------------|----------------|-----------------|
| 1. | BBB | Sprague-Dawley | Contusion |
| 2. | Electrophysiology | Wistar | Transection |
| 3. | Hot plate | Lewis | Hemisection |
| 4. | Von Frey | Long-Evans | Compression |
| 5. | Grid walking | Fisher | Cervical injury |

Table 5
Recommendations concerning the use of behavioral testing methods for different types of injury based on an analysis of studies published during the past 12 years

| | First choice | Second choice | Third choice |
|-------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------------|
| Cervical | Forelimb assymetry | Footprint analysis | BBB |
| Th compression | BBB | Hot plate | Inclined plane |
| Th contusion | BBB | Electrophysiology | Von Frey Hot plate |
| Th hemisection | BBB | Electrophysiology | Hot plate Von Frey |
| Th transection | BBB | Electrophysiology | Kinematic analysis |
| Th excitotoxic | Hot plate | Cold testing | Von Frey |
| Th ischemic | BBB | Electrophysiology | Inclined plane Hot plate |
| Other injury | BBB | Electrophysiology | Hot plate Grid walk |

All housed animals should be provided with five freedoms (Tatlisumak and Fisher, 2006). Freedom from malnutrition becomes important during the restriction of the diet required by some behavioral tests. Freedom from injury and disease indicates the necessity of keeping the environment clean and safe in terms of sharp cage edges, free wires, etc. This kind of freedom includes providing the animals with preventive antibiotics, if preliminary or similar studies indicate their need. Freedom from thermal and physical discomfort becomes important mainly during the first phase after the SCI procedure. Animals shortly after an injury procedure demand a higher temperature to prevent cold. The simplest way to achieve this is by the addition of extra bedding material to the animal's cage. Freedom from fear and stress is absolutely crucial for the proper reflection of neurological functions during the subsequent testing sessions; a stressed, startled or depressed animal will fight for its life and try to escape instead of performing the required task. The freedom to express most normal patterns of behavior is mainly dependent on the companionship of conspecifics and, if possible, housing in an enriched environment. Cage-mates provide opportunities for play, grooming and other social activities, which might be important when the mate is subsequently used as an attractant. It should be noted that rats in particular are extremely gregarious animals and will exhibit marked

changes in behavior, such as aggression during handling or destructive behavior, if deprived of companionship. When individual housing is unavoidable, which is fortunately not very often in SCI studies, at least some form of shelter should be introduced into the animal's environment (Tatlisumak and Fisher, 2006).

3.4. Handling animals

Most often, a rat is held by its tail or beneath its body. In rats with SCI, the latter method is usually preferred, to avoid damage to the spinal cord. Also, the provocation of pathologic reflexes and the irritation of the perineum are thus avoided, so the result of behavioral testing is not distorted. In addition, rats are much more "friendly" animals than mice, so holding them by their body is not as dangerous as with mice. Rats should feel comfortable during the testing; if the animals are stressed, their reactions are adversely affected. To eliminate any possible effect of a full urinary bladder on behavior, the bladder should be expressed before testing. Rats enrolled in an SCI study should be repeatedly cleaned to prevent urinary and breathing infections caused by microorganisms and ammonia, which rest in the bedding of the cage. The severely injured animal has decreased weight support and locomotion, which reduces the extent of the space in which the animal moves and also decreases the mean distance between the bottom of the animal's trunk and the ground. The need for frequent cleaning increases with the severity of the injury and the length of the study (Santos-Benito et al., 2006).

3.5. Animal's behavior during testing

During the testing session, it is important to take into account the type of behavior shown by the animal, developed on the basis of the testing device. Murray (2004) categorized the animal's behavior during the testing session into (i) spontaneous behaviors, (ii) triggered behaviors, and (iii) trained behaviors. In tests based on the spontaneous activity of the animal, such as exploration or locomotion, any triggering to enhance the movement of the animal should be avoided. A typical example of such action is irritating or pushing the animal's back or tail by the scientist to enhance the movement of the rat in an open field. In tests based on triggered behaviors, the response is elicited by a standard stimulus. Here, the experimenter should make sure that the stimulus is always the same, applied to the same part of the animal's body with the same intensity and that the animal has the "physical and psychological space" to respond properly. For example, the animal will probably not be interested in food pellets if the pellets are standard rat chow, the animal is not food-deprived or the animal is stressed due to unexpected noise produced by the scientist. When trained behavior is tested, the animal should be able to accomplish the task without any problems before the injury. For example, when beam

walking has not been trained previously, the post-injury behavioral results might be more dependent on the ability of the animal to learn than on its sensory–motor coordination.

3.6. Video-monitoring

Several tests require video-monitoring for training the testers, monitoring the scoring sessions and/or proper evaluation of the testing sessions. In addition, video-monitoring allows the investigator to store each session's data, to evaluate the data afterwards, to evaluate the data repeatedly and to compare and send the data between investigators or laboratories. Basso (2004) describes in her review a situation in which a running wheel was placed into a rat's home cage overnight and its revolutions measured. The number of rotations was exceptionally high, so the question arose as to whether the rat could have been running so far. A video camera resolved this problem—the rats were lying beside the running wheel, spinning it with their forelimbs. This example nicely illustrates the necessity of video-monitoring during the testing or training in situations where the examiner is not able to see the animal or its particular outcomes.

3.7. Pre-training

In the majority of behavioral tests, the pre-training and/or acclimatization of animals are necessary (Table 3). The main reason for this is to familiarize the animal with the testing procedure, to avoid stressing the animal during the subsequent sessions and to verify the normal health of the animal. Pre-training might also be required to make sure the animal understands the required task. To minimize the inter-individual variability in some tests, the pre-training values are considered to be the normal values and the post-injury values are calculated as deviations (in percentages). In addition, assessing the performance of trained behaviors will eliminate differences in motivation between animals and will provide more detailed and specific measures of functional abilities (Muir and Webb, 2000).

3.8. Lab diet, motivators and attractants

Most tests do not require any food restriction or addition, so animals have access to rat chow and water *ad libitum*. It has been observed that rats need 20–26 g of chow per day, depending on the weight (age) of the animal. In contrast to guinea pigs or primates, rats do not require a daily dietary source of vitamin C. Interestingly, rats obtain an additional source of vitamin B by eating fecal pellets—they are coprophagic. Although rats are able to cope with reduced water intake and conserve fluids by producing very concentrated urine, the amount of clear water intake is not restricted throughout an SCI study (Tatlisumak and Fisher, 2006).

Some tests require the restriction of food in order to increase the motivation of the rats to look for and reach food. In these tests, the restricted diet is usually around 13 g per animal per day (Chan et al., 2005). On the other hand, some scientists feel that food deprivation or restriction represents an unreasonable health risk to severely impaired animals with SCI (Basso, 2004). However, cyclic food restriction with no weight loss is suggested as a method of choice. Instead of deprivation, animals can be pre-trained to eat attractive motivators, such as raspberry syrup, cereal such as fruit loops or apple jacks, or other substances. Chocolate, alcohol and caffeine should be avoided in the rat diet, because they can cause serious medical problems. Chocolate contains theobromine, which in large amounts has diuretic effects, relaxes smooth muscles, and stimulates the heart and central nervous system (Aboel-Zahab et al., 1997). Caffeine has hypercholesterolemic effects and negatively influences the development of the nervous system (Fears, 1978; Ohta et al., 2002). The negative effects of ethanol are multiple, similar to those observed in humans (Barr et al., 2005; Rivier, 1995). Conversely, some substances such as creatine or cyclosporine A might have neuroprotective effects (Rabchevsky et al., 2001, 2003).

During a long-term study, the lab diet dose should be adjusted individually to maintain the body weights of all animals in a similar range, usually 270–330 g (Santos-Benito et al., 2006). It is important to know that animal body weight decreases by about 10% during the first week after SCI and starts to raise thereafter (Van Meeteren et al., 2003). Immediately after the injury procedure, the scientist should make sure the animals can reach the food and water (Tatlisumak and Fisher, 2006). With gnawing animals, food and water are usually offered in an elevated wire-mesh hopper. In our experiments, we place food pellets and an additional water flask on the bottom of the cages of all animals until they are able to reach the hopper (Šedý et al., 2007a; Syková et al., 2006a).

In several tests, such as open-field based tests, where food motivators are not optimal, other attractants, such as the presence of a familiar housing mate or a close relation or the smell of the home cage, can be used. When using immunosuppressive drugs, the quality of the lab diet might be enriched, using a high-energy diet such as Ensure (Archer et al., 2005). In the majority of tests, the use of attractants is not necessary, because rats are tireless explorers and are interested in all new stimuli.

3.9. Pharmacological treatment

For several testing methods, some pharmacological treatment is necessary to avoid stress or injury of the animal or to prevent unwanted reactions or inflammation. To limit post-operative pain, analgesics such as metacam (5 mg/kg/day), or buprenorphine hydrochloride (0.1 mg/kg/day, s.c.) should be administered for the first 24–48 h (Baldrige et al., 2002; Kim et al., 2002; Roussos et al., 2005; Xu et al., 1999). Antibiotics, including gentamycin sulfate (1–12 mg/kg/

day, i.m., i.p. or s.c.), ampicilin (100–150 mg/kg/day, i.m.), enrofloxacin (2.5 mg/kg/day, s.c.), cefazolin sodium (50–100 mg/kg/day, s.c.) or approximately 15 ml of an oral suspension of sulfamethoxazole (40 mg/ml)–trimethoprim (8 mg/ml) are used for the prevention of urinary infections (Baldrige et al., 2002; Roussos et al., 2005; Xu et al., 1995, 1999). Immunosuppressive drugs, such as cyclosporine A (5–10 mg/kg/day, i.p.) or FK506 (initial bolus 2 mg/kg, followed by 0.2 or 0.5 mg/kg/day), can be used to prevent the rejection of implanted cells or biomaterial (Akgun et al., 2004; Diaz-Ruiz et al., 2004; Lopez-Vales et al., 2005). In addition, ascorbic acid (approx. 10 mg/rat/day) can be administered to prevent bacterial growth and to support the general health of the animal (Roussos et al., 2005; Xu et al., 1995). To encourage rats to drink more, sucrose can be added to the drinking water for the first few days (Kim et al., 2002). If an animal's general health is not very good, small amounts of Ringer-Lactate, saline or 5% dextrose might be injected; such an intervention should be written into the experimental protocol. Some experimenters give 10 ml of saline s.c. immediately after the lesioning procedure to compensate for the poor oral water intake in the perioperative period (van de Meent et al., 1997). Other laboratories prefer an injection of 5% saline–glucose (Baldrige et al., 2002; Roussos et al., 2005). When minor autophagia of an impaired hindlimb occurs, some scientists dip the limb into 1% picric acid to give the skin a bitter taste (Kim et al., 2002).

For more sophisticated testing methods, such as evoked potential monitoring, some other drugs might be necessary. These include volatile (e.g. isoflurane) or intravenous anesthetics (e.g. pentobarbital or ketamine–xylazine), myorelaxation drugs (e.g. pancuronium bromide), atropine (to diminish secretions in the respiratory tract) or ophthalmic ointment. The intramuscular injection of drugs into a hindlimb should be avoided due to muscular atrophy, thus the forelimb musculature should be used instead (Santos-Benito et al., 2006). Generally, the less medication that is used in an experimental study, the fewer cross-reactions and false results will occur. On the other hand, some drugs are necessary to minimize the stress and pain of the animals or are even required by ethical committees or grant agency policies, thus their use cannot be avoided. Importantly, the pharmacokinetics of several drugs, such as gentamycin (Segal et al., 1988) or cyclosporine A (Ibarra et al., 1996), have been shown to be altered in spinal cord injured mammals. Thus, when new drugs are introduced, it should be taken into consideration that the dose–response curve might be different from other types of injury.

3.10. Time factors

There are several time factors that must be decided upon before the study starts, including the time of testing, the frequency of testing, the length of testing, the number of repetitions of individual testing and the periods between

them. A preliminary or so-called pilot study utilizing a few animals is a great tool for establishing the time factors without losing significant numbers of animals, time or money. At the beginning of an SCI study, less might be more. In order to minimize the role of circadian rhythms, the testing time should be consistent and should not be changed during the study (Kriegsfeld et al., 1999). It should also be taken into account that rats are naturally crepuscular or nocturnal animals, so they are more active during the night. Testing is usually performed in the morning or in the evening, depending on the schedule of the scientist, in order to ensure sufficient time in which to perform the testing. Also, the day–night cycle can be reversed for the purpose of the experiment, if needed.

The frequency of testing depends on the required sensitivity of the data to be obtained. If no gross abnormalities are expected, the interval between testing periods can be longer than in the case where the clinical state of the animal is expected to change rapidly. For example, in the first 5–6 weeks after SCI or the start of treatment, testing of the animals is usually performed 1–2 times per week, while after this period, testing 1–2 times per month might be sufficient. Generally, the animals would be tested before SCI (treatment), several hours to one day after SCI (treatment), once per week for the first six weeks and then once per month until the end of the study. Testing the animals for more than six months is not typical in many studies; however, Ramon-Cueto et al. (2000) observed locomotor improvement even seven months after injury. Long-term experiments with chronically injured animals need additional special care, including special feeding, housing, cleaning, control of health, etc. (for review, see Santos-Benito et al., 2006).

In animals with central nervous system injury, the question of when the testing, and more importantly, the training sessions should begin, remains crucial. It has been shown that the pattern of gene expression is influenced by both the severity of injury and the time after injury (Li et al., 2004). Genes encoding molecules for cellular signaling, synaptic plasticity, metabolism, ion channels and transporters are up-regulated following severe injury, but down-regulated following moderate injury. Furthermore, moderate injury is associated with an increase in the number of responsive genes, whereas a severe injury is associated with a decrease during the same post-injury period (Li et al., 2004). Similarly, when voluntary exercise is delayed by two weeks, an increase in BDNF expression and an improvement in behavioral outcome can be observed (Griesbach et al., 2007). Generally, early time point testing (less than two weeks post-injury) is unnecessary unless the hypothesis posits changes during this early period; testing is stressful and may negatively influence the recovery of the animals. These papers indicate the necessity of properly timing the “behavioral testing window” and more importantly the “training window”. However, as not much is known about the timing of these windows and as

the timing might be different in particular SCI models, a quite large field remains open to investigation.

How long the animals should be tested depends primarily on the type of test. In some tests, a minimal testing period is required to see the full picture of the testing modality, while in others the maximal testing period serves to prevent injury to the animals. The question of how many times an individual test should be repeated also depends mainly on the type of test. Usually, a test is done once or three times by each examiner, but can range between 1 and 20 times. The period between individual testings depends mainly on the time the animal requires to reach a level of physical and psychological comfort similar to that before the start of testing.

3.11. Role of the scientist

In the interest of objectivity, the testing should be performed by two to three independent scientists who are familiar with the testing procedure. When two or more testers are included into a study, the difference between the values obtained by each examiner should vary by no more than 5% (Basso, 2004). To blind the study, the tested animals should be marked by code, so that the scientists are not able to recognize to which group the animals belong, even after repetitive testing. The recording sheets should also be free of group identification marks. As it is important to use the same tester(s) throughout the experiment, vacations, conferences, etc. should be planned in advance. Also, if the scheduled tester is sick, the testing day might be postponed by 1–2 days rather than being performed by another individual. The frequent changing of testers throughout a study might completely ruin the study. All scientists have a small level of individual bias. However, the existence of the same small relative error throughout an entire study will not affect the absolute error, while the existence of several different relative errors of several different scientists will certainly create an absolute error, without any chance to correct it after the end of the study. Finally, feelings of stress, frustration or anxiety on the part of the examiner can negatively impact the behavioral performance of the animals, which become very apprehensive. Also, a shortage of time and hurrying might influence the animals' behavior. Therefore, it is important for the tester to leave all external issues outside the door of the testing room.

3.12. Overall recovery of the animal

The overall recovery of the animal should be included in the testing process, because it provides the investigator with additional significant data. Overall recovery can be evaluated by weekly weighing of the animal (Urdžiková and Vanický, 2006) and measurements of the thigh circumference, reflecting the leg muscle mass, usually before the beginning of a testing session (Vaquero et al., 2006). In addition, the general locomotor activity of the

animal could also be graded as normal, reduced or minimal (Farooque, 2000).

3.13. Experimental design of the study

During the preparation of the study, several aspects such as animal weight and gender, injury procedure, post-injury care and the proper selection of testing methods should be carefully taken into account. The testing strategy, once started, should not be changed during the experiment (Metz et al., 2000). If some other factor, such as treadmill training or an enriched environment, is included in the study, it should be applied to all animals in the study (Fouad et al., 2000). One of the most important factors is the selection of proper, sensitive, standardized and generalizable behavioral tests to produce reliable, reproducible and worthwhile data. Most importantly, the behavioral test must match the hypothesis and it must have proven performance standards—it must be shown that the test produces reliable results across sessions, examiners and labs, as was done for the BBB test (Basso et al., 1996). Without evidence of reliability, it is impossible to attribute behavioral changes to biological events or interventions. In addition, the standardization of behavioral equipment and testing procedures is necessary. Although no ideal behavioral test has yet been developed, the weaknesses of one test can be compensated by the strengths of another test. For example, the BBB test reflects open-field locomotion in detail, but fails to analyze body balance, which can be easily monitored during beam walking. Conversely, beam walking in isolation will not be able to distinguish, for example, between an animal's status corresponding to BBB 1 and 8—in both cases, the animal falls off the beam.

One of the most important questions during the selection of the proper testing method is whether the investigator wants to know “whether” or “why” behavior changed. This problem was previously discussed in an excellent review by Basso (2004). She concludes that experiments concerned with “why” behavioral changes occur should rely on precise, quantitative behavioral tests, although studies focused on “whether” a change occurred can use more general measures of behavior without invalidating the results. Another question is the required sensitivity, i.e. the ability of a test to detect changes in behavior that actually exist. Rats are well known for compensating to overcome lesion-induced deficits, thus it is important to choose tests that will target the deficit directly and be minimally affected by compensatory behaviors. If the test is influenced by compensatory mechanisms, it may not be clear if the effect of the therapy is ameliorating the deficit itself or enhancing motor learning mechanisms that allow the development of compensatory behavior (Schallert and Woodlee, 2003). Dichotomous or trichotomous tests, with broad categories such as yes/no or absent/normal/abnormal, have a lower level of sensitivity because they are unlikely to detect small changes. On the other hand, they

are usually less time and money consuming. In contrast, the most sensitive tests, such as kinematic analysis, usually require special equipment, educated personnel and much time. Fundamentally, (i) the more general the test, the broader its scope and the lower its precision and (ii) the greater the test's applicability, the less sensitive it tends to be. If using more than one or a battery of tests, the order and timing of the individual tests should be preserved throughout the study (Basso, 2004).

4. Locomotor tests

Locomotor tests are usually open-field based tests in which the locomotor apparatus, especially the proximal forelimb, hindlimb and tail striated muscles, are tested. Besides limb muscle function, locomotion also requires the proper coordination and strength of the involved muscle groups. Locomotor recovery is recognized as the most important modality in patients suffering from SCI (Syková et al., 2006b). For the purpose of behavioral testing of spinal cord injured animals, locomotion is usually divided into overground locomotion, horizontal or inclined treadmill locomotion and locomotion during swimming. The crucial break point for locomotion is the onset of weight support, on which depends proper hindlimb stepping. In addition, the spatiotemporal details of the locomotor pattern, including step size and swing duration, vary as a function of the weight support provided (Timoszyk et al., 2005). Experimental lesions are usually performed at the mid-thoracic level, so only the hindlimb and tail muscles are affected. The lesion is usually not made above the C5 level, so the phrenic motor pool, responsible for respiration, is spared (McKenna et al., 2000).

4.1. Primary open-field tests

Open-field behavioral testing of the locomotor performance of rats with an SCI is probably the oldest such testing. It is simple, reproducible and does not need any special devices. The developed rating scales are based on the observation of defined leg movements, reflecting the activation of spinal networks that are able to produce a coordinated stepping pattern (Rossignol and Dubuc, 1994). In the past, the most commonly used test of this kind was Tarlov's open-field test, which ranks hindlimb movements and weight support in five categories (Tarlov, 1954). However, this method has been found to be more sensitive when the animal is able to hindlimb weight support and is less reliable when used to score hindlimb movements without weight support (Broton et al., 1996; Metz et al., 2000). Subsequently, the test was modified, resulting in the so-called Tarlov's modified open-field test, which has a scale from 0 (complete paralysis) to 6 (normal locomotion) (Guizar-Sahagun et al., 2004). Additional modifications of Tarlov's scale are, for example, the motor performance score (MPS), developed by von Euler et al. (1996, 1997), the motor deficits score (MDS), used mainly in

an ischemic model of SCI developed by Maršala and Yaksh (1994), the open field motor test (OFT), developed by Behrmann et al. (1992) and Bohlman's motor evaluation score (Bohlman et al., 1981). None of these scales is, unfortunately, very sensitive; so they have been improved by increasing the number of categories for all hindlimb motor features in the BBB score (Basso et al., 1995). In contrast to these testing methods, the evaluation of one isolated function modality during open-field testing has been proposed several times; for example, Houle et al. (2006) examined the angle of forelimb swing movement and classified it using their own scale, ranging from 1 (angle more than 90°) to 5 (grooming motion above the level of the eyes).

4.2. BBB test

The BBB test, named after the first letters of its developers, Basso, Beattie and Bresnahan, is probably the most commonly used test of locomotor function in spinal cord injured rats worldwide (Basso et al., 1995). It is a modified open-field test, based on grading hindlimb locomotion from 0 (no spontaneous locomotor activity) to 21 (normal movement—coordinated gait with parallel paw placement) (Table 6). Scores from 0 to 7 indicate the return of isolated movements in the hip, knee and ankle joints. Scores from 8 to 13 indicate the return of paw placement and coordinated movements with the forelimbs. Scores from 14 to 21 show the return of toe clearance during stepping, predominant paw position, trunk stability and tail position (Table 6). Rats are usually tested on a non-slippery surface, able to reveal toe clearance disturbances, in a circular arena, about 90 mm in diameter and 30 cm high. The use of a video camera is recommended especially for training the testers and comparison between testers from different experimental groups. However, the BBB was primarily designed to be based on live, subjective observation. The video-camera is thus not recommended for testing, mainly due to limited parts of the animal body seen and the inability to evaluate the toe clearance (D. Michelle Basso, personal communication). The testing is based on an analysis of the movements of individual hindlimb joints, sweeping without weight support, weight-supported dorsal stepping, plantar placement of the paw with or without weight support, forelimb–hindlimb coordination, internal or external rotation and parallelness of the paws in the predominant paw position at initial contact and when the paw is lifted off, toe clearance (occurrence of pathologic acoustic phenomena during hindlimb locomotion), elevation of the tail during locomotion and trunk stability (Basso et al., 1995). One advantage of this scale is that pre-operative training of the animals is not necessary; however, pre-operative gentling and exposure to the testing field are highly recommended. The BBB score was originally designed for contusion injuries, but it also works well for other types of injuries such as a balloon compression lesion or hemisection (Metz et al., 2000; Syková and Jendelová, 2005; Syková et al., 2006a; Šedý

Table 6

Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale, reprinted from the Journal of Neurotrauma (Basso et al., 1995) with permission from Mary Ann Liebert, Inc

| | |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0 | No observable hindlimb movement |
| 1 | Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee |
| 2 | Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint and slight movement of one other joint |
| 3 | Extensive movement of two joints |
| 4 | Slight movement of all three joints of the HL |
| 5 | Slight movement of two joints and extensive movement of the third |
| 6 | Extensive movement of two joints and slight movement of the third |
| 7 | Extensive movement of all three joints of the HL |
| 8 | Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support |
| 9 | Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e. when stationary) or occasional, frequent or consistent weight-supported dorsal stepping and no plantar stepping |
| 10 | Occasional weight-supported plantar steps; no FL–HL coordination |
| 11 | Frequent to consistent weight-supported plantar steps and no FL–HL coordination |
| 12 | Frequent to consistent weight-supported plantar steps and occasional FL–HL coordination |
| 13 | Frequent to consistent weight-supported plantar steps and frequent FL–HL coordination |
| 14 | Consistent weight-supported plantar steps; consistent FL–HL coordination, and predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes initial contact with the surface as well as just before it is lifted off at the end of stance; or frequent plantar stepping, consistent FL–HL coordination, and occasional dorsal stepping |
| 15 | Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination and no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement; predominant paw position is parallel to the body at initial contact |
| 16 | Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift-off |
| 17 | Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait and toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and lift-off |
| 18 | Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait and toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact and rotated at lift-off |
| 19 | Consistent plantar stepping and consistent FL–HL coordination during gait, toe clearance occurs consistently during forward limb advancement, predominant paw position is parallel at initial contact and lift-off, and tail is down part or all of the time |
| 20 | Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel at initial contact and lift-off, and trunk instability; tail consistently up |
| 21 | Consistent plantar stepping and consistent gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, and consistent trunk stability; tail consistently up |

et al., 2007a, b; Urdzíkova et al., 2006). It is thought to be less sensitive to clip compression injuries (von Euler et al., 1997). Some authors propose that there are potential limitations to the BBB score due to the subjectivity of the test (Brotton et al., 1996; Metz et al., 2000), but the experiences of our and other groups show that rigorous

training of the testers minimizes subjectivity, especially when the evaluation is made by two independent scientists (Basso et al., 1996; Syková and Jendelová, 2005; Urdzíkova et al., 2006). Metz et al. (2000) concluded that an important drawback of the test lies in the fact that the ordinal BBB rating system is not linear; the lower part of the scale concerns gross aspects of locomotion, while the upper part of the scale includes rather discrete movement aspects that do not represent major improvements in the animal's motor ability. However, this problem occurs in the majority of tests and probably cannot be easily solved. The BBB score is now widely used and has been shown to provide reproducible results, so it remains the gold standard (Basso et al., 1996).

4.3. BBB sub-scoring scale

After the publication of the BBB scale (Basso et al., 1995), several modifications and improvements have been proposed (Lankhorst et al., 1999, 2001; Metz et al., 2000; Popovich et al., 1999; von Euler et al., 1997). The BBB sub-scoring scale improves the sensitivity of the BBB scale by scoring each of the behavioral attributes independently and then adding them together to yield a single score, using a process we call sub-scoring (Basso, 2004; Lankhorst et al., 1999, 2001; Popovich et al., 1999; Van Meeteren et al., 2003). The justification for sub-scoring is the assumption that when a treatment is applied, it will affect some but perhaps not all aspects of locomotion. For instance, a treatment may improve toe clearance or trunk stability without having any impact on forelimb–hindlimb coordination (for details, see Basso, 2004).

4.4. Open-field activity test

This simple test, originally described by Bignami (1996), is sensitive to a wide range of injuries, including SCI. To assess exploratory behavior, rats are tested in an open field (100 × 80 cm) subdivided into nine fields. Animals are observed individually for 5 min. The number of fields crossed during this observation interval is noted, and a ratio of the animals' performance in comparison to baseline data (taken as 100%) is modified to a 5-point score. A value of 0–50% is rated as 1 point, 51–90% as 2 points, 91–110% as 3 points, 111–200% as 4 points and more than 200% of baseline values is rated as 5 points (Bignami, 1996; Metz et al., 2000).

Generally, the open field activity test is a good measure of gross motor behavior and general health in spinal cord injured rats. Exploratory activity is especially sensitive to individual differences among animals with a low locomotor capacity, and even severely damaged rats can show significant locomotor activity. However, spontaneous exploratory activity is influenced by motivational factors such as anxiety, which can cause freezing behavior in rodents, thus reducing the rate of exploration (Gerlai and Clayton, 1999). It is also important to leave appropriate

intervals between individual test sessions to avoid habituation to the testing environment. Furthermore, locomotor training after SCI can enhance exploratory activity (Fouad et al., 2000; Metz et al., 2000).

4.5. Automated walkway test

In the automated walkway test (CatWalk[®] test, CatWalk[®]-assisted gait analysis), first described by Hamers et al. (2001, 2006), the animal is first trained to cross a 100–120 cm long glass walkway, at least 6 mm thick, with black Plexiglas walls spaced 8 cm apart and a ceiling above. In a dark room, the light from an encased fluorescent bulb is transmitted through the glass surface of the walkway. Paw contact causes light to exit the floor and illuminate the paw print, which is monitored by a video camera connected to a computer with the CatWalk[®] program, which acquires, compresses and stores the data for further analysis. The analysis is based on step sequence distributions, inter-limb coordination (regularity index), the total floor area contacted with the paw (print area), the distance between two hind paws (base of support), the duration of the swing and stance phases and hind paw pressure (Gensel et al., 2006; Hamers et al., 2001). This test overcomes the difficulty of analyzing all phases of the movements of rapidly locomoting animals in an open field, especially in the evaluation of forelimb–hindlimb coordination; it can thus remove the subjectivity encountered with other tests, such as the BBB, from the evaluation of forelimb–hindlimb coordination. In addition, the animals are not forced to walk, thus eliminating undesired influences on the results.

In contrast to other locomotor tests, Catwalk analysis provides the experimenter with a very large amount of data concerning different locomotor patterns. One interesting aspect of this test is the fact that different quantitative or qualitative outcome measures are differently sensitive to different SCI models. For example, the regularity index nicely reflects the neurological impairment resulting from complete transection or contusion injury, but it fails with dorsal column transection. This problem was discussed in detail by Hamers et al. (2006). The animals need to be pre-trained to cross the Catwalk runway without any hesitation or stress reactions. Importantly, the gait velocity should be controlled by the fact that training of the animals results in runs with a stable crossing time of the runway between 1 and 2 s, as described by Deumens et al. (2007). This requirement is based on the fact that different gait velocities—for example, trot and pace, have a different order of paw placings, i.e. the regular step patterns. Thus, the regularity index might be different in an animal when it runs at a different speed or, more importantly, changes its speed throughout the runway. Other pitfalls of the CatWalk[®] analysis were recently reviewed by Hamers et al. (2006). It should be noted, that the CatWalk system is still under development, and new methods of obtaining additional data are expected to be developed in the near future (Hamers et al., 2006).

4.6. Footprint analysis test

One of the earliest descriptions of walking tract footprint analysis was published by de Medinaceli et al. (1982). Later, several modifications were developed (Chan et al., 2005; Metz et al., 2000). This test is based on a walking analysis of paw-colored animals across a narrow, paper-covered wooden beam, 1 m in length and 7 cm wide. Pre-training of the animals is required. A different color dye is used for forelimbs and hindlimbs to distinguish between them. The distance between corresponding steps, the angle of the paws (an indicator of walking stability and body balance) and the ability of the paw to support the animal's body are evaluated (Chan et al., 2005; de Medinaceli et al., 1982; Metz et al., 2000). A series of at least eight sequential steps is used to determine the mean values for each measurement of limb rotation, stride length and base of support. The base of support is determined by measuring the core-to-core (midpoint) distance of the central pads of the hind paws. The limb rotation is defined by the angle formed by the intersection of a line through the print of the third digit and a line through the central pad parallel to the walking direction. Stride length is measured between the central pads of two consecutive prints on each side.

It is unfortunately true that individual and motivational factors can greatly interfere with the quantification. In addition, walking velocity influences the length of single steps (Metz et al., 2000). In animals that have only partial weight support and little plantar placement, measurements of angle and stride length are almost impossible. It has been shown that footprint analysis can serve to refine observations made using the BBB or other motor tests for weight support trunk stability and foot placement (Metz et al., 2000). The use of only footprint analysis for evaluating recovery in SCI rats would probably not be optimal.

A recently developed system for gait analysis—the DiGiGaitTM[®] system (Mouse Specifics, Inc., Boston, USA)—overcomes the imperfections of footprint analysis. No dyes are used, and the data are obtained and subsequently analyzed by a computer. The device includes a transparent treadmill belt, which allows a camera and subsequently image processing software to identify and analyze the paw contact with the treadmill surface. The system is able to analyze horizontal or inclined gait dynamics, treadmill and overground locomotion and coordination. The analysis of treadmill locomotion is possible at different speeds (range 0–100 cm/s). Although it was also developed for behavioral analysis of rats or guinea pigs, up to now it has been used mainly in gait analysis of spinal cord injured mice (Li et al., 2005).

4.7. Kinematic analysis

The kinematic measurement of step cycles provides an assessment of the individual components of limb movement in two or three dimensions (Metz et al., 1998;

Westerga and Gramsbergen, 1990). Two-dimensional kinematic analysis is usually performed because the predominant motion of the hindlimbs can be assumed to be planar; therefore, movements of the rat hindlimb joints distal to the hip are primarily those of flexion and extension and movements in the coronal and transverse planes are often neglected (Gasc, 2001; Gillis and Biewener, 2001). For kinematic analysis, the tested animal's hindlimb is shaved and the iliac crest, greater trochanter, lateral malleolus and the fifth metatarsophalangeal joint are marked with ink visible in normal or infra-red light or with glued-on circular light-reflecting discs (Filipe et al., 2006). While the position of the knee joint is obscured by loose skin coverage, it is calculated by using hip and ankle joint positions and external individual measurements of femur and tibia length. The proper position of the markers is crucial—if the marker deviates by as little as 2 mm in placement, the result can be as much as a 10° change in angular joint measures (Basso, 2004). Moreover, soft tissue movement over the limb joints might significantly alter the position of the marker, which will subsequently lead to misleading artifactual results. To prevent this, the marker should be attached or pointed to skin areas that are tightly attached to the underlying connective tissue (Filipe et al., 2006). Considering that soft tissue artifacts are recognized as a major error source in human motion analysis (Andriacchi and Alexander, 2000), skin markers respecting the underlying bone, such as bone pins (Yack et al., 2000), external fixators (Cappozzo et al., 1996) or percutaneous trackers (Manal et al., 2003), have been employed. Paradoxically, due to their invasive nature, they are not applicable for repeated use in laboratory rodents (Filipe et al., 2006). After positioning the markers, the animal is made to walk on a treadmill and recorded using a digital video camera. The rigorous selection and maintenance of the treadmill speed throughout the entire session and in all rats in the experiment is crucial because the timing and the amplitude of excursion of most kinematic variables during each step cycle differ among gaits (Gillis and Biewener, 2001). On the basis of the animal's strain, age and general health status, the speed is usually set between 50 and 400 mm/s. The marker coordinates are used to calculate the knee position and to find the maximum flexion–extension range of each joint. In a spinal cord injured rat, the joint that shows the highest diversity of movements and thus is most suitable for reflecting the recovery of locomotor function is the ankle (Basso, 2000). The flexion–extension range is measured at the initiation of the swing phase, in the middle swing phase, and in the phase in which the paw initially contacts the ground. The middle stance phase is used to determine the weight support. The limb movements of a set number of step cycles, defined as flexion and extension of the limb, are analyzed frame-by-frame and averaged. In order to reduce inter-individual differences, a percentage ratio is calculated from the pre-operative baseline values (Metz et al., 2000). Isolated analysis of foot trajectories from the lift-off phase to the

step-down phase, including horizontal step length and vertical step amplitude, reconstructed in two-dimensional space, is also possible (Cho et al., 1997). Although less important, the technique also allows the experimenter to acquire quantitative data. From the videotapes, the number of hindlimb steps can be obtained (Coumans et al., 2001).

Although time-consuming, this method allows the detection of discrete deficits in the gait and can be utilized for normal and treadmill walking. If the animals show no weight support but do undertake limb movements, a qualitative assessment can be made. Otherwise, this method can quantify foot placement, limb coordination and exact joint angles. This technique adds precise information to other locomotor tests, such as BBB or footprint analysis, and provides a detailed description of step cycle duration and phase relations (Metz et al., 1998, 2000). In order to exclude differences in motivation and motor learning, it is very important to sufficiently train the animals before testing (Filipe et al., 2006). In severely injured animals without weight support and consistent stepping, kinematic analysis is not able to provide any important data and should be replaced by other tests such as the BBB. An alternative to kinematic analysis is cineradiography, introduced by Fischer et al. (2002), in which the displacements of the bones are imaged directly. Although it is precise and non-invasive, it is expensive and potentially dangerous due to radiation emission (Filipe et al., 2006; Fischer et al., 2002; Freeman and Pinskerova, 2005).

4.8. Thoracolumbar height test

This test was developed by van de Meent et al. (1996, 1997) in order to more precisely differentiate between full and partial weight bearings. The idea of this test is based on the knowledge that the height of the thoracolumbal kyphosis depends on a rat's ability to support weight on its hindquarters. Before the beginning of a testing session, the maximal convexity of the thoracolumbar kyphosis is marked on the skin with ink. The animal is put into a transparent walkway corridor, and the position of the marker is monitored during the rat's crossing of the walkway using a video camera connected to a computer equipped with software developed by Frank Hamers's laboratory. The position of the thoracolumbal kyphosis is determined 50 times per second and stored for subsequent off-line analysis (van de Meent et al., 1996, 1997; Van Meeteren et al., 2003). van de Meent et al. (1996) also showed that the thoracolumbar test is more sensitive than Tarlov's open field test for correctly discriminating walking patterns, particularly in the moderate to light severity range of injury. We can speculate that this test would also be able to add unique and important data to that obtained with the BBB test. In mildly or very severely injured animals, its usefulness is very limited.

4.9. Swim tests

Normal rats swim with their body almost parallel to the water surface, with their head, neck and approximately 30% of the dorsal surface of their backs above the surface and the tail at or just below the surface. They use their hindlimbs to provide forward motion by rapid, alternating hindlimb strokes; forelimbs are tucked under their chins and used only occasionally for steering. They exhibit none or only a small degree of rotation along their long axis. By contrast, thoracic spinal cord injured rats prefer forelimbs for their forward movement and exhibit different degrees of posterior body part submersion and trunk instability (Smith et al., 2006a, b). The major advantages of swim tests are the support provided to the animal by the water and the necessity to locomote, due to the lack of sufficient buoyancy to stay afloat without such locomotion, a condition that is not typical in other tests such as open-field based tests.

Originally, the swim test was performed by placing a rat in a pool with a diameter of 125 cm. The movement of the hindlimbs during swimming was evaluated for 45 s, and the rats were scored between 0 and 3, with 3 assigned to rats with a normal performance (Gale et al., 1985; von Euler et al., 1997).

A modification of the swimming test was developed by Arvanian et al. (2006). Rats are gently placed in a 40 cm diameter tub filled with warm water and allowed to swim for 15 s. The sessions are videotaped, and the frequency of rear-leg (hindlimb) kicking is quantified. This test results in significant swimming even in neonatal rats that cannot ambulate on a solid surface (Arvanian et al., 2006).

A recent swim test was developed by Martin Schwab's laboratory (Liebscher et al., 2005). The animal is put into a rectangular Plexiglas basin (150 × 40 × 13 cm). The level of the water (23–25 °C) is high enough to prevent the rat from touching the bottom of the basin. Intact animals swim by paddling with their hindlimbs and their tail, holding their forelimbs immobile under their chin. A total of five runs per rat are monitored using a mirror placed at a 45° angle on the bottom of the pool in order to film the rats from the side and the bottom simultaneously. The swimming performance is analyzed by scoring their movements according to the forelimb usage, hindpaw distance, hindlimb stroke and tail movement. Normal swimming results in a score of 7–8 points, while no locomotion receives a score of 0 (Liebscher et al., 2005).

Scientists from David Magnuson's laboratory in Kentucky recently developed the 18-point Louisville swim scale, based on grading an animal's performance during swimming in a 150 cm long, 18 cm wide and 30 cm deep tank, filled with warm tap water, where an adjustable Plexiglas ramp, covered with soft neoprene, is present at one end of the pool (Smith et al., 2006a). After the trial, the hindlimb movement performance, hindlimb alternation, forelimb dependency, trunk instability and body angle are evaluated from a video camera record and graded in summary from 0 (severe injury) to 17 (normal perfor-

mance). Animals with 0–5 points are designated poor swimmers (severe disturbance of all parameters; hardly able or not able to swim), animals with 6–11 points intermediate swimmers (occasional or frequent occurrence of the monitored characteristics; able to swim with visible problems) and animals with 12–17 points as good swimmers (normal or almost normal characteristics; able to swim well). The generation of the scale was based on and evaluated in accordance with the BBB scale. Experiments in the Magnuson laboratory indicate that the scale is very useful for evaluating mild, moderate and moderately severe thoracic SCIs, where it is comparable to the BBB. Conversely, it is not reliable in evaluating severe injuries, in cases where the animals use only their forelimbs for swimming. The hindlimbs of the animals are passively spread, and thus the trunk stability and body angle are not impaired, distorting the results (Smith et al., 2006a).

4.10. Eshkol–Wachmann notation

Eshkol–Wachmann movement notation (analysis) was originally created for recording dance movements in humans by Eshkol and Wachmann (1958). It was designed to enable choreographers to write a dance down on paper that dancers could later reconstruct in its entirety, in a manner analogous to a musical score (Eshkol and Wachmann, 1958). It views the body as a set of limbs connected with joints; the body is treated as a system of articulated axes and a limb as any part of the body that either lies between two joints or has a joint and a free extremity. The notation system has been used to describe the details of rat forelimb movements during precision reaching (Farr and Whishaw, 2002; Whishaw and Pellis, 1990). Through single-frame analysis of videotaped recordings, each behavior is subdivided into separate movements of the component limbs and limb segments, and a rating scale is applied to each component. The strength of this approach is that the individual movements by which an animal accomplishes a task can be identified in detail. The Eshkol–Wachmann notation of reaching movements in animals with and without spinal cord lesions reveals differences that are neither noted from cursory visual examination of videotapes nor can these differences be detected using endpoint measures of reaching success. Although Eshkol–Wachmann notation is not a quantitative method, it has proven useful as a screening device to identify movement differences, which can subsequently be quantified with other tests (Muir and Webb, 2000; Whishaw and Pellis, 1990; Whishaw et al., 1993). It has been also used for evaluating exploratory behavior in rats during the cylinder test (Gharbawie et al., 2004).

5. Motor tests

In this section, behavioral tests that test skeletal muscle function not primarily involved in locomotion are discussed.

5.1. Inclined plane

The inclined plane is a 28 × 30 cm floor covered with a grooved, 1 mm thick rubber surface and 20 × 30 cm walls, 10 cm high on three sides. This task evaluates the animal's ability to maintain its body position on a board that is incrementally raised to increasing angles. The rat is placed on the inclined plane with its head down, up, to the right or to the left. Alternatively, it can be placed in such a position that its body is perpendicular to the axis of the plane. Usually, testing in two upright directions, called bidirectional inclined plane testing, is sufficient (Pearse et al., 2005). The angle of inclination is then gradually increased towards the vertical position until the rat can no longer remain in place at the starting position. The greatest angle at which the rat can maintain a stable position for 5 s is recorded. Performance on the inclined plane correlates with the integrity of the rubrospinal tract and other non-pyramidal pathways after SCI (Fehlings and Tator, 1995). In addition, this test can be used as an index of animal strength (Gale et al., 1985; von Euler et al., 1997). The inclined plane has been shown to be a sensitive and reliable test for clip compression injury (Fehlings and Tator, 1995; Rivlin and Tator, 1977).

5.2. Limb hanging test

This test, introduced by Diener and Bregman (1998), utilizes the natural grasping function of the paw. Although it is able to evaluate both forelimb and hindlimb function, it is mainly employed for testing forelimb muscle function in animals with cervical spinal cord lesions (Pearse et al., 2005). The stimulation is provided using a 12-cm long and 1.8 mm wide rounded metal rod, which is applied to the volar surface of the forepaw, and the presence or absence of grasping and the release time in seconds are evaluated. In addition, the testing of animal's forelimb muscle strength is also possible, when the rod is elevated above the surface and suspended. The contact of the body, hindlimb or tail with the ground or parts of the equipment on the sides should be prevented. The time the rat holds onto the suspended rod is measured and recorded. The testing should be done repeatedly, typically five times, and the mean values calculated (Pearse et al., 2005). In severely injured animals, the forelimb hanging test provides only dichotomous yes/no data; it should thus be employed in combination with other tests or replaced by other tests. It should be noted that a normal or mildly impaired animal might pull itself on top of the hanging device, rendering such a trial immeasurable (Pearse et al., 2005). We believe that this can be prevented by using a rotating rod.

5.3. Limb grip strength test

The limb grip strength test was developed on the basis of the previous test in order to assess neuromuscular function, in particular strength, by sensing the peak amount of force

an animal applies in grasping a specially designed pull bar assembly. This test can be used for evaluating both forelimb and hindlimb function. It requires a special device called a grip strength meter (San Diego Instruments, CA or Columbus Instruments, OH), which is constructed on the basis of the Meyer Method (Meyer et al., 1979). The animal is gently held and permitted to grasp with its limbs a mesh grip attachment that has been placed on a digital force gauge. The animal is then drawn along a straight line leading away from the sensor until the animal releases the grip mesh. At this point, the maximum grip strength in Newtons is attained and displayed. The values can be recorded manually or the whole device can be connected to a computer. Usually, three consecutive trials are undertaken (Pearse et al., 2005). The weakness of this test is similar to that of the previous test—it is not able to evaluate severely injured animals. In addition, special equipment is needed. However, the obtained data are precise and unique—not many tests are able to measure limb muscle strength using such a simple method.

5.4. Forelimb asymmetry test

The forelimb asymmetry test (paw preference test, limb-use asymmetry test, cylinder test) is sensitive to asymmetries produced by a variety of central nervous system insults, including SCI at the cervical level. It is a natural feature of a rat to explore vertical surfaces by rearing up on its hindlimbs and exploring the surface with its front paws and vibrissae (Gharbawie et al., 2004). The number of times an animal in a clear upright plastic cylinder independently places its left, right or both forepaws against the side of the so-called Schallert's cylinder during weight-supported movements is recorded using a video camera, counted and analyzed. Limb use is scored as the percentage of left, right, or both-limb wall placements relative to the total number of placements observed. It is also possible to obtain a single limb-use asymmetry score by subtracting the percentage of independent use of the impaired limb from the percentage use of the unimpaired limb. Higher numbers then indicate a greater bias for the use of the unimpaired limb. It is important to prevent the habituation of the rat to the cylinder by testing during the dark cycle and by dividing long trials into shorter segments separated by several minutes, during which the rat is placed back in its home cage. A notable feature of this test is its high degree of sensitivity to chronic deficits that might be masked by post-lesion compensatory behaviors. In addition, it is able to detect chronic sensorimotor deficits that many tests fail to detect (Gensel et al., 2006; Schallert et al., 1986, 2000; Schallert and Woodlee, 2005).

5.5. Rearing test

The equipment required for the rearing test is similar to that for the forelimb asymmetry test, but the idea behind the test is different. The rats are tested individually in an

open field for a period of 10 min by an investigator blinded to the treatment condition. The sessions are videotaped and the number of rearings quantified from the videotape. This test is a sensitive measure of the selective use of the hindlimbs defined by the simultaneous lifting of both front paws off the floor and then adopting either a free standing posture or leaning up in a standing position against a side wall for balance with most weight still supported on the rear paws. The smooth plastic surface of the cage prohibits the rat from compensating for rear limb weakness by using the front paws to pull itself up to a rearing stance (Arvanian et al., 2006).

Animals with moderate and moderate-severe SCI rarely develop weight supported rearing. Rather, they explore with their forelimbs from a crouched position and their rearing action is then called attempted rears. One possibility is to analyze the number of such rears during a 3 min observation period and then to analyze them separately (Yoshihara et al., 2006).

5.6. Food pellet reaching test

This examines the ability of the forelimbs to reach, touch, grasp and retrieve a food pellet. For SCI experiments, it can thus be used only for lesions at the cervical level. The objective performance of the test requires pre-training the rats to reach a 190 mg food pellet through a 1–2 cm wide opening in the wall of a clear Plexiglas box (30 × 36 × 30 cm). During the test, the retrieval of each food pellet is documented using one or two video cameras for further analysis. To ensure that the rat approaches the opening with a new stance on every reach, a 45 mg pellet is dropped into the back of the box each time the rat retrieves the pellet, so the rat is encouraged to leave the reaching area. The “success rate” of food grasping is calculated as the number of times the rat successfully grasps and retrieves the food pellet, divided by the number of attempts. For evaluation, a 10-point scale developed by Whishaw (2000) is used, which scores the successful execution of the sequential aspects of the reach, i.e. reaching, grasping and retrieval of the pellet. In addition, the amount of time needed to grasp 10 pellets can be measured (Chan et al., 2005; Whishaw et al., 1993; Z’Graggen et al., 1998). A modification of the foot pellet reaching test is the staircase test (paw reaching test), used mainly for the behavioral testing of rats after stroke (Montoya et al., 1991; Grabowski et al., 1993).

6. Sensory tests

Here are included the behavioral testing methods able to detect sensory system disorders in terms of hyperactivity (hypersensitivity, allodynia) or hypoactivity (decrease or loss of sensoric functions) of the sense of touch, cold, heat, or pain. To locate the borderline between a sensory-motor response involving both the sensory ascending and descending motor pathways and a pain-based withdrawal

reflex–response is not always possible. For example, in hot plate-based tests, the limb can be withdrawn due to either the sensing of heat or the stimulation of nociceptive endings on the basis of skin damage. Although a cut-off time is utilized to prevent the latter, one cannot always be sure that all responses are based on proper temperature sensing.

6.1. Hot plate-based tests

Several different variations of the hot plate withdrawal test equipment and arrangement exist. For example, Gale et al. (1985) used a hotplate pre-heated to 50 °C for a period of 60 s and measured the time that transpired before the rat licked each hindpaw. Animals which showed no reaction were removed after 60 s to avoid paw injury. A standardized and commercially available example of such a test is the Plantar Heater Test (Ugo Basil, Comerio, Italy), in which three rats are put into three separate plastic cages and each animal is tested three times (sequence 1, 2, 3, 1, 2, 3, 1, 2, 3) (Fig. 1). It is crucial to always test the same part of the limb during the entire experiment, usually the center of the rat’s hindpaw sole (Hargreaves et al., 1988). The cut-off time of a movable infrared generator, located under the Plexiglas floor of the cages, is usually set to 35 s, and its intensity is set between 50 and 60 units, which correspond to the midpoint of the emission range. This testing arrangement precludes any injury to the animal’s paw (Hargreaves et al., 1988; Syková and Jendelová, 2005; Syková et al., 2006a; Urdzíkova et al., 2006). A modification of the plantar hot-plate test is the tail-flick test. The testing procedure is the same with the exception that the base of the tail is heated (Merkler et al., 2001).

6.2. Cold sensitivity-based tests

In the cold-spray test, ethyl chloride is sprayed on shaved skin and the response of the animal is recorded and graded as: 0—no response, 1—localized response, i.e. transient skin twitch, 2—transient vocalization, 3—sustained vocalization (Yu et al., 1998; Vaquero et al., 2006). Another option for testing cold sensitivity is the application of 100 µl of acetone onto the plantar hindpaw. The response to five applications of acetone is recorded and converted to



Fig. 1. A plantar apparatus (Ugo Basile, Comerio, Italy) which measures the hind paw withdrawal latency from a radiant heat source (arrow). Note that three rats can be tested in one session.

a percentage. At least 3 min should elapse between each session (Choi et al., 1994).

6.3. *Von Frey filaments*

Von Frey filaments (Von Frey hairs, Semmes-Weinstein monofilaments) are often used to evaluate the degree of mechanical allodynia—one type of neuropathic pain resulting in an increased sensitivity to innocuous stimuli, i.e. stimuli that are not painful for an uninjured animal or person (Gris et al., 2004). The calibrated filaments of ascending target forces (0.008–300 N or 2.5–125 g) are sequentially applied to the plantar surface of the forelimb or hindpaw, with a pressure that causes a slight bend of the filament, until a withdrawal response is elicited. Usually, a Plexiglas box with a fine-grid bottom is used (Liebscher et al., 2005). If a Plexiglas box is not available, testing might be done in the tester's hand, but a food reward throughout testing should be given to prevent visual recognition of the application of the filament. A positive response occurs when the paw is briskly withdrawn from the filament. This response might be accompanied by flinching, escape, licking, vocalization or abnormal aggressive behaviors (Gris et al., 2004). After a brief 3–5 min rest period, the paw should be re-tested with the same filament. Since a change in the absolute number of withdrawals to a stimulus may indicate an increase in the spinal reflex and not the development of allodynia, only withdrawals accompanied by supraspinal behaviors, such as head turning to attend to the stimulus or biting the Von Frey filament, are counted as a response (Chan et al., 2005; Hutchinson et al., 2004; Levin et al., 1978; Mills et al., 2001).

6.4. *Paw compression test*

This test, first described by Randall and Selitto (1957), enables the tester to measure hindpaw hyperalgesia. For the procedure, a commercially available analgesia meter can be used (Ugo Basile, Comerio, Italy), in which a plastic device is in contact with the third interdigital space of the hindlimbs, which are lying on a plane surface. A progressive weight is then applied and the test stopped when the animal performs any movement of the paw or when the weight reaches a maximum, cut-off level. The force at which the rat withdraws its hindpaw is noted, multiplied by 10, and the withdrawal force in grams is thus obtained (Randall and Selitto, 1957; Giglio et al., 2006).

6.5. *Withdrawal reflexes*

Withdrawal reflexes are a group of stimulus-based reflex response reactions. They are evaluated as to both the speed and the force with which the hindlimb is withdrawn when stimulated by extension, pain, or pressure. This is done by pulling the hindlimb backward with 2 fingers (extension),

pricking the sole of the foot with a needle (pain), or pressing the foot between the tester's thumb and index finger (pressure). The reflex response is considered absent, normal or abnormal (Gale et al., 1985; von Euler et al., 1997). Although their performance does not need any special device and is thus quite inexpensive, such tests are not very sensitive and can be only used for evaluating the integrity of spinal segmental reflex circuits. However, in many SCI models, mainly the ascending and descending pathways are disrupted, so the use of withdrawal reflexes in such models is very limited.

7. *Sensory–motor tests*

An accurate response in such behavioral tests requires functional sensory and motor systems and, most importantly, their proper connection.

7.1. *Rope walk testing*

Experimental animals have to cross a 125 cm long horizontally oriented rope, 4 cm in diameter, three times between two platforms. During each run the number of slips and falls is counted. Successful completion of this task requires hindlimb weight support, precise paw placement, posture and coordinated balance of the body. This test is very sensitive to unilateral lesions, such as hemisections. Trained unlesioned rats cross the rope quickly, seldom slip and do not fall. Usually, the “total error/step” ratio is counted (no. of slips + 2 × [no. of falls] / [total no. of steps]) (Kim et al., 2001) or a 0–4° scale is used to evaluate the locomotor performance. Each rat is tested three times. A limitation of this test might be the required training of the rats, which can take five weeks before the experiments (Kim et al., 2001; Ruitenberg et al., 2003).

7.2. *Narrow beam test*

In the narrow beam test (beam walking test), originally described by Hicks and D'Amato (1975), three types of beams are used as narrow pathways: a rectangular 2.3-cm wide beam, a rectangular 1.2-cm wide beam and a round dowel of 2.5-cm diameter. All beams are 1 m long and elevated 30 cm from the ground. The pre-training of rats is required, and the rats must be able to transverse the horizontal beams with less than 3 footfalls. A scoring system is used for each beam: 0 indicates the complete inability of the animal to walk on the beam and an immediate fall, 0.5 if the animal is able to traverse half of the beam, 1 point is given for traversing the whole length, 1.5 when stepping with the hindlimbs is partially possible and 2 points are awarded for normal weight support and accurate foot placement. Thus, the scale ranges from 0 (0 + 0 + 0) to 6 (2 + 2 + 2) (Hicks and D'Amato, 1975; Metz et al., 2000). Quantitative assessment of narrow beam performance is a very sensitive tool to monitor even discrete deficits in foot placement and body balance,

including tail movements. Another advantage of this paradigm is that the difficulty of this task can be varied via the narrowness of and the shape of the beams. The ability of rats to cross a narrow beam is dependent upon the function of spinal networks as well as on supraspinal motor control from the cortico-, rubro-, and possibly the vestibulospinal tracts (Metz et al., 2000). In paralyzed animals, such a scoring system can be useful since the rats can be trained to traverse the beam without the use of the hindlimbs by crawling with the forelimbs only. In the scoring system, these observations can be taken into account (Metz et al., 2000). Modifications of this test have also been developed, for example, von Euler et al. (1997) used seven different planks of different widths, on which the rats are tested in sequence from the widest to the narrowest. The narrowest plank that a rat can cross without slipping is recorded.

The use of a tapered and/or ledged beam is also possible, although its use predominates in the behavioral testing of rats following stroke. In this test, the rats are first trained and then allowed to traverse an elevated beam that is tapered along its extent and has an underhanging ledge that the rat can use as a crutch if it slips. The difficulty of this test increases as the rat moves along the narrowing beam, leading to more foot faults. Hindlimb foot faults are measured as an index of hindlimb function. The strength of this test is that it does not allow the rat to mask its motor deficits by compensatory mechanisms (Ohlsson and Johansson, 1995; Sutton and Feeney, 1992; Schallert and Woodlee, 2005; Schallert et al., 2002).

7.3. Grooming test

This test was originally developed by Bertelli and Mira (1993) for testing recovery in a brachial plexus injury model. Now, it is often used for testing following SCI in the cervical region (Gensel et al., 2006). Cool tap water is applied to the rat's head and back with soft gauze, then the animal is returned to its home cage. Grooming activity is then recorded by a video camera and evaluated. The scale is set between 0 and 5. Zero reflects the inability of the animal to contact any part of its head while 5 represents a normal animal, able to contact the area above the ears with its forepaws (Bertelli and Mira, 1993; Gensel et al., 2006).

7.4. Foot slip test

In the foot slip test (horizontal ladder walking test), animals walk along a horizontal ladder with variable rung spacing. The ladder consists of side rails and metal rungs, with a platform on each side. To prevent the animals from learning the pattern and anticipating the position of the rungs, the distances between metal rungs are irregular and the pattern differs depending on whether the animal is walking from the left or the right side. Crossing the

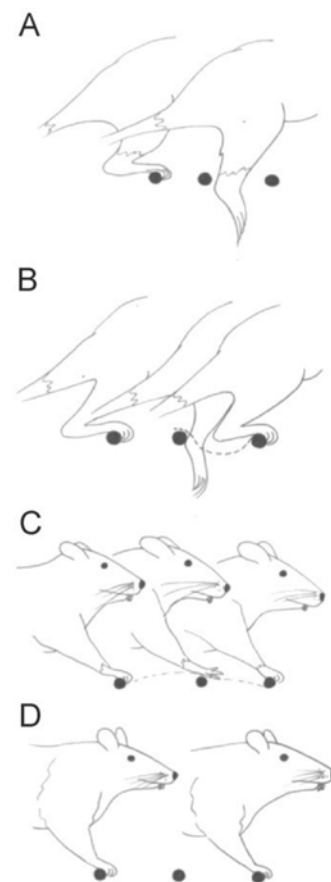


Fig. 2. Representation of the four horizontal ladder movement categories. (A) Miss. (B) Slip. (C) Touch. (D) Step.

horizontal ladder requires that animals accurately place their limbs on the bars (Fig. 2). Walking over the ladder is recorded with a video camera and analyzed in slow motion. The foot slip (missteps, errors) frequency is calculated as the number of foot slips by each limb divided by the total number of steps (Chan et al., 2005; Metz and Whishaw, 2002). In addition, qualitative evaluation of forelimb and hindlimb placement can be performed using a foot fault scoring system (Table 7), developed by Metz and Whishaw (2002).

7.5. Grid walking test

The grid walking test (grid walk test, foot fault test) is a very sensitive test for evaluating the sensory–motor coordination of the forelimb and hindlimbs and the descending motor control of the limb motor pathways. Animals are allowed to cross a 1–1.2 m long grid with irregularly assigned gaps (0.5–5 cm in diameter) between round metal bars while the number of limb displacements, described as both foot falls or foot faults, is counted and averaged. In addition, plastic garden fencing (3 ft × 3 ft) stretched over a metal frame can also be used. Crossing the grid requires that the animals accurately place their limbs on the bars. If an animal is not able to move its hindlimbs,

Table 7
Foot fault scoring system

| Category | Type of foot misplacement | Characteristics |
|----------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0 | Total miss | Deep fall after limb missed the rung |
| 1 | Deep slip | Deep fall after limb slipped off the rung |
| 2 | Slight slip | Slight fall after limb slipped off the rung |
| 3 | Replacement | Limb replaced from one rung to another |
| 4 | Correction | Limb aimed for one rung but was placed on another Or: limb position on same rung was corrected |
| 5 | Partial placement | Limb placed on rung with either digits/toes or wrist/heel |
| 6 | Correct placement | Mid-portion of limb placed on rung |

Reprinted from the Journal of Neuroscience Methods, 115, Metz GAS and Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate forelimb and hindlimb stepping, placing, and co-ordination, pp. 169–179, copyright (2002), with permission from Elsevier.

a maximum score of 20 is given. The numbers of errors counted can be also classified as a non-parametric grid walk score: 0–1 error is scored as 3 points, 2–5 as 2 points, 6–9 as 1 point and 10–20 footfalls as 0 points. Every animal has to cross the grid at least three times (Behrmann et al., 1992; Metz et al., 2000).

To successfully cross the grid, the animal requires normal forelimb–hindlimb coordination, which is mediated by ventrolateral tracts, a functioning reticulospinal system to initiate the stepping rhythm, as well as voluntary movement control, which is predominantly mediated by the corticospinal and rubrospinal systems in rats (Metz et al., 2000). Therefore, complex tasks such as the grid walk paradigm can reveal deficits that are not apparent during normal locomotion. In order to improve the effectiveness of the training and reduce the training effect of repeated trials, a variably spaced grid should be used. However, gait velocity and stress can influence the outcome of this task—more foot faults may occur when animals are crossing the grid faster or inattentively. By using a 4-point rating scale and respecting the animal's individuality, this interference can be filtered out (Metz et al., 2000, 2001). The most beneficial aspect of this test is the possibility to focus on the isolated function of the hindlimbs in thoracic spinal cord injured rats, whereas these injuries do not produce noticeable deficits in overground locomotion in quadrupedal rats in comparison with humans, in whom they are enough to produce a complete loss of walking ability (Norrie et al., 2005). This test is, however, useful mainly for low or moderate SCI, after the rats are able to accomplish weight-supported hindlimb plantar placement and some degree of coordinated stepping; otherwise they simply drag their hindquarters across the runway. Thus, some authors start to use it after the time at which the rats gain such locomotor skills (Gris et al., 2004).

8. Reflex response-based tests

8.1. Toe spread reflex

This reflex is studied by lifting the rat by its tail with its legs hanging free and observing the spread of the toes. The reflex response is considered absent, normal or abnormal. An abnormal response presents as hyperextension and/or shaking of the toes or feet (Gale et al., 1985; von Euler et al., 1997). For several days after injury, there is no response, followed by an abnormal response. A hyperactive hindlimb response seems to reflect decreased control of the locomotor system from the upper motor neurons. Subsequently, the reflex response normalizes, first as a minimal spread of the toes, then the full normal response develops (Seki et al., 2002).

Toe spread is caused by the contraction of the musculi interossei and the abductor hallucis muscle, which are innervated by the common peroneal nerve, which is a branch of the sciatic nerve. For this reason, the reflex is also used for evaluating regeneration after experimental sciatic nerve damage (Pockett and Philip, 1987; Renno et al., 2006).

8.2. Contact placing response test

The contact placing response test (tactile placing test, hindlimb placing test) is based on the fact that contact placing of the hindpaw can be elicited by lightly touching the skin of the dorsal side of the foot without any joint displacement—the animal responds by lifting the hindlimb and placing it upon the obstacle (Kunkel et al., 1993; Metz et al., 2000). The animal is held, supported by the upper body, with the hindlimbs hanging free. The dorsum of each foot is touched with the edge of a piece of paper. The total number of placing responses of 10 trials per limb is noted, and the placing rate for the individual animal is determined from baseline data taken as 100% (Kunkel et al., 1993; Metz et al., 2000). The old version of this test is called the placing reflex test, in which the lateral and dorsal aspects of each foot are rubbed against a table to elicit the reflex response. The speed and accuracy in placing the foot on the table are evaluated. The reflex response is considered absent, normal or abnormal (Gale et al., 1985; von Euler et al., 1997).

Unfortunately, the placing reactions of injured and even normal rats are variable, so this test might provide distorted results when not used in combination with other tests (Metz et al., 2000). This finding was confirmed in spinal cats (Forssberg et al., 1974). The placing response might also depend on muscle tone—after acute SCI, paralyzed animals often show a clearer placing reaction than do normal animals. One way to reduce intra-individual variability is to calculate the ratio of post-operative to pre-operative values.

The development of placing responses temporally correlates with the post-natal growth of corticospinal

axons into the gray matter of the spinal cord. In normal animals, a tactile hindlimb response first appears on post-natal day 13 and slowly declines with age (Donatelle, 1977). In a study by Marshall (1982), the reflex response was present in 90% of rats 6–12 months old but in only 24% of animals older than 24 months. Proper contact placing thus depends on the integrity of the corticospinal tract and cortical control. In cats and rats, this reflex has been shown to be dependent upon spinal circuitry that normally is under supraspinal control, but which remains elicitable in decerebrate animals (Woolf, 1984). Another study indicates that the tracts running in the ventrolateral part of the spinal cord may play a role in mediating this reflex response (Metz et al., 2000).

8.3. Righting reflex

The righting reflex (static reflex) is usually defined as any one of a number of various reflexes that tend to bring the body into a normal position in space and resist forces acting to displace it from its normal position. In experimental SCI, righting reflex testing usually means the time in seconds spent by an animal to assume a normal ventral position after being placed on its back. It is elicited by holding a rat in one hand, turning it over on its back, 7–8 cm above a cushioned table surface and then dropping the animal. The reflex response is considered absent, normal or abnormal and its length might be measured. In addition, the reflex response might also be rated as 0 (no righting reflex), 1 (attempt to right itself), 2 (rights itself during the drop) or 3 (rights itself immediately after the drop) (Gale et al., 1985; von Euler et al., 1997). The righting reflex response might be affected by previous sleep deprivation (Tung et al., 2005).

9. Autonomic tests

Autonomic system disturbances, such as disruption of urinary bladder function or sexual reflexes, are important complications of SCI in both animals and humans. In the majority of animal studies, the testing of autonomic functions is unfortunately largely neglected, although urogenital system disturbances represent a very important clinical problem in human medicine (for review, see Karlsson, 2006).

9.1. Urinary bladder function

The most common autonomic dysfunction in experimental rats with SCI is detrusor–sphincter dyssynergia of the urinary bladder during the first 1–2 weeks. This affection manifests as urine retention and requires daily manual evacuation of the urine—the Credé maneuver. Emptying the bladder is crucial for avoiding urinary retention, which may cause damage to the bladder wall, with bleeding and renal damage by urine reflux. The increased chance of acquiring a urinary infection is clear.

The bladder function scoring system was developed by Martin Schwab's lab (Liebscher et al., 2005) as follows: (i) dysfunction is defined as a full bladder, medium to high pressure required for manual voiding of the bladder; (ii) normal function is an empty to half-full bladder, voiding after a slight touch. Following SCI at the cervical level, detrusor–sphincter dyssynergia does not occur, so the animals do not need this kind of intensive care (Soblosky et al., 2001).

For the quantitative study of the various phases of the urinary bladder voiding cycle, a cystometric procedure, described by Maggi et al. (1986) that involves a non-stop transvesical infusion of warm saline in anesthetized rats, might be used. The saline is infused into the bladder through a needle inserted into the bladder's dome. The recording is performed by a transurethral bladder catheter. During the bladder detrusor contractions, fluid is released by flowing around the catheter in the urethra. The signal is amplified, sampled, acquired and analyzed by a special device connected to a computer (Maggi et al., 1986). The main disadvantages of this method, i.e. the necessity of anesthesia and the quite complex nature of the monitoring device, are compensated for by the acquisition of unique and precise data (Maggi et al., 1986; Píkov and Wrathall, 2001, 2002; Yoshihama and de Groat, 2002).

9.2. Erection-based tests

The most frequently used erection-based tests are the ex copula reflex erection test, the non-contact erection test and the mating test. In the ex copula reflex erection test, the preputial sheath of a conscious animal is retracted to elicit a reflex erection and maintained in this position for 20 min by placing the glans of the penis through a hole in a small piece of tape fastened to the abdomen. Events are visually scored from 1 (weak glans engorgement) to 5 (intense flaring or cup of the distal glans together with dorsiflexion or flip of the penile body greater than 90° with respect to the body of the rat) (Holmes et al., 1988; Schmidt et al., 1995; Nout et al., 2007). In the non-contact erection test, a male rat is put into one half of a cage, separated from the other half by a sheet of wire mesh, and left for 5 min to adjust to his new environment. After that, an estrous female rat, whose rut is ensured by the administration of estradiol and progesterone and a preliminary approximation to a healthy male rat, is placed into the second half of the cage and events are observed for 30 min. They are scored using a 3 point scale (1—visible erections, 2—grooming of the body parts, 3—grooming of the genital area) (Sachs et al., 1994; Nout et al., 2007). The mating test has a similar arrangement as the one above, except the male and female rats are put together and the scale is 6-pointed. The first 3 points of the scale are the same and the other 3 points describe the following mating behaviors: 4—mounts, 5—intromissions, 6—ejaculations (Nout et al., 2007).

9.3. Telemetric monitoring

To simultaneously evaluate micturition parameters and describe erectile events in rats with SCI, a new method of telemetric monitoring of corpus spongiosum penis pressure has been recently developed (Nout et al., 2005, 2007). The development of this technique was based on previous experiments by Schmidt et al. (1995). After the minimally invasive implantation of a telemetric pressure transducer catheter, an analysis of the pressure waveforms of micturition, full erectile and partial erectile events together with the video recording of micturition events and the performance of a reflex erection test—ex copulatory reflex erection test (Schmidt et al., 1995)—is possible in conscious, freely moving rats. In the first 3–4 weeks following moderate SCI, continuous dribbling of urine, i.e. a typical sign of overflow incontinence, can be seen on video recordings, which results in no detectable changes of corpus spongiosum penis pressure. Measurable characteristics first appear following the beginning of the return of autonomic–somatic motor function (Nout et al., 2005, 2007).

9.4. Autonomic dysreflexia testing

Autonomic dysreflexia, also known as hyperreflexia, is a massive sympathetic discharge that occurs in both spinal cord injured animals and human patients. It is manifested by often debilitating hypertension accompanied by bradycardia, sweating, skin flushing and pounding headaches. It is triggered by a variety of noxious stimuli, including bladder distention, irritation of the urinary tract, bowel distention or impaction, skin ulcers, fractures, abdominal emergencies or uterine contractions. Autonomic dysreflexia most likely develops on the basis of an injury-induced loss of descending tonic and baroreceptor-related control of sympathetic pre-ganglionic neurons in the intermediolateral cell column of the thoracolumbal spinal cord (Cameron et al., 2006; Gris et al., 2004).

The testing method, also called noxious colorectal distention, is based on monitoring blood pressure during and after bowel distention induced by balloon inflation inside the colon lumen. Before the testing session, the carotid or femoral artery of the animal is cannulated under general anesthesia, and the animal is put into a special cage to prevent damage to the cannula. After 3–4 days, the cannula is connected to a monitoring device, and the animal left to stabilize its blood pressure to obtain a baseline value. This usually does not take more than 10 min. Then, a balloon-tipped catheter is inserted into the animal's colon, slowly inflated with 2 ml of air over 15 s and maintained for 1 min (Ditor et al., 2006). The inflation of the balloon with 2 ml of air generates a colon distension similar to that during the passing of a large fecal bolus, thus mimicking the clinical manifestation of fecal impaction (Cameron et al., 2006; Marsh and Weaver, 2004). An animal is regarded as dysreflexic if colorectal distention

produces a rise in blood pressure and a decrease in heart rate for as long as the period of colorectal distention. More than one trial might be conducted. As autonomic dysreflexia occurs only in spinal injuries above the Th6 level, the use of the testing method would thus be suitable only for cervical and upper thoracic spinal cord lesions (Cameron et al., 2006; Weaver et al., 2001). The main advantage of this test is its ability to uncover the presence of autonomic dysreflexia and thus obtain unique data, reflecting the presence or absence of this pathologic condition. In addition, it provides the experimenter with objective, reliable and precise data. However, this test is relatively invasive and requires a special device for monitoring blood pressure and heart rate. More importantly, it can hardly be performed repeatedly. This can be overcome by performing the test only in one session, most frequently two weeks post-injury (Cameron et al., 2006; Weaver et al., 2001). In case the severity of autonomic dysreflexia is not the only studied parameter, this test should certainly be combined with other tests.

In the future, other types of autonomic tests might be developed based, for example, on changes in the vasoconstriction/vasodilatation of skin vessels due to sympathetic system function changes, including autonomic dysreflexia. Also, the frequent monitoring of temperature might be useful. In some animals, the presence of bowel constipation due to SCI-induced spasticity of the anal sphincter and the decreased activity of the descending colon might be observed and its presence or absence included in the observation protocol. However, constipation does not occur in SCI rats (Santos-Benito et al., 2006).

10. Increasing the skills of the animals

Intensive daily training improves functional locomotor recovery after SCI in both animals and humans (for review see Barbeau et al., 2002), and the benefits are retained for some time after training (Norrie et al., 2005). The recovery of sensorimotor functions in behavioral enrichment procedures is based mainly on the facilitation of neuronal plasticity, including neural or astrocytic growth factor expression, axonal sprouting, synapse remodeling, receptor density changes, neural-glia interactions and cell mitotic activity, differentiation and migration (for review, see Ding et al., 2005). Studies in rodents and humans suggest that the timing of the training onset may be important because a long delay between injury and the commencement of training appears to reduce the beneficial effects of training regimens (Norrie et al., 2005; Wernig, 2006). Thus, a delay period makes SCI victims less responsive to rehabilitative training (Norrie et al., 2005; Wernig, 2006). On the other hand, several authors have shown that post-injury training is task specific; animals that are trained to walk show improvements in walking, training to stand will improve standing but not walking, swimming will improve mainly swimming skills, etc. (De Leon et al., 1998a, b; Hutchinson et al., 2004; Smith et al., 2006a, b). In the future, it should

thus be reasonable to combine rehabilitative techniques, as is being done in humans suffering from SCI. Several behavioral tests can also be used as training methods, for example, the use of a horizontal ladder (Norrie et al., 2005).

10.1. Enriched environment

Although they have no agreed-upon definition, enriched environments are housing conditions that go beyond meeting the fundamental requirements of animal welfare by offering complex and stimulating conditions that are more conducive to natural behavior than what animals experience in standard housing (Döbrössy and Dunnet, 2004). Even the most sedentary of people does not experience as impoverished an environment as a rat living in an isolated home cage (Schallert and Woodlee, 2005). The simplest methods of enriching the environment are increasing the number of cage-mates, introducing additional objects such as wooden blocks or sticks and enriching the food with, for example, forage grains or pellets. Enrichment should also be defined as the presence of sufficient space for hiding or escaping from conspecifics in the cage (Tatlisumak and Fisher, 2006). In contrast to standard housing conditions, animals in an enriched environment have greater opportunities for sensory and motor stimulation, activity, social interaction and exploration of the environment (Fig. 3). It has been shown that an enriched environment promotes neurogenesis within the population of resting stem cells and enhances the recovery from central nervous system injury at both the structural and functional levels (Döbrössy and Dunnet, 2004; Rose et al., 1993; Young et al., 1999). To increase the activity of animals, dairy food might be placed inside the toys of an enriched environment (Santos-Benito et al., 2006).

10.2. Treadmill and running wheel training

Locomotor training has been shown to accelerate locomotor recovery in cats and humans (Barbeau and Rossignol, 1987, 1994), indicating that training can be a valuable tool during rehabilitation. For example, the introduction into clinical practice of weight-supported

training of patients with partial SCI on a treadmill was firmly based on animal research (Barbeau and Rossignol, 1987; Fouad and Pearson, 2004; Harkema, 2001).

Generally, rats do not spontaneously develop rhythmic locomotor movements of the hindlimbs following complete spinal cord transection (Weber and Stelzner, 1977). In quadrupeds with SCI, there is overwhelming evidence that neuronal networks, referred to as central pattern generators, can generate a variety of rhythmic patterns, depending on the manner in which they are activated, the chemical environment, and the extent of isolation from other neural tissue (for review, see Fouad and Pearson, 2004). We know the central pattern generator for each hind leg is distributed within the lumbar region of the spinal cord in rodents (Kiehn and Kjaerulff, 1998). Undoubtedly the greatest uncertainty is whether central pattern generators exist in the human spinal cord (Fouad and Pearson, 2004). Rhythmic stepping movements are not common in patients with complete SCI, but have been frequently observed in patients with severe incomplete injury, in both cases following locomotor training (Dimitrijevic et al., 1998; Wernig et al., 1999).

From studies on experimental animals it is known that a motor pattern for locomotion can be expressed following the application of serotonin (Feraboli-Lohnherr et al., 1999; Gimenez y Ribotta et al., 1998). The challenge, therefore, is to facilitate activity in these networks. It has been shown that treadmill-training techniques (Fig. 4) are effective in improving the locomotor performance of rats with incomplete SCI, most probably on the basis of such activation of the central pattern generator network (Multon et al., 2003; Thota et al., 2001). However, some studies found no effect of such treatment (Fouad et al., 2000).

Similarly, a majority of reports indicates that both combined pre- and post-injury or isolated post-injury running wheel training has beneficial effects on the recovery of neurological functions in spinal cord injured rats (Engesser-Cesar et al., 2007; Hutchinson et al., 2004;



Fig. 3. Enriched environment.

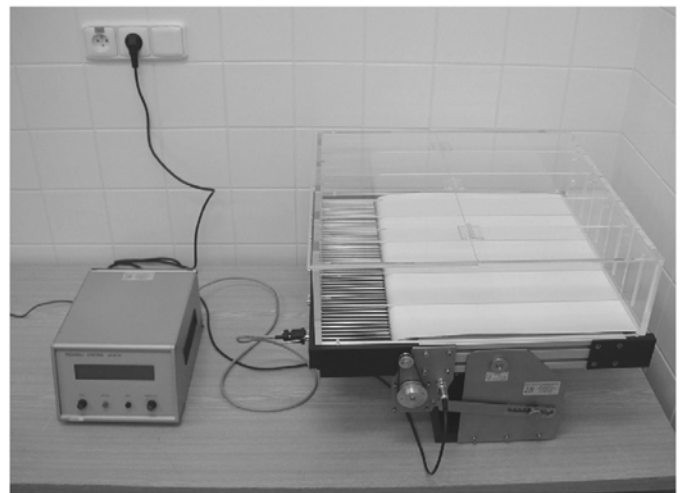


Fig. 4. Treadmill.

Van Meeteren et al., 2003), but some authors have found no effect of such training (Erschbamer et al., 2006). Engesser-Cesar et al. (2007) recently found an increase in serotonin fiber length caudal to the lesion in the running vs. non-running groups, indicating the above-mentioned role of spinal nervous plasticity in terms of the development of the central pattern generator. Interestingly, they did not find a significant difference in behavioral outcome in rats which ran 3 days/week compared to 7 days/week, but both groups had significantly different behavioral outcomes from non-runners (Engesser-Cesar et al., 2007). Taken together, both treadmill and running wheel training might have an important role in the locomotor training of rats suffering from SCI. In addition, it is generally believed that treadmill (Fig. 4) or running wheel-based exercise has mood-enhancing and anxiety-reducing effects (Burghardt et al., 2004).

10.3. Swimming

As stated earlier in regards to swimming tests, swimming is a natural form of locomotion for rodents, including rats, which involves repetitive stepping-like movements of unloaded limbs. In comparison with a treadmill, swimming involves a higher number of step cycles being produced by the central pattern generator circuitry (Smith et al., 2006b). However, during swimming, both cutaneous feedback and loading of the limbs are significantly reduced (Muir and Steeves, 1995). It has been recently shown that swimming improves the functional recovery of spinal cord injured rats, especially sensory function (Hutchinson et al., 2004). If artificial cutaneous feedback is provided by adding buoyant centrifuge tubes attached to the bottom of the pool that touch the feet of the animals during swimming, locomotion is improved, but only to a limited extent (Smith et al., 2006a, b). This method was originally described in experiments with chicks by Muir and Steeves (1995).

10.4. Robot-assisted hindlimb extension

The development of robot-assisted hindlimb extension was based on the hypothesis that the training of hindlimb locomotion would be more efficient if an appropriate swing motion could be reliably elicited. The robotic “rat stepper” device used in this training method consists of a body weight support mechanism that can provide precise amounts of upward force to the torso, two lightweight robotic arms that can measure and manipulate hindlimb motion in the para-sagittal planes, and a miniature treadmill (Fig. 5). Beside its use in training spinal cord injured animals to step, this device can also be used for quantifying the body weight that spinal cord injured rats can support during stepping, for performing a detailed analysis of weight-supported, bipedal stepping and for examining the response of the spinal locomotor controller to small changes in the load on the hindlimbs (Nessler

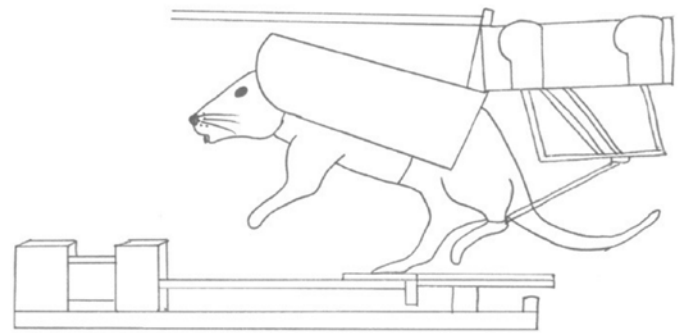


Fig. 5. Robot-assisted hindlimb extension device. The rat steps bipedally in the device, while placed in a cloth harness and attached to the end of the body weight support lever.

et al., 2005, 2007; Timoszyk et al., 2002). The value of robotic training is limited in complete spinal cord transection. In addition, and unfortunately, the majority of rodents used as models are injured as neonates (Timoszyk et al., 2005), which is in contrast to the usual clinical situation (Bracken et al., 1985; Syková et al., 2006b). The robotic stepper is also limited in its use because most studies involve bipedal stepping (Nessler et al., 2005, 2007; Timoszyk et al., 2002, 2005).

11. Electrophysiology and fMRI

11.1. Evoked potentials—transcranial

Animals are anesthetized and motor evoked potentials are elicited by transcranial electrical stimulation of the motor cortex using percutaneously placed stainless steel stimulating electrodes. Responses are recorded from a peripheral skeletal hindlimb muscle, usually the gastrocnemius, using needle electrodes. Conversely, brain activity can be recorded in response to sensory stimulation, eliciting somato-sensory evoked potentials (Maršala et al., 2004; Metz et al., 2000). The advantages of electrophysiological techniques lie in their direct and precise measurement of muscle activation, reflex latency and the relative strength of reflex responses. The disadvantages of these methods include the implantation of the stimulation electrodes and the fact that recording devices are required (Fig. 6) (Muir and Webb, 2000).

For the recording of transcranial magnetic motor evoked potentials, needle electrodes are introduced into a peripheral muscle, reference electrodes into the muscle's tendon, and over the skull a magnetic coil, responsible for the activation of subcortical structures, is placed. Subsequently, magnetic pulses are generated; action potentials descend in the ventral spinal cord and synapse on motoneuron pools. Electromyograms are recorded from the peripheral muscle, usually the gastrocnemius. The main advantages of this technique is its minimal invasiveness, the possibility of repeated measurements and the consistency of the results (Cruz-Orengo et al., 2007; Linden et al., 1999; Loy et al., 2002; Magnuson et al., 1999).



Fig. 6. Electrophysiological device connected to a computer (right) with a stereotaxic holder (left).

11.2. Motor evoked potentials—intracranial—intraspinal

In this test, the animals are usually anesthetized and intubated. Atropine is injected to reduce tracheal secretions and pancuronium bromide for muscle relaxation. Body temperature is monitored. The animal is placed in a stereotaxic holder (Fig. 6), the skull surgically opened and the motor cortex is directly stimulated by an electrode positioned by a micromanipulator. Recording of the impulse is done by epidural recording electrodes, positioned after laminectomy at the lumbar level. The motor evoked potentials are transmitted to and analyzed by special software (Fehlings et al., 1987; Lee et al., 2005). The disadvantages of this method are its invasiveness and the need for specialized devices and operators. In addition, testing cannot be repeated daily or weekly.

The above-mentioned data studies indicate that evoked potential monitoring is generally performed in anesthetized animals to eliminate stress and pain. For transcranial evoked potentials, intubation of the animals and supplementation with other drugs is usually not necessary, although for the more invasive evoked potential techniques, such procedures might be of benefit (Fehlings et al., 1987; Lee et al., 2005).

11.3. Contact electrode recording

This testing method combines the advantages of a horizontal runway and electrophysiological monitoring. First, the animals are pre-trained to cross a horizontal ladder, then they are fitted with small contact electrodes; eventually, the electromyography electrodes are also implanted. The contact electrodes, i.e. thin copper wires twisted into a spindle shape, are attached to the palmar or plantar surface of the paws by a thin rubber band. After some time, the rats tolerate the electrodes quite well and do

not try to remove them. The runway is covered with conductive material connected to a low voltage supply that enables recording (Gorska et al., 1998). The main advantage of this method is its accuracy. In addition, no anesthesia is needed during the testing session (Majczynski et al., 2007).

11.4. Functional MRI

Functional magnetic resonance imaging (fMRI) is a precise but challenging method, demanding a special MR-spectrometer. It is usually performed in anesthetized and mechanically ventilated rats. Bipolar stimulation electrodes must be implanted into the forelimbs and hindlimbs. Muscle relaxation with pancuronium bromide and temperature monitoring are also needed. After the stimulation of the limb electrodes, a signal in the somatosensory cortex and/or subcortical sensory areas can be recorded. This method makes it possible to distinguish between the recovery of sensory and motor function (Hofstetter et al., 2003).

12. Systematic protocols

The use of more than one test in a single experiment decreases the bias level and reduces the variability in animal performance caused by stress, handling, circadian rhythms, habituation or post-operative pain. Also, the degree to which treatment effects are mimicked or masked by spontaneous recovery and compensatory mechanisms is reduced. An important issue in combining tests is a potential partial overlap in outcomes between parameters due to a common neural basis. For many of these tests, the pathway involved in mediating the respective behavior is not completely known. Therefore, tests have to be selected carefully to cover a broad spectrum of parameters and to yield reproducible data over days or weeks. The effect of training must also be considered. Because most tests are differentially sensitive to the degree of injury, a combination of tests allows for a more complete and precise evaluation of the overall deficit than any individual test alone. Muir and Webb (2000) recommend that the testing battery should include: (i) a measure of motor abilities during spontaneous locomotor activity; (ii) a measure of abilities during one or more trained behavioral tasks; and (iii) an assessment of reflex function. Several methods and hints how to correctly choose the right behavioral tests and how to design an SCI study have been proposed (Basso, 2004; Goldberger et al., 1990; Kunkel et al., 1993; Metz et al., 2000).

12.1. Combined behavioral score

The combined behavioral score (CBS) was originally developed by Gale et al. (1985) (see also Kerasidis et al., 1987). To calculate the CBS, a battery of tests is used, including toe spread reflex, placing reflex, withdrawal in

response to stimulation, righting and hot plate tests. Rats are also tested for coordination between forelimbs and hindlimbs and weight support during walking, swimming, and standing on an inclined plane. The CBS ranges from 0 to 100, with 0 indicating no functional deficit and 100 indicating abnormal responses in all of the tests. Our analysis showed that the CBS is used mainly for evaluating recovery following contusion injury, followed by compression models. In both, the lesions were incomplete. It has been shown to be highly sensitive, therefore optimal for use with small spinal cord lesions (von Euler et al., 1997). Thus, for transection, evaluation methods other than CBS should be employed (Table 5). One problem with the CBS is similar to that of the BBB: it is not a linear test and thus points in the score represent more or less discrete aspects of behavior. Most importantly, because the final value is computed using a battery of different tests, the same value in two animals might reflect two different levels of recovery. For example, the first animal exhibits rapid locomotor recovery (weight support, swimming), the second one recovers sensory and sensory–motor pathways (reflexes, hot plate), and both achieve the same score. In extreme cases, the first animal is actively moving around, exploring the open field, but would easily hurt itself if it contacts some sharp or hot object. The second one would react to all sensory stimulation, but it is not able to move itself for even a few centimeters. Which one recovered more rapidly?

13. Conclusions

For the evaluation of functional recovery after SCI in the rat, several sensory, motor or autonomic behavioral testing methods as well as electrophysiology and fMRI can be used. Fundamentally, the more general the test, the broader its scope and the lower its precision. In addition, the greater the test's applicability, the less sensitive it tends to be. Before beginning a study, the proper selection of previously crosschecked behavioral testing methods is crucial for the success of the study.

Acknowledgments

We thank Dominika Dušková for excellent technical assistance and James Dutt for critical reading of the manuscript. We acknowledge the support provided by the Grants AV0Z50390512, AV0Z 50390703, 1M0021620803, LCC554, GACR309/06/1246, 1A8697-5 and the EC FP6 project RESCUE (LSHB-CT-2005-518233).

References

Aboel-Zahab, H., el-Khyat, Z., Sidhom, G., Awadallah, R., Abdel-al, W., Mahdy, K., 1997. Physiological effects of some synthetic food colouring additives on rats. *Bollettino Chimico Farmaceutico* 136, 615–627.

Akgun, S., Tekeli, A., Kurtkaya, O., Civelek, A., Isbir, S.C., Ak, K., Arsan, S., Sav, A., 2004. Neuroprotective effects of FK-506,

L-carnitine and azathioprine on spinal cord ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* 25, 105–110.

Andriacchi, T.P., Alexander, E.J., 2000. Studies of human locomotion: past, present and future. *Journal of Biomechanics* 33, 1217–1224.

Archer, Z.A., Rayner, D.V., Barrett, P., Balik, A., Duncan, J.S., Moar, K.M., Mercer, J.G., 2005. Hypothalamic energy balance gene responses in the Sprague-Dawley rat to supplementation of high-energy diet with liquid ensure and subsequent transfer to chow. *Journal of Neuroendocrinology* 17, 711–719.

Arvanian, V.L., Manuzon, H., Davenport, M., Bushell, G., Mendell, L.M., Robinson, J.K., 2006. Combined treatment with neurotrophin-3 and LSD facilitates behavioral recovery from double-hemisection spinal injury in neonatal rats. *Journal of Neurotrauma* 23, 66–74.

Baldridge, B.R., Burgess, D.E., Zimmerman, E.E., Carroll, J.J., Sprinkle, A.G., Speakman, R.O., Li, S.G., Brown, D.R., Taylor, R.F., Dworkin, S., Randall, D.C., 2002. Heart rate-arterial blood pressure relationship in conscious rat before vs. after spinal cord transection. *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 283, R748–R756.

Barbeau, H., Rossignol, S., 1987. Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult rat. *Brain Research* 412, 84–95.

Barbeau, H., Rossignol, S., 1994. Enhancement of locomotor recovery following spinal cord injury. *Current Opinion in Neurology* 7, 517–524.

Barbeau, H., Fung, J., Leroux, A., Ladouceur, M., 2002. A review of the adaptability and recovery of locomotion after spinal cord injury. *Progress in Brain Research* 137, 9–25.

Barr, A.M., Hofmann, C.E., Phillips, A.G., Weinberg, J., Honer, W.G., 2005. Prenatal ethanol exposure in rats decreases levels of complexin proteins in the frontal cortex. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 29, 1915–1920.

Basso, D.M., 2000. Neuroanatomical substrates of functional recovery after experimental spinal cord injury: implications of basic science research for human spinal cord injury. *Physical Therapy* 80, 808–817.

Basso, D.M., 2004. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies. *Journal of Neurotrauma* 21, 395–404.

Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 1995. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma* 12, 1–21.

Basso, D.M., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., Anderson, D.K., Faden, A.I., Gruner, J.A., Holford, T.R., Hsu, C.Y., Noble, L.J., Nockels, R., Perot, P.L., Salzman, S.K., Young, W., 1996. MASCIS evaluation of open field locomotor scores: effects of experience and teamwork on reliability. *Journal of Neurotrauma* 13, 343–359.

Behrmann, D.L., Bresnahan, J.C., Beattie, M.S., Shah, B.R., 1992. Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *Journal of Neurotrauma* 9, 197–217.

Bertelli, J.A., Mira, J.C., 1993. Behavioral evaluating methods in the objective clinical assessment of motor function after experimental brachial plexus reconstruction in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 46, 203–208.

Bickford, P., 1993. Motor learning deficits in aged rats are correlated with loss of cerebellar noradrenergic function. *Brain Research* 620, 133–138.

Bignami, G., 1996. Economical test methods for developmental neurobehavioral toxicity. *Environmental Health Perspectives* 104, 285–298.

Bohlman, H.H., Bahniuk, E., Field, G., Raskulinec, G., 1981. Spinal cord monitoring of experimental incomplete cervical spinal cord injury: a preliminary report. *Spine* 6, 428–436.

Bracken, M.B., Shepard, M.J., Hellenbrand, K.G., Collins, W.F., Leo, L.S., Freeman, D.F., Wagner, F.C., Flamm, E.S., Eisenberg, H.M., Goodman, E.H., et al., 1985. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury. Results of the National Acute Spinal Cord Injury Study. *Journal of Neurosurgery* 63, 704–713.

Brailowsky, S., Knight, R.T., 1987. Recovery from GABA-mediated hemiplegia in young and aged rats: effects of catecholaminergic manipulations. *Neurobiology of Aging* 8, 441–447.

- Broton, J.G., Nikolic, Z., Suys, S., Calancie, B., 1996. Kinematic analysis of limb position during quadrupedal locomotion in rats. *Neurotrauma* 13, 409–416.
- Burghardt, P.R., Fulk, L.J., Hand, G.A., Wilson, M.A., 2004. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Research* 1019, 84–96.
- Cameron, A.A., Smith, G.M., Randall, D.C., Brown, D.R., Rabchevsky, A.G., 2006. Genetic manipulation of intraspinal plasticity after spinal cord injury alters the severity of autonomic dysreflexia. *Journal of Neuroscience* 26, 2923–2932.
- Cappozzo, A., Catani, F., Leardini, A., Benedetti, M.G., Croce, U.D., 1996. Position and orientation in space of bones during movement: experimental artefacts. *Clinical Biomechanics* 11, 90–100.
- Chan, C.C., Khodarahmi, K., Liu, J., Sutherland, D., Oschipok, L.W., Steeves, J.D., Tetzlaff, W., 2005. Dose-dependent beneficial and detrimental effects of ROCK inhibitor Y27632 on axonal sprouting and functional recovery after rat spinal cord injury. *Experimental Neurology* 196, 352–364.
- Chaovipoch, P., Jelks, K.A., Gerhold, L.M., West, E.J., Chongthammakun, S., Floyd, C.L., 2006. 17beta-estradiol is protective in spinal cord injury in post- and pre-menopausal rats. *Journal of Neurotrauma* 23, 830–852.
- Cho, K-S., Huh, P-W., Park, C-K., Park, C-K., Kye, D-K., Kim, D-S., Madsen, P.W., Yezerski, R.P., Kang, J-K., 1997. Experimental syringomyelia in the rat: histopathology of spinal cord and kinematic analysis of locomotion. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 26, 29–39.
- Choi, Y., Yoon, Y.W., Na, H.S., Kim, S.H., Chung, J.M., 1994. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59, 369–376.
- Coumans, J.V., Lin, T.T., Dai, H.N., MacArthur, L., McAtee, M., Nash, C., Bregman, B.S., 2001. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *Journal of Neuroscience* 21, 9334–9344.
- Cruz-Orengo, L., Figueroa, J.D., Torrado, A., Puig, A., Whittemore, S.R., Miranda, J.D., 2007. Reduction of EphA4 receptor expression after spinal cord injury does not induce axonal regeneration or return of tMMEP response. *Neuroscience Letters* 418, 49–54.
- de Leon, R.D., Hodgson, J.A., Roy, R.R., Edgerton, V.R., 1998a. Full weight-bearing hindlimb standing following stand training in the adult spinal cat. *Journal of Neurophysiology* 80, 83–91.
- de Leon, R.D., Hodgson, J.A., Roy, R.R., Edgerton, V.R., 1998b. Locomotor capacity attributable to step training versus spontaneous recovery after spinalization in adult cats. *Journal of Neurophysiology* 79, 1329–1340.
- de Medinaceli, L., Freed, W.J., Wyatt, R.J., 1982. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Experimental Neurology* 77, 634–643.
- Deumens, R., Jaken, R.J.P., Marcus, M.A.E., Joosten, E.A.J., 2007. The CatWalk gait analysis in assessment of both dynamic and static changes after adult rat sciatic nerve resection. *Journal of Neuroscience Methods* 164, 120–130.
- Díaz-Ruiz, A., Vergara, P., Perez-Severiano, F., Segovia, J., Guizar-Sahagun, G., Ibarra, A., Rios, C., 2004. Cyclosporin-A inhibits inducible nitric oxide synthase activity and expression after spinal cord injury in rats. *Neuroscience Letters* 357, 49–52.
- Diener, P.S., Bregman, B.S., 1998. Fetal spinal cord transplants support the development of target reaching and coordinated postural adjustments after neonatal cervical spinal cord injury. *Journal of Neuroscience* 18, 763–778.
- Dimitrijevic, M.R., Gerasimenko, Y., Pinter, M.M., 1998. Evidence for a spinal central pattern generator in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 860, 360–376.
- Ding, Y., Kastin, A.J., Pan, W., 2005. Neural plasticity after spinal cord injury. *Current Pharmaceutical Design* 11, 1441–1450.
- Ditor, D.S., Bao, F., Chen, Y., Dekaban, G.A., Weaver, L.C., 2006. A therapeutic time window for anti-CD11d monoclonal antibody treatment yielding reduced secondary tissue damage and enhanced behavioral recovery following severe spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery: Spine* 5, 343–352.
- Döbrösy, M.D., Dunnet, S.B., 2004. Environmental enrichment affects striatal graft morphology and functional recovery. *European Journal of Neuroscience* 19, 159–168.
- Donatelle, J.M., 1977. Growth of the corticospinal tract and the development of placing reactions in the postnatal rat. *Journal of Comparative Neurology* 175, 207–232.
- Engesser-Cesar, C., Ichiyama, R.M., Nefas, A.L., Hill, M.A., Edgerton, V.R., Cotman, C.W., Anderson, A.J., 2007. Wheel running following spinal cord injury improves locomotor recovery and stimulates serotonergic fiber growth. *European Journal of Neuroscience* 25, 1931–1939.
- Erschbamer, M.K., Pham, T.M., Zwart, M.C., Baumans, V., Olson, L., 2006. Neither environmental enrichment nor voluntary wheel running enhances recovery from incomplete spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology* 201, 154–164.
- Eshkol, N., Wachmann, A., 1958. *A Movement Notation*. Weinfeld and Nicholson, London.
- Farooque, M., 2000. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. *Acta Neuropathologica* 100, 13–22.
- Farr, T.D., Whishaw, I.Q., 2002. Quantitative and qualitative impairments in skilled reaching in the mouse (*Mus musculus*) after a focal motor cortex stroke. *Stroke* 33, 1869–1875.
- Fears, R., 1978. The hypercholesterolaemic effect of caffeine in rats fed on diets with and without supplementary cholesterol. *British Journal of Nutrition* 39, 363–374.
- Fee, D.B., Swartz, K.R., Joy, K.M., Roberts, K.N., Scheff, N.N., Scheff, S.W., 2007. Effects of progesterone on experimental spinal cord injury. *Brain Research* 1137, 146–152.
- Fehlings, M.G., Tator, C.H., 1995. The relationship among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Experimental Neurology* 132, 220–228.
- Fehlings, M.G., Tator, C.H., Linden, R.D., Piper, I.R., 1987. Motor evoked potentials recorded from normal and spinal cord-injured rats. *Neurosurgery* 20, 125–130.
- Feraboli-Lohnherr, D., Barthe, J.Y., Orsal, D., 1999. Serotonin-induced activation of the network for locomotion in adult spinal rats. *Journal of Neuroscience Research* 55, 87–98.
- Filipe, V.M., Pereira, J.E., Costa, L.M., Mauricio, A.C., Couto, P.A., Melo-Pinto, P., Varejao, A.S.P., 2006. Effect of skin movement on the analysis of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats. *Journal of Neuroscience Methods* 153, 55–61.
- Fischer, M.S., Schilling, N., Schmidt, M., Haarhaus, D., Witte, H., 2002. Basic limb kinematics of small therian mammals. *Journal of Experimental Biology* 205, 1315–1338.
- Forsberg, H., Grillner, S., Sjöström, A., 1974. Tactile placing reactions in chronic spinal kittens. *Acta Physiologica Scandinavica* 92, 114–120.
- Fouad, K., Pearson, K., 2004. Restoring walking after spinal cord injury. *Progress in Neurobiology* 73, 107–126.
- Fouad, K., Metz, G.A.S., Merkler, D., Dietz, V., Schwab, M.E., 2000. Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. *Behavioral and Brain Research* 115, 107–113.
- Freeman, M.A., Pinskerova, V., 2005. The movement of normal tibio-femoral joint. *Journal of Biomechanics* 38, 197–208.
- Gale, K., Kerasidis, H., Wrathall, J.R., 1985. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Experimental Neurology* 88, 123–134.
- Gasc, J.P., 2001. Comparative aspects of gait, scaling and mechanics in mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131, 121–133.
- Gensel, J.C., Tovar, C.A., Hamers, F.P., Deibert, R.J., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 2006. Behavioral and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats. *Journal of Neurotrauma* 23, 36–54.

- Gerlai, R., Clayton, N.S., 1999. Analysing hippocampal function in transgenic mice: an ethological perspective. *Trends in Neuroscience* 22, 47–51.
- Gharbawie, O.A., Whishaw, P.A., Whishaw, I.Q., 2004. The topography of three-dimensional exploration: a new quantification of vertical and horizontal exploration, postural support, and exploratory bouts in the cylinder test. *Behavioral and Brain Research* 151, 125–135.
- Giglio, C.A., Defino, H.L., da-Silva, C.A., de-Souza, A.S., Del Bel, E.A., 2006. Behavioral and physiological methods for early quantitative assessment of spinal cord injury and prognosis in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39, 1613–1623.
- Gillis, G.B., Biewener, A.A., 2001. Hindlimb muscle function in relation to speed and gait: in vivo patterns of strain and activation in a hip and knee extensor of the rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Experimental Biology* 204, 2717–2721.
- Gimenez y Ribotta, M., Orsal, D., Feraboli-Lohnherr, D., Privat, A., Provencher, J., Rossignol, S., 1998. Kinematic analysis of recovered locomotor movements of the hindlimbs in paraplegic rats transplanted with monoaminergic embryonic neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences* 860, 521–523.
- Goldberger, M.E., Bregman, B.S., Vierck, C.J.J., Brown, M., 1990. Criteria for assessing recovery of function after spinal cord injury: behavioral methods. *Experimental Neurology* 107, 113–117.
- Gorska, T., Majczynski, H., Zmyslowski, W., 1998. Overground locomotion in intact rats: contact electrode recording. *Acta Neurobiologicae Experimentalis (Wars)* 58, 227–237.
- Grabowski, M., Brundin, P., Johansson, B.B., 1993. Paw-reaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats. *Stroke* 24, 889–895.
- Griesbach, G.S., Gomez-Pinilla, F., Hovda, D.A., 2007. Time window for voluntary exercise-induced increases in hippocampal neuroplasticity molecules after traumatic brain injury is severity dependent. *Journal of Neurotrauma* 24, 1161–1171.
- Grill, R.J., 2005. User-defined variables that affect outcome in spinal cord contusion/compression models. *Experimental Neurology* 196, 1–5.
- Gris, D., Marsh, D.R., Oatway, M.A., Chen, Y., Hamilton, E.F., Dekaban, G.A., Weaver, L.C., 2004. Transient blockade of the CD11d/CD18 integrin reduces secondary damage after spinal cord injury, improving sensory, autonomic, and motor function. *Journal of Neuroscience* 24, 4043–4051.
- Guizar-Sahagun, G., Grijalva, I., Salgado-Ceballos, H., Espitia, A., Orozco, S., Ibarra, A., Martinez, A., Franco-Bourland, R.E., Madrazo, I., 2004. Spontaneous and induced aberrant sprouting at the site of injury is irrelevant to motor function outcome in rats with spinal cord injury. *Brain Research* 1013, 143–151.
- Hall, E.D., Gibson, T.R., Pavel, K.M., 2005. Lack of a gender difference in post-traumatic neurodegeneration in the mouse controlled cortical impact injury model. *Journal of Neurotrauma* 22, 669–679.
- Hamers, F.P.T., Lankhorst, A.J., Van Laar, T.J., Veldhuis, W.B., Gispén, W.H., 2001. Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *Journal of Neurotrauma* 18, 187–201.
- Hamers, F.P.T., Koopmans, G.C., Joosten, E.A.J., 2006. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 23, 537–548.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., Joris, J., 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77–88.
- Harkema, S.J., 2001. Neural plasticity after human spinal cord injury: application of locomotor training to the rehabilitation of walking. *Neuroscientist* 7, 455–468.
- Hicks, S., D'Amato, C.J., 1975. Motor-sensory cortex-corticospinal system and developing locomotion and placing in rats. *American Journal of Anatomy* 143, 1–42.
- Hofstetter, C.P., Schweinhardt, P., Klason, T., Olson, L., Spenger, C., 2003. Numb rats walk—a behavioural and fMRI comparison of mild and moderate spinal cord injury. *European Journal of Neuroscience* 18, 3061–3068.
- Holmes, G.M., Holmes, D.G., Sachs, B.D., 1988. An IBM-PC based data collection system for recording rodent sexual behavior and for general event recording. *Physiology and Behavior* 44, 825–828.
- Houle, J.D., Tom, V.J., Mayes, D., Wagoner, G., Phillips, N., Silver, J., 2006. Combining an autologous peripheral nervous system “bridge” and matrix modification by chondroitinase allows robust, functional regeneration beyond a hemisection lesion of the adult spinal cord. *Journal of Neuroscience* 26, 7405–7415.
- Hutchinson, K.J., Gomez-Pinilla, F., Crowe, M.J., Ying, Z., Basso, D.M., 2004. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain* 127, 1403–1414.
- Ibarra, A., Guizar-Sahagun, G., Correa, D., Kretschmer, R., Grijalva, I., Flores-Murrieta, F.J., Castaneda-Hernandez, G., Odor, A., Lopez, R.M., Franco-Bourland, R., Espitia, A.L., Salgado-Ceballos, H., Madrazo, I., 1996. Alteration of cyclosporin-A pharmacokinetics after experimental spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 13, 267–272.
- Karlsson, A.K., 2006. Autonomic dysfunction in spinal cord injury: clinical presentation of symptoms and signs. *Progress in Brain Research* 152, 1–8.
- Kerasidis, H., Wrathall, J.R., Gale, K., 1987. Behavioral assessment of functional deficits in rats with contusive spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Methods* 20, 167–179.
- Kiehn, O., Kjaerulff, O., 1998. Distribution of central pattern generators for rhythmic motor outputs in the spinal cord of limbed vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences* 860, 110–129.
- Kim, D., Schallert, T., Liu, Y., Browarak, T., Nayeri, N., Tessler, A., Fischer, I., Murray, M., 2001. Transplantation of genetically modified fibroblasts expressing BDNF in adult rats with a subtotal hemisection improves specific motor and sensory functions. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 15, 141–150.
- Kim, E.S., Kim, G.M., Lu, X., Hsu, C.Y., Xu, X.M., 2002. Neural circuitry of the adult rat central nervous system after spinal cord injury: a study using fast blue and the Bartha strain of pseudorabies virus. *Journal of Neurotrauma* 19, 787–800.
- Kriegsfeld, L.J., Eliasson, M.J., Demas, G.E., Blackshaw, S., Dawson, T.M., Nelson, R.J., Snyder, S.H., 1999. Nocturnal motor coordination deficits in neuronal nitric oxide synthase knock-out mice. *Neuroscience* 89, 311–315.
- Kunkel, B.E., Dai, H.N., Bregman, B.S., 1993. Methods to assess the development and recovery of locomotor function after spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology* 119, 153–164.
- Kwon, B.K., Oxland, T.R., Tetzlaff, W., 2002. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine* 27, 1504–1510.
- Lankhorst, A.J., verzijl, M.R., Hamers, F.P.T., 1999. Experimental spinal cord contusion injury: comparison of different outcome parameters. *Neuroscience Research Communication* 24, 135–148.
- Lankhorst, A.J., ter Laak, M.P., van Laar, T.J., van Meeteren, N.L., de Groot, J.C., Schrama, L.H., Hamers, F.P., Gispén, W.H., 2001. Effects of enriched housing on functional recovery after spinal cord contusive injury in the adult rat. *Journal of Neurotrauma* 18, 203–216.
- Lee, B.H., Lee, K.H., Yoon, D.H., Kim, U.J., Hwang, Y.S., Park, S.K., Choi, J.U., Park, Y.G., 2005. Effects of methylprednisolone on the neural conduction of the motor evoked potentials in spinal cord injured rats. *Journal of Korean Medical Science* 20, 132–138.
- Levin, S., Pearsall, G., Ruderman, R.J., 1978. Von Frey's method of measuring pressure sensibility in the hand: an engineering analysis of the Weinstein-Semmes pressure aesthesiometer. *Journal of Hand Surgery* 3, 211–216.
- Li, H.H., Lee, S.M., Cai, Y., Sutton, R.L., Hovda, D.A., 2004. Differential gene expression in hippocampus following experimental brain trauma reveals distinct features of moderate and severe injuries. *Journal of Neurotrauma* 21, 1141–1153.
- Li, S., Kim, J.E., Budel, S., Hampton, T.G., Strittmatter, S.M., 2005. Transgenic inhibition of Nogo-66 receptor function allows axonal sprouting and improved locomotion after spinal injury. *Molecular and Cellular Neuroscience* 29, 26–39.
- Liebscher, T., Schnell, L., Schnell, D., Scholl, J., Schneider, R., Gullo, M., Fouad, K., Mir, A., Rausch, M., Kindler, D., Hamers, F.P., Schwab, J.M., 2006. Axonal sprouting and functional recovery after spinal cord injury in mice lacking Nogo-66 receptor. *Journal of Neurotrauma* 23, 1011–1021.

- M.E., 2005. Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Annals of Neurology* 58, 706–719.
- Linden, R.D., Zhang, Y.P., Burke, D.A., Hunt, M.A., Harpring, J.E., Shields, C.B., 1999. Magnetic motor evoked potential monitoring in the rat. *Journal of Neurosurgery* 91, 205–210.
- Lopez-Vales, R., Garcia-Alias, G., Fores, J., Udina, E., Gold, B.G., Navarro, X., Verdu, E., 2005. FK 506 reduces tissue damage and prevents functional deficit after spinal cord injury in the rat. *Journal of Neuroscience Research* 81, 827–836.
- Loy, D.N., Magnuson, D.S.K., Zhang, Y.P., Onifer, S.M., Mills, M.D., Cao, Q-L., Darnall, J.B., Fajardo, L.C., Burke, D.A., Whittemore, S.R., 2002. Functional redundancy of ventral spinal locomotor pathways. *Journal of Neuroscience* 22, 315–323.
- Maggi, C.A., Santicioli, P., Meli, A., 1986. The nonstop transvesical cystometrogram in urethane-anesthetized rats: a simple procedure for quantitative studies on the various phases of urinary bladder voiding cycle. *Journal of Pharmacology Methods* 15, 157–167.
- Magnuson, D.S., Trinder, T.C., Zhang, Y.P., Burke, D., Morassutti, D.J., Shields, C.B., 1999. Comparing deficits following excitotoxic and contusion injuries in the thoracic and lumbar spinal cord of the adult rat. *Experimental Neurology* 156, 191–204.
- Majczynski, H., Maleszak, K., Gorska, T., Slawinska, U., 2007. Comparison of two methods for quantitative assessment of unrestrained locomotion in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 163, 197–207.
- Manal, K., McClay, D.I., Galinat, B., Stanhope, S., 2003. The accuracy of estimating proximal tibial translation during natural cadence walking: bone vs. skin mounted targets. *Clinical Biomechanics* 18, 126–131.
- Maršala, M., Yaksh, T.Y., 1994. Transient spinal ischemia in the rat: characterization of behavioral and histopathological consequences as a function of the duration of aortic occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 14, 526–535.
- Maršala, M., Kakinohana, O., Yaksh, T.L., Tomori, Z., Maršala, S., Číková, D., 2004. Spinal implantation of hNT neurons and neuronal precursors: graft survival and functional effects in rats with ischemic spastic paraplegia. *European Journal of Neuroscience* 20, 2401–2414.
- Marsh, D.R., Weaver, L.C., 2004. Autonomic dysreflexia, induced by noxious or innocuous stimulation, does not depend on changes in dorsal horn substance P. *Journal of Neurotrauma* 21, 817–828.
- Marshall, J.F., 1982. Sensorimotor disturbances in the aging rodent. *Journal of Gerontology* 37, 548–554.
- McKenna, J.E., Prusky, G.T., Whishaw, I.Q., 2000. Cervical motoneuron topography reflects the proximodistal organization of muscles and movements of the rat forelimb: a retrograde carbocyanine dye analysis. *Journal of Comparative Neurology* 419, 286–296.
- Merkler, D., Metz, G.A.S., Raineteau, O., Dietz, V., Schwab, M.E., Fouad, K., 2001. Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *Journal of Neuroscience* 21, 3665–3673.
- Metz, G.A.S., Whishaw, I.Q., 2002. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *Journal of Neuroscience Methods* 115, 169–179.
- Metz, G.A.S., Dietz, V., Schwab, M.E., van de Meent, H., 1998. The effects of unilateral pyramidal tract section on hindlimb motor performance in rat. *Behavioral and Brain Research* 96, 37–46.
- Metz, G.A.S., Merkler, D., Dietz, V., Schwab, M.E., Fouad, K., 2000. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Research* 883, 165–177.
- Metz, G.A.S., Schwab, M.E., Welzl, H., 2001. The effects of acute and chronic stress on motor and sensory performance. *Physiology and Behavior* 72, 29–35.
- Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C., Riley, M.T., 1979. A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobiobehavioral Toxicology* 1, 233–236.
- Mills, C.D., Hains, B.C., Johnson, K.M., Hulsebosch, C.E., 2001. Strain and model differences in behavioral outcomes after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 18, 743–756.
- Montoya, C.P., Campbell-Hope, L.J., Pemberton, K.D., Dunnett, S.B., 1991. The “staircase test”: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *Journal of Neuroscience Methods* 36, 219–228.
- Muir, G.D., Steeves, J.D., 1995. Phasic cutaneous input facilitates locomotor recovery after incomplete spinal injury in the chick. *Journal of Neurophysiology* 74, 358–368.
- Muir, G.D., Webb, A.A., 2000. Assessment of behavioural recovery following spinal cord injury in rats. *European Journal of Neuroscience* 12, 3079–3086.
- Multon, S., Franzen, R., Poirrier, A.L., Scholtes, F., Schoenen, J., 2003. The effect of treadmill training on motor recovery after a partial spinal cord compression-injury in the adult rat. *Journal of Neurotrauma* 20, 699–706.
- Murray, M., 2004. Cellular transplants: steps toward restoration of function in spinal injured animals. *Progress in Brain Research* 143, 133–146.
- Nessler, J.A., Minakata, K., Sharp, K., Reinkensmeyer, D.J., 2005. A robotic device for studying rodent locomotion after spinal cord injury. *IEEE Transactions on Neural System and Rehabilitation Engineering* 13, 497–506.
- Nessler, J.A., Minakata, K., Sharp, K., Reinkensmeyer, D.J., 2007. Robot-assisted hindlimb extension increases the probability of swing initiation during treadmill walking by spinal cord contused rats. *Journal of Neuroscience Methods* 159, 66–77.
- Norrie, B.A., Nevett-Duchcherer, J.M., Gorassini, M.A., 2005. Reduced functional recovery by delaying motor training after spinal cord injury. *Journal of Neurophysiology* 94, 255–264.
- Nout, Y.S., Schmidt, M.H., Tovar, C.A., Culp, E., Beattie, M.S., Bresnahan, J.C., 2005. Telemetric monitoring of corpus spongiosum penis pressure in conscious rats for assessment of micturition and sexual function following spinal cord contusion injury. *Journal of Neurotrauma* 22, 429–441.
- Nout, Y.S., Bresnahan, J.C., Culp, E., Tovar, C.A., Beattie, M.S., Schmidt, M.H., 2007. Novel technique for monitoring micturition and sexual function in male rats using telemetry. *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 292, R1359–R1367.
- Ohlsson, A.L., Johansson, B.B., 1995. Environment influences functional outcome of cerebral infarction in rats. *Stroke* 26, 644–649.
- Ohta, M., Ide, K., Cheuk, G., Cheuk, S.L., Yazdani, M., Nakamoto, T., Thomas, K.A., 2002. A caffeine diet can alter the mechanical properties of the bones of young ovariectomized rats. *Annals of Nutrition and Metabolism* 46, 108–113.
- Pearse, D.D., Lo, T.P., Cho, K.S., Lynch, M.P., Garg, M.S., Marcillo, A.E., Sanchez, A.R., Cruz, Y., Dietrich, W.D., 2005. Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat. *Journal of Neurotrauma* 22, 680–702.
- Pikov, V., Wrathall, J.R., 2001. Coordination of the bladder detrusor and the external urethral sphincter in a rat model of spinal cord injury: effect of injury severity. *Journal of Neuroscience* 21, 559–569.
- Pikov, V., Wrathall, J.R., 2002. Altered glutamate receptor function during recovery of bladder detrusor–external urethral sphincter coordination in a rat model of spinal cord injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 300, 421–427.
- Pockett, S., Philip, B.A., 1987. Problems with the use of the toe-spreading reflex in rats as an assay in nerve regeneration studies. *Neuroscience Letters* 80, 347–350.
- Popovich, P.G., Guan, Z., Wei, P., Huitinga, I., van Rooijen, N., Stokes, B.T., 1999. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Experimental Neurology* 158, 351–365.
- Rabchevsky, A.G., Fugaccia, I., Sullivan, P.G., 2001. Cyclosporin A treatment following spinal cord injury to the rat: behavioral effects and stereological assessment of tissue sparing. *Journal of Neurotrauma* 18, 513–522.

- Rabchevsky, A.G., Sullivan, P.G., Fugaccia, I., Scheff, S.W., 2003. Creatine diet supplement for spinal cord injury: influences on functional recovery and tissue sparing in rats. *Journal of Neurotrauma* 20, 659–669.
- Ramon-Cueto, A., Cordero, M.I., Santos-Benito, F.F., Avila, J., 2000. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 25, 425–435.
- Randall, L.O., Selitto, J.J., 1957. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie* 111, 409–419.
- Renno, W.M., Saleh, F., Klepáček, I., Al-Khaledi, G., Ismael, H., Asfar, S., 2006. Green tea modulating effect in sciatic nerve chronic constriction injury rat model. *Nutrition and Neuroscience* 9, 41–47.
- Rivier, C., 1995. Adult male rats exposed to an alcohol diet exhibit a blunted adrenocorticotropic hormone response to immune or physical stress: possible role of nitric oxide. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 19, 1474–1479.
- Rivlin, A.S., Tator, C.H., 1977. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurosurgery* 47, 577–581.
- Roof, R.L., Hall, E.D., 2000. Gender differences in acute CNS trauma and stroke. Neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *Journal of Neurotrauma* 9, 187–195.
- Rose, F.D., al Khamees, K., Davey, M.J., Attree, E.A., 1993. Environmental enrichment following brain damage: an aid to recovery or compensation? *Behavioral and Brain Research* 56, 93–100.
- Rossignol, S., Dubuc, R., 1994. Spinal pattern generation. *Current Opinion in Neurology* 4, 894–902.
- Roussos, I., Rodriguez, M., Villan, D., Ariza, A., Rodriguez, L., Garcia, J., 2005. Development of a rat model of spinal cord injury and cellular transplantation. *Transplantation Proceedings* 37, 4127–4130.
- Ruitenbergh, M.J., Plant, G.W., Hamers, F.P., Wortel, J., Blits, B., Dijkhuizen, P.A., Gispens, W.H., Boer, G.J., Verhaagen, J., 2003. Ex vivo adenoviral vector-mediated neurotrophin gene transfer to olfactory ensheathing glia: effects on rubrospinal tract regeneration, lesion size, and functional recovery after implantation in the injured rat spinal cord. *Journal of Neuroscience* 23, 7045–7058.
- Sachs, B.D., Akasofu, K., Citron, J.H., Daniels, S.B., Natoli, J.H., 1994. Noncontact stimulation from estrous females evokes penile erection in rats. *Physiology and Behavior* 55, 1073–1079.
- Santos-Benito, F.F., Munoz-Quiles, C., Ramon-Cueto, A., 2006. Long-term care of paraplegic laboratory animals. *Journal of Neurotrauma* 23, 521–536.
- Schallert, T., Woodlee, M.T., 2003. Brain-dependent movements and cerebral-spinal connections: key targets of cellular and behavioral enrichment in CNS injury models. *Journal of Rehabilitation Research Development* 40, 9–17.
- Schallert, T., Woodlee, M.T., 2005. Orienting and placing. In: Whishaw, I.Q., Kolb, B. (Eds.), *The Behavior of The Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. Oxford University Press, New York, pp. 129–140.
- Schallert, T., Hernandez, T.D., Barth, T.M., 1986. Recovery of function after brain damage: severe and chronic disruption by diazepam. *Brain Research* 379, 104–111.
- Schallert, T., Fleming, S.M., Leasure, J.L., Tillerson, J.L., Bland, S.T., 2000. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, Parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39, 777–787.
- Schallert, T., Woodlee, M.T., Fleming, S.M., 2002. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. In: Kriegstein, J., Klumpp, S. (Eds.), *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, pp. 201–216.
- Schmidt, M.H., Valatx, J.L., Sakai, K., Debilly, G., Jouvet, M., 1995. Corpus spongiosum penis pressure and perineal muscle activity during reflexive erections in the rat. *American Journal of Physiology* 269, R904–R913.
- Šedý, J., Urdžiková, L., Hejčl, A., Burian, M., Likavčanová, K., Jendelová, P., Zicha, J., Kuneš, J., Syková, E., 2007a. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Journal of Neurotrauma* 24, 1487–1501.
- Šedý, J., Urdžiková, L., Likavčanová, K., Hejčl, A., Jendelová, P., Syková, E., 2007b. A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neuroscience Letters* 423, 167–171.
- Segal, J.L., Brunemann, S.R., Gray, D.R., 1988. Gentamicin bioavailability and single-dose pharmacokinetics in spinal cord injury. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy* 22, 461–465.
- Seki, T., Hida, K., Tada, M., Koyanagi, I., Iwasaki, Y., 2002. Graded contusion model of the mouse spinal cord using a pneumatic impact device. *Neurosurgery* 50, 1075–1081.
- Smith, R.R., Burke, D.A., Baldini, A.D., Shum-Siu, A., Baltzley, R., Bunger, M., Magnuson, D.S., 2006a. The Louisville Swim Scale: a novel assessment of hindlimb function following spinal cord injury in adult rats. *Journal of Neurotrauma* 23, 1654–1670.
- Smith, R.R., Shum-Siu, A., Baltzley, R., Bunger, M., Baldini, A., Burke, D.A., Magnuson, D.S., 2006b. Effects of swimming on functional recovery after incomplete spinal cord injury in rats. *Journal of Neurotrauma* 23, 908–919.
- Soblosky, J.S., Song, J.H., Dinh, D.H., 2001. Graded unilateral cervical spinal cord injury in the rat: evaluation of forelimb recovery and histological effects. *Behavioral and Brain Research* 119, 1–13.
- Sutton, R.L., Feeney, D.M., 1992. Alpha-noradrenergic agonists and antagonists affect recovery and maintenance of beam-walking ability after sensorimotor cortex ablation in the rat. *Restorative Neurology and Neuroscience* 4, 1–11.
- Swartz, K.R., Fee, D.B., Joy, K.M., Roberts, K.N., Sun, S., Scheff, N.N., Wilson, M.E., Scheff, S.W., 2007. Gender differences in spinal cord injury are not estrogen-dependent. *Journal of Neurotrauma* 24, 473–480.
- Syková, E., Jendelová, P., 2005. Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1049, 146–160.
- Syková, E., Jendelová, P., Urdžiková, L., Lesný, P., Hejčl, A., 2006a. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels—two strategies for spinal cord injury repair. *Cellular and Molecular Neurobiology* 26, 1111–1127.
- Syková, E., Homola, A., Mazanec, R., Lachmann, H., Konrádová, S.L., Kobyłka, P., Padr, R., Neuwirth, J., Komrská, V., Vávra, V., Štulík, J., Bojar, M., 2006b. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplantation* 15, 675–687.
- Tarlov, I.M., 1954. Spinal cord compression studies. III. Time limits for recovery after gradual compression in dogs. *American Medical Association Archives of Neurology and Psychiatry* 71, 588–597.
- Tatlisumak, T., Fisher, M., 2006. *Handbook of Experimental Neurology: Methods and Techniques in Animal Research*, first ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Thota, A., Carlson, S., Jung, R., 2001. Recovery of locomotor function after treadmill training of incomplete spinal cord injured rats. *Biomedical Sciences Instrumentation* 37, 63–67.
- Timoszyk, W.K., de Leon, R.D., London, N., 2002. The rat lumbosacral spinal cord adapts to robotic loading applied during stance. *Journal of Neurophysiology* 88, 3108–3117.
- Timoszyk, W.K., Nessler, J.A., Acosta, C., Roy, R.R., Edgerton, V.R., Reinkensmeyer, D.J., de Leon, R.D., 2005. Hindlimb loading determines stepping quantity and quality following spinal cord transection. *Brain Research* 1050, 180–189.
- Tung, A., Herrera, S., Szafran, M.J., Kasza, K., Mendelson, W.B., 2005. Effect of sleep deprivation on righting reflex in the rat is partially reversed by administration of adenosine A1 and A2 receptor antagonists. *Anesthesiology* 102, 1158–1164.
- Urdžiková, L., Vanický, I., 2006. Post-traumatic moderate systemic hyperthermia worsens behavioural outcome after spinal cord injury in the rat. *Spinal Cord* 44, 113–119.

- Urdziková, L., Jendelová, P., Glogarová, K., Burian, M., Hájek, M., Syková, E., 2006. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *Journal of Neurotrauma* 23, 1379–1391.
- van de Meent, H., Hamers, F.P., Lankhorst, A.J., Buise, M.P., Joosten, E.A., Gispen, W.H., 1996. New assessment techniques for evaluation of posttraumatic spinal cord function in the rat. *Journal of Neurotrauma* 13, 741–754.
- van de Meent, H., Hamers, F.P., Lankhorst, A.J., Buise, M.P., Joosten, E.A., Gispen, W.H., 1997. Beneficial effects of the melanocortin alpha-melanocyte-stimulating hormone on clinical and neurophysiological recovery after experimental spinal cord injury. *Neurosurgery* 40, 122–130.
- Vanický, I., Urdziková, L., Saganová, K., Čížková, D., Gálik, J., 2001. Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *Journal of Neurotrauma* 18, 1399–1407.
- Van Meeteren, N.L., Eggers, R., Lankhorst, A.J., Gispen, W.H., Hamers, F.P., 2003. Locomotor recovery after spinal cord contusion injury in rats is improved by spontaneous exercise. *Journal of Neurotrauma* 20, 1029–1037.
- Vaquero, J., Zurita, M., Oya, S., Santos, M., 2006. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neuroscience Letters* 398, 129–134.
- von Euler, M., Akesson, E., Samuelsson, E.B., Seiger, A., Sundström, E., 1996. Motor performance score: a new algorithm for accurate behavioral testing of spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology* 137, 242–254.
- von Euler, M., Seiger, A., Sundström, E., 1997. Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. *Experimental Neurology* 145, 502–510.
- Wahlsten, D., 2001. Standardizing tests of mouse behavior: reasons, recommendations and reality. *Physiology and Behavior* 73, 695–704.
- Wallace, J.E., Krauter, E., Campbell, B.A., 1980. Motor and reflexive behavior in the aging rat. *Journal of Gerontology* 35, 364–370.
- Weaver, L.C., Verghese, P., Bruce, J.C., Fehlings, M.G., Krenz, N.R., Marsh, D.R., 2001. Autonomic dysreflexia and primary afferent sprouting after clip-compression injury of the rat spinal cord. *Journal of Neurotrauma* 18, 1107–1119.
- Weber, E.D., Stelzner, D.J., 1977. Behavioral effects of spinal cord transection in the developing rat. *Brain Research* 125, 241–255.
- Wernig, A., 2006. Long-term body-weight supported treadmill training and subsequent follow-up in persons with chronic SCI: effects on functional walking ability and measures of subjective well-being. *Spinal Cord* 44, 265–266.
- Wernig, A., Nanassy, A., Muller, S., 1999. Laufband (treadmill) therapy in incomplete paraplegia and tetraplegia. *Journal of Neurotrauma* 16, 719–726.
- Westerga, J., Gramsbergen, A., 1990. The development of locomotion in the rat. *Development in Brain Research* 57, 163–174.
- Whishaw, I.Q., 2000. Loss of the innate cortical engram for action patterns used in skilled reaching and the development of behavioral compensation following motor cortex lesions in the rat. *Neuropharmacology* 39, 788–805.
- Whishaw, I.Q., Pellis, S.M., 1990. The structure of skilled forelimb reaching in the rat: a proximally driven movement with a single distal rotatory component. *Behavioral and Brain Research* 41, 49–59.
- Whishaw, I.Q., Pellis, S.M., Gorny, B., Kolb, B., Tetzlaff, W., 1993. Proximal and distal impairments in rat forelimb use in reaching follow unilateral pyramidal tract lesions. *Behavioral and Brain Research* 56, 59–76.
- Wolf, C.J., 1984. Long-term alterations in the excitability of the flexion reflex produced by peripheral tissue injury in the chronic decerebrate rat. *Pain* 18, 325–343.
- Xu, X.M., Guenard, V., Kleitman, N., Bunge, M.B., 1995. Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *Journal of Comparative Neurology* 351, 145–160.
- Xu, X.M., Zhang, S.X., Li, H., Aebischer, P., Bunge, M.B., 1999. Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 11, 1723–1740.
- Yack, H.J., Houck, J., Cuddeford, T., Pierrynowski, M., Ball, K., 2000. Measuring 3D knee motion with surface markers, it can be done. *Gait Posture* 11, 148–149.
- Yoshihama, M., de Groat, W.C., 2002. Effect of bilateral hypogastric nerve transection on voiding dysfunction in rats with spinal cord injury. *Experimental Neurology* 175, 191–197.
- Yoshihara, H., Shumsky, J.S., Neuhuber, B., Otsuka, T., Fischer, I., Murray, M., 2006. Combining motor training with transplantation of rat bone marrow stromal cells does not improve repair or recovery in rats with thoracic contusion injuries. *Brain Research* 1119, 65–75.
- Young, D., Lawlor, P.A., Leone, P., Dragunow, M., During, M.J., 1999. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Medicine* 5, 448–453.
- Yu, W., Hao, J.X., Xu, X.J., Saydoff, J., Haegerstrand, A., Hokfelt, T., Wiesenfeld-Hallin, Z., 1998. Long-term alleviation of allodynia-like behaviors by intrathecal implantation of bovine chromaffin cells in rats with spinal cord injury. *Pain* 74, 115–122.
- Z'Graggen, W.J., Metz, G.A., Kartje, G.L., Thallmair, M., Schwab, M.E., 1998. Functional recovery and enhanced cortico-fugal plasticity in the adult rat after unilateral pyramidal tract section and blockade of myelin-associated neurite growth inhibitors. *Journal of Neuroscience* 18, 4744–4757.

12. Šedý J. Neurogenní plicní edém. Čas Lék Čes 2011, 150: 147–155.

Neurogení plicní edém

Jiří Šedý

Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i., Praha

SOUHRN

Neurogení plicní edém je komplikace závažného poškození centrálního nervového systému. Centrem vzniku neurogeního plicního edému je s největší pravděpodobností skupina jader rostrální ventrolaterální prodloužené míchy, které jej spouští na podkladě kombinace hyperaktivace jejich aferentních drah a náhle zvýšeného intrakraniálního tlaku. V patogenezi neurogeního plicního edému hraje zásadní roli sympatický nervový systém, který spouští rychlou kaskádu dějů, vedoucích k intersticiálnímu a intraalveolárnímu edému, který doplňuje výrazná hemoragická složka. V diagnostice neurogeního plicního edému má zásadní význam fyzikální vyšetření a RTG hrudníku. Diferenciálně diagnostická úvaha není snadná, avšak šance na správnou diagnózu výrazně rostou, pokud lékař dá do souvislosti poškození centrálního nervového systému a plicní potíže. Cílená kurativní léčba neurogeního plicního edému dosud neexistuje, proto je smyslem terapeutických snah zejména léčba podpůrná a symptomatická. Jako nejdůležitější opatření se jeví kontinuální monitorace stavu pacienta, polohování pacienta a podpora ventilace a oxygenace. V současné době existuje několik experimentálních modelů, které je možné využít pro studium etiopatogeneze i léčby neurogeního plicního edému. Hlavním cílem experimentálních snah je získání preventivního a terapeutického přístupu, který umožní zabránit a včas léčit neurogení plicní edém. Z tohoto hlediska je zatím nejvíce slibný atropin.

Klíčová slova: neurogení plicní edém, poranění mozku, poranění míchy, sympatický nervový systém.

SUMMARY

Šedý J. Neurogenic pulmonary oedema

Neurogenic pulmonary oedema is a complication of severe central nervous system injury. The centre of neurogenic pulmonary oedema is assumed to be a group of dorsal ventrolateral medulla nuclei, which are activated by a combination of afferent pathway hyperactivity and a sudden increase of intracranial pressure. The sympathetic system plays a crucial role in the pathogenesis of neurogenic pulmonary oedema by activating a rapid cascade of processes, leading to interstitial and intraalveolar oedema, together with important haemorrhage. For the diagnosis of neurogenic pulmonary oedema, physical examination and chest X-ray are crucial. The differential diagnosis is not easy, but the chances of proper diagnosis are increased when the relation between the central nervous system injury and the pulmonary problems is considered. Targeted curative treatment of neurogenic pulmonary oedema does not exist yet; thus, the treatment options are mainly supportive and symptomatic. The most important ones are continuous patient monitoring, posture and ventilation and oxygenation support. There are several experimental models that can be used for studying the etiopathogenesis or treatment of neurogenic pulmonary oedema. The main goal of experimental studies is to elucidate a preventive and therapeutic approach that is able to prevent or treat neurogenic pulmonary oedema. In this context, the most promising agent is atropine.

Key words: neurogenic pulmonary oedema, brain injury, spinal cord injury, sympathetic nervous system.

Še.

Čas Lék čes 2011; 150: 147–155

ÚVOD

Normální funkce plicní tkáně vyžaduje co nejtenčí bariéru pro výměnu plynů mezi krevním řečištěm a vzduchem v plicích. Za normálních okolností je pohyb tekutiny přes stěnu cév přísně regulován. Pokud dojde k poruše tohoto mechanismu z nejrůznějších příčin a relativní nebo absolutnímu zmožení tekutiny v oblasti mimo cévní řečiště na úkor tekutiny uvnitř cév, vzniká otok tkáně – edém. Plicní edém může mít celou řadu příčin, může probíhat různě závažně, s dočasnými nebo trvalými důsledky (1). Pro klinickou praxi je důležité, že plicní edém poměrně často zásadně komplikuje zdravotní stav pacienta a může dokonce vést navzdory intenzivní léčbě k jeho smrti.

Neurogení plicní edém (NPE) je definován jako akutně vzniklý intersticiální a/nebo intraalveolární edém plicní

tkáně, který vzniká na základě předchozího poškození tkáně centrálního nervového systému (CNS) (2). Jako první popsal NPE Shanahan již v roce 1908 jako komplikaci opakovaných epileptických záchvatů u jedenácti pacientů a byl to právě on, kdo spojil těžké poškození CNS se vznikem plicního edému, a zároveň první, kdo použil pro tento edém název „neurogení“ (3). Neurogení plicní edém vzniká řádově v minutách až hodinách po poranění CNS. Vzhledem k jeho „neurogení“ povaze jej řadíme k nekardiogenním (extrakardiálním) plicním edémům. Z hlediska mechanismu vzniku se však jedná o poměrně unikátní klinickou jednotku, neboť se zde synergicky uplatňují oba základní mechanismy vzniku plicního edému, jmenovitě vysoký tlak intravaskulární a intersticiální tekutiny společně se zvýšenou permeabilitou součástí plicního parenchymu, které se u jiných typů edému vyskytují izolovaně (4). Kromě toho je zde hemoragická složka vyjádřena výrazně více, než u kteréhokoliv jiného edému. Podle dostupných statistických údajů by se mohlo zdát, že se jedná o velice vzácnou klinickou jednotku. Velice rozporuplná data však naznačují, že je tato jednotka spíše řazena mezi ostatní plicní edémy a není kladen důraz na její neurogení původ. Neurogení plicní edém bohužel klinický obraz ostatních plicních edémů pouze připomíná, jeho nebezpečí

AUTOR PRO KORESPONDENCI:

MDDr. MUDr. Jiří Šedý, PhD.
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.
Vítězská 1083, 142 20 Praha 4
fax: +420 241 062 783, e-mail: jirisedy@hotmail.com

tkví ve výše zmíněných patofyziologických odlišnostech, v jejichž důsledku je často klinický průběh výrazně proměnný, a tedy i hůře předvídatelný, což může vést k dramatickým situacím.

EPIDEMIOLOGIE NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

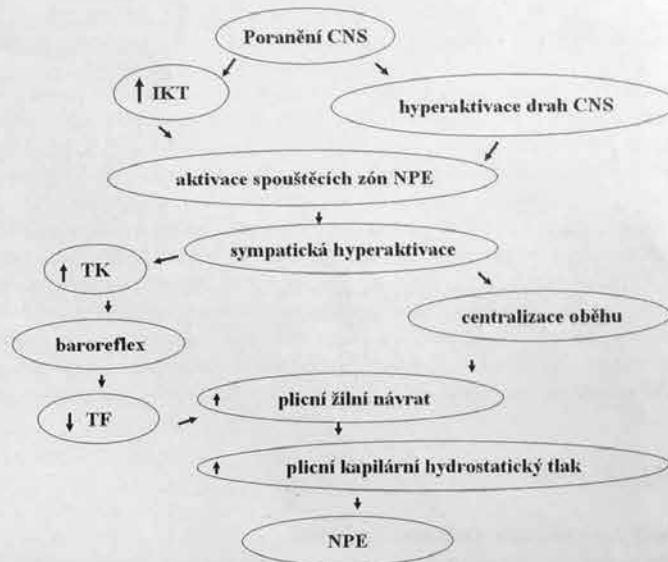
Není snad na světě klinická jednotka, jejíž epidemiologická data by vykazovala tak rozporuplné výsledky jako právě NPE. Podle různých klinických studií se NPE vyskytuje v 1 až 71 % případů poškození CNS. Většina studií našťástí naznačuje, že pravda bude zřejmě někde uprostřed, okolo 20–30 % pacientů s těžkým, náhle vzniklým poškozením CNS. Nižší čísla jsou pravděpodobně zaviněna skutečností, že NPE je u celé řady pacientů s poškozením CNS maskován jinými faktory, nebo je jeho význam v dané chvíli považován za druhořadý, vzhledem k často velmi těžkému celkovému klinickému stavu a nutnosti řešení důležitějších, akutně život ohrožujících stavů (akutní tepenné krvácení, počínající známky herniace mozkové tkáně apod.). Zvýšená čísla jsou pak pravděpodobně způsobena označením jakéhokoliv plicního edému za neurogení, což je opačný extrém. Mortalita NPE se pohybuje okolo 10 % (5).

OBCENÁ ETIOPATOGENEZE PLICNÍHO EDÉMU

Plicní edém obecně vzniká na podkladě porušené rovnováhy intravaskulární a intersticiální tekutiny. Může vznikat z celé řady příčin, které vedou k jednomu nebo více z následujících dějů: 1. zvýšení kapilárního hydrostatického tlaku představuje nejčastější příčinu. Vzniká při přetlaku v žilním systému plic, který může být způsoben jak vlastními plicními cévami, tak poruchou přečerpávání krve levým srdcem. Dalším důvodem může být zvýšení objemu cirkulujících tekutin buď v celém organismu, nebo významná centralizace oběhu do oblasti životně důležitých orgánů, způsobená nejrůznějšími příčinami; 2. zvýšení propustnosti kapilární stěny – tento mechanismus vzniká na podkladě přímého nebo humorálně podmíněného rozšíření prostoru mezi jednotlivými endotelovými buňkami, případně jejich poškozením. Vede k nárůstu extravazace tekutiny a krevních elementů do intersticia a odtud eventuálně do intraalveolárního prostoru; 3. zvýšení povrchového napětí vnitřní plochy alveolů – vzniká v okamžiku, kdy v důsledku poškození nebo změny struktury surfaktantu, které vede ke změně vlastností na hranici vzduch-tekutina, kolapsu příslušných částí plic a úniku tekutiny do alveolů; 4. snížení onkotického tlaku krevní plazmy – vzniká při relativním nebo absolutním poklesu množství bílkovin krevní plazmy, zejména albuminu. Výsledkem je změna osmotického gradientu a únik tekutiny z intravaskulárního prostoru do intersticia a 5. snížení lymfatické drenáže plicního parenchymu – vzniká na podkladě zánětu nebo metastatického rozsevu (6, 7). Může být rovněž vrozená. Vede k nedostatečnému odvádění lymfy plicní tkáně a jejímu hromadění v plicním parenchymu. Předstupněm plicního edému je překrvění plicního parenchymu – kongesce plic. Vlastní plicní edém se projevuje zvýšením tekutiny nejdříve v mezibuněčné hmotě plicního parenchymu – intersticiální edém, následně únikem tekutin do oblastí plicních sklípků – intraalveolární edém a dále i do dalších úseků dýchacích cest. Neurogení plicní edém je charakterizován významným stupněm dilatace plicních kapilár, kongescí kapilár krvinkami, intraalveolárním krvácením a intersticiálním (perivaskulárním) a intraalveolárním edémem, který je tvořen na proteiny bohatým tkáňovým mokem – exsudátem, jež obsahuje více než 70 % plazmatické hladiny proteinů.

ETIOPATOGENEZE NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Ačkoliv je v etiologii NPE podezřívána celá řada mechanismů, není přes všechny snahy etiopatogeneze NPE dodnes spolehlivě vysvětlena. Etiologie NPE je dnes nejčastěji definována jako neuro-humorálně-stresová. Předpokládaný mechanismus rozvoje NPE ilustruje obrázek 1. Patofyziologicky



Obr. 1. Předpokládaný mechanismus rozvoje neurogeního plicního edému

představuje vznik NPE nerovnováhu Starlingových sil, odvislých od permeability kapilárního endotelu, cévního povrchu a hydrostatického a osmotického tlaku (4, 6–8). Roli Starlingových sil při vzniku NPE vymezuje Starlingova rovnice (9). Podle této rovnice je míra exfluxu tekutiny přímo úměrná hydrostatickému tlaku v kapiláře a nepřímo úměrná onkotickému tlaku v kapiláře. Zatímco za normálních okolností je většina této tekutiny odváděna systémem lymfatických cév zpět do žilního řečiště, v případě zvýšeného úniku tekutiny extravaskulárně tyto mechanismy brzy nedokáží tento děj dostatečně kompenzovat a rozvíjí se nejprve intersticiální a následně intraalveolární edém plic. Při extrémně náhlých objemově-tlakových změnách v plicním kapilárním řečišti navíc dochází k mechanickému poškození kapilárních stěn a extravazaci krevních elementů, což je typické právě pro NPE.

Role poranění nervového systému

Neurogení plicní edém se rozvíjí nejčastěji v řádu hodin po poškození CNS nebo akutní exacerbaci chronického onemocnění mozku nebo míchy. Velmi rychle se rozvíjející NPE se může vyvinout i v řádu minut až desítek minut, tento typ je však spíše vzácný. Nejčastěji se rozvíjí u těžkých traumat CNS, u pacientů s epilepsií a v případech subarachnoidálního krvácení. Méně často se vyskytuje u pacientů se subdurálním krvácením, intracerebrálním nebo intramedulárním krvácením, hyponatremické encefalopatie, meningitidy, intrakraniálních a intraspinalních tumorů spojených s rozvojem hydrocefalu, u lupus erythematoses a u záchvatu roztroušené sklerózy (8). Kromě toho může NPE vzniknout velmi vzácně i iatrogeně při neurochirurgických zákrocích. Podobný mechanismus vzniku jako v případě NPE je podezříván i u plicního edému vznikajícího na podkladě feochromocytomu a u hand, foot and mouth disease (10, 11). Relativně sporné je označení NPE u toxických poškození tkáně CNS exogenními substancemi, jako jsou salicyláty (12), heroin (13), metadon (14). Efekty těchto látek

jsou někdy přirovnávány k experimentálnímu modelu NPE, který je indukován vpravením veratrinu do cisterna magna. Neurogenní plicní edém byl popsán až u 20 % těžkých poranění mozku, charakterizovaných Glasgow coma scale < 8 (15). Studie Rogerse et al. (16) popisuje výskyt NPE ve 32 % případech poranění mozku s následkem smrti, přičemž 50 % pacientů s NPE zemřelo do 3 dnů. Výskyt NPE bývá v případech poranění mozku nejčastěji sdružen s náhlým vzestupem intrakraniálního tlaku (17). Byly však popsány i případy, kde prokazatelně ke vzestupu intrakraniálního tlaku nedošlo a přesto se edém rozvinul (18). Poškození plic v důsledku NPE je vedle infekce nejčastější příčinou kontraindikace jejich použití pro transplantaci u pacientů s diagnostikovanou mozkovou smrtí. Trulock (19) udává, že NPE je jednou z příčin toho, že pouze 20 % multiorganových dárců má plíce ve stavu vhodném k transplantaci. Subarachnoidální krvácení, vznikající zejména na podkladě ruptury aneuryzmatu mozkové tepny, je jednou z nejčastějších příčin NPE. Velmi významná data udává studie Weira (20) popisující výskyt NPE u 71 % případů fatálního subarachnoidálního krvácení. Z této studie však vyplývá, že pouze 31 % pacientů mělo klinické známky NPE v období před úmrtím. V rozsáhlé retrospektivní studii na 477 pacientech nalezli Muroi et al. (21) NPE u 8 % pacientů. U všech pacientů se jednalo o rozsáhlý plicní edém s výraznou hemoragickou složkou. Edém byl signifikantně častější u pacientů, u kterých se příčina nacházela v dorzální části Willisova tepenného okruhu. Zvýšený intrakraniální tlak byl nalezen u 67 % pacientů s edémem. I když byly u 83 % pacientů nalezeny zvýšené srdeční markery, žádný z pacientů neměl v anamnéze ani v průběhu hospitalizace zjištěnu závažnou srdeční vadu. Neurogenní plicní edém měl zásadní dopad na návrat neurologických funkcí; Glasgow coma scale nižší než 4 mělo více než 77 % pacientů s NPE ve srovnání s 25 % pacientů bez NPE. V případě subarachnoidálního krvácení byl opakovaně popsán pozdní nástup rozvoje NPE, který se vyvíjel i několik dní po nejvýznamnější atace krvácení. Kromě toho se zpočátku mírný edém po různém období latence nebo zdánlivé rezoluce opět rozvíjí ve výrazně těžší až smrtelný stav (22). Epileptický záchvat je jednou z nejčastějších netraumatických příčin NPE. Nejčastější příčinou je záchvat typu grand mal. Neurogenní plicní edém se zde vždy rozvíjí v období po vlastním epileptickém záchvatu, u jednoho jedince i vícekrát za život (4, 23, 24). Ve studii Mulroye et al. (23) bylo zjištěno, že NPE ohrožuje zejména dětské pacienty s epilepsií. Celá řada experimentálních dat a klinických zkušeností ukazuje, že NPE může rovněž způsobit náhlá hyperaktivace většího množství drah, které vedou do center NPE. Typicky nastává tato situace u subarachnoidálního krvácení (2) nebo kompresní léze v hrudní části míchy (25–28). Experimentální data ukazují, že anestezie, aplikovaná epidurálně nebo intratekálně do místa léze může rozvoji NPE zabránit, což lze velmi dobře sledovat i ve vymezení hemodynamické odpovědi (6, 29). Experimenty na ventilovaných zvířatech ukázaly, že NPE můžeme zabránit, pokud provedeme transekcii krční míchy nad úroveň nebo přímo v úrovni míšní C7 (30, 31). V této oblasti se totiž nacházejí dráhy sympatiku, které převádějí tyto autonomní signály do oblasti plic. Vzato z opačného pohledu, rozvoj NPE můžeme potencionovat, pokud míšní dráhy v této úrovni stimulujeme.

Role intrakraniálního tlaku

Epidemiologická data ukazují, že NPE vzniká zejména při rozsáhlejších poškozeních CNS, s výrazným podílem případů se zvýšeným intrakraniálním tlakem. V experimentu bylo prokázáno, že při náhlém zvýšení intrakraniálního tlaku dochází ke zvýšení tlaku systémového a mírnému zpomalení srdeční frekvence během 1 minuty. Zvýšení systémového a plicního tlaku spojené se zvýšeným žilním návratem, pozitivně inotropním účinkem na srdce a zvýšeným srdečním výdejem v závislosti na zvýšení tlaku intrakraniálního se označuje jako Cushingův reflex (5). Cílem tohoto reflexního mechanismu je za každou cenu perfundovat otékající tkáň CNS proti rostoucí pe-

riferní kapilární rezistenci; jeho důsledkem je však plicní edém. Cushing sám vysvětlil tento reflexní mechanismus na základě skutečnosti, že se v prodloužené míše hodnoty intrakraniálního tlaku přibliží hodnotám tlaku systémového a mozkový perfuzní tlak klesne pod prahovou hodnotu, při které je mozková cirkulace ještě schopna autoregulace a zajištění 100 % nutričních potřeb (32). Při injekci plně krve nebo roztoku albuminu do cisterna magna umírá 50 % pokusných zvířat na komplikace spojené se vznikem NPE. Přitom množství vpravené tekutiny je mnohem důležitější než její složení. Někteří autoři prokázali, že role zvýšeného intrakraniálního tlaku při vzniku NPE je dána zejména tlakovou ischemií jader prodloužené míchy a deformace mozkového kmene, které vedou ke Cushingově odpovědi, zejména ve smyslu zvýšení krevního tlaku (sympatikus) a poklesu srdeční frekvence (parasympatikus) (33). Dnes se ukazuje, že mechanická deformace mozkového kmene má mnohem větší vliv na rozvoj systémové odpovědi, jejíž součástí je i NPE, než ischemická složka ve smyslu Cushingovy teorie. Jiní autoři prokázali, že při provedení bilaterální adrenalectomie před zákrokem na míše ke zvýšení systémového tlaku ani změnám srdeční frekvence nedochází. Na druhé straně, oboustranná vagotomie nemá žádný protektivní efekt při vzniku NPE, naopak rozsah edému ještě více zhoršuje. Zvýšený intrakraniální tlak prokazatelně poškozuje centra v prodloužené míše, která jsou podezřívána ze spuštění sympatické bouře. Klinické studie ukazují, že subarachnoidální krvácení z ruptury aneuryzmatu v povodí arteria vertebralis vede ke vzniku NPE častěji než ruptura aneuryzmatu v jiné lokalizaci. Nepřímé důkazy nasvědčují tomu, že ztráta krve může mít „protektivní“ vliv při rozvoji NPE, neboť se nemožou v dostatečné míře uplatnit významné tlakové změny, způsobené sympatickou bouří. Z doby války ve Vietnamu pochází kauzistika vojáka, který byl střelen nejdříve do břicha a poté do hlavy. Kulka, která zasáhla břišní dutinu, způsobila laceraci vena cava inferior a masivní vnitřní krvácení. Voják zemřel na následky poranění mozku, u plicích však nebyly nalezeny žádné známky plicního edému (5).

Hyperaktivace sympatického nervového systému

Na vzniku NPE se nejpravděpodobněji podílí náhle vzniklá systémová alfa-adrenergická stimulace sympatiku a uvolnění vazomotorických substancí, označovaná jako catecholaminová bouře nebo méně často Cushingova odpověď. Výsledkem je generalizovaná vazokonstrikce a nárůst systémového a plicního tlaku, vedoucí k centralizaci oběhu. Následkem těchto změn je zvýšení plicního hydrostatického tlaku, poškození cévní a alveolární stěny, nárůst permeability alveolární stěny a uvolňování tekutiny a krevních buněk do intraalveolárního prostoru. Patofyziologický mechanismus, který se snaží vysvětlit vznik náhlých rozsáhlých hemoragií do plicního parenchymu na základě catecholaminové bouře, se označuje jako teorie výbuchu. Role sympatického systému při rozvoji NPE byla přímo i nepřímo prokázána celou řadou experimentů s využitím nejrůznějších experimentálních modelů. Příkladem je studie Novitzkyho et al. (34), kteří na opičím modelu zabránili rozvoji NPE, indukovaného nafouknutím balonku intrakraniálně, chirurgickou sympatektomií. Farmakologickým korelátom této studie je naše zjištění, že preventivní podání gangliového blokátoru pentolinia zcela zabránilo rozvoji NPE u potkanů s poraněním míchy (25). Celkový pohled na tyto experimenty navíc ukazuje, že čím má pokusné zvíře více rozvinutý plicní autonomní systém, tím pravděpodobněji a tím těžší rozvine NPE. O náchylnosti k jeho rozvoji tedy vypovídá již samotný morfologický substrát (8). Někteří autoři, aby zdůraznili roli plicního řečiště a sympatiku při jeho vzniku, razili pro NPE termín neurohemodynamický plicní edém (8). Následky catecholaminové bouře jsou zvýšení systémového a plicního krevního tlaku, pokles tepové frekvence, centralizace krevního oběhu, zvýšený venózní návrat, zvýšení levostranného end-diastolického tlaku, zvýšení kapilárního hydrostatického tlaku a extravazace tekutiny, vedoucí k plicnímu edému.

Role krevního tlaku a tepové frekvence

V experimentech na zvířatech bylo opakovaně prokázáno, že rozvoji NPE předchází náhlé významné zvýšení systémového krevního tlaku. Blessing et al. (35) pozorovali zvýšení systémového tlaku o 40 mm u králíků, kterým experimentálně vyvolali NPE pomocí bilaterální destrukce A1 neuronů v medulla oblongata. Reis et al. (36) vyvolali NPE pomocí léze nucleus tractus solitarii na modelu laboratorního potkana a předpokládali, že smrt zvířete nastává na základě levostranného srdečního selhání v terénu těžké hypertenze. Blessing et al. (35) pozorovali zvýšení cévní rezistence v abdominální aortě bezprostředně po inzultu, spouštějícím NPE o 350 %. Bradykardie je častým průvodním jevem při rozvoji NPE. Experimentálně bylo pozorováno, že bradykardie vzniká souběžně s elevací systémového tlaku (35). Podkladem bradykardie je pravděpodobně, podobně jako při aktivaci sympatiku, komprese a ischémie mozkového kmene. Bradykardie přímo následuje zvýšení intrakraniálního tlaku. Jádra mozkového kmene, odpovědná za tuto reakci, jsou pravděpodobně nucleus tractus solitarii a nucleus ambiguus. Experimentální data ukazují, že osu „mozkový kmen – srdeční frekvence“ není možné ovlivnit změnami systémového krevního tlaku. Zajímavé je, že experimentální intrakraniální hypertenze na levé straně mozkového kmene má výrazně větší vliv na rozvoj arytmií než na straně pravé. Pravděpodobně je to dáno asymetrickou autonomní periferní inervací srdce (37). Z těchto pokusů je zřejmé, že bradykardie pozorovaná u NPE může vznikat více na základě ovlivnění center v CNS než na podkladě periferního baroreflexu (27). Bradykardii u NPE je možné zvrátit pomocí bilaterální vagotomie nebo léze nucleus dorsalis nervi vagi.

Význam parasympatického nervového systému

Nervus vagus představuje jediný zdroj parasympatiku plic. Stimulace nervus vagus, například pomocí acetylcholinu, indukuje plicní vazodilataci a snížení kapilárního hydrostatického tlaku. Působení acetylcholinu je přitom dvojího typu – jednak působí na muskarinové receptory plicní hladké svaloviny cév, která takto ochabuje, jednak v plicním cévním řečišti inhibuje uvolňování katecholaminů (38). Naproti tomu, uvolnění vazoaktivního intestinálního polypeptidu z nervus vagus je příkladem působení alternativní, non-cholinergní, non-adrenergické cesty. V experimentech na morčeti, králíkovi a potkanovi bylo ukázáno, že oboustranné přetětí nervus vagus (bilaterální vagotomie) je schopné samo o sobě vyvolat plicní edém. Ačkoliv byl tomuto edému původně přiřazován stejný patofyziologický mechanismus jako edému neurogeninímu – tj. excesivní aktivace sympatiku na základě vyřazení parasympatiku, tedy ono úplné odstranění závaží z jedné mísky vah a úplné převážení mísky druhé (39), další experimenty tyto úvahy nepotvrdily. Ukázalo se totiž, že bilaterální vagotomie pod odstupem nervus laryngeus recurrens plicní edém nevyvolává, a byly tak potvrzeny úvahy skeptiků, kteří tvrdili, že tento druh edému je způsobem obstrukcí dýchacích cest v důsledku laryngeálního a bronchiálního spazmu. Obstrukce dýchacích cest vyústí ve zvýšené nasávání a hromadění vzduchu v postižených plicních segmentech. V nepostižených plicních segmentech vzniká reflexním mechanismem negativní intersticiální tlak, který vyústí ve zvýšení transkapilárního filtračního tlaku v převzdušněných částech plic a dochází k rozvoji plicního edému. Nakonec se ukázalo, že bilaterální vagotomie pod odstupem nervus laryngeus recurrens nemá ani stupňující ani protektivní vliv na rozvoj NPE (8). Hlavním nebezpečím NPE je zejména náhlý a velmi razantní rozvoj, který může během několika minut ukončit život pacienta (40, 41). Z války ve Vietnamu pochází kazuistika naprosto zdravého vojáka, který byl v průběhu bitvy střelen zezadu do hlavy a na místě padl mrtev. Jeho pitva prokázala masivní NPE, vzniklý na základě rozsáhlého poranění mozku a zároveň vyloučila jinou příčinu plicního edému (5). V jeho patogenezi hra-

je významnou úlohu hemoragická složka, která je nejvíce vyjádřena právě u tohoto typu plicního edému. V našich experimentech vedla masivní exsudace sangvinolentní tekutiny z plic k úmrtí více než 40 % pokusných zvířat s nízkou hladinou isofluranové anestezie ve velmi krátké době (25, 26). Vznik NPE může být navíc potencován plicní kapilární vazokonstrikcí nebo změnami ve stěnách plicních cév v důsledku systémové choroby, jak bylo popsáno v případě systémového lupus erythematoses. Z řady experimentů vyplývá, že zvýšený krevní tlak hraje sice velmi důležitou roli, není však jediným zdrojem rozvoje NPE. V roce 1981 provedli Hoff et al. pokus, ve kterém modelovému zvířeti pomocí pouštění žilou regulovali tlak na normální hodnotu v kritické době rozvoje NPE. Neurogeniní plicní edém byl sice menšího rozsahu, jeho rozvoj byl však pravidlem (42). Podobnou zkušenost máme i u našich experimentálních zvířat – pokud zvíře během výkonu v rámci experimentálního poranění míchy více kvácí, existuje menší pravděpodobnost, že zemře na následky NPE; edém však vytvořen bude. Tato zjištění odpovídají hemodynamickým vlastnostem krevního řečiště (28).

Poškození myokardu

V důsledku závažných hemodynamických změn dochází v průběhu rozvoje NPE i k sekundárnímu poškození myokardu. Syndrom bývá často označován jako syndrom myokardiálního otřesu (angl. neurogenic stunned myocardium) nebo Tako-Tsubo kardiomyopatie. Projevuje se nejčastěji reverzibilní generalizovanou hypokinezi srdečního svalu, doprovázeného sníženou ejekční frakcí. Vznik syndromu myokardiálního otřesu je nejpravděpodobněji způsoben náhlým vzestupem sérových katecholaminů, který je jedním z mechanismů, spouštějících NPE. Kromě toho se může podílet i katecholaminy vyvolaný nárůst systémové cévní rezistence. Syndrom je podmíněn generalizovaným výskytem mikronekróz v srdečním svalu (43). Mimořádně důležité je zjištění, že navzdory tomu, že syndrom myokardiálního otřesu vede v akutním stadiu často k výraznému zhoršení až smrti pacienta, při zvládnutí této situace nezanechává na myokardu téměř žádné funkčně-morfologické stopy a v průběhu 4–5 dnů se spontánně upraví. V těchto místech tedy spočívá velký potenciál pro budoucí výzkum, jehož cílem by mělo být terapeuticky ochránit srdeční sval proti působení negativního vlivu NPE a pomoci mu aktivně překlenout nejtěžší období, s výhledem vědomí, že v následujícím období bude schopen spontánní restituce ad integrum. Diferenciálně diagnosticky může být někdy obtížné odlišit syndrom myokardiálního otřesu od infarktu myokardu (44).

Látka ovlivňující vznik a rozvoj neurogeniního plicního edému

Rozvoj a stupeň NPE ovlivňuje celá řada farmak a neurohumorálních působků. Mezi nejvýznamnější patří adrenalin, noradrenalin, neuropeptid Y, pentolinium, atropin a oxid dusnatý (28, 45). Adrenalin a noradrenalin hrají prokazatelně roli v průběhu katecholaminové bouře, infuze adrenalinu a noradrenalinu však per se NPE nezpůsobuje (46). Neuropeptid Y je neurohumorální působek, který má celou řadu farmakologických účinků, jako např. antinociceptivní, anxiolytický a orexigeniní (zvyšující chuť k jídlu) a roli v modulaci cirkadiálního rytmu (47). Pokud je experimentálně do plic vpraven neuropeptid Y, který je mimojiné společně s noradrenalinem vylučován sympatickými nervy, a zvyšuje tak stupeň plicní vazodilatace a plicní vaskulární permeabilitu, reguluje organismus pokusného zvířete zvýšením plicní vaskulární permeability a vznikem NPE. Neuropeptid Y přitom působí přímo na endotelové buňky. Neuropeptid Y je schopen působením na GABA-ergní, glutamatergní a dopaminergní nervové dráhy ovlivňovat hloubku anestezie na úrovni CNS (47). Různé druhy anestetik, jako např. pentobarbital nebo ketamin, jsou zpětně schopny ovlivňovat receptory pro neuropeptid Y, a v důsledku pak i modulovat

vznik NPE (40,41). Naše práce prokázaly, že podání pentolinia nebo atropinu dokáže zvrátit rozvoj NPE (25, 28, 45). Experimentální údaje ukazují, že endogenní opioidy (např. endorfiny) jsou zodpovědné za zvýšení plicní vaskulární permeability a objem extravaskulární tekutiny na podkladě zvýšení nitrolebního tlaku (48). Tato zjištění jsou založena na základě pozorovaného protektivního vlivu naloxonu (antagonista opioidních receptorů) při rozvoji NPE. Bylo prokázáno, že podání fentolaminu je schopno zabránit rozvoji NPE (49–51). Experimentální i klinická data ukazují, že beta-adrenergní složka je při rozvoji NPE méně významná. Colgan et al. (52) ukázal na psím modelu hypertenze, že propranolol redukuje plicní intravaskulární tlak a rozsah plicního zkratu. Při použití našeho modelu NPE jsme prokázali, že propranolol má mírně protektivní účinky na jeho rozvoj, které jsou však nesrovnatelně méně výrazné ve srovnání s alfa-adrenergní blokádou (27).

ANAMNÉZA, KLINICKÝ OBRAZ A VYŠETŘENÍ

Z anamnestických údajů jsou z hlediska NPE důležité zejména parametry související se současným onemocněním CNS. Obecně řečeno jsou příznaky NPE poměrně různorodé a často nespecifické. Diagnostika proto není často snadná. Velmi důležité je dát tento klinický stav do souvislosti s akutně vzniklým poškozením CNS. Pokud je však již jednou pomýšeno na NPE, potvrzení diagnózy nečiní obvykle potíže. Klíčovým vyšetřením pro diagnostiku NPE je fyzikální vyšetření (zejména vědomí, srdeční a dechová frekvence, krevní tlak, typ dýchání, poklep a poslech plic).

Subjektivní příznaky

Mezi subjektivní příznaky NPE patří:

1. náhle vzniklá dušnost (dyspnoe) – vzniká zejména v důsledku zvýšené dechové práce a větších tlakových změn a napětí v hrudním koši a v plicním parenchymu;
2. bolesti na hrudi – vznikají ze stejných příčin jako dušnost, nemají charakter stenokardií;
3. zhoršené odkašlávání – je způsobeno přetížením dýchacího svalstva předchozí námahou a nemožností kašlem odstranit edematózní tekutinu v alveolárních částech plic;
4. bolesti hlavy, nauzea a zvracení – jsou způsobeny hypoxií. Často jsou projevem poškození CNS, zejména zvýšeného intrakraniálního tlaku.
5. celkové oslabení – projevuje se pocity slabosti, schváceností, úzkostí až obavami o vlastní život, které vznikají v důsledku nemožnosti se dostatečně nadechnout a bolestí při dýchání. Pacient se výrazně potí.

Objektivní příznaky

Mezi objektivní příznaky NPE patří:

1. vazba na poškození CNS – pro diagnostiku je klíčová. Může se jednat jak o poranění mozku nebo míchy, tak o náhle vzniklý stav poškození parenchymu CNS; způsobený krvácením, tlakem útvarů různé etiologie nebo náhlou exacerbací celkové chronické choroby.
2. povrchnější dýchání – jedná se o obrannou reakci organismu na edémem způsobené zvýšení tlakových změn, potřebných pro ventilaci. Pacient více zapojuje pomocné dýchací svaly. Může být přítomno vpadávání supraklavikulárních jamek a prodloužení expirace se spastickými bronchitickými fenomény.
3. tachypnoe – důsledek hypoxie organismu. Vzhledem k tomu, že organismus nemůže zvyšovat dechovou práci zvětšením dechového objemu, musí takto činit zvýšením dechové frekvence.
4. tachykardie – rovněž důsledek hypoxie. Vzniká reflexně, snahou o lepší zajištění krevního zásobení organismu.

5. poslechový nálezný – typické jsou polopřívzvučné až nepřívzvučné vrzoty a chrůpky malých bublin, začínající při bázích plic a později se šířící na celý plicní parenchym. Chrůpky bývají typicky nad oběma plicemi, mohou však začínat na jedné plicí a později se šířit i nad druhou plicí.

6. suchý dráždivý kašel – ke kašli dráždí tekutina přítomná v plicích;

7. narůžovělé sputum až hemoptýza – jsou typické pro NPE v důsledku jeho hemoragické složky;

8. hypoxemie – vzniká v důsledku nedostatečného okysličování krve kyslíkem, která se projevuje nízkým parciálním tlakem O_2 , sníženou saturací hemoglobinu kyslíkem, chladnými a bledými akry až cyanózou, vystupňovanou dušností, zapojováním pomocného dýchacího svalstva a řadou subjektivních nespecifických příznaků typu únavy a malátnosti. Hyperkapnie u plicního edému nebývá přítomna, neboť zvýšené ventilační úsilí v naprosté většině případů kompenzuje difuzní a ventilační poruchy. Častěji nacházíme hypokapnii, vznikající v důsledku zvýšeného ventilačního úsilí, která vede k rozvoji respirační alkalózy. Tento stav snižuje stupeň ionizace kalcia, a vede tak ke zvýšené neuromuskulární dráždivosti až křečím kosterního svalstva. Kromě toho může hypokapnie způsobovat vazokonstrikci mozkových cév, a tedy projevy sníženého zásobení krve kyslíkem v podobě točení hlavy, závratí až poruch vědomí.

9. zvýšený intrakraniální tlak – je důsledkem nebo příčinou poškození CNS. Neurogenní plicní edém jej nevyvolává.

10. poruchy vědomí – vznikají buď v důsledku hypokapnie, nebo častěji v důsledku generalizované hypoxie;

11. spíše mírnější zvýšení teploty – NPE je nezánětlivý, proto významné zvýšení teploty odráží spíše jiný nebo nasedající zánětlivý stav;

12. smrtelný chropot (angl. death rattle) – doprovází terminální stadium NPE v okamžiku, kdy není edematózní tekutina dostatečně odstraňována;

13. minimální nebo žádné známky zánětu – důležitý diferenciálně diagnostický znak.

Vyšetření

Pro diagnostiku plicního edému je z pomocných vyšetření nejdůležitějším RTG hrudníku. Nacházíme zde obraz plicní žilní hyperemie a difuzní zastření plicního parenchymu v důsledku intersticiálního edému, které v pozdějších stadiích přechází v husté zastření, odpovídající alveolárnímu edému. V případě NPE bývá zpočátku maximum zastření v perihilární oblasti, později se rozšiřuje na ostatní části plic. Pro diferenciální diagnostiku je důležité, že v případě kardiálních příčin doprovází RTG obraz zvětšení levostranného srdečního stínu. V případě prodělaného infarktu myokardu můžeme pozorovat i vyklenující se poinfarktové aneurysma levé srdeční komory. V 90 % případů je možné pozorovat různý stupeň difuzního zastření obou plicních polí, zejména v hilové oblasti, nástřik plicních cév a normální velikost srdečního stínu. Monitoring plicního tlaku v zaklínění může poskytnout důležité diferenciálně diagnostické údaje v rámci odlišení kardiálního plicního edému, jeho nevýhodou je však invazivita. Kromě toho v případě plicního edému poměrně nepřesně odráží hodnoty kapilárního hydrostatického tlaku, a může proto často vykazovat normální hodnoty i v případě velmi vysokého kapilárního hydrostatického tlaku, prohlubujícího plicní edém (53). Biochemické testy jsou zde spíše druhořadé, časté monitorování pomocí ASTRUP může být přínosem. V periferní krvi je patrná významná metabolická acidóza se zvýšeným deficitem bazí. Vyšetření krevních plynů odhalí známky hypoxie a snížení parciálního tlaku oxidu uhličitého. Elektrokardiografie a echokardiografie pomohou vyloučit kardiogenní příčinu plicního edému. Echokardiografie pomůže odhalit syndrom myokardiálního otřesu, projevující se generalizovanou hypokinezi srdečního svalstva, doprovázeného sníženou ejekční frakcí. Vyšetření srdečních enzymů pomůže diferenciálně diagnosticky odhalit infarkt myokardu a další příčiny kardiálního

plicního edému. Pro diagnostiku syndromu myokardiálního otřesu je nejvýznamnější stanovení hladiny troponinu, která je u těchto pacientů nižší než 2,8 ng/ml a vyskytuje se konkomitantně s ejekční frakcí menší než 40 % a echokardiografickými abnormitami, při absenci jakýchkoliv změn na EKG (54). Zvýšené hodnoty mozkového natriuretického peptidu (BNP) naznačují, že příčinou plicního edému je levostranné srdeční selhání. Histopatologicky můžeme makroskopicky pozorovat zvětšené prosáklé plíce, na kterých jsou patrné subpleurální sufuze. Z plic vytéká narůžovělá zpěněná tekutina. Mikroskopicky je suverénním barvení hematoxylin-eosin. Na řezu můžeme pozorovat ztlustělé alveolární stěny a alveoly, vyplněné eozinofilním materiálem, mezi nímž jsou četné krevní elementy s převahou erytrocytů. Časté jsou atelektázy.

DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Diferenciální diagnostika plicního edému (tab. 1) záleží zejména v 1. nalezení nebo vyloučení kardiální příčiny a 2. rozlišení mezi edémem s převahou hydrostatického a permeabilního mechanismu vzniku. Odlišení nemusí být vždy jednoduché, neboť jednotlivé formy se mohou překrývat. Například, primárně hydrostatický mechanismus u kardiálního

Tab. 1. Typické znaky neurogenního plicního edému ve srovnání s ostatními plicními edémy

| Neurogenní plicní edém | Ostatní plicní edémy |
|------------------------------------------|----------------------------------------|
| obecně velmi málo známý | obecně známé |
| etiologie – poškození CNS | etiologie – jiná |
| velmi rychlý nástup | různě rychlý nástup |
| velmi rychlé změny klinického obrazu | středně rychlé změny klinického obrazu |
| hemoragický | nehemoragický |
| vysoká mortalita | střední až nízká mortalita |
| velmi málo prozkoumaný | poměrně dobře prozkoumané |
| velmi sporadicky popisovaný v literatuře | často popisované v literatuře |
| terapie problematická | terapie uspokojujivá |

plicního edému může v případě náhlého nárůstu kapilárního hydrostatického tlaku způsobit tak rozsáhlou extravazaci intravaskulární tekutiny, že může připomínat permeabilní mechanismus vzniku. Základní diferenciativní diagnostická rozvaha je vedena na podkladě anamnézy, fyzikálního vyšetření a laboratorních hodnot. U nekardiálních edémů není obvykle v anamnéze žádná srdeční příhoda ani chronické srdeční onemocnění. U kardiálních edémů nacházíme při fyzikálním vyšetření studená cyanotická akra, zrychlený tep, kardiomegalii, distenzi krčních žil a vlhké chropy na plicích. Pacient s nekardiogenním edémem má obvykle teplá akra bez zásadních poruch tepové frekvence, bez distenze krčních žil a suché chropy na plicích. Z pomocných vyšetření nacházíme u kardiálních plicních edémů známky ischemie na EKG, zvýšené kardiální enzymy a perihilární distribuci vaskulární kongesce na RTG hrudníku. Plicní kapilární tlak obvykle převyšuje 18 mm Hg a poměr množství proteinů v edematózní tekutině ku množství proteinů v krevní plazmě nepřevyšuje 0,5. Naproti tomu u nekardiálních plicních edémů jsou EKG a kardiální enzymy normální, RTG hrudníku vykazuje vesměs periferní distribuci edematózní tekutiny, plicní kapilární tlak je obvykle nižší než 18 mm Hg a poměr množství proteinů v edematózní tekutině k množství proteinů v krevní plazmě je vyšší než 0,7. RTG nálezy se obvykle objeví relativně později, průměrně okolo 12 hodin po začátku kardiopulmonálních

symptomů. V těžkých případech je na podkladě RTG vyšetření obtížné odlišit, zda se jedná o kardiogenní či nekardiogenní plicní edém. Studie však dokazují, že je možné v iniciačních fázích mezi těmito dvěma typy plicního edému najít odlišnosti, pokud se při hodnocení RTG snímku zaměříme na určité specifické rysy; pak je možné kardiogenní od nekardiogenního plicního edému odlišit s přesností na 91 % (55–57). Důležitá kritéria zahrnují:

1. u nekardiogenního plicního edému je místem iniciační akumulace tekutiny plicní intersticiem včetně peribronchiální oblasti a septálních linií. Poměrně rychle se však plicní edém mění v intraalveolární, kdy jsou alveolární prostory zcela vyplněny na proteiny bohatou tekutinou. Naproti tomu u kardiálního plicního edému dochází k zaplnění nitra alveolů tekutinou až v okamžiku, kdy již jsou překročeny reabsorpční kapacity intersticia.

2. Kerleyho linie jsou typické pro kardiogenní plicní edém, zatímco u nekardiogenního plicního edému, vznikajícího na principu zvýšené permeability alveolo-kapilární membrány tyto linie přítomny nejsou. Lze je tedy považovat za znak typický pro kardiální plicní edém.

3. periferní distribuce edematózní tekutiny v plicích a pleurální efuze jsou typické pro nekardiální plicní edém, zatímco u kardiálního se v iniciačních stadiích nevyskytují.

4. u nekardiálního plicního edému jsou normální velikost a morfolgie srdečního stínu a stíny velkých cév. Naproti tomu u kardiálního plicního edému jsou srdeční stín v oblasti levého srdce a šířka cév vycházejících ze srdce, zvětšeny. Neurogenní plicní edém může imitovat celá řada stavů, nejpravděpodobnější jsou však akutní plicní selhání (ALI – acute lung injury) a syndrom akutní dechové tísně (ARDS – adult respiratory distress syndrome). Tyto syndromy totiž vznikají na zánětlivém podkladě vedoucím k difúznímu poškození alveolů (DAD – diffuse alveolar damage) a současně bez akutní vazby na poškození CNS. Mortalita ARDS a ALI je vyšší než mortalita NPE. Klinický obraz aspirační pneumonie je podobný NPE (pacient v těžkém stavu, dechová nedostatečnost, restriktivní porucha dýchání, tachykardie, tachypnoe). Aspirační pneumonie však nevzniká tak dramaticky rychle jako NPE a je u ní přítomna horečka. Je třeba dát pozor na stavy, kdy je horečka způsobena poškozením vlastního CNS (zejména oblasti ventrálního hypothalamu) – to však není na vrub NPE, tento nemá zánětlivou složku. Odeznění příznaků aspirační pneumonie navíc trvá déle, okolo 2 týdnů. Klinický obraz kardiálního plicního edému nejrůznější etiologie, např. v důsledku levostranného srdečního selhání, může rovněž imitovat NPE. Zde jsou nejdůležitější anamnestické údaje a neurologické a kardiologické vyšetření.

TERAPIE NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Základem terapie je odstranění, minimalizace nebo stabilizace příčiny v CNS. Vzhledem k tomu, že cílená kurativní léčba NPE dosud neexistuje, je smyslem terapeutických snah zejména léčba podpurná a symptomatická. Jako nejdůležitější opatření se jeví kontinuální monitorace stavu pacienta, polohování pacienta a podpora ventilace a oxygenace. Neurogenní plicní edém se u většiny pacientů podaří zvládnout do 48–72 hodin. Ačkoliv je léčbu možné považovat spíše za podpurnou než kauzální, tedy jinými slovy, že poskytneme organismu možnost, aby se plicního edému sám zbavil, je tato léčba naprosto klíčová a často život zachraňující. Základem terapeutických snah je kontinuální monitorace životních funkcí pacienta, zejména měření krevního tlaku, tepové frekvence, dechové frekvence, EKG a saturace. Provádíme opakovanou hematologická a biochemická vyšetření krve. Monitorace tlaku v zaklínění může být velkým přínosem v průběhu terapie, neboť umožní udržení nízkých hodnot tlaku na srdeční úrovni a zároveň může zabránit nadměrnému snížení srdečního výdeje a hypoperfuzi mozku (58).

Poloha těla

Pro pacienta s NPE je klíčová poloha těla. Základem je taková poloha, která zabrání zvýšenému žilnímu návratu. Nutná je zvýšená poloha hlavy. Nejvýhodnější je poloha vsedě s dolními končetinami spuštěnými z lůžka. Tuto polohu však nelze uplatnit u pacientů s hypotenzí. V rámci první pomoci je někdy doporučováno dočasné přiměřené zaškrcení dolních kočetin v oblasti stehien, které redukuje žilní návrat z této oblasti. Zaškrcení pochopitelně musí umožňovat cirkulaci, nesmí tedy omezovat proud krve v tepnách. V některých případech může být výhodné pacienta uložit do polohy na břicho, jak doporučuje Marshall a Nyquist (59) nebo Fletcher a Atkinson (60). Tato poloha se velmi osvědčila i u pacientů s ARDS, jak ukazuje randomizovaná klinická studie Guerina (61). Studie Mancebo et al. (62) jasně ukazuje i snížení mortality u pacientů s ARDS, u kterých byla použita poloha na břicho již od prvních projevů onemocnění. Pro NPE zatím systematická studie bohužel neexistuje. Mechanismus terapeutického úspěchu polohy na břicho není zcela jasný, předpokládá se však redistribuce výměny plynů do oblastí méně postižených plicním edémem a zároveň zmírnění poškození plic způsobené umělou plicní ventilací. Při indikaci polohy na břicho však musíme vzít v úvahu, že u některých neurologických onemocnění, jako je intracerebrální krvácení, subarachnoidální krvácení, tepenné uzávěry v oblasti arteria cerebri media nebo poranění mozku, může poloha na břicho přivodit zvýšení intrakraniálního tlaku a takto zhoršit prognózu pacienta.

Oxygenace

Základním opatřením při podpoře oxygenace a ventilace je potlačení hypoxie pomocí přímého podávání kyslíku nosní nebo obličejovou maskou, případně pomocí endotracheální intubace a přetlakové mechanické ventilace pomocí pozitivního endexpiračního přetlaku (PEEP – positive end expiratory pressure). Izolované dodávání kyslíku zvyšuje parciální tlak kyslíku v plicních alveolech, a usnadňuje tak výměnu plynů. Kontinuální nebo dvoustupňové dodání vysokotlakého kyslíku kromě toho umožňuje úlevu přetíženým dýchacím svalům. Přetlaková mechanická ventilace pomocí PEEP značí iatrogeně navozenou situaci, kdy je na konci expira v dýchacích cestách vyšší tlak než atmosférický. Rozeznáváme tři úrovně PEEP. Nízká úroveň značí úroveň PEEP do 5 mm H₂O, střední úroveň značí PEEP v rozmezí 5–15 mm H₂O, vysoká úroveň značí PEEP nad 15 mm H₂O. Pro ventilační podporu pacientů s NPE používáme nejčastěji střední úroveň, výjimečně vysokou úroveň PEEP. Kontinuální pozitivní přetlak v dýchacích cestách (CPAP – continuous positive airway pressure) pak značí situaci, kdy je u spontánně dýchajícího nemocného v dýchacích cestách udržen tlak vyšší než atmosférický po celou dobu dechového cyklu, tedy i v době inspira. Kromě dodávky kyslíku a úlevy dechových svalů přetlaková mechanická ventilace 1. snižuje preload a afterload a takto usnadňuje srdeční činnost, 2. napomáhá redistribuci tekutiny v plicích z intraalveolárních do extraalveolárních prostor, kde tolik neinterferují s výměnou dechových plynů a 3. zvětšuje plicní objem a napomáhá tak prevenci rozvoje plicní atelektázy. PEEP vede ke zlepšení oxygenace v důsledku snížení plicního zkratu a ke zlepšení eliminace oxidu uhličitého na podkladě zvýšení alveolární ventilace. Je však třeba dbát toho, aby nedošlo k hyperinflaci, která se projevuje snížením perfuze ventilovaných alveolů, zhoršením eliminace oxidu uhličitého a dále dokonce zhoršením oxygenace – tento efekt závisí na podílu redistribuce krevního průtoku do neventilovaných oblastí. Bylo prokázáno, že v určitých oblastech plic probíhá průtok krve plicními kapilárami pouze v době expira, kdy je plicní kapilární tlak vyšší než plicní alveolární tlak. Velikost perfuze těmito oblastmi odpovídající velikosti plicního zkratu tak závisí jednak na použité hodnotě PEEP, jednak na velikosti dechového objemu, poměru inspira a expira a hodnotě plicního kapilárního tlaku. Bylo prokázáno, že po pře-

kročení optimální hodnoty středního tlaku v dýchacích cestách, která u konkrétního pacienta závisí na i na aktuální hodnotě plicního kapilárního tlaku, dochází tímto mechanismem nejen ke zhoršení eliminace oxidu uhličitého, ale i oxygenace. Provdzdušněním tekutinou vyplněných alveolů a roztažení kolabovaných alveolů v terénu plicního edému pomocí PEEP se označuje v zahraniční literatuře jako recruitment. Za tento děj je zodpovědný vrcholový alveolární tlak, dosahovaný v průběhu inspira. Kromě působení na respirační systém má PEEP i poměrně velký vliv na hemodynamické poměry v malém oběhu. PEEP 1. snižuje venózní návrat do oblasti levého srdce a tedy i preload, 2. snižuje transmuralní tlakový gradient, který musí být překonáván v průběhu srdeční kontrakce, což vede ke snížení afterloadu a s tím souvisí i 3. snížená spotřeba kyslíku myokardem – tyto efekty jsou nejvíce vyjádřeny u pacientů s levostranným srdečním selháním. Naproti tomu u pacientů bez levostranného srdečního selhání dominuje u aplikace PEEP snížení žilního návratu, a tedy i preloadu. U hypovolemických pacientů pak ke snížení srdečního výdeje. Vliv PEEP na afterload pravé komory závisí na redistribuci plicní reperfuze po zařazení PEEP a na aktuální velikosti plicního objemu. Plicní vaskulární rezistence dosahuje při nízkém plicním objemu vysokých hodnot, což je důsledek hypoxické plicní vazokonstrikce. Se zvyšováním plicního objemu plicní vaskulární rezistence klesá a po překročení optimální hodnoty plicního objemu dochází k jejímu opětovnému vzestupu v důsledku komprese kapilárního řečiště. Efekt aplikace PEEP na funkci pravé komory je tedy výsledkem komplikované interakce mezi snížením preloadu a ovlivněním afterloadu. PEEP má rovněž vliv na nitrobřišní tlak, který po zařazení PEEP stoupá. U pacientů s výrazně sníženou poddajností dutiny břišní může vést použití nadměrně vysokých hodnot PEEP k vzestupu nitrobřišního tlaku a omezení perfuze nitrobřišních orgánů. Nastavení hodnot PEEP v konkrétních situacích je stále předmětem diskuzí.

Farmakologická léčba

V časném stadiu mohou být užitečné alfa-blokátory a kortikoidy, farmakologická terapie však obvykle mnoho nevyřeší. Zvýšení diurézy představuje základní opatření při snižování preloadu. Snižuje hemodynamickou zátěž na levé srdce a pozitivně tak ovlivňuje jak srdeční sval, tak plicní hemodynamiku. Většina kličkových diuretik typu furosemidu, bumetanidu nebo torsemidu představuje úspěšnou podpůrnou terapeutickou modalitu při léčbě plicního edému, i v terénu hypoalbuminémie, hyponatrémie nebo hypochlorémie. Lékem první volby je furosemid, vzhledem k jeho venodilatačnímu účinku, kterým snižuje preload ještě před vlastním počátkem diuretického působení. Počáteční dávky furosemidu jsou doporučovány spíše nižší (do 0,5 mg/kg), teprve při jejich nedostatečném účinku se zvyšují (1 mg/kg), zejména u pacientů již léčených diuretiky nebo pacientů s renální insuficiencí nebo tam, kde je primární příčinou plicního edému hypervolemie. Nitráty slouží k vazodilataci jak koronárních tepen, které zlepšují srdeční funkci, tak ke snížení preloadu levého srdce vazodilatací plicních žil. Zatímco u kardiogenních plicních edémů je jejich účinek významný, u NPE je jejich efekt nižší. V akutním stadiu používáme zejména sublinguálně aplikovaný nitroglycerin (1,2 mg každých 5 minut). Metodou volby, používanou zejména při systolickém tlaku vyšším než 100 mm Hg, je intravenózní podávání nitroprussidu sodného v dávce 0,1–5 µg/kg za minutu. Jeho podávání vyžaduje kontinuální monitoraci jeho hemodynamických parametrů. Morfinové preparáty mají kromě anxiolytického a analgetického účinku, který je v případě NPE rovněž žádoucí, také venodilatační efekt, který snižuje preload. Kromě toho snižuje stupeň dušnosti na podkladě odstranění stresu, útlumu vylučování katecholaminů, odstranění tachykardie a komorového afterloadu. ACE inhibitory mají význam zejména u pacientů s konkomitantní hypertenzí nebo hypertenzní krizí. Zpočátku se podávají spíše nižší dávky, následované vyššími udržovacími dávkami. U izolovaného NPE ne-

mají zásadní efekt. Intravenózní podávání rekombinantního mozkového natriuretického faktoru (BNF) je nová efektivní léčebná modalita, která působí poměrně efektivní vasodilataci a snižuje tak preload. Iničiální dávka je 2 µg/kg, následovaně kontinuální infuzí 0,01 µg/kg za minutu. Při edému mozku a zvýšeném intrakraniálním tlaku aplikujeme příslušnou léčbu, která však ovlivňuje základní onemocnění a nikoli NPE.

ZÁVĚR

Neurogení plicní edém je relativně málo častá, avšak závažná klinická jednotka. Poprvé byl popsán Shanahanem v roce 1908 jako komplikace opakovaných epileptických záchvatů. Jeho rozvoj je vázán na závažné poškození CNS. Centrem vzniku NPE je s největší pravděpodobností skupina jader rostřední ventrolaterální prodloužené míchy, které jej spouští na podkladě kombinace hyperaktivace jejich aferentních drah a náhle zvýšeného intrakraniálního tlaku. V patogenezi NPE hraje zásadní roli sympatický nervový systém, který spouští rychlou kaskádu dějů, vedoucích k intersticiálnímu a intraalveolárnímu edému, který doplňuje výrazná hemoragická složka. V diagnostice NPE má zásadní význam fyzikální vyšetření a RTG hrudníku. Diferenciálně diagnostická úvaha není snadná, avšak šance na správnou diagnózu výrazně rostou, pokud lékař dá do souvislosti poškození CNS a plicní potíže. Cílená kurativní léčba NPE dosud neexistuje, proto je smyslem terapeutických snah zejména léčba podpůrná a symptomatická. Jako nejdůležitější opatření se jeví kontinuální monitorace stavu pacienta, polohování pacienta a podpora ventilace a oxygenace. V současné době existuje několik experimentálních modelů, které je možné využít pro studium etiopatogeneze i léčby NPE. Hlavním cílem experimentálních snah je získání preventivního a terapeutického přístupu, který umožní zabránit a včas léčit NPE. Z tohoto hlediska je zatím nejvíce slibný atropin. Detailnější informace o neurogením plicním edému můře čtenář nalézt v mé recentní monografii na toto téma (63).

Zkratky

| | |
|------|-------------------------------------------------------------------------------|
| ALI | – akutní plicní selhání (acute lung injury) |
| ARDS | – syndrom akutní dechové tísně (adult respiratory distress syndrome) |
| BNF | – mozkový natriuretický faktor |
| CNS | – centrální nervový systém |
| CPAP | – pozitivní přetlak v dýchacích cestách (continuous positive airway pressure) |
| DAD | – difuzní poškození alveolů (diffuse alveolar damage) |
| NPE | – neurogení plicní edém |
| PEEP | – pozitivní endexpirační přetlak (positive end expiratory pressure) |

LITERATURA

- Vinš P. Plicní edém. *Interní medicína pro praxi* 2003; 11: 540–547.
- Fontes RB, et al. Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesthesiol* 2003; 15: 144–150.
- Shanahan WT. Acute pulmonary edema as a complication of epileptic seizures. *N Y Med J* 1908; 37: 54–56.
- Colice GL. Neurogenic pulmonary edema. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 941–948.
- Simmons RL, et al. Respiratory insufficiency in combat casualties. II. Pulmonary edema following head injury. *Ann Surg* 1969; 170: 39–44.
- Šedý J, et al. Mechanism of neurogenic pulmonary edema development. *Physiol Res* 2008; 57: 499–506.
- Šedý J, et al. Rapid but not slow spinal cord compression elicits neurogenic pulmonary edema in the rat. *Physiol Res* 2009; 58: 269–277.
- Malik AB. Mechanisms of neurogenic pulmonary edema. *Circ Res* 1985; 57: 1–18.
- Starling EG. *The Linacre Lecture on the Law of the Heart*. London: Longmans, Green and Company 1918.
- Rassler B. The role of catecholamines in formation and resolution of pulmonary oedema. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targ* 2007; 7: 27–35.
- McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26: 91–107.
- Broderick TW, et al. Salicylate-induced pulmonary edema. *AJR Am J Roentgenol* 1976; 127: 865–866.
- Steinberg AD, Karliner JS. The clinical spectrum of heroin pulmonary edema. *Arch Intern Med* 1968; 122: 122–127.
- Frand UI, et al. Methadone-induced pulmonary edema. *Ann Intern Med* 1972; 76: 975–979.
- Bratton SL, Davis RL. Acute lung injury in isolated traumatic brain injury. *Neurosurgery* 1997; 40: 707–712.
- Rogers FB, et al. Neurogenic pulmonary edema in fatal and nonfatal head injuries. *J Trauma* 1995; 39: 860–866.
- Baumann A, et al. Neurogenic pulmonary edema. *Acat Anaest scand* 2007; 51: 447–455.
- Popp AJ, et al. Delayed pulmonary dysfunction in head-injured patients. *J Neurosurg* 1982; 57: 784–790.
- Trulock EP. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 789–818.
- Weir BK. Pulmonary edema following fatal aneurysm rupture. *J Neurosurg* 1978; 49: 502–507.
- Muroi C, et al. Neurogenic pulmonary edema in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol* 2008; 20: 188–192.
- Fisher A, Aboul-Nasr HT. Delayed nonfatal pulmonary edema following subarachnoid hemorrhage. Case report. *J Neurosurg* 1979; 51: 856–859.
- Mulroy JJ, et al. Postictal pulmonary edema in children. *Neurology* 1985; 35: 403–405.
- Darnell JC, Jay SJ. Recurrent postictal pulmonary edema: a case report and review of the literature. *Epilepsia* 1982; 23: 71–83.
- Šedý J, et al. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma* 2007; 24: 1487–1501.
- Šedý J, et al. A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neurosci Lett* 2007; 423: 167–171.
- Šedý J, et al. Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 2008; 70: 308–313.
- Šedý J, et al. The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats: the effect of preventive interventions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297: R1111–R1117.
- Hall SR, et al. Intrathecal lidocaine prevents cardiovascular collapse and neurogenic pulmonary edema in a rat model of acute intracranial hypertension. *Anesth Analg* 2002; 94: 948–953.
- Chen HI, et al. Pulmonary edema and hemorrhage resulting from cerebral compression. *Am J Physiol* 1973; 224: 223–229.
- Chen HI, Chai CY. Integration of the cardiovagal mechanism in the medulla oblongata of the cat. *Am J Physiol* 1976; 231: 454–461.
- Cushing H. Concerning a definitive regulatory mechanism of the vasomotor center which controls blood pressure during cerebral compression. *John Hopkins Hosp Bull* 1901; 12: 290.
- Thompson RK, Malina S. Dynamic axial brain-stem distortion as a mechanism explaining the cardiorespiratory changes in increased intracranial pressure. *J Neurosurg* 1959; 16: 664–675.
- Novitzky D, et al. Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon. *Ann Thorac Surg* 1986; 41: 520–524.
- Blessing WW, et al. Hypertension, bradycardia, and pulmonary edema in the conscious rabbit after brainstem lesions coinciding with the A1 group of catecholamine neurons. *Circ Res* 1981; 49: 949–958.
- Reis DJ, et al. Brain lesions and hypertension: chronic lability and elevation of arterial pressure produced by electrolytic lesions and 6-hydroxydopamine treatment of nucleus tractus solitarius (NTS) in rats and cats. *Prog Brain Res* 1977; 47: 169–188.
- Krasney JA, Koehler RC. Heart rate and rhythm and intracranial pressure. *Am J Physiol* 1976; 230: 1695–1700.

38. **Bergofsky EH.** Humoral control of the pulmonary circulation. *Annu Rev Physiol* 1980; 42: 221–233.
39. **Schmitt GH, Meyers FH.** Characterization of the acute pulmonary edema that follows vagal section in the guinea pig. *Am J Physiol* 1957; 190: 89–92.
40. **Leal Filho MB, et al.** Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63: 990–996.
41. **Leal Filho MB, et al.** Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci Lett* 2005; 373: 165–170.
42. **Hoff JT, et al.** Experimental neurogenic pulmonary edema. Part 1: The role of systemic hypertension. *J Neurosurg* 1981; 54: 627–631.
43. **Marshall SA, Nyquist P.** A Change of Position for Neurogenic Pulmonary Edema. *Neurocrit Care* 2009; 10: 213–217.
44. **Seow VK, et al.** Neurogenic pulmonary oedema misdiagnosed as acute myocardial infarction in a comatose patient. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36: 684–686.
45. **Sedý J, et al.** Atropine prevents the neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 2009; 73: 42–44.
46. **Rosell S.** Neuronal control of microvessels. *Annu Rev Physiol* 1980; 42: 359.
47. **Naveilhan P, et al.** Distinct roles of the Y1 and Y2 receptors on neuropeptide Y-induced sensitization to sedation. *J Neurochem* 2001; 78: 1201–1207.
48. **Peterson BT, et al.** Effect of naloxone on the pulmonary vascular responses to graded levels of intracranial hypertension in anesthetized sheep. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 1024–1029.
49. **Maron MB, Dawson CA.** Pulmonary venoconstriction caused by elevated cerebrospinal fluid pressure in the dog. *J Appl Physiol* 1980; 49: 73–78.
50. **Maron MB.** Dose-response relationship between plasma epinephrine concentration and alveolar liquid clearance in dogs. *J Appl Physiol* 1998; 85: 1702–1707.
51. **Hakim TS, et al.** Effects of sympathetic nerve stimulation on lung fluid and protein exchange. *J Appl Physiol* 1979; 47: 1025–1030.
52. **Colgan FJ, et al.** Protective effects of beta blockade on pulmonary function when intracranial pressure is elevated. *Crit Care Med* 1983; 11: 368–372.
53. **Ganter BG, et al.** Pulmonary capillary pressure. A review. *Minerva Anesthesiol* 2006; 72: 21–36.
54. **Schubert A.** Cardiovascular therapy of neurosurgical patients. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2007; 21: 483–496.
55. **Kithireotis P.** Noncardiogenic pulmonary edema, ARDS, acute respiratory failure. *Hell Respir Soc Publ* 2000; 1: 452–458.
56. **Milne EN, et al.** The radiologic distinction of cardiogenic and noncardiogenic edema. *Am J Roentgenol* 1985; 144: 879–894.
57. **Aberle R, et al.** Hydrostatic versus increased permeability pulmonary edema. Diagnosis based on radiographic criteria in critically ill patients. *Radiology* 1988; 168: 73–75.
58. **Lagerkranser M, et al.** Neurogenic pulmonary oedema: a review of the pathophysiology and clinical and therapeutic implications. *Acta Med Scand* 1982; 212: 267–271.
59. **Fletcher SJ, Atkinson JD.** Use of prone ventilation in neurogenic pulmonary oedema. *Br J Anaesth* 2003; 90: 238–240.
60. **Guerin C.** Ventilation in the prone position in patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12: 50–54.
61. **Mancebo J, et al.** A multicenter trial of prolonged prone ventilation in severe acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 1233–1239.
62. **Sedý J.** Neurogení plicní edém, 1. vydání. Bratislava: Spišské vydavateľstvo 2011.

Spolek lékařů českých v Praze

Spolek lékařů českých v Praze pořádá v **lednu, únoru a v březnu 2011** pravidelné přednáškové večery s diskuzí. Začátek v 17 hodin v Lékařském domě v Praze 2, Sokolská 31.

DNE 7. BŘEZNA 2011

Přednáškový večer 2. interní kliniky 3. LF UK a FNKV

Přednosta: prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

Syllabův večer

Večer věnovaný

prof. MUDr. Jiřímu Syllabovi

Koordinátor: prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

1. M. Anděl: Úvod (5 min)
 2. M. Anděl: Prof. Jiří Syllaba: diabetolog, internista, vědec a klinický učitel – život propojující klasické hodnoty s modernismem (10 min)
 3. J. Trnka: Jak překonat rozdělení preklinických a klinických oborů ve výuce (10 min)
 4. Z. Vernerová: Jak se vyučuje patologie v Nottinghamu (10 min)
 5. D. Marx: Srovnání hodinových dotací výuky na českých a vybraných evropských lékařských fakultách (15 min)
 6. M. Anděl: Mění se curriculum výuky medicíny na 3. lékařské fakultě UK (15 min)
- Diskuze

DNE 14. BŘEZNA 2011

Přednáškový večer Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FNKV

Přednosta: prof. MUDr. Milan Macek, DrSc.

Seklův večer

Novinky v reprodukční a psychiatrické genetice

Koordinátor: prof. MUDr. Petr Goetz, DrSc.

1. P. Goetz: Úvod (5 min)
 2. M. Macek, sr.: Farmakogenetické využití polymorfismu receptoru FSH (15 min)
 3. J. Diblík: Nové referenční hodnoty WHO pro spermogram (15 min)
 4. H. Kuželová: Farmakogenetika u ADHD (15 min)
 5. M. Vlčeková: Submikroskopické aberace u pacientů s mentální retardací (15 min)
- Diskuze

DNE 21. BŘEZNA 2011

Přednáškový večer II. interní kliniky 1. LF UK a VFN

Přednosta: prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc.

Pelnářův večer

Koordinátor: prof. MUDr. Michael Aschermann, DrSc.

1. A. Linhart: Úvod (5 min)
2. M. Pšenička, E. Kejřová, S. Magage, J. Gandalovičová, A. Linhart: Upgrade na biventrikulární kardiostimulaci u pacientů se srdečním selháním navozeným stimulací pravé komory (15 min)

3. S. Magage, M. Pšenička, E. Kejřová, M. Válek, A. Linhart: Implantabilní defibrilátory – naše zkušenosti (15 min)

4. J. Šimek, D. Wichterle, Š. Havránek, M. Pšenička: Nefarmakologická léčba fibrilace síní (15 min)

5. D. Wichterle, J. Šimek, Š. Havránek, M. Pšenička: Katetrizační léčba komorových tachykardií (15 min)

Diskuze

DNE 28. BŘEZNA 2011

Přednáškový večer Kliniky dětské chirurgie

2. LF UK a FN Motol

Přednosta: prof. MUDr. Jiří Šnajdauf, DrSc.

Kafkův večer – dětská chirurgie

Koordinátor: prof. MUDr. Jiří Šnajdauf, DrSc.

1. J. Šnajdauf: Úvod (5 min)
 2. M. Vyhnánek: Miniinvazivní operace vpáčeného hrudníku (10 min)
 3. J. Šnajdauf: Současné indikace k resekcii plicní u dětí (10 min)
 4. P. Kuklová: Vrozené brániční kýly – dlouhodobé výsledky (10 min)
 5. J. Kříž: Primární megaureter (10 min)
 6. L. Kavalcová: Invaginace v dětském věku (10 min)
- Diskuze

prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.
vědecký sekretář

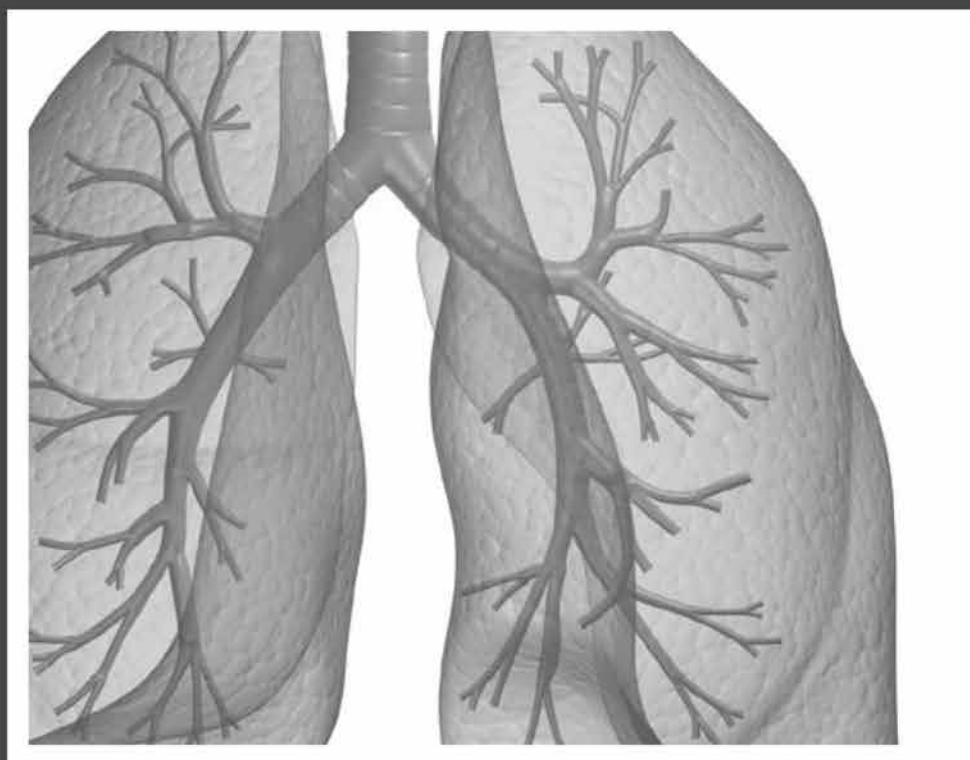
prof. MUDr. Jan Kvasnička, DrSc.
předseda

Akce jsou zařazeny do systému celoživotního vzdělávání ve smyslu SP ČLK č. 16/2007 (2 kredity), KVVOPZ ve smyslu vyhlášky č.4/2010 Sb. (1 kredit) a ČAS ve smyslu vyhlášky MZ 321/2008 Sb. (1 kredit). Aktivní účast je hodnocena dále dle příslušných předpisů.

13. Šedý J. Neurogenní plicní edém. Spišské vydavatelstvo, Bratislava, 2011, 91 s. ISBN 978-80-970526-0-7. Recenze: Dr. Zicha, prof. Syková.

NEUROGENNÍ PLICNÍ EDÉM

Jiří Šedý



BRATISLAVA 2010

NEUROGENNÍ PLICNÍ EDÉM

Jiří Šedý



BRATISLAVA 2010

ISBN 978-80-970526-0-7

Neurogení plicní edém

Autor:

MDDr. et MUDr. Jiří Šedý, PhD.

Recenzenti:

MUDr. Josef Zicha, DrSc.

Fyziologický ústav AVČR, v.v.i.

Prof. MUDr. Eva Syková, DrSc.

Ústav experimentální medicíny AVČR, v.v.i.

Grantová podpora:

GA ČR 305/08/0139

GA AVČR IAA 500110902

Centrum výzkumu chorob srdce a cév MŠMT 1M0510

Pracoviško:

Fyziologický ústav AVČR, v.v.i.

Centrum výzkumu chorob srdce a cév

Všetky práva vyhradené. Nijaká časť textu nemôže byť použitá na ďalšie šírenie akoukoľvek formou bez súhlasu majiteľa autorských práv.

©Jiří Šedý, 2010

©SPIŠSKÉ VYDAVATELSTVO, 2010

Vydalo SPIŠSKÉ VYDAVATELSTVO

ISBN 978-80-970526-0-7

OBSAH

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| Předmluva | 4 |
| Úvod | 5 |
| 1. Morfologie a fyziologie dýchacího aparátu | 6 |
| 2. Rozdělení plicních edémů | 11 |
| 3. Epidemiologie neurogenního plicního edému | 13 |
| 4. Etiopatogeneze neurogenního plicního edému | 14 |
| 5. Anamnéza, klinický obraz a vyšetření | 28 |
| 6. Terapie neurogenního plicního edému | 32 |
| 7. Diferenciální diagnostika neurogenního plicního edému | 36 |
| 8. Kazuistiky | 38 |
| 9. Neurogenní plicní edém v experimentu | 47 |
| 10. Vlastní výsledky | 50 |
| 11. Závěr | 82 |
| 12. Literatura | 83 |

PŘEDMLUVA

Monografie si bere za cíl seznámit širší lékařskou veřejnost s aktuálními poznatky o neurogenním plicním edému (NPE), který představuje jednu z nejzávažnějších komplikací poškození centrálního nervového systému. Tato klinická jednotka je v domácí odborné literatuře často zmíněna pouze okrajově, obvykle několika obecnými větami. Dosud u nás nebyl publikován souborný text, který by se touto problematikou podrobněji zabýval. V povědomí většiny lékařů není bohužel tato klinická jednotka pevně zakotvena, dokladem čehož je i její častá misinterpretace a záměna se syndromem akutní dechové tísně (ARDS) nebo dřívější deskriptivně-klinickou jednotkou, označovanou jako „šoková plíce“. Tuto mezeru se snaží vyplnit tato monografie.

V Akademii věd České Republiky v Praze studujeme neurogenní plicní edém na vlastním experimentálním modelu od roku 2005. V tomto roce došlo ke sdružení několika vědců, kteří se cíleně zaměřili na tuto problematiku. Ustavení experimentální skupiny zabývající se etiopatogenezí neurogenního plicního edému je světovým unikátem, neboť na světě v této chvíli není skupina vědců, která by tento problém cíleně studovala. Výzkum neurogenního plicního edému se omezuje nejčastěji na publikaci kazuistik z klinické praxe, retrospektivních studií, přehledových článků a pouze výjimečně na experimentální práce, kde je však problematika neurogenního plicního edému studována pouze okrajově nebo jako vedlejší fenomén.

Výzkum v této oblasti začal na našem ústavu prioritním objevem vlivu stupně anestezie na rozvoj neurogenního plicního edému u potkanů s poraněnou míchou. Bylo zjištěno, že při povrchové anestezii dochází k rozvoji velmi těžkého edému, na který většina zvířat umírá, zatímco při hlubší anestezii k jeho rozvoji nedochází. Následně byl vytvořen a do detailu popsán experimentální model tohoto edému. Tyto výsledky se staly podkladem celé řady studií, jejichž cílem je postupné odhalování jednotlivých úrovní etiopatogenetického mechanismu této klinické jednotky jakož i terapeutických možností. Výsledky těchto prací jsou publikovány téměř výlučně ve světově uznávaných časopisech s definovaným impact faktorem a ve světovém písemnictví opakovaně citovány. Za výsledky studií obdrželi autoři celou řadu domácích ocenění, včetně nejvyššího vědeckého vyznamenání v České Republice, ocenění Česká hlava. Odrazem zájmu vědecké veřejnosti o tuto problematiku jsou i živé diskuse na vědeckých sympozii, včetně zvaných přednášek na toto téma.

Autor je velmi nakloněn diskusi se zájemci o dané téma nebo případné spolupráci při přípravě, provádění nebo vyhodnocování preklinických i klinických studií na toto nebo příbuzná témata a je velmi otevřen jakýmkoli námětům studentů i lékařů všech oborů, týkajících se údajů i dat zde prezentovaných.

Monografie byla podpořena projekty GA ČR 305/08/0139, GA AVČR IAA 500110902 a z Centra výzkumu chorob srdce a cév 1M0510.

J.Š. (jirisedy@hotmail.com)

ÚVOD

Normální funkce plicní tkáně vyžaduje co nejtenčí bariéru pro výměnu plynů mezi krevním řečištěm a vzduchem v plicích. Za normálních okolností je pohyb tekutiny přes stěnu cév přísně regulován. Pokud dojde k poruše tohoto mechanismu z nejrůznějších příčin a k relativnímu nebo absolutnímu zmnožení tekutiny v oblasti mimo cévní řečiště na úkor tekutiny uvnitř cév, vzniká otok plicní tkáně – **edém**. Plicní edém může mít celou řadu příčin, může probíhat různě závažně, s dočasnými nebo trvalými důsledky (Vinš, 2003). Pro klinickou praxi je důležité, že plicní edém poměrně často zásadně komplikuje zdravotní stav pacienta a může dokonce vést navzdory intenzivní léčbě k jeho smrti.

Neurogenní plicní edém (hemoragický plicní edém, neurohemodynamický plicní edém) je definován jako akutně vzniklý intersticiální a/nebo intraalveolární edém plicní tkáně, který vzniká na základě předchozího poškození tkáně centrálního nervového systému (Fontes et al., 2003). Jako první popsal neurogenní plicní edém Shanahan již v roce 1908 jako komplikaci opakovaných epileptických záchvatů u 11 pacientů a byl to právě on, kdo spojil těžké poškození centrálního nervového systému se vznikem plicního edému a zároveň první, kdo použil pro tento edém název „neurogenní“ (Shanahan, 1908). Neurogenní plicní edém vzniká řádově v minutách až hodinách po poranění centrálního nervového systému. Vzhledem k jeho „neurogenní“ povaze jej řadíme k nekardiogenním (extrakardiálním) plicním edémům. Z hlediska mechanismu vzniku se však jedná o poměrně unikátní klinickou jednotku, neboť se zde synergicky uplatňují oba základní mechanismy vzniku plicního edému, jmenovitě vysoký tlak intravaskulární a intersticiální tekutiny společně se zvýšenou permeabilitou součástí plicního parenchymu, které se u jiných typů edému vyskytují izolovaně (Colice, 1984). Kromě toho je zde hemoragická složka vyjádřena výrazně více, než u kteréhokoli jiného edému. Proto jsou jeho etiopatogeneze i terapeutické přístupy navzdory předchozímu výzkumu a řadě klinických zkušeností ne zcela jasné.

Podle dostupných statistických údajů by se mohlo zdát, že se jedná o velice vzácnou klinickou jednotku. Velice rozporuplná data však naznačují, že je tato jednotka spíše řazena mezi ostatní plicní edémy a není kladen důraz na její neurogenní původ. Neurogenní plicní edém bohužel klinický obraz ostatních plicních edémů pouze připomíná, jeho nebezpečí tkví ve výše zmíněných patofyziologických odlišnostech, v jejichž důsledku je často klinický průběh výrazně proměnný a tedy i hůře předvídatelný, což může vést k dramatickým situacím.

1. MORFOLOGIE A FYZIOLOGIE DÝCHACÍHO APARÁTU

V této kapitole shrnuji některé základní morfologické a fyziologické poznatky, potřebné k pochopení problematiky neurogenního plicního edému. Zájemce o hlubší studium anatomie, histologie a fyziologie dýchacího aparátu odkazují na příslušné monografie.

Obecná anatomie dýchacího aparátu

Dýchací aparát člověka se skládá ze zevního nosu, dutiny nosní, vedlejších dutin nosních, ústní a hrtanové části hltanu, hrtanu, průdušnice, průdušek a plic, ke kterým funkčně řadíme i hrudní koš a dýchací svaly. Pravá plíce, složená ze 3 laloků, je uložena v pravé pohrudniční dutině, levá plíce, složená pouze ze 2 laloků, v pohrudniční dutině levé. Pravá plíce má 10 segmentů, levá pouze 8. Místo, kde do plic vstupuje plicní tepna, plicní žíly a hlavní průduška se označuje jako **hilus**. Kraniální část plíce označujeme jako **hrot**, kaudální část jako **bázi**. Plíce je pokryta **poplicnicí**, hrudní dutina **pohrudnicí**, mezi nimi je úzký prostor vyplněný tekutinou – **interpleurální prostor**. Pravá a levá hlavní průduška se uvnitř plicního parenchymu postupně větví na stále menší větve, až do terminálních plicních sklípků. Kolem tohoto větvení – **bronchiálního stromu** jsou v řídkém intersticiálním vazivu uloženy lymfatické uzliny a větve plicních tepen, žil, nervů a lymfatických cév. Pravá plíce je o 1/10 objemnější než levá. Celkový objem plic je okolo 4 litrů, hmotnost pouze 700 g. V inspiriu pojmu plíce okolo 5 litrů vzduchu, z toho 3 litry jsou obsaženy v plicních sklípcích. Plíce obsahují 300 miliónů plicních sklípků, které zaujímají plochu 70 m². Plicní sklípek – **alveolus** má průměr 0,1 - 0,2 mm. V okolí alveolu je uloženo 4 - 12 kapilárních kliček. Stěnu alveolu vystylají pneumocyty podložené basální membránou a jemným skeletem z elastických a kolagenních vláken. V alveolu se nacházejí dva typy pneumocytů – **membranózní pneumocyty I. typu**, podílející se na difuzi plynů a **sekreční (granulární) pneumocyty II. typu**, produkující **surfaktant** – jemný film, který snižuje povrchové napětí a chrání tak alveolus před kolapsem. Výměna kyslíku a oxidu uhličitého probíhá přes **alveolo-kapilární membránu**, která se skládá z výběžku pneumocytu, bazální membrány a endotelu kapiláry. Intersticiem plic je vyplněno imunitně aktivními buňkami, které zajišťují ochranu proti cizorodým látkám a fagocytují cizorodé nebo nepotřebné částice. Mezi **hlavní dýchací svaly** řadíme bránici (inspirační sval) a mezižeberní svaly (vnější jsou inspirační, vnitřní expirační). Ostatní příčně pruhované svaly, které se upínají na hrudní koš a podílejí se tak na dýchacích pohybech, označujeme jako **vedlejší (auxiliární) dýchací svaly**. Kromě dýchání se plíce podílejí na schopnosti metabolizovat určité sloučeniny, udržovat acidobazickou rovnováhu, filtrovat toxické substance z oběhu a tvořit zásobník krve. Většina dýchacích svalů je inervována příslušnými větvemi hrudních nervů. Za zmínku stojí inervace bránice z míšního segmentu C3-C5 cestou nervus phrenicus. Části plic neschopné výměny dýchacích plynů – **ventilace**, jako je nosní dutina, průduš-

nice apod., se označují jako **anatomicky mrtvý prostor**. Části plic, které v daném okamžiku nejsou schopny výměny plynů, označujeme jako **funkčně mrtvý prostor**. Anatomicky mrtvý prostor je konstantní, funkčně mrtvý je proměnlivý.

Krevní oběh

Krevní oběh rozdělujeme na systémový (velký, vysokotlaký) a plicní (malý, nízkotlaký). **Systémový krevní oběh** začíná výstupem aorty z levé srdeční komory, pokračuje větvením tepen a tepének do celého těla až v kapiláry. Z nich se dále sbírají postkapilární venuly, venuly, vény a nakonec dvě hlavní žíly, horní a dolní dutá žíla, které ústí do pravé předsíně. **Plicní krevní oběh** začíná v pravé komoře, ze které vystupuje plicnice, která se rozděluje na pravou a levou plicní tepnu, vstupující do příslušné plíce, kde se dále dělí až na kapiláry. Z kapilár se podobně jako v systémovém oběhu sbírají žíly až do čtyř hlavních plicních žil (dvě vpravo a dvě vlevo), které se vlévají do levé předsíně. Kromě toho existuje **oběh lymfatický**, který sbírá tekutinu z intersticia a pomocí lymfatických cév ji převádí zpět do žilního systému. Cestou mezi intersticiem a žilami prostupuje tato tekutina – lymfa přes lymfatické uzliny. Jako tepny se označují cévy vystupující ze srdce, jako žíly cévy vstupující do srdce. V systémovém krevním oběhu vedou tepny krev okysličenou, v plicním odkysličenou. Podobně v systémovém krevním oběhu vedou žíly krev odkysličenou, v plicním okysličenou. Plíce jsou napojeny na všechny tři oběhy. Plicní krevní oběh zde reprezentuje tzv. **funkční oběh**, který představuje hlavní zdroj krve pro plíce, systémový krevní oběh reprezentuje tzv. **nutriční oběh**, který je velmi redukován. Lymfatický oběh je vytvořen stejně jako v jiných orgánech. Mezi arteriálním a žilním systémem obou oběhů a rovněž mezi oběma oběhy jsou vytvořeny spojky – **anastomózy**.

Řízení dýchání na úrovni centrálního nervového systému

Dechové centrum je uloženo v prodloužené míše. Skládá se ze dvou skupin neuronů, uspořádaných jako **ventrální respirační skupina** a **dorsální respirační skupina**. **Aferentní vlákna** k těmto jádrům přicházejí i) z mozkové kůry, ii) mechanoreceptorů plic, dýchacích cest a stěny hrudníku, iii) z centrálních a periferních chemoreceptorů a iv) z proprioreceptorů dýchacích svalů. **Eferentní vlákna** směřují i) do dýchacích svalů, ii) do autonomních center, iii) do mozkové kůry.

Inervace plic

Plíce jsou inervovány zejména vůlí neovladatelným autonomním nervovým systémem – sympatikem a parasympatikem. **Parasympatická vlákna** přicházejí cestou desátého hlavového nervu - *nervus vagus*, **sympatická vlákna** pocházejí z druhého až čtvrtého ganglia hrudního sympatiku. Obecně platí, že plicní řečiště je zásobeno autonomními nervy méně než řečiště systémové. Autonomní vlákna přicházejí do plic přes hilus a při dalším větvení respektují větvení plicních cév a bronchiálního stromu. Takto vznikají **peribronchiální** a **periarteriální pleteně**. V periarteriální pleteni převažují sympatická vlákna. Peribronchiální pleteně zasahují až po interalveolární septa a převažují zde parasympatická vlákna, kde jsou místy vmezeřena parasympatická ganglia. Autonomní nervy plicních cév probíhají

v jejich tunica media. Inervace je nejhustší v místě cévního větvení. Plicní tepny, ve kterých jsou přítomna autonomní nervová vlákna, mají průměr nejčastěji mezi 30-500 μm . Ve srovnání se systémovými tepnami mají plicní tepny obecně nižší obsah hladké svaloviny a autonomních nervů. Plicní žíly mají autonomní složku vyjádřenu ještě méně. Většina aferentních vláken vede z plic informace z baroreceptorů a chemoreceptorů, vlákna vedoucí bolest jsou zastoupena velmi málo. Poplicnice je s výjimkou oblasti kolem hilu úplně nebolestivá.

Mechanika dýchání

Do dýchacích cest vstupuje vzduch nosem nebo ústy a dále pokračuje oropharyngem, laryngopharyngem, laryngem, tracheou a bronchy a jejich větvemi až do alveolů. Kromě toho, že dýchací cesty přivádějí vzduch do alveolů, zbavují jej většiny nečistot, prostřednictvím imunity brání zavlečení infekce do organismu, upravují vzduch tepelně, zvlhčují jej, ovlivňují jeho distribuci do jednotlivých úseků dýchacího traktu a vytvářejí hlas. Optimální dýchání vzniká na základě optimálního vyladění mezi distribucí a difuzí plynů, perfuzí plic a neurohumorální regulací dýchání. Dechový cyklus zahrnuje vdechovou fázi – **inspirium** a výdechovou fázi – **expirium** a klidovou fázi. Inspirium je založeno na kontrakci příčně pruhovaných dýchacích svalů, které rozšiřují hrudník do všech stran. Rozšíření hrudníku je možné jednak na základě i) pohybů jednotlivých žeber v kloubech a omezeně i v chrupavčitých spojeních, ii) pohybu bránice, iii) trojího zakřivením žeber (v horizontálním směru, ve vertikálním směru a podél vlastní osy). Rozšíření hrudníku pasivně rozšiřuje i objem plic díky konstantní šířce interpleurální štěrbině. Zatímco tlak v plicích odpovídá vnějšímu atmosférickému tlaku, v interpleurální štěrbině je tlak nižší – **transtorakální tlakový gradient**. Expirium je vesměs děj pasivní, význam expiračních svalů roste při námaze. Z hlediska plic je inspirium i expirium dějem pasivním – zatímco při inspiriu se celá plíce rozpíná na základě rozšiřování objemu hrudníku, při expiriu je retraktilním tahem elastických vláken – **elasticitou plic** objem plic navrácen do původního. Jev se souborně označuje jako poddajnost plic – **compliance**. Dýchání rozlišujeme **brániční** (břišní), **hrudní** (kostální) a **smíšené**. Za normálních okolností dýcháme smíšeně, ze 2/3 bráničním a z 1/3 hrudním dýcháním. Dýchání se přizpůsobuje potřebám organismu změnami dechového objemu, frekvence dýchání, perfuze plic a koordinace hrudního a abdominálního dýchání.

Ventilace a perfuze plic

Ventilace plic zajišťuje výměnu vzduchu mezi okolní atmosférou a alveolárním prostorem. Tuto výměnu umožňuje proudění vzduchu v dýchacích cestách ve směru tlakových gradientů. Od terminálních bronchiolů k alveolům se stává významnou také difuze a dýchací plyny tak difundují od alveolární membrány ve směru koncentračních gradientů. Suchý atmosférický vzduch se skládá z přibližně 21 % kyslíku, 0,04 % oxidu uhličitého, 78 % dusíku a 0,92 % vzácných plynů. Za normálních podmínek je v atmosférickém vzduchu parciální tlak kyslíku 160 mm Hg, parciální tlak oxidu uhličitého 0,3 mm Hg a parciální tlak dusíku a vzácných plynů 600 mm Hg. Pokud je směs plynů v kontaktu s kapalinou, rozpouští se jednotlivě

plyny v kapalině úměrně jejich rozpustnosti v kapalině a jejich parciálním tlakům v plynné fázi. Pokud trvá kontakt dostatečně dlouho, ustaví se rovnováha a jednotlivé plyny získají v kapalině stejné parciální tlaky jako v plynné fázi. V systémové arteriální krvi je parciální tlak kyslíku 100 mm Hg, parciální tlak oxidu uhličitého 40 mm Hg a parciální tlak dusíku a vzácných plynů 571 mm Hg. Ve smíšené žilní krvi je parciální tlak kyslíku 40 mm Hg, parciální tlak oxidu uhličitého 46 mm Hg a parciální tlak dusíku a vzácných plynů 571 mm Hg.

S každým vdechem se do plic dostane přibližně 0,5 litru vzduchu. Při průměrné dechové frekvenci 15/min je minutový dechový objem 7,5 litru vzduchu – **celková ventilace plic**. Z každého 0,5 litru vzduchu však zůstane 150 ml v anatomicky mrtvém prostoru, reálně tedy probíhá v klidu ventilace na základě pouze 350 ml vzduchu na každý vdech, tedy 5,25 litru za minutu – **alveolární ventilace plic**.

Základem schopnosti plic reagovat na jakoukoli změnu potřeby organismu je zajištění optimálního **poměru ventilace-perfuze**. Základem této regulace je **Eulerův-Liljestrandův alveolo-kapilární reflex**, kdy na základě hypoventilace dojde k lokální vazokonstrikci malých plicních arterií. Tento mechanismus je naprosto klíčový pro ekonomiku plicního řečiště; je totiž schopen udržet saturaci krve na vysoké úrovni a zároveň předcházet „nevyužití“ krve přicházející do plic. Ventilace a perfuze jsou i za klidových fyziologických podmínek různé v různých částech plic – poměr ventilace/perfuze je při stoju u hrotu plic vysoký a směrem k bázi se snižuje. Vleže se poměr na hrotu a při bázi vyrovnává, což souvisí se změnami hydrostatických tlaků v cévách. Kromě toho je i intratorakální tlak různý v různých částech plic – při apexu je okolo -10 mm H₂O, při bázi plic okolo -2,5 mm H₂O.

Difuze

Další složkou fyziologie dýchání je **difuze kyslíku a oxidu uhličitého** mezi alveolem a plicní kapilárou, která závisí na difuzní kapacitě alveolo-kapilární membrány a difuzní kapacitě erytrocytů. Tuto difuzi popisuje **Fickův zákon**, podle kterého je množství difundujících plynů přímo úměrné i) velikosti alveolo-kapilární plochy pro výměnu plynů, ii) gradientu parciálního tlaku plynů, iii) materiálové difuzní konstantě membrán a nepřímo úměrné dráze difuze.

Na proces difuze plynů navazuje **transport plynů krví**, který závisí zejména na vazbě plynů na erytrocyty. Pouze malá část plynů je rozpuštěna v krvi. Vazba krevních plynů na erytrocyty závisí na několika faktorech (viz tab. 2.1.). Z tabulky mimo jiné vyplývá známý fakt, že pokud se parciální tlak CO₂ zvýší, sytí se erytrocyty CO₂ a odevzdávají O₂. Tyto efekty lze popsat vazebnou křivkou O₂ a disociační křivkou CO₂. Závislost vazebné křivky O₂ na parciálním tlaku CO₂ se označuje jako **Bohrův efekt**.

Tab. 2.1. Vliv různých zvýšení různých faktorů na snížení/zvýšení sycení hemoglobinu kyslíkem

| Zvýšený faktor | Nasycení erytrocytu kyslíkem |
|--------------------------------|------------------------------|
| Hemoglobin | Zvyšuje |
| Teplota | Zvyšuje |
| pH (c H ⁺) | Snižuje |
| Parciální tlak CO ₂ | Snižuje |
| 2,3- bis-fosfoglycerát | Zvyšuje |
| ATP | Zvyšuje |

Plicní kapilární hydrostatický tlak

Plicní kapilární hydrostatický tlak je primární silou, která určuje přestup tekutiny přes stěnu plicních kapilár do intersticia a odtud případně i do lumen plicních alveolů. Zvýšený kapilární hydrostatický tlak má proto schopnost indukovat plicní edém. Tlak v plicních cévách je výslednicí tlaku na úrovni arteria pulmonalis a tlaku v levé srdeční předsíni. Plicní kapilární hydrostatický tlak vychází z hodnot plicního arteriálního tlaku, cévního odporu plicního řečiště a celkových parametrů krevního toku. Při pohledu na vlastní plicní tkáň tedy hodnoty kapilárního hydrostatického tlaku odrážejí stupeň plicní rezistence a schopnost distribuce krve mezi prekapilární a postkapilární částí plicního krevního oběhu. V normálních plicích zdravého člověka je tlak v levé předsíni mírně nižší než plicní diastolický tlak. Hodnoty plicního kapilárního tlaku se pohybují okolo 6-8 mm Hg. Jeho hodnoty mírně rostou v systole a klesají téměř k nule v diastole. V okamžiku, kdy je zvýšený tlakový gradient mezi arteria pulmonalis a levou srdeční předsíní – **transpulmonální tlakový gradient**, mění se i hodnoty plicního kapilárního tlaku. Příkladem takových stavů je ARDS, plicní hypertenze, sepse, zánětlivé stavy plicní tkáně, hypoxie nebo kardiovaskulární choroby. Měření plicního kapilárního tlaku je v humánní medicíně velmi obtížné. Důležitou skutečností je, že na hodnoty kapilárního hydrostatického tlaku lze na podkladě častěji měřených hodnot tlaku v plicnici usuzovat jen velmi přibližně (Ganter et al., 2006).

2. ROZDĚLENÍ PLICNÍCH EDÉMŮ

Plicní edém můžeme rozdělovat podle celé řady hledisek. Nejčastěji jsou zdůrazňována hlediska etiologická a patofyziologická.

Z hlediska působení tekutiny rozdělujeme plicní edém na:

- **hydrostatický** – příčinou je zpomalení průtoku tekutin plicní tkání
- **hypervolemický** – příčinou je relativní nebo absolutní zmnožení tekutin v plicní cirkulaci
- **vysokotlaký** – na vzniku edému se podílí zvýšený tlak tekutiny v plicních cévách a intersticiu
- **nízkotlaký** – vznik edému je nezávislý na tlaku tekutiny v plicních cévách a intersticiu

Podle původu rozdělujeme plicní edém na:

- **kardiální plicní edém** – příčina vychází z poškození srdce
- **nekardiální plicní edém** (extrakardiální, nonkardiální) – příčina edému je mimo srdce

*Kardiální plicní edém v důsledku **primárního** poškození srdce může způsobovat:*

- levostranné srdeční selhání
- infarkt myokardu v oblasti levého srdce
- mitrální stenóza
- mitrální insuficience
- aortální stenóza
- aortální insuficience
- myocarditis
- kardiomyopatie
- hemodynamicky závažná arytmie
- vrozená srdeční vada s pravolevým zkratem

*Kardiální plicní edém v důsledku **sekundárního** poškození srdce může způsobovat:*

- hypertenzní krize
- neléčená systémová hypertenze
- horečka
- interkurentní infekce
- zvýšený příjem tekutin nebo elektrolytů
- nepřiměřená fyzická zátěž
- podání léků s negativně inotropními účinky
- hypertyreóza
- anémie

Nekardiální plicní edém může způsobovat:

- poškození CNS
- hyponatremická encefalopatie
- masivní plicní embolizace
- renální (způsobený nemožností vyloučení nadměrného množství tekutin v důsledku renálního selhání – uremická plíce)
- hypoproteinemie (nefrotický syndrom, těžká jaterní porucha, enteropatie, malnutrice)
- jako součást ARDS
- mediastinální fibróza (blokáda lymfatických uzlin)
- těžká pneumonie (blokáda lymfatických uzlin)
- plicní lymfangiomatózní karcinomatóza (blokáda lymfatických uzlin)
- fibrotizující obliterační lymfangitida při silikóze
- plicní venookluzivní nemoc
- toxický (dráždivé plyny) – amoniak, chlorovodík, dusičnany, sirovodík, ozón, slzný plyn, bojové chemické látky
- aspirace (mořské vody, žaludečního obsahu, cizí těleso)
- septický šok
- hemoragická pankreatitida
- vysoká nadmořská výška (vysokohorský plicní edém)
- abusus drog (heroin, morfin, kokain)
- strangulace
- masivní zvětšení štítné žlázy vedoucí k obstrukci dýchacích cest
- eklampsie

Iatrogenní plicní edém může způsobit:

- vytvoření pravolevého zkratu
- pooperační levostranné srdeční selhání
- pooperační hypovolémie (např. leak-syndrom po kardiologické operaci)
- předávkování léky (morfin, metadon, dextropropoxyphen, salicyláty, terbutalin, salbutamol, fenoterol, ritodrin, hydrochlorothiazid, protamin, interleukin-2, cyklosporin)
- rychlá evakuace masivního pneumothoraxu,
- rychlé odstranění tekutiny při masivním hydrothoraxu (zejména pokud je současně přítomna obstrukce bronchu)
- rozsáhlá plicní resekce
- trombendarterektomie plicních tepen
- dilatace stenózy plicní tepny
- chemoterapie
- postextubační laryngospasmus
- následek předchozí kardioperace
- předchozí srdeční bypass

3. EPIDEMIOLOGIE NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Není snad na světě klinická jednotka, jejíž epidemiologická data by vykazovala tak rozporuplné výsledky jako právě neurogenní plicní edém. Podle různých klinických studií se neurogenní plicní edém vyskytuje v 1-71 % případů poškození centrálního nervového systému. Většina studií naštěstí naznačuje, že pravda bude zřejmě někde uprostřed, okolo 20-30 % pacientů s těžkým, náhle vzniklým poškozením CNS. Nižší čísla jsou pravděpodobně zaviněna skutečností, že neurogenní plicní edém je u celé řady pacientů s poškozením CNS zamaskován jinými faktory, nebo je jeho význam v dané chvíli považován za druhořadý, vzhledem k často velmi těžkému celkovému klinickému stavu a nutnosti řešení důležitějších, akutně život ohrožujících stavů (akutní tepenné krvácení, počínající známky herniace mozkové tkáně apod.). Zvýšená čísla jsou pak pravděpodobně způsobena označením jakéhokoli plicního edému za neurogenní, což je opačný extrém. **Mortalita** neurogenního plicního edému se pohybuje okolo 10 %. Z epidemiologických údajů však není jasné, zda je toto poměrně vysoké číslo způsobeno skutečně edémem plic nebo původním, často velmi těžkým poškozením CNS. U těžkých poranění mozku a míchy (zejména krční) je plicní edém častým nálezem. Častěji se u těchto úrazů vyskytuje neurogenní plicní edém u mladších pacientů, pravděpodobně vzhledem k paradoxně „reaktivnějšímu“ kardiovaskulárnímu aparátu u mladších (Simmons et al., 1969).

4. ETIOPATOGENEZE NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Etiopatogeneze neurogenního edému byla předmětem intenzivního výzkumu zejména v 70.- 80. letech 20. století, poté byl výzkum této problematiky z neznámého důvodu utlumen, navzdory stále nejasnému mechanismu jeho vzniku. Ačkoli je v etiologii neurogenního plicního edému podezřívána celá řada mechanismů, není přes všechny snahy etiopatogeneze neurogenního plicního edému dodnes spolehlivě vysvětlena. Etiologie neurogenního plicního edému je dnes nejčastěji definována jako neuro-humorálně-stresová.

Obecné mechanismy rozvoje plicního edému

Plicní edém vzniká na podkladě porušené rovnováhy intravaskulární a intersticiální tekutiny. Může vznikat z celé řady příčin, které vedou k jednomu nebo více z následujících dějů:

Zvýšení kapilárního hydrostatického tlaku – jedná se o nejčastější příčinu. Vzniká při přetlaku v žilním systému plic, který může být způsoben jak vlastními plicními cévami, tak poruchou přečerpávání krve levým srdcem. Dalším důvodem může být zvýšení objemu cirkulujících tekutin buď v celém organismu, nebo významná centralizace oběhu do oblasti životně důležitých orgánů, způsobená nejrůznějšími příčinami.

Zvýšení propustnosti kapilární stěny – tento mechanismus vzniká na podkladě přímého nebo humorálně podmíněného rozšíření prostoru mezi jednotlivými endotelovými buňkami, případně jejich poškozením. Vede k nárůstu extravazace tekutiny a krevních elementů do intersticia a odtud event. do intraalveolárního prostoru.

Zvýšení povrchového napětí vnitřní plochy alveolů – vzniká v okamžiku, kdy v důsledku poškození nebo změny struktury surfaktantu, které vede ke změně vlastností na hranici vzduch-tekutina, dochází ke kolapsu příslušných částí plic a úniku tekutiny do alveolů.

Snížení onkotického tlaku krevní plazmy – vzniká při relativním nebo absolutním poklesu množství bílkovin krevní plazmy, zejména albuminu. Výsledkem je změna osmotického gradientu a únik tekutiny z intravaskulárního prostoru do intersticia. Snížení lymfatické drenáže plicního parenchymu – vzniká na podkladě zánětu nebo metastatického rozsevu. Může být rovněž vrozená. Vede k nedostatečnému odvádění lymfy z plicních tkání a jejímu hromadění v plicním parenchymu.

Předstupněm plicního edému je překrvení plicního parenchymu – **kongesce plic**. Vlastní plicní edém se projevuje zvýšením množství tekutiny nejdříve v mezibuněčné hmotě plicního parenchymu – **intersticiální edém**, následně únikem tekutin do oblasti plicních sklípků – **intraalveolární edém** a dále i do dalších úseků dýchacích cest. Neurogenní plicní edém je charakterizován významným stupněm dilatace plicních kapilár, kongescí kapilár krvinkami, intraalveolárním krvácením

a intersticiálním (perivaskulárním) a intraalveolárním edémem, který je tvořen na proteiny-bohatým tkáňovým mokem – **exsudátem**, jež obsahuje více než 70 % plazmatické hladiny proteinů. Stejně jako ostatní typy plicního edému, je i neurogenní plicní edém charakterizován třemi fázemi:

1. Předémová fáze

Dochází nejprve ke kongesci plic a následně ke zvýšenému pohybu tekutiny z kapilár do intersticia. Přebytek přívodu tekutiny je však stále kompenzován zvýšenou lymfatickou drenáží.

2. Intersticiální edém

V této fázi je překročena drenážní kapacita intersticia až o 30 % a tekutina se začíná hromadit v poddajném vazivu mezi bronchioly, arterioly a venulami. Tento edém je nejprve perikapilární a většinou asymetricky lokalizovaný na jedné straně kapiláry, k níž z obou stran přiléhají plicní alveoly. Při nepoškozené epitelové části alveolo-kapilární membrány jeví tekutina hromadící se v intersticiu tendenci nešířit se dále do alveolů, neboť epitelová výstelka alveolů je prakticky zcela neprostupná pro proteiny. V intersticiální tekutině je za normálních okolností relativně vysoká koncentrace proteinů, která dosahuje až 75 % plazmatické koncentrace, což vytváří velmi silný osmotický gradient, který táhne tekutinu z alveolárního prostoru směrem do intersticia a zabraňuje tak intraalveolárnímu edému. Plicní edém si tedy může zachovat charakter intersticiálního edému i při poměrně vyšším stupni naplnění intersticia tekutinou. V tomto stavu se v plicním parenchymu rozšiřuje prostor zaujímaný alveolárními stěnami na úkor alveolárních prostor vyplněných plynem a dochází tak k restriční poruše dýchání v důsledku zmenšené funkční kapacity plic. Kromě toho se zásadně zvyšuje hmotnost plicní tkáně, klesá její poddajnost a zvyšuje se plicní cévní odpor. Tekutina však intraalveolárně neuniká. Za hranici intersticiálního edému je u člověka považována tloušťka alveolární stěny alespoň 2 μm (Nečas et al., 2009).

Při normálním objemu intersticiální tekutiny závisí tlak v intersticiu jednak na přítomnosti pevných struktur pojivové tkáně, jednak na hydrostatickém tlaku přítomné tekutiny. Tlak pevných struktur intersticia je za normálních okolností vyšší ve srovnání s atmosférickým tlakem vzduchu v alveolech – pevné struktury totiž musí odolat působení vzduchu. Naproti tomu tlak tekutiny přítomné v intersticiu je nižší než tlak vzduchu v alveolu – za normálních okolností není žádoucí, aby tekutina vystupovala intraalveolárně. Sumací obou tlaků vzniká tlak, který je za normálních okolností blízký nule. Nahromaděním tekutiny v intersticiu se zvyšuje hydrostatický tlak v tomto prostoru. Pokud je primární příčinou edému zvýšený intravaskulární tlak, působí vlastně zvýšení intersticiálního tlaku v důsledku hromadění tekutiny v intersticiu proti zvýšenému intravaskulárnímu tlaku. Nahromaděním tekutiny však kromě zvyšování hydrostatického tlaku rovněž rozvolňuje pevné součásti intersticia, jehož kompenzační mechanismy takto oslabuje. Při určitém objemu nahromaděné intersticiální tekutiny jsou od sebe pevné struktury intersticia natolik vzdálené, že se jejich role přestává uplatňovat a dominujícím

faktorem se stává pouze hydrostatický tlak a objem intersticiální tekutiny. S dále rostoucím objemem intersticiální tekutiny se proto začne hydrostatický tlak nepoměrně zvyšovat, a jakmile dosáhne hodnoty atmosférického tlaku vzduchu v alveolech, začne docházet k unikání tekutiny intraalveolárně.

Tekutina, která se hromadí v intersticiálním prostoru, se volně šíří do perivaskulární a peribronchiální tkáně, kde je za normálních okolností nižší hydrostatický tlak. Dochází tak k přesouvání tekutiny směrem k plicním hilům a jejímu odvádění od míst s vysokou koncentrací alveolů. Tento kompenzační mechanismus umožňuje nahromadění až 500 ml tekutiny bez zásadního zvýšení jejího hydrostatického tlaku v intersticiu. V tomto prostoru dochází rovněž ke zvýšené resorpci tekutiny zpět do krve. Perivaskulární a peribronchiální části intersticia rovněž komunikují s interlobárnými septy a viscerální pleurou. Tekutina, která takto ve zvýšené míře proniká do pleurální dutiny, je odtud odváděna lymfatickým systémem parietální pleury. Nahromadění tekutiny v pleurálním prostoru v podobě pleurálního výpotku sice omezuje objemové změny plic, avšak méně, než kdyby byla tato tekutina v plicním intersticiu. Pro neurogení plicní edém je typická téměř úplná absence tohoto pleurálního výpotku, což zřejmě souvisí s rychlostí, jakou se tento edém rozvíjí.

3. Alveolární edém

Třetí stadium odpovídá situaci, kdy jsou překročeny objemové možnosti intersticiálního prostoru a tlak tekutiny vede k rozrušení spojů alveolárních membrán. Počátkem tohoto stadia je okamžik, kdy se s rostoucím objemem intersticiální tekutiny začne hydrostatický tlak zvyšovat natolik, že dosáhne hodnoty atmosférického tlaku vzduchu v alveolech. Někteří autoři hovoří o **prolomení epitelové bariéry alveolů** (Nečas et al., 2009). Roli zde hraje jak tlak tekutiny, tak překonání povrchového napětí surfaktantu pronikající tekutinou, která umožní její vylití do nitra alveolů. Tekutina se může uvnitř alveolů nacházet jak izolovaně při jejich stěnách, tak vyplňovat celý vnitřní objem alveolu.

V případě neurogeního plicního edému však na sebe všechny fáze navazují velmi rychle a navíc jsou doplněny o často masivní hemoragie. Patofyziologicky představuje vznik neurogeního plicního edému nerovnováhu Starlingových sil, odvislých od permeability kapilárního endotelu, cévního povrchu a hydrostatického a osmotického tlaku (Malik, 1985; Colice, 1984). Roli Starlingových sil při vzniku neurogeního plicního edému naznačuje Starlingova rovnice (Starling, 1918):

$$Q = K_{fk} \cdot (P_k - P_i) - K_d (\pi_k - \pi_i)$$

kde Q označuje eflux tekutiny, P_k – hydrostatický tlak v kapiláře, P_i – hydrostatický tlak v intersticiu, K_{fk} – kapilární filtrační koeficient (výsledek pohybu tekutiny v kapilárách a kapilárního povrchu), K_d – koeficient odrazu (nabývá hodnot od 0, kdy je stěna kapiláry extrémně propustná pro proteiny, do 1, kdy je stěna pro proteiny nepropustná), π_k – onkotický tlak v kapiláře a π_i – onkotický tlak v intersticiu.

Míra exfluxu tekutiny je tedy přímo úměrná hydrostatickému tlaku v kapiláře a nepřímo úměrná onkotickému tlaku v kapiláře. Za fyziologických okolností prochází kapilární stěnou do intersticia okolo 15 ml tekutiny za hodinu, což odpovídá 0,01 % z celkového objemu plazmy, která proteče za tuto dobu systémem plicních kapilár. V případě rozvoje plicního edému je toto množství vyšší i o několik řádů. Zatímco za normálních okolností je většina této tekutiny odváděna systémem lymfatických cév zpět do žilního řečiště, v případě zvýšeného úniku tekutiny extravaskulárně tyto mechanismy brzy nedokáží tento děj dostatečně kompenzovat a rozvíjí se nejprve intersticiální a následně intraalveolární edém plic. Při extrémně náhlých objemově-tlakových změnách v plicním kapilárním řečišti navíc dochází k mechanickému poškození kapilárních stěn a extravazaci krevních elementů, což je typické právě pro neurogenní plicní edém.

Příčiny neurogenního plicního edému

Jak bylo řečeno výše, neurogenní plicní edém se vyskytuje u pacientů s různými formami poškození centrálního nervového systému. Rozvíjí se nejčastěji v řádu hodin po poškození centrálního nervstva nebo akutní exacerbaci chronického onemocnění mozku nebo míchy. Velmi rychle se rozvíjející neurogenní edém se může vyvinout i v řádu minut až desítek minut, tento typ je však spíše vzácný. Nejčastěji se rozvíjí u těžkých traumat centrálního nervového systému, u pacientů s epilepsií a v případech subarachnoidálního krvácení. Méně často se vyskytuje u pacientů se subdurálním krvácením, intracerebrálním nebo intramedulárním krvácením, u hyponatremické encefalopatie, meningitidy, intrakraniálních a intraspinálních tumorů spojených s rozvojem hydrocefalu, u lupus erythematodes a u záchvatu roztroušené sklerózy (Malik, 1985). Kromě toho může neurogenní plicní edém vzniknout velmi vzácně i iatrogeně při neurochirurgických zákrocích (viz kazuistika 7). Podobný mechanismus vzniku jako v případě neurogenního plicního edému je podezříván i u plicního edému vznikajícího na podkladě feochromocytomu a u hand, foot and mouth disease (Rassler, 2007; McMinn, 2002). Relativně sporné je označení NPE u toxických poškození tkáně CNS exogenními substancemi jako jsou salicyláty (Broderick et al., 1976), heroin (Steinberg a Karliner, 1968), metadon (Frاند et al., 1972). Efekty těchto látek jsou někdy přirovnávány k experimentálnímu modelu NPE, který je indukován vpravením veratrinu do cisterna magna (viz kap. 10).

Neurogenní plicní edém byl popsán až u 20 % těžkých poranění mozku, charakterizovaných Glasgow coma scale < 8 (Bratton et al., 1997). Studie Rogerse et al. (1995) popisuje výskyt neurogenního plicního edému ve 32 % případů poranění mozku s následkem smrti, přičemž 50 % pacientů s NPE zemřelo do 3 dnů. Výskyt neurogenního plicního edému bývá v případech poranění mozku nejčastěji sdružen s náhlým vzestupem intrakraniálního tlaku (Baumann et al., 2007). Byly však popsány i případy, kde prokazatelně ke vzestupu intrakraniálního tlaku nedošlo a přesto se edém rozvinul (Popp et al., 1982). Poškození plic v důsledku neurogenního plicního edému je vedle infekce nejčastější příčinou kontraindikace jejich použití pro transplantaci u pacientů s diagnostikovanou mozkovou smrtí. Trulock

(1997) udává, že neurogení plicní edém je jednou z příčin toho, že pouze 20 % multiorgánových dárců má plíce ve stavu vhodném k transplantaci.

Subarachnoidální krvácení, vznikající zejména na podkladě ruptury aneurysmatu mozkové tepny, je jednou z nejčastějších příčin neurogeního plicního edému. Velmi významná data udává studie Weira (1978), popisující výskyt neurogeního plicního edému u 71 % případů fatálního subarachnoidálního krvácení. Z této studie však vyplývá, že pouze 31 % pacientů mělo klinické známky plicního edému v období před úmrtím. V rozsáhlé retrospektivní studii na 477 pacientech našli Muroi et al. (2008) neurogení plicní edém u 8 % pacientů. U všech pacientů se jednalo o rozsáhlý plicní edém s výraznou hemoragickou složkou. Edém byl signifikantně častější u pacientů, u kterých se příčina nacházela v dorsální části Willisova tepenného okruhu. Zvýšený intrakraniální tlak byl nalezen u 67 % pacientů s edémem. I když byly u 83 % pacientů nalezeny zvýšené srdeční markery, žádný z pacientů neměl v anamnéze ani v průběhu hospitalizace zjištěnu závažnou srdeční vadu. Neurogení plicní edém měl zásadní dopad na návrat neurologických funkcí; Glasgow Coma Scale (viz tab. 5.1.) nižší než 4 mělo více než 77 % pacientů s neurogením plicním edémem ve srovnání s 25 % pacientů bez neurogeního plicního edému. V případě subarachnoidálního krvácení byl opakovaně popsán pozdní nástup rozvoje neurogeního plicního edému, který se vyvíjel i několik dní po nejvýznamnější atace krvácení. Kromě toho se zpočátku mírný edém po různém období latence nebo zdánlivé resoluce opět rozvíjí ve výrazně těžší až smrtelný stav (Fisher a Abdoul-Nasr, 1979).

Tab. 5.1. *Glasgowská škála kómatu (angl. Glasgow coma scale)*

| ÚKON | SKÓRE |
|---------------------------|-------|
| Otevření očí | |
| Spontánně | 4 |
| Na oslovení | 3 |
| Na bolest | 2 |
| Chybí | 1 |
| | |
| Motorická odpověď | |
| Vyhoví | 6 |
| Lokalizuje bolest | 5 |
| Uhýbá od bolesti | 4 |
| Flexní reakce na bolest | 3 |
| Extenční reakce na bolest | 2 |
| Chybí | 1 |
| | |

| Slovní odpověď | |
|----------------|---|
| Orientovaný | 5 |
| Zmatený | 4 |
| Nepřiléhavá | 3 |
| Nesmyslná | 2 |
| Chybí | 1 |

Epileptický záchvat je jednou z nejčastějších netraumatických příčin neurogenního plicního edému. Nejčastější příčinou je záchvat typu *grand mal*. Neurogenní plicní edém se zde vždy rozvíjí v období po vlastním epileptickém záchvatu, u jednoho jedince i vícekrát za život (Colice et al., 1984; Mulroy et al., 1985; Darnell a Jay, 1982). Neurogenní plicní edém byl nalezen až u jedné třetiny pacientů s fatálním status epilepticus (Simon, 1993; Ohlmacher, 1910). V soudně-lékařské studii Leestma et al. (1989) se neurogenní plicní edém dokonce vyskytoval ve 45 z 52 případů epileptických pacientů s nevysvětlenou příčinou smrti – u těchto případů však bylo sporné, zda byl plicní edém skutečnou příčinou smrti. Ve studii Mulroye et al. (1985) bylo zjištěno, že neurogenní plicní edém ohrožuje zejména dětské pacienty s epilepsií.

Na podkladě roztroušené sklerózy vzniká neurogenní plicní edém velmi vzácně, ve světové literatuře je popsáno pouze několik kazuistik. V těchto případech vzniká neurogenní plicní edém nejčastěji na podkladě ztráty inhibiční funkce určitých jader mozkového kmene, které umožní hyperaktivaci center neurogenního plicního edému v prodloužené míše mozkového kmene (viz kazuistika 6).

Lupus erythematosus je systémové autoimunitní onemocnění, postihující celou řadu tkání těla. V případě, že postihuje i stěnu plicních cév ve formě vaskulitidy, ledviny ve formě nefritidy nebo působí trombocytopenii, může se stát predisponujícím faktorem při rozvoji neurogenního plicního edému a potencovat tak jeho hemoragickou složku (Chang et al., 2005).

Centrum vzniku neurogenního plicního edému

Bylo prokázáno, že neurogenní plicní edém vzniká při těžkých poškozeních nejrůznějších částí mozku i míchy. Ačkoli je tedy *a priori* splněna implikace „poškození určitého centra => neurogenní plicní edém“, není tím řečeno, že edém nemůže vyvolat poškození jakékoli jiné části CNS. K tomu může přispívat jednak působení zvýšeného intrakraniálního tlaku, jednak vyplavení celé řady neurohumorálních působků z poškozené tkáně centrálního nervstva. Celá řada experimentálních i klinických prací přímo i nepřímo ukazuje, že vznik neurogenního plicního edému vychází z vasomotorických center rostrální ventrolaterální části prodloužené míchy – adrenergní area A1, inhibující vasokonstrikční sympatický tonus (Blessing et al., 1981) a A5, *nucleus tractus solitarii* (Reis et al., 1977), *nucleus dorsalis nervi vagi*, *area postrema* a ventrální medulární raphe (Malik, 1985). Blessing et al. (1981) prokázali v experimentech na králících, že bilaterální destrukce A1 katecholaminových neuronů, uložených ve ventrální dorsolaterální medulla oblongata, způso-

buje v několika pooperačních hodinách smrtelný neurogení plicní edém. Bilaterální léze těchto jader způsobuje extenzivní sympatickou reakci, aktivaci plicních C vláken a rozvoj systémové hypertenze a plicního edému. O nucleus tractus solitarii je známo, že integruje aferentní chemoreceptivní signály a převádí je na excitační impulsy do nervů ovlivňujících dechové svaly v okamžiku, kdy v jejich blízkosti klesá pH a obsah kyslíku – jeho role při rozvoji neurogeního plicního edému je proto rovněž podezřívána.

Experimentální model plicního edému u potkanů je indukován vpravením fibrinu do *cisterna magna*, model plicního edému u psů je indukován vpravením veratrinu opět do *cisterna magna* (viz dále), tedy v obou případech do bezprostřední blízkosti výše uvedených jader. Pokud jsou tato jádra skutečně místem vzniku neurogeního plicního edému, významně to podporuje teorii o excesivní aktivaci sympatiku, označované jako katecholaminová bouře, jako příčině neurogeního plicního edému. Preventivní funkce alfa-adrenergních blokátorů (fentolamin) při vzniku neurogeního plicního edému tuto teorii jen potvrzují. Kromě toho byly v experimentu s různými výsledky k potlačení rozvoje použity – blokáda cervikálních sympatických ganglií, sympatektomie, adrenalektomie a decerebrace. Poměrně dlouhou dobu byla jako centrum rozvoje neurogeního plicního edému podezřívána i některá jádra ventrálního hypothalamu, tehdy nazývaná „edémogenní“, mezi nimi zejména preoptická area (Reynolds, 1963). Pozdější experimenty však prokázaly, že role hypothalamických jader při rozvoji edému je spíše modulačního charakteru (Malik, 1985). Stimulace hypothalamických jader v experimentu sice vyvolá sekreci katecholaminů, které v důsledku způsobí zvýšení plicního kapilárního hydrostatického tlaku, jejich množství však není schopno vyvolat plicní edém. Toho bylo dosaženo pouze v případě vpravení alkaloidu akonitinu do oblasti ventrálního hypothalamu (Minnear a Connel, 1981).

Role hyperaktivace drah vedoucí do center NPE

Celá řada dat a klinických zkušeností ukazuje, že neurogení plicní edém může rovněž způsobit náhlá hyperaktivace většího množství drah, které vedou do center neurogeního plicního edému. Typicky nastává tato situace u subarachnoidálního krvácení (Fontes et al., 1997) nebo kompresní léze v hrudní části míchy (Šedý et al., 2007a, 2007b). Experimentální data ukazují, že anestezie, aplikovaná epidurálně nebo intratekálně do místa léze může rozvoji neurogeního plicního edému zabránit, což lze velmi dobře sledovat i ve vymizení hemodynamické odpovědi (Hall et al., 2002; Šedý et al., in press).

Role drah vedoucích z center NPE

Experimenty na ventilovaných zvířatech ukázaly, že neurogenímu plicnímu edému můžeme zabránit, pokud provedeme transektci krční míchy nad úrovní nebo přímo v úrovni míšní C7 (Chen et al., 1973; Chen and Chai, 1976). V této oblasti se totiž nacházejí dráhy sympatiku, které převádějí tyto autonomní signály do oblasti plic. Vzato z opačného pohledu, rozvoj neurogeního plicního edému můžeme potencionovat, pokud míšní dráhy v této úrovni stimulujeme.

Role intrakraniálního tlaku

Epidemiologická data ukazují, že neurogenní plicní edém vzniká zejména při rozsáhlejších poškozeních centrálního nervstva, s výrazným podílem případů se zvýšeným intrakraniálním tlakem. V experimentu bylo prokázáno, že při náhlém zvýšení intrakraniálního tlaku dochází ke zvýšení tlaku systémového a mírnému zpomalení srdeční frekvence během 1 minuty. Zvýšení systémového a plicního tlaku, spojené se zvýšeným žilním návratem, pozitivně inotropním účinkem na srdce a zvýšeným srdečním výdejem v závislosti na zvýšení tlaku intrakraniálního se označuje jako **Cushingův reflex** (Simmons et al., 1969). Cílem tohoto reflexního mechanismu je za každou cenu perfundovat otékající tkáň centrálního nervstva proti rostoucí periferní kapilární rezistenci; jeho důsledkem je však plicní edém. Cushing sám vysvětlil tento reflexní mechanismus na základě skutečnosti, že se v prodloužené míše hodnoty intrakraniálního tlaku přiblíží hodnotám tlaku systémového a mozkový perfuzní tlak klesne pod prahovou hodnotu, při které je mozková cirkulace ještě schopna autoregulace a zajištění 100 % nutričních potřeb (Cushing, 1901).

Při injekci plné krve nebo roztoku albuminu do cisterna magna umírá 50 % pokusných zvířat na komplikace spojené se vznikem neurogenního plicního edému. Přitom množství vpravené tekutiny je mnohem důležitější než její složení. Někteří autoři prokázali, že role zvýšeného intrakraniálního tlaku při vzniku neurogenního plicního edému je dána zejména tlakovou ischemií jader prodloužené míchy a deformací mozkového kmene, které vedou ke Cushingově odpovědi, zejména ve smyslu zvýšení krevního tlaku (sympatikus) a poklesu srdeční frekvence (parasympatikus) (Thompson a Malina, 1959). Dnes se ukazuje, že mechanická deformace mozkového kmene má mnohem větší vliv na rozvoj systémové odpovědi, jejíž součástí je i neurogenní plicní edém, než ischemická složka ve smyslu Cushingovy teorie.

Jiní autoři prokázali, že při provedení bilaterální adrenalectomie před zákrokem na míše ke zvýšení systémového tlaku ani změnám srdeční frekvence nedochází. Na druhé straně, oboustranná vagotomie nemá žádný protektivní efekt při vzniku neurogenního plicního edému, naopak rozsah edému ještě více zhoršuje. Zvýšení intrakraniálního tlaku prokazatelně poškozuje centra v prodloužené míše, která jsou podezřívána ze spuštění sympatické bouře. Klinické studie ukazují, že subarachnoidální krvácení z ruptury aneurysmatu v povodí arteria vertebralis vede ke vzniku neurogenního plicního edému častěji, než ruptura aneurysmatu v jiné lokalizaci.

Nepřímé důkazy nasvědčují tomu, že ztráta krve může mít „protektivní“ vliv při rozvoji neurogenního plicního edému, neboť se nemohou v dostatečné míře uplatnit významné tlakové změny, způsobené sympatickou bouří. Z doby války ve Vietnamu pochází kazuistika vojáka, který byl střelen nejdříve do břicha a poté do hlavy. Kulka, která zasáhla břišní dutinu způsobila laceraci vena cava inferior a masivní vnitřní krvácení. Voják zemřel na následky poranění mozku, v plicích však nebyly nalezeny žádné známky plicního edému (Simmons et al., 1969).

Katecholaminová bouře

Na vzniku neurogenního plicního edému se nejpravděpodobněji podílí náhle vzniklá systémová alfa-adrenergická stimulace sympatiku a uvolnění vasoaktivních substancí, označovaná jako **katecholaminová bouře** (angl. catecholamine storm) nebo méně často Cushingova odpověď (angl. Cushing response). Výsledkem je generalizovaná vazokonstrikce a nárůst systémového a plicního tlaku, vedoucí k centralizaci oběhu. Následkem těchto změn je zvýšení plicního hydrostatického tlaku, poškození cévní a alveolární stěny, nárůst permeability alveolární stěny a uvolňování tekutiny a krevních buněk do intraalveolárního prostoru. Patofyziologický mechanismus, který se snaží vysvětlit vznik náhlých rozsáhlých hemoragií do plicního parenchymu na základě katecholaminové bouře se označuje jako **teorie výbuchu** (angl. blast theory).

Role sympatického systému při rozvoji neurogenního plicního edému byla přímo i nepřímo prokázána celou řadou experimentů s využitím nejrůznějších experimentálních modelů. Příkladem je studie Novitzkyho a kol. (1986), kteří na opičím modelu zabránili rozvoji neurogenního plicního edému, indukovaného nafouknutím balónku intrakraniálně, chirurgickou sympatektomií. Farmakologickým korelátem této studie je naše zjištění, že preventivní podání gangliového blokátoru pentolinia zcela zabránilo rozvoji neurogenního plicního edému u potkanů s poraněním míchy (Šedý et al., 2007a). Celkový pohled na tyto experimenty navíc ukazuje, že čím má pokusné zvíře více rozvinutý plicní autonomní systém, tím pravděpodobněji a tím těžší neurogenní plicní edém se rozvine. O náchylnosti k jeho rozvoji tedy vypovídá již samotný morfologický substrát (Malik, 1985). Někteří autoři, aby zdůraznili roli plicního řečiště a sympatiku při jeho vzniku, razili pro neurogenní plicní edém termín **neurohemodynamický plicní edém** (Malik, 1985). Následky katecholaminové bouře jsou zvýšení systémového a plicního krevního tlaku, pokles tepové frekvence, centralizace krevního oběhu, zvýšený venózní návrat, zvýšení levostranného end-diastolického tlaku, zvýšení kapilárního hydrostatického tlaku a extravazace tekutiny, vedoucí k plicnímu edému.

Role hemodynamických změn

V experimentech na zvířatech bylo opakovaně prokázáno, že rozvoji neurogenního plicního edému předchází náhlé významné zvýšení systémového krevního tlaku. Blessing et al. (1981) pozorovali zvýšení systémového tlaku o 40 mm u králíků, kterým experimentálně vyvolali NPE pomocí bilaterální destrukce A1 neuronů v medulla oblongata. Reis et al. (1977) vyvolali NPE pomocí léze nucleus tractus solitarii na modelu laboratorního potkana a předpokládali, že smrt zvířete nastává na základě levostranného srdečního selhání v terénu těžké hypertenze. Blessing et al. (1981) pozorovali zvýšení cévní rezistence v abdominální aortě bezprostředně po inzultu, spouštějícím NPE o 350 %. Bradykardie je častým průvodním jevem při rozvoji neurogenního plicního edému.

Experimentálně bylo pozorováno, že bradykardie vzniká souběžně s elevací systémového tlaku (Blessing et al., 1981). Podkladem bradykardie je pravděpodobně,

podobně jako při aktivaci sympatiku, komprese a ischemie mozkového kmene. Bradykardie přímo následuje zvýšení intrakraniálního tlaku. Jádra mozkového kmene, odpovědná za tuto reakci, jsou pravděpodobně nucleus tractus solitarii a nucleus ambiguus. Experimentální data ukazují, že osu „mozkový kmen – srdeční frekvence“ není možno velmi ovlivnit změnami systémového krevního tlaku. Zajímavé je, že experimentální intrakraniální hypertenze na levé straně mozkového kmene má výrazně větší vliv na rozvoj arytmií než na straně pravé. Pravděpodobně je to dáno asymetrickou autonomní periferní inervací srdce (Krasney a Koehler, 1976). Z těchto pokusů je zřejmé, že bradykardie, pozorovaná u neurogenního plicního edému, může vznikat více na základě ovlivnění center v CNS, než na podkladě periferního baroreflexu. Bradykardii u NPE je možné zvrátit pomocí bilaterální vagotomie nebo léze nucleus dorsalis nervi vagi.

Role parasympatiku

Nervus vagus je X. hlavový nerv, který je jediným zdrojem parasympatiku plic. Stimulace *nervus vagus*, například pomocí acetylcholinu, indukuje plicní vasodilataci a snížení kapilárního hydrostatického tlaku. Působení acetylcholinu je přitom dvojího typu – jednak působí na muskarinové receptory plicní hladké svaloviny cév, která takto ochabuje, jednak v plicním cévním řečišti inhibuje uvolňování katecholaminů (Bergofsky, 1980). Naproti tomu uvolnění vazoaktivního intestinálního polypeptidu z *nervus vagus* je příkladem působení alternativní, non-cholinergní, non-adrenergické cesty.

V experimentech na morčeti, králíkovi a potkanovi bylo ukázáno, že oboustranné přetěti *nervus vagus* (bilaterální vagotomie) je schopno samo o sobě vyvolat plicní edém. Ačkoli byl tomuto edému původně přiřazován stejný patofyziologický mechanismus jako edému neurogenímu – tj. excesivní aktivace sympatiku na základě vyřazení parasympatiku, tedy ono úplné odstranění závaží z jedné misky vah a úplné převážení misky druhé (Schmitt a Meyers, 1957), další experimenty tyto úvahy nepotvrdily. Ukázalo se totiž, že bilaterální vagotomie pod odstupem *nervus laryngeus recurrens* plicní edém nevyvolává a byly tak potvrzeny úvahy skeptiků, kteří tvrdili, že tento druh edému je způsobem obstrukcí dýchacích cest v důsledku laryngeálního a bronchiálního spasmu. Obstrukce dýchacích cest vyústí ve zvýšené nasávání a hromadění vzduchu v postižených plicních segmentech. V nepostižených plicních segmentech vzniká reflexním mechanismem negativní interstiální tlak, který vyústí ve zvýšení transkapilárního filtračního tlaku v převzdušněných částech plic a dochází k rozvoji plicního edému. Nakonec se ukázalo, že bilaterální vagotomie pod odstupem *nervus laryngeus recurrens* nemá ani stupňující, ani protektivní vliv na rozvoj neurogenního plicního edému (Malik, 1985).

Role kapilárního hydrostatického tlaku

Sympatická a parasympatická visceromotorická inervace plicního řečiště ovlivňuje tonus plicních cév. Jakákoli změna eferentní autonomní aktivity může zvýšit nebo snížit plicní kapilární hydrostatický tlak (Bergofsky, 1980). Je nepochybné, že změny v hodnotách kapilárního hydrostatického tlaku se zásadním způsobem uplatňují

při vzniku neurogenního plicního edému. V důsledku zvýšené sympatické aktivity dochází ke zvýšení systémového tlaku, centralizaci oběhu a tím i zvýšenému množství krve ve vysokotlaké centrální části oběhu. Toto zvýšení tlaku je jednak na vrub samotnému poškození míšní tkáně, jednak zvýšení intrakraniálního tlaku a působení na centra v prodloužené míše. Na tak náhle zvýšené nároky zřejmě nemůže srdce, zejména levá komora, dostatečně zareagovat a pravděpodobně dochází ke snížení množství krve přečerpávané levým srdcem a městnání krve v nízkotlakém cévním systému plic. Bylo prokázáno, že existuje korelace mezi tlakem v levé předsíni a stupněm neurogenního plicního edému. Tato tvrzení podporuje i paralelní zjištění nižšího krevního průtoku v aortě na modelu neurogenního plicního edému. Dochází tak k náhle vzniklému enormnímu nárůstu kapilárního hydrostatického tlaku, extrémním změnám a vzniklé nerovnováze Starlingových sil, působících na stěnu kapilár, exsudaci tekutiny a při překročení určitých hodnot i k poškození až popraskání stěn kapilár a vzniku krvácení, které je častým doprovodným znakem neurogenního plicního edému a může být příčinou úmrtí pacienta. Role sympatikem aktivované plicní venokonstrikce a na jejím základě vzniklé další zvýšení kapilárního hydrostatického tlaku a plicní vaskulární permeability není rovněž zanedbatelná (Dauber a Weil, 1983). Hypotéza o zásadní roli zvýšeného kapilárního hydrostatického tlaku je podpořena i zjištěním nízkého sérového poměru tekutina-proteiny u zvířat s NPE (Smith a Matthay, 1997).

Krvácení u neurogenního plicního edému

Hlavním nebezpečím neurogenního plicního edému je zejména náhlý a velmi razantní rozvoj, který může během několika minut ukončit život pacienta. V jeho patogenezi hraje významnou úlohu hemoragická složka, která je nejvíce vyjádřena právě u tohoto typu plicního edému. V našich experimentech vedla masivní exsudace sangvinolentní tekutiny z plic k úmrtí více než 40 % pokusných zvířat s nízkou hladinou isofluranové anestezie ve velmi krátké době (Šedý et al., 2007a, 2007b). Vznik neurogenního plicního edému může být navíc potencován plicní kapilární vasokonstrikcí nebo změnami ve stěnách plicních cév v důsledku systémové choroby, jak bylo popsáno v případě systémového lupus erythematodes.

Role permeability kapilár a anestezie

Jak bylo řečeno v úvodu, isofluran indukuje reversibilní snížení alveolární epiteliální tekutinové clearance a snižují tak práh pro vznik plicního edému. Bylo prokázáno, že isofluran inhibuje mitochondriální oxidaci, což vede ke snížené produkci ATP v pneumocytech II. typu a stimuluje tak produkci laktátu v těchto buňkách. Navíc snižuje syntézu fosfatidylcholinu a indukuje apoptózu pneumocytů II. typu, což zásadním způsobem poškozuje surfaktant. U intravenózních anestetik typu pentobarbitalu nebo kombinace ketaminu-xylazinu tento nežádoucí efekt zjištěn nebyl. Použití isofluranu tedy primárně vytváří podmínky pro vznik neurogenního plicního edému. Navíc, nízké koncentrace isofluranu zřejmě zvyšují stres pokusného zvířete a vznik neurogenního plicního edému je dále potencován. Při použití jiných anestetik, jako je např. lidokain, ketamin, xylazin, pentobarbital, halothan a sevofluran byl během vytváření míšní léze v experimentu rovněž pozorován

rozvoj neurogenního plicního edému, doprovázeného krvácením (Leal Filho et al., 2005a, 2005b). Zvýšení tlaku v nízkotlakém plicním řečišti navíc působí barotrauma endotelu plicních kapilár a poruchy kapilární permeability jsou tak dále stupňovány. Výsledkem je exsudace tekutiny až protržení kapilární stěny, vedoucí ke krvácení, které jsme pozorovali i my. Podle nás je vznik neurogenního plicního edému v našich experimentech způsoben jednak primárním lehkým poškozením plic vlivem isofluranu v kombinaci se sníženou anestézií u 1,5 % a 2 % skupin, která dovolí průběh sympatické bouře a vznik edému. Permeabilitu plicních kapilár zvyšuje neuropeptid Y, adrenalin a noradrenalin.

Role epitelu alveolární stěny

Z řady experimentů vyplývá, že zvýšený krevní tlak hraje sice velmi důležitou roli, není však jediným zdrojem rozvoje neurogenního plicního edému. V roce 1981 provedli Hoff et al. pokus, ve kterém modelovému zvířeti pomocí pouštění žilou regulovali tlak na normálních hodnotách v kritické době rozvoje neurogenního plicního edému. Neurogenní plicní edém byl sice menšího rozsahu, jeho rozvoj byl však pravidlem (Hoff et al., 1981). Podobnou zkušenost máme i u našich experimentálních zvířat – pokud zvíře během výkonu v rámci experimentálního poranění míchy více krvácí, existuje menší pravděpodobnost, že zemře na následky neurogenního plicního edému; edém však vytvořen bude. Tato zjištění odpovídají hemodynamickým vlastnostem krevního řečiště.

Epitel alveolární stěny hraje kritickou úlohu při minimalizaci vlhkosti intraalveolárního prostoru vzdušných plicních sklípků, která je nezbytná pro správnou výměnu plynů. Mnohé studie ukazují klíčovou roli epitelu alveolární stěny při absorpci a reabsorpci isotonické tekutiny z intraalveolárního prostoru plicních sklípků proti vzrůstajícímu osmotickému gradientu do lumina plicních kapilár. Je známo, že hlavní podíl na tomto procesu má transport Na^+ a K^+ iontů, což lze nepřímo prokázat inhibicí procesu vstřebávání tekutiny z intraalveolárního prostoru amiloridem a ouabainem. Porušení této iontové rovnováhy může potencovat vznik neurogenního plicního edému.

Blastická teorie

Blastická teorie (angl. blast theory) předpokládá poškození jemných plicních cév a následný vzestup permeability jejich stěn v důsledku náhlého vzestupu plicního vaskulárního tlaku, který může být iniciován například plicním vasospasmem nebo náhlým zvýšením žilního návratu do plic. Blastickou teorii podporují experimenty Westa et al. (1992), kteří prokázali poškození stěn plicních kapilár při překročení tlaku 40 mm Hg. Slabinou této teorie je opakované experimentální i klinické zjištění, že plicní vaskulární hypertenze nemusí být nutně přítomna u všech případů neurogenního plicního edému (Bowers et al., 1979; Touho et al., 1989). Kromě toho bylo zjištěno, že zvýšený plicní tlak v důsledku poškození centrálního nervového systému nemusí vždy vést k neurogennímu plicnímu edému (Landolt et al., 1983).

Poškození srdečního svalu v důsledku neurogenního plicního edému

V důsledku závažných hemodynamických změn dochází v průběhu rozvoje neurogenního plicního edému i k sekundárnímu poškození myokardu. Syndrom bývá často označován jako **syndrom myokardiálního otřesu** (angl. neurogenic stunned myocardium) nebo Tako-Tsubo kardiomyopatie. Projevuje se nejčastěji reverzibilní generalizovanou hypokinézou srdečního svalu, doprovázenou sníženou ejekční frakcí. Vznik syndromu myokardiálního otřesu je nejpravděpodobněji způsoben náhlým vzestupem sérových katecholaminů, který je jedním z mechanismů spouštějících neurogenní plicní edém. Kromě toho se může podílet i katecholaminy vyvolaný nárůst systémové cévní rezistence. Syndrom je podmíněn generalizovaným výskytem mikronekróz v srdečním svaly (Marshall a Nyquist, 2009). Mimořádně důležité je zjištění, že navzdory tomu, že syndrom myokardiálního otřesu vede v akutním stadiu často k výraznému zhoršení až smrti pacienta, při zvládnutí této situace nezanechává na myokardu téměř žádné funkčně-morfologické stopy a v průběhu 4-5 dnů se spontánně upraví. V těchto místech tedy spočívá velký potenciál pro budoucí výzkum, jehož cílem by mělo být terapeuticky ochránit srdeční sval proti působení negativního vlivu neurogenního plicního edému a pomoci mu aktivně překlenout nejtěžší období, s výhledem vědomí, že v následujícím období bude schopen spontánní restituace ad integrum. Diferenciálně diagnosticky může být někdy obtížné odlišit syndrom myokardiálního otřesu od infarktu myokardu (Seow et al., 2007).

Role farmakologických intervencí

Rozvoj a stupeň neurogenního plicního edému ovlivňuje celá řada farmak a neurohumorálních působků (viz též kap. 7 a 11). Mezi nejvýznamnější patří adrenalin, noradrenalin, neuropeptid Y, pentolinium, atropin a oxid dusnatý. Adrenalin a noradrenalin hrají prokazatelně roli v průběhu katecholaminové bouře (viz kap. 11), infuze adrenalinu a noradrenalinu však per se neurogenní plicní edém nezpůsobuje (Rossel, 1980). **Neuropeptid Y** je neurohumorální působek, který má celou řadu farmakologických účinků, jako např. antinociceptivní, anxiolytický a orexigenní (zvyšující chuť k jídlu) a roli v modulaci cirkadiálního rytmu (Naveilhan et al., 2001). Pokud je experimentálně do plic vpraven neuropeptid Y, který je mimo jiné společně s noradrenalinem vylučován sympatickými nervy a zvyšuje tak stupeň plicní vasodilatace a plicní vaskulární permeabilitu, reaguje organismus pokusného zvířete zvýšením plicní vaskulární permeability a vznikem neurogenního plicního edému. Neuropeptid Y přitom působí přímo na endotelové buňky. Neuropeptid Y je schopen působením na GABA-ergní, glutamátergní a dopaminergní nervové dráhy ovlivňovat hloubku anestezie na úrovni centrálního nervového systému (Naveilhan et al., 2001). Různé druhy anestetik, jako např. pentobarbital nebo ketamin, jsou zpětně schopny ovlivňovat receptory pro neuropeptid Y a v důsledku pak i modulovat vznik neurogenního plicního edému (Leal Filho et al., 2005a, 2005b). Role pentolinia a atropinu viz kap. 11. Experimentální údaje ukazují, že **endogenní opioidy** (např. endorfiny) jsou zodpovědné za zvýšení plicní vaskulární permeability a objem extravaskulární tekutiny na podkladě zvýšení nitrolebního tlaku (Peterson et al., 1983). Tato zjištění jsou založena na základě pozorova-

ného protektivního vlivu naloxonu (antagonista opioidních receptorů) při rozvoji NPE. Bylo prokázáno, že podání **fentolaminu** je schopno zabránit rozvoji NPE (Maron a Dawson, 1980; Malik, 1985; Hakim et al., 1979). Experimentální i klinická data ukazují, že beta-adrenergní složka je při rozvoji NPE méně významná. Colgan et al. (1983) ukázal na psím modelu hypertenze, že propranolol redukuje plicní intravaskulární tlak a rozsah plicního zkratu. Při použití našeho modelu NPE jsme prokázali, že propranolol má mírně protektivní účinky na jeho rozvoj, které jsou však nesrovnatelně méně výrazné ve srovnání s alfa-adrenergní blokádou (viz kap. 11).

Důsledky neurogenního plicního edému

Neurogenní plicní edém má celou řadu důsledků, z nichž nejvýznamnější je omezení kapacity plic v důsledku omezení plochy pro výměnu dýchacích plynů a z toho vyplývající snížení množství kyslíku v organismu – **hypoxie**. Dochází ke zvětšení vzdálenosti mezi alveolárním vzduchem a krví a rovněž zmenšení celé plochy určené pro výměnu plynů, což vede ke snížení množství kyslíku, který může difundovat přes alveolo-kapilární membránu. Vyplnění alveolů tekutinou se zachovaným průtokem krve v bezprostředním okolí zaplavených alveolů způsobuje vznik pravolevého plicního zkratu. Zvýšení obsahu tekutiny v plicích a případné poškození alveolů, provázené snížením koncentrace surfaktantu, vede ke snížení poddajnosti plicní tkáně a zvýšení úsilí, které je nutné vynaložit k dechové funkci. Plicní edém může rovněž zvyšovat odpor dýchacích cest kladený prouděním vzduchu, který tkví v omezení průsvitu drobných bronchiolů peribronchiálním edémem, v reflexním bronchospasmu a v těžších případech i ve vlastním zaplavení dýchacích cest tekutinou. Rizikem neléčeného neurogenního plicního edému je rozvoj pneumonie, atelektázy a pleurálního výpotku.

Podstata vzniku dušnosti

Poruchy ventilace se již tradičně rozdělují na obstrukční a restriční formy. Podstatou obstrukční poruchy je snížení objemu vzduchu, který je dopraven k částem plicního parenchymu, schopným ventilace. Naopak podstata restriční poruchy tkví ve zmenšení (restriční) množství funkčního parenchymu plíce, schopného ventilace. Z tohoto pohledu se při vzniku dušnosti u neurogenního plicního edému uplatňují oba tyto faktory. Obstrukční mechanismus je dán zaplněním dýchacích cest edematózní tekutinou a krví, restriční mechanismus destrukcí alveolo-kapilárních membrán parenchymu a prokrvácením intersticia.

5. ANAMNÉZA, KLINICKÝ OBRAZ A VYŠETŘENÍ

Z anamnestických údajů jsou z hlediska neurogenního plicního edému důležité zejména parametry související se současným onemocněním CNS. Obecně řečeno jsou příznaky neurogenního plicního edému poměrně různorodé a často nespecifické. Diagnostika proto není často snadná. Velmi důležité je dát tento klinický stav do souvislosti s akutně vzniklým poškozením CNS. Pokud je však již jednou pomyšleno na neurogenní plicní edém, potvrzení diagnózy nečiní obvykle potíže. Klíčovým vyšetřením pro diagnostiku neurogenního plicního edému je fyzikální vyšetření (zejména vědomí, srdeční a dechová frekvence, krevní tlak, typ dýchání, poklep a poslech plic).

Subjektivní příznaky

- **náhle vzniklá dušnost** (dyspnoe) – vzniká zejména v důsledku zvýšené dechové práce a větších tlakových změn a napětí v hrudním koši a v plicním parenchymu
- **bolesti na hrudi** – vznikají ze stejných příčin jako dušnost. Nemají charakter stenokardií.
- **zhoršené odkašlávání** – je způsobeno přetížením dýchacího svalstva předchozí námahou a nemožností kašlem odstranit edematózní tekutinu v alveolárních částech plic
- **bolesti hlavy, nauzea a zvracení** – jsou způsobeny hypoxií. Často jsou projevem poškození centrálního nervového systému, zejména zvýšeného intrakraniálního tlaku.
- **celkové oslabení** – projevuje se pocity slabosti, schváceností, úzkostí až obavami o vlastní život, které vznikají v důsledku nemožnosti se dostatečně nadechnout a bolestí při dýchání. Pacient se výrazně potí.

Objektivní příznaky

- **vazba na poškození centrálního nervového systému** – pro diagnostiku je klíčová. Může se jednat jak o poranění mozku nebo míchy, tak o náhle vzniklý stav poškození parenchymu centrálního nervstva, způsobený krvácením, tlakem útvarů různé etiologie nebo náhlou exacerbací celkové chronické choroby.
- **povrchnější dýchání** – jedná se o obrannou reakci organismu na edémem způsobené zvýšení tlakových změn, potřebných pro ventilaci. Pacient více zapojuje pomocné dýchací svaly. Může být přítomno vpadávání supraklavikulárních jamek a prodloužení exspira se spastickými bronchitickými fenomény.
- **tachypnoe** – důsledek hypoxie organismu. Vzhledem k tomu, že organismus nemůže zvyšovat dechovou práci zvětšením dechového objemu, musí takto činit zvýšením dechové frekvence.
- **tachykardie** – rovněž důsledek hypoxie. Vzniká reflexně, snahou o lepší zajištění krevního zásobení organismu.

- **poslechový nález** – typické jsou polopřízvučné až nepřízvučné vrzoty a chrůpky malých bublin, začínající při bazích plic a později se šířící na celý plicní parenchym. Chrůpky bývají typicky nad oběma plicemi, mohou však začínat na jedné plíci a později se šířit i nad druhou plíci.
- **suchý dráždivý kašel** – ke kašli dráždí tekutina přítomná v plicích
- **narůžovělé sputum až hemoptýza** – jsou typické pro neurogenní plicní edém v důsledku jeho hemoragické složky
- **hypoxemie** – vzniká v důsledku nedostatečného okysličování krve kyslíkem, projevuje se nízkým parciálním tlakem O_2 , sníženou saturací hemoglobinu kyslíkem, chladnými a bledými akry až cyanózou, vystupňovanou dušností, zapojováním pomocného dýchacího svalstva a řadou subjektivních nespecifických příznaků typu únavy a malátnosti. Hyperkapnie u plicního edému nebývá přítomna, neboť zvýšené ventilační úsilí v naprosté většině případů kompenzuje difuzní a ventilační poruchy. Častěji nacházíme hypokapnii, vznikající v důsledku zvýšeného ventilačního úsilí, která vede k rozvoji respirační alkalózy. Tento stav snižuje stupeň ionizace kalcia a vede tak ke zvýšené neuromuskulární dráždivosti až křečím kosterního svalstva. Kromě toho může hypokapnie způsobovat vasokonstrikci mozkových cév a tedy projevy sníženého zásobení krve kyslíkem v podobě točení hlavy, závratí až poruch vědomí.
- **zvýšený intrakraniální tlak** – je důsledkem nebo příčinou poškození centrálního nervového systému. Neurogenní plicní edém jej nevyvolává.
- **poruchy vědomí** – vznikají buď v důsledku hypokapnie nebo častěji v důsledku generalizované hypoxie
- **spíše mírnější zvýšení teploty** – neurogenní plicní edém je nezánětlivý, proto významné zvýšení teploty odráží spíše jiný nebo nastupující zářnlivý stav
- **smrtelný chropot** (angl. death rattle) – doprovází terminální stadium neurogenního plicního edému v okamžiku, kdy není edematózní tekutina dostatečně odstraňována
- **minimální nebo žádné známky zánětu** - důležitý diferenciálně diagnostický znak

Pro diagnostiku plicního edému je z pomocných vyšetření nejdůležitějším RTG hrudníku. Nacházíme zde obraz plicní žilní hyperemie a difuzní zastřeni plicního parenchymu v důsledku intersticiálního edému, které v pozdějších stadiích přechází v husté zastřeni, odpovídající alveolárnímu edému. V případě neurogenního plicního edému bývá zpočátku maximum zastřeni v perihilární oblasti, později se rozširuje na ostatní části plic. Pro diferenciální diagnostiku je důležité, že v případě kardiálních příčin doprovází RTG obraz zvětšení levostranného srdečního stínu. V případě prodělaného infarktu myokardu můžeme pozorovat i vyklenující se poinfarktové aneurysma levé srdeční komory. V 90 % případů je možné pozorovat různý stupeň difuzního zastřeni obou plicních polí, zejména v hilové oblasti, nástřik plicních cév a normální velikost srdečního stínu. Monitoring plicního tlaku v zaklínění může poskytnout důležité diferenciálně diagnostické údaje v rámci odlišení kardiálního plicního edému, jeho nevýhodou je však invazivita. Kromě toho v případě plicního edému poměrně nepřesně odráží hodnoty kapilárního hydrostatického

tlaku a může proto často vykazovat normální hodnoty i v případě velmi vysokého kapilárního hydrostatického tlaku, prohlubujícího plicní edém (Ganter et al., 2006). Biochemické testy jsou zde spíše druhořadé, časté monitorování pomocí ASTRUP může být přínosem. V periferní krvi je patrná významná metabolická acidóza se zvýšeným deficitem bází. Vyšetření krevních plynů odhalí známky hypoxie a snížení parciálního tlaku oxidu uhličitého. Elektrokardiografie a echokardiografie pomohou vyloučit kardiogenní příčinu plicního edému. Echokardiografie pomůže odhalit syndrom myokardiálního otřesu, projevující se generalizovanou hypokinézou srdečního svalu, doprovázeného sníženou ejekční frakcí. Vyšetření srdečních enzymů pomůže diferenciatně diagnosticky odhalit infarkt myokardu a další příčiny kardiálního plicního edému. Pro diagnostiku syndromu myokardiálního otřesu je nejvýznamnější stanovení hladiny troponinu, která je u těchto pacientů nižší než 2,8 ng/ml a vyskytuje se konkomitantně s ejekční frakcí menší než 40 % a echokardiografickými abnormitami, při absenci jakýchkoli změn na EKG (Schubert, 2007). Zvýšené hodnoty mozkového natriuretického peptidu (BNP) naznačují, že příčinou plicního edému je levostranné srdeční selhání. Histopatologicky můžeme makroskopicky pozorovat zvětšené prosáklé plíce, na kterých jsou patrné subpleurální sufuze. Z plic vytéká narůžovělá zpěněná tekutina. Mikroskopicky je suverénním barvením hematoxylin-eosin. Na řezu můžeme pozorovat ztlustělé alveolární stěny a alveoly, vyplněné eosinofilním materiálem, mezi nímž jsou četné krevní elementy s převahou erytrocytů. Časté jsou atelektázy.

Neurogenní plicní edém u poranění míchy

Poranění míchy patří mezi jeden z nejdůležitějších celospolečenských medicínských problémů, zejména s vysokým rozvojem a nárůstem automobilové dopravy a extrémních druhů sportovních aktivit. Nejohroženější skupinou jsou mladí muži mezi 15 a 30 lety. Okolo 40-50 % úrazů míchy je spojených s požitím alkoholu. Incidence poranění míchy je ve vyspělých zemích udávána okolo 5 případů na 100 000 obyvatel. Není zanedbatelný ani dopad ekonomický, například v USA dosahují roční výdaje, spojené s léčbou míšního poranění 10 miliard dolarů (Bracken, 1991; Bracken a Sheprad, 1997). Síly, které mohou působit na míchu a způsobit její poranění, jsou flekční, akceleračně-decelerační, trakční, rotačně-deformační, kompresní a penetrační. K míšnímu poranění dochází buď **přímo** - při prudkém ohnutí, napnutí nebo rotaci míchy, prudkým otřesem při přímém nárazu na páteř, při výbuchu v blízkém okolí a při paravertebrálním průstřelu, nebo **nepřímo** - stlačením nebo přetětím kostním úlomkem, fragmentem intervertebrálního disku nebo cizím tělesem. Nejzávažnější poranění míchy vznikají v návaznosti na luxační a tříštivé zlomeniny páteře. Nejčastějšími mechanismy jsou **mechanismus flekční**, při kterém je páteř prudce ohnuta vpřed (čelní náraz automobilu) a **mechanismus extenční**, při kterém je páteř naopak prudce ohnuta dozadu (náraz zezadu bez hlavové opěrky). Poranění míchy je výraznější u vrozené nebo získané stenózy průsvitu páteřního kanálu a u starších lidí s degenerativními poruchami páteře (osteofyty).

Míšní šok nastává bezprostředně po poranění míchy, byť je toto reverzibilního charakteru. Obvykle u člověka trvá 2-3 týdny. Projeví se parézou a plegií postižené oblasti, areflexií, anestezií, zástavou pocení, retencí moči a stolice. Tyto stavy

se ve většině případů postupně upravují, až dosáhnou určité hranice, od které je odvislé výsledné neurologické postižení. Paréza nebo plegie bezprostředně po poranění bývá proto obvykle těžší, než výsledné klinické postižení pacienta. Po odeznění míšního šoku nastává v postižených oblastech hyperreflexie a svalová spasticita. **Traumatický šok** se naproti tomu vyskytuje pouze u těžších poranění, obvykle polytraumat, kde je výsledkem velké krevní ztráty, nahromadění zplodin metabolismu apod. Koncepce primárního a sekundárního míšního poškození označuje jako **primární poškození** mechanické zhmoždění a laceraci nervové tkáně, včetně mechanického poškození cév, doprovázené sníženou perfuzí nervové tkáně, acidózou a hypoxií, vedoucí ke vzniku nekrot. Stručně primární poškození charakterizuje trias trauma – ischemie – hematoma. Termínem **sekundární poškození** je pak označován soubor buněčných a molekulárních procesů, které jsou vyvolány a bezprostředně navazují na primární poškození a vedou k rozšíření původní léze (Tator a Fehlings, 1991; Taoka a Okajima, 1998; Urdzíkova, 2006). V experimentu bylo prokázáno, že již 2 minuty po kompresivním míšním poranění je pozorovatelné poškození alveolárních buněk, které zde ztrácejí integritu s okolním epitelem a postupně se rozpadají v buněčný detritus.

Neurogení plicní edému u poranění mozku

Poranění mozku je s rozvojem automobilové dopravy v civilizovaných zemích stále častější. Jeho výsledkem je často doživotní porucha motorických a sensitivních funkcí, která často výrazně hendikepuje pacienta. Rychlost, s jakou neurogení plicní edém někdy vzniká, je často ohromující. Z války ve Vietnamu pochází kazuis-tika naprosto zdravého vojáka, který byl v průběhu bitvy střelen zezadu do hlavy a na místě mrtev. Jeho pitva prokázala masivní neurogení plicní edém, vzniklý na základě rozsáhlého poranění mozku a zároveň vyloučila jinou příčinu plicního edému (Simmons et al., 1969).

6. TERAPIE NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Základem terapie je odstranění, minimalizace nebo stabilizace příčiny v CNS. Vzhledem k tomu, že cílená kurativní léčba neurogenního plicního edému dosud neexistuje, je smyslem terapeutických snah zejména léčba podpůrná a symptomatická. Jako nejdůležitější opatření se jeví kontinuální monitorování stavu pacienta, polohování pacienta a podpora ventilace a oxygenace. Neurogenní plicní edém se u většiny pacientů podaří zvládnout do 48-72 hodin. Ačkoli je léčbu možno považovat spíše za podpůrnou než kauzální, tedy jinými slovy, že poskytneme organismu možnost, aby se plicního edému sám zbavil, je tato léčba naprosto klíčová a často život zachraňující.

Monitorování pacienta

Základem terapeutických snah je kontinuální monitorování životních funkcí pacienta, zejména měření krevního tlaku, tepové frekvence, dechové frekvence, EKG a saturace. Provádíme opakovaná hematologická a biochemická vyšetření krve. Monitorování tlaku v zaklínění může být velkým přínosem v průběhu terapie, neboť umožní udržení nízkých hodnot tlaku na srdeční úrovni a zároveň může zabránit nadměrnému snížení srdečního výdeje a hypoperfuzi mozku (Lagerkranser et al., 1982).

Poloha pacienta

Pro pacienta s plicním edémem je poloha těla klíčová. Základem je taková poloha, která zabrání zvýšenému žilnímu návratu. Nutná je zvýšená poloha hlavy. Nejvýhodnější je poloha vsedě s dolními končetinami spuštěnými z lůžka. Tuto polohu však nelze uplatnit u pacientů s hypotenzí. V rámci první pomoci je někdy doporučováno dočasné přiměřené zaškrcení dolních končetin v oblasti stehen, které redukuje žilní návrat z této oblasti. Zaškrcení pochopitelně musí umožňovat cirkulaci, nesmí tedy omezovat proud krve v tepnách. V některých případech může být výhodné pacienta uložit do polohy na břicho, jak doporučuje Marshall a Nyquist (2009) nebo Fletcher a Atkinson (2003). Tato poloha se velmi osvědčila i u pacientů s ARDS, jak ukazuje randomizovaná klinická studie Guerina (2006). Studie Mancebo et al. (2006) jasně ukazuje i snížení mortality u pacientů s ARDS, u kterých byla použita poloha na břicho již od prvních projevů onemocnění. Pro neurogenní plicní edém zatím systematická studie bohužel neexistuje. Mechanismus terapeutického úspěchu polohy na břicho není zcela jasný, předpokládá se však redistribuce výměny plynů do oblastí méně postižených plicním edémem a zároveň zmírnění poškození plic způsobené umělou plicní ventilací. Při indikaci polohy na břicho však musíme vzít v úvahu, že u některých neurologických onemocnění, jako je intracerebrální krvácení, subarachnoidální krvácení, tepenné uzávěry v oblasti arteria cerebri media nebo poranění mozku, může poloha na břicho přivodit zvýšení intrakraniálního tlaku a takto zhoršit prognózu pacienta.

Podpora oxygenace a ventilace

Základním opatřením při podpoře oxygenace a ventilace je potlačení hypoxie pomocí přímého podávání kyslíku nosní nebo obličejovou maskou, případně pomocí endotracheální intubace a přetlakové mechanické ventilace pomocí **pozitivního endexpiračního přetlaku** (PEEP - Positive End Expiratory Pressure). Izolované dodávání kyslíku zvyšuje parciální tlak kyslíku v plicních alveolech a usnadňuje tak výměnu plynů. Kontinuální nebo dvoustupňové dodání vysokotlakého kyslíku kromě toho umožňuje úlevu přetíženým dýchacím svalům. Přetlaková mechanická ventilace pomocí PEEP značí iatrogeně navozenou situaci, kdy je na konci expira v dýchacích cestách vyšší tlak než atmosférický. Rozeznáváme tři úrovně PEEP. Nízká úroveň značí úroveň PEEP do 5 mm H₂O, střední úroveň značí PEEP v rozmezí 5-15 mm H₂O, vysoká úroveň značí PEEP nad 15 mm H₂O. Pro ventilační podporu pacientů s NPE používáme nejčastěji střední úroveň, výjimečně vysokou úroveň PEEP. **Kontinuální pozitivní přetlak v dýchacích cestách** (CPAP – continuous positive airway pressure) pak značí situaci, kdy je u spontánně dýchajícího nemocného v dýchacích cestách udržen tlak vyšší než atmosférický po celou dobu dechového cyklu, tedy i v době inspira. Kromě dodávky kyslíku a úlevy dechových svalů přetlaková mechanická ventilace (i) snižuje preload a afterload a takto usnadňuje srdeční činnost, (ii) napomáhá redistribuci tekutiny v plicích z intraalveolárních do extraalveolárních prostor, kde tolik neinterferují s výměnou dechových plynů a (iii) zvětšuje plicní objem a napomáhá tak prevenci rozvoje plicní atelektázy. PEEP vede ke zlepšení oxygenace v důsledku snížení plicního zkratu a ke zlepšení eliminace oxidu uhličitého na podkladě zvýšení alveolární ventilace. Je však třeba dbát toho, aby nedošlo k hyperinflaci, která se projeví naopak snížením perfuze ventilovaných alveolů, zhoršením eliminace oxidu uhličitého a dále dokonce zhoršením oxygenace – tento efekt závisí na podílu redistribuce krevního průtoku do neventilovaných oblastí. Bylo prokázáno, že v určitých oblastech plic probíhá průtok krve plicními kapilárami pouze v době expira, kdy je plicní kapilární tlak vyšší než plicní alveolární tlak. Velikost perfuze těmito oblastmi, odpovídající velikosti plicního zkratu tak závisí jednak na použité hodnotě PEEP, jednak na velikosti dechového objemu, poměru inspira a expira a hodnotě plicního kapilárního tlaku. Bylo prokázáno, že po překročení optimální hodnoty středního tlaku v dýchacích cestách, která u konkrétního pacienta závisí i na aktuální hodnotě plicního kapilárního tlaku, dochází tímto mechanismem nejen ke zhoršení eliminace oxidu uhličitého, ale i oxygenace. Provzdušnění tekutinou vyplněných alveolů a roztažení kolabovaných alveolů v terénu plicního edému pomocí PEEP označujeme v zahraniční literatuře jako **recruitment**. Za tento děj je zodpovědný vrcholový alveolární tlak, dosahovaný v průběhu inspira.

Kromě působení na respirační systém má PEEP i poměrně velký vliv na hemodynamické poměry v malém oběhu. PEEP (i) snižuje venózní návrat do oblasti levého srdce a tedy i preload, (ii) snižuje transmuralní tlakový gradient, který musí být překonáván v průběhu srdeční kontrakce, což vede ke snížení afterloadu a s tím souvisí i (iii) snížená spotřeba kyslíku myokardem – tyto efekty jsou nejvíce vyjádřeny u pacientů s levostranným srdečním selháním. Naproti tomu u pacientů bez levostranného srdečního selhání dominuje u aplikace PEEP snížení žilního návratu a tedy i preloadu. U hypo-

volemických pacientů pak ke snížení srdečního výdeje. Vliv PEEP na afterload pravé komory závisí na redistribuci plicní perfuze po zařazení PEEP a na aktuální velikosti plicního objemu. Plicní vaskulární rezistence dosahuje při nízkém plicním objemu vysokých hodnot, což je důsledek hypoxické plicní vasokonstrikce. Se zvyšováním plicního objemu plicní vaskulární rezistence klesá a po překročení optimální hodnoty plicního objemu dochází k jejímu opětovnému vzestupu v důsledku komprese kapilárního řečiště. Efekt aplikace PEEP na funkci pravé komory je tedy výsledkem komplikované interakce mezi snížením preloadu a ovlivněním afterloadu.

PEEP má rovněž vliv na nitrobřišní tlak, který po zařazení PEEP stoupá. U pacientů s výrazně sníženou poddajností dutiny břišní může vést použití nadměrně vysokých hodnot PEEP ke vzestupu nitrobřišního tlaku a omezení perfuze nitrobřišních orgánů.

Nastavení hodnot PEEP v konkrétních situacích je stále předmětem diskusí. Navzdory tomu, že pro většinu klinických situací existují doporučené postupy, je často nutné se uchýlit k individuálnímu posouzení a nastavení hodnot PEEP. Z hlediska působení PEEP rozeznáváme pacienty, kteří PEEP tolerují dobře a jeho použití je pro ně benefitem (angl. PEEP responders) a pacienty, kteří reagují negativně (angl. PEEP non-responders). U druhé skupiny pacientů je nutno přistoupit k individuálnímu nastavení hodnot PEEP a v případě dalšího neúspěchu raději zvolit nižší hodnoty, u kterých je jistota, že pacienta nepoškozují. U sledovaných pacientů nebo u pacientů bez dechové aktivity je ventilace s nulovou hodnotou PEEP považována za závažnou chybu, ze které vyplývá postupné zhoršování plicních funkcí, včetně vysokého rizika následného plicního poškození.

Při indikaci PEEP musíme mít rovněž na paměti komplikace, které z jeho použití mohou vyplynout. Hlavní komplikací je trauma plicní tkáně z jejího nadměrného rozpětí – **volutrauma**, kdy dochází k ruptuře jednotlivých součástí alveolárních membrán, zejména epitelu alveolární membrány a endotelu cév. V patogenezi ruptur se uplatňuje i velikost gradientu mezi intraluminárním a extraluminárním tlakem – transkapilární gradient, který je roztahováním pevných struktur alveolárních stěn zvyšován. Incidence a rozsah volutraumatu stoupá přímo úměrně použitému endexpiračnímu plicnímu objemu, rozsah PEEP je proto nutno indikovat uvážlivě. Kromě toho může vysoký stupeň PEEP redukovat žilní návrat z mozku a zhoršovat tak nebo vyvolávat edém mozku a intrakraniální hypertenzi (Colice, 1984).

PEEP svým přetlakovým působením naopak zabraňuje **působení střižných sil** v plicních oblastech s tendencí ke kolapsu, kde nevytváří zóny s opakovaným cyklickým střídáním maximálního kolapsu a maximálního rozpětí, které může nastat v případě klasické umělé plicní ventilace. Střižnými mechanismy vznikají vysoké tlakové gradienty, poškozující endotel cév, buňky malých bronchů a alveolů. Další výhodou PEEP proti klasické umělé plicní ventilaci je skutečnost, že **nedochází k inaktivaci surfaktantu**, což má výrazně lepší prognostický efekt v období zpětného převodu pacienta na spontánní dýchání.

Farmakologická léčba

V časném stadiu mohou být užitečné alfa-blokátory a kortikoidy, farmakologická terapie však obvykle mnoho nevyřeší.

Zvýšení diurézy představuje základní opatření při snižování preloadu. Snižuje hemodynamickou zátěž na levé srdce a pozitivně tak ovlivňuje jak srdeční sval, tak plicní hemodynamiku. Většina kličkových diuretik typu furosemidu, bumetanidu nebo torsemidu představuje úspěšnou podpůrnou terapeutickou modalitu při léčbě plicního edému, i v terénu hypoalbuminemie, hyponatremie nebo hypochloremie. Lékem první volby je furosemid, vzhledem k jeho venodilatačnímu účinku, kterým snižuje preload ještě před vlastním počátkem diuretického působení. Počáteční dávky furosemidu jsou doporučovány spíše nižší (do 0,5 mg/kg), teprve při jejich nedostatečném účinku se zvyšují (1 mg/kg), zejména u pacientů již léčených diuretiky nebo pacientů s renální insuficiencí nebo tam, kde je primární příčinou plicního edému hypervolémie.

Nitráty slouží k vasodilataci jak koronárních tepen, které zlepšují srdeční funkci, tak ke snížení preloadu levého srdce vasodilatací plicních žil. Zatímco u kardiogenních plicních edémů je jejich účinek významný, u neurogenního plicního edému je jejich efekt nižší. V akutním stadiu používáme zejména sublinguálně aplikovaný nitroglycerin (1,2 mg každých 5 minut). Metodou volby, používanou zejména při systolickém tlaku vyšším než 100 mm Hg, je intravenózní podávání nitroprusidu sodného v dávce 0,1 – 5 µg/kg za minutu. Jeho podávání vyžaduje kontinuální monitorování jeho hemodynamických parametrů.

Morfinové preparáty mají kromě anxiolytického a analgetického účinku, který je v případě neurogenního plicního edému rovněž žádoucí, také venodilatační efekt, který snižuje preload. Kromě toho snižuje stupeň dušnosti na podkladě odstranění stresu, útlumu vylučování katecholaminů, odstranění tachykardie a komorového afterloadu.

ACE inhibitory mají význam zejména u pacientů s konkomitantní hypertenzí nebo hypertenzní krizí. Zpočátku se podávají spíše nižší dávky, následované vyššími udržovacími dávkami. U izolovaného neurogenního plicního edému nemají zásadní efekt.

Intravenózní podávání rekombinantního **mozkového natriuretického faktoru** (BNF) je nová efektivní léčebná modalita, která působí poměrně efektivní vasodilatací a snižuje tak preload. Iniciální dávka je 2 µg/kg, následovaná kontinuální infuzí 0,01 µg/kg za minutu.

Při edému mozku a zvýšeném intrakraniálním tlaku aplikujeme příslušnou léčbu, která však ovlivňuje základní onemocnění a nikoli neurogenní plicní edém.

7. DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA NEUROGENNÍHO PLICNÍHO EDÉMU

Diferenciální diagnostika plicního edému spočívá zejména v i) nalezení nebo vyloučení kardiální příčiny a ii) rozlišení mezi edémem s převahou hydrostatického a permeabilního mechanismu vzniku. Odlišení nemusí být vždy jednoduché, neboť jednotlivé formy se mohou překrývat. Například primárně hydrostatický mechanismus u kardiálního plicního edému může v případě náhlého nárůstu kapilárního hydrostatického tlaku způsobit tak rozsáhlou extravazaci intravaskulární tekutiny, že může připomínat permeabilní mechanismus vzniku. Základní diferenciálně diagnostická rozvaha je vedena na podkladě anamnézy, fyzikálního vyšetření a laboratorních hodnot.

U nekardiálních edémů není obvykle v anamnéze žádná srdeční příhoda ani chronické srdeční onemocnění. U kardiálních edémů nacházíme při fyzikálním vyšetření studená cyanotická akra, zrychlený tep, kardiomegalii, distenzi krčních žil a vlhké chropy na plicích. Pacient s nekardiogenním edémem má obvykle teplá akra bez zásadních poruch tepové frekvence, bez distenze krčních žil a suché chropy na plicích.

Z pomocných vyšetření nacházíme u kardiálních plicních edémů známky ischemie na EKG, zvýšené kardiální enzymy a perihilární distribuci vaskulární kongesce na RTG hrudníku. Plicní kapilární tlak obvykle převyšuje 18 mm Hg a poměr množství proteinů v edematózní tekutině k množství proteinů v krevní plazmě nepřevyšuje 0,5. Naproti tomu u nekardiálních plicních edémů jsou EKG a kardiální enzymy normální, RTG hrudníku vykazuje vesměs periferní distribuci edematózní tekutiny, plicní kapilární tlak je obvykle nižší než 18 mm Hg a poměr množství proteinů v edematózní tekutině k množství proteinů v krevní plazmě je vyšší než 0,7.

RTG nálezy se obvykle objeví relativně později, průměrně okolo 12 hodin po začátku kardiopulmonálních symptomů. V těžkých případech je na podkladě RTG vyšetření obtížné odlišit, zda se jedná o kardiogenní či nekardiogenní plicní edém. Studie však dokazují, že je možné v iniciálních fázích mezi těmito dvěma typy plicního edému najít odlišnosti, pokud se při hodnocení RTG snímku zaměříme na určité specifické rysy; pak je možné kardiogenní od nekardiogenního plicního edému odlišit s přesností na 91 % (Kithreotis, 2000; Milne et al., 1985; Aberle et al., 1988). Důležitá kritéria zahrnují:

1. U nekardiogenního plicního edému je místem iniciální akumulace tekutiny plicní intersticiium, včetně peribronchiální oblasti a septálních linií. Poměrně rychle se však plicní edém mění v intraalveolární, kdy jsou alveolární prostory zcela vyplněny na proteiny bohatou tekutinou. Naproti tomu u kardiálního plicního edému dochází k zaplnění nitra alveolů tekutinou až v okamžiku, kdy již jsou překročeny reabsorpční kapacity intersticia.

2. Kerleyho linie jsou typické pro kardiogenní plicní edém, zatímco u nekardiogenního plicního edému, vznikajícího na principu zvýšené permeability alveolo-kapilární membrány tyto linie přítomny nejsou. Lze je tedy považovat za znak typický pro kardiální plicní edém.
3. Periferní distribuce edematózní tekutiny v plicích a pleurální efuze jsou typické pro nekardiální plicní edém, zatímco u kardiálního se v iničiálních stadiích nevy-skytují.
4. U nekardiálního plicního edému jsou normální velikost a morfologie srdečního stínu a stíny velkých cév. Naproti tomu u kardiálního plicního edému jsou srdeční stín v oblasti levého srdce a šířka cév vycházejících ze srdce zvětšeny.

Neurogenní plicní edém může imitovat celá řada stavů, nejpravděpodobnější jsou však následující:

ALI a ARDS

Od neurogenního plicního edému je třeba odlišovat akutní plicní selhání (ALI – acute lung injury) a syndrom akutní dechové tísně (ARDS – adult respiratory distress syndrome). Tyto syndromy totiž vznikají na zánětlivém podkladě, vedoucímu k difúznímu poškození alveolů (DAD – diffuse alveolar damage) a současně bez akutní vazby na poškození centrálního nervového systému. Mortalita ARDS a ALI je vyšší než mortalita neurogenního plicního edému.

Aspirační pneumonie

Klinický obraz aspirační pneumonie je podobný neurogennímu plicnímu edému (pacient v těžkém stavu, dechová nedostatečnost, restriktivní porucha dýchání, tachykardie, tachypnoe). Aspirační pneumonie však nevzniká tak dramaticky rychle jako neurogenní plicní edém a je u ní přítomna horečka. Je třeba dát pozor na stavy, kdy je horečka způsobena poškozením vlastního centrálního nervového systému (zejména oblasti ventrálního hypothalamu) – to však není na vrub neurogenního plicního edému, tento nemá zánětlivou složku. Odeznění příznaků aspirační pneumonie navíc trvá déle, okolo 2 týdnů.

Kardiální plicní edém

Klinický obraz kardiálního plicního edému nejrůznější etiologie (levostranné srdeční selhání...) může rovněž imitovat neurogenní plicní edém. Zde jsou nejdůležitější anamnestické údaje a neurologické a kardiologické vyšetření.

8. KAZUISTIKY

Kazuistika č. 1. – fatální neurogenní plicní edém u pacienta se subarachnoidálním krvácením (Ahrens et al., 2008)

Dříve zcela zdravý 19letý pacient byl nalezen v koupelně v kómatu. Při příjezdu rychlé záchranné služby pacient vykazoval krevní tlak 160/90 mm Hg, tepovou frekvenci 108 tepů za minutu a saturaci hemoglobinu kyslíkem 83 %. Glasgow coma scale (viz tab. 5.1.) bylo 4. Zornice byly mydriatické bez reakce na světlo. V důsledku těžké respirační dysfunkce byl pacient sledován 0,5 mg fentanylu a 20 mg etomidátu a na místě intubován. V průběhu intubace pacient projevoval kašlací a polykací reflexy. V průběhu transportu pacient dostal dalších 0,5 mg fentanylu a 15 mg midazolamu. V okamžiku příjezdu do nemocnice bylo pacientovo Glasgow coma scale 3, jeho krevní tlak byl 150/80, tepová frekvence 124 tepů za minutu a saturace krve kyslíkem 89 %. Respirační parametry byly: dechový objem 750 ml, dechová frekvence 12 dechů za minutu, koncentrace vdechovaného kyslíku 100 % a pozitivní end expirační tlak (viz kap. 7) 5 cm H₂O. Na pohotovosti byl pacientovi zaveden arteriální a centrální žilní katétr. RTG hrudníku ukázalo oboustranné difuzní plicní infiltráty. Diferenciálně diagnostická rozvaha směřovala k diagnóze těžkého poranění centrálního nervového systému se sekundární aspirací obsahu žaludku. Hladina kreatinkinázy byla 1,058 U/l (normálně nižší než 170/l). Vyšetření CT ukázalo povšechný mozkový edém, masivní subarachnoidální krvácení a krev ve všech mozkových komorách. Vyšetření pomocí CT angiografie ukázalo aneurysma pravé arteria carotis interna. Klinicky pacient vykazoval stupeň 5 podle Hunta a Hesse. V závislosti na morfologických nálezech, získaných pomocí zobrazovacích metod a klinického obrazu bylo neurochirurgické řešení aneurysmatu odloženo. Do postranních komor byly zavedeny dva drény pro monitorování intracerebrálního tlaku a v rámci podpůrné terapie. Za účelem potvrzení diagnózy aspirační pneumonie a odstranění maxima aspirovaného obsahu byla provedena bronchoskopie. V jejím průběhu nebyly nalezeny žádné součásti aspirovaného žaludečního obsahu. Byla učiněna diagnóza neurogenního plicního edému. Respirační parametry byly dechový objem 680 ml, dechová frekvence 15 dechů za minutu, koncentrace inspirovaného kyslíku 100 % a PEEP 8 cm H₂O. Analýza krevních plynů z arteriální krve ukázala pH=7,23, parciální tlak oxidu uhličitého 51 mm Hg, parciální tlak kyslíku 137 mm Hg, base excess -5,6, koncentraci HCO₃⁻ iontů 22,5 mmol/l a saturaci krve kyslíkem 94 %. Pacient byl hospitalizován na jednotce intenzivní péče a dostával farmakologickou podporu, zahrnující intravenózní podávání tekutin, bikarbonátu sodného, manitolu, tří jednotek čerstvé zmražené krevní plazmy a noradrenalin, za účelem zvýšení systémového krevního tlaku a zajištění mozkové perfuze. V průběhu následujících 12 hodin neustále rostl intrakraniální tlak až na úroveň 36 mm Hg a ani vysoké dávky noradrenalinu nebyly schopny udržet mozkový perfuzní tlak vyšší než 50 mm Hg. Navzdory všem snahám zabránit rozvratu vnitřního prostředí byly stále přítomny tyto plazmatické hladiny iontů: sodné ionty 154 mmol/l, draselné ionty 2,7 mmol/l, chloridové ionty 131 mmol/l nebo kalciové ionty 1,32 mmol/l. V průběhu druhého dne hospitalizace se zhoršila pacientova

saturace hemoglobinu kyslíkem při pH =7,15, parciálním tlaku oxidu uhličitého 72 mm Hg, parciálním tlaku kyslíku 96 mm Hg, base excess -4,6, koncentraci hydrogenuhličitanových iontů 24 mmol/l a saturaci krve kyslíkem 93 %. Venti-lační hodnoty byly následující: dechový objem 700 ml, dechová frekvence 18 dechů za minutu, koncentrace inspirovaného kyslíku 85 % a PEEP 9 cm H₂O. Navzdory hyperventilaci, opakovanému podání manitolu a barbituráty-indukovanému kómatu se stav pacienta zhoršoval. Mozková smrt a následné multiorgánové selhání bylo diagnostikováno 36 hodin po přijetí.

Uvedený příklad znázorňuje, jak rychle a výrazně může neurogenní plicní edém zhoršit celkový zdravotní stav pacienta. Kromě těžkého primárního stavu navíc neurogenní plicní edém výrazně omezuje, až znemožňuje léčebné možnosti primár-ního stavu. V daném případě neurogenní plicní edém znemožnil jinak adekvátní neurochirurgickou léčbu a odkázal pacienta i lékaře na vyčkávací terapii, která byla pro pacienta letální. Diferenciálně diagnosticky je významná změna stavu s aspi-rační pneumonií, v jejímž důsledku se opozdila indikace léčby neurogenního plic-ního edému. Pokud by nebyla provedena bronchoskopie, mohla být diagnóza neuro-genního plicního edému u pacienta v tak těžkém stavu stanovena až post-mortem. V případě těžkého subarachnoidálního krvácení dochází často i k sekundárnímu poškození srdečního svalu, které mohlo dále zhoršit zdravotní stav pacienta; toto poškození však nebylo v tomto případě cíleně vyšetřováno a nelze se k němu tedy zodpovědně vyjádřit. Aplikaci PEEP lze hodnotit jako korektní. I když zásadním způsobem neovlivnila intrakraniální tlak a mozkovou perfuzi, jistě alespoň dočasně zlepšila dechové parametry pacienta a zabránila rozvoji atelektázy.

Kazuistika č.2. – fatální neurogenní plicní edém u pacienta s roztroušenou sklerózou (Bramow et al., 2008)

Dříve zcela zdravý 19letý pacient se dostavil na neurologickou ambulanci s 3 měsíce trvajících paresteziemi obou chodidel. Vyšetření mozkomíšního moku ukázalo lehce zvýšenou hladinu leukocytů v počtu 11/μl, avšak zcela normální hladinu glukózy a proteinů. O šest let později, ve věku 25 let, začalo onemocnění progredovat v podobě zvyšujících se obtíží při běhu a rozvíjejících se parestezií obou dolních končetin. Neurologické vyšetření ukázalo generalizovanou hyperreflexii s obou-stranným klonem v kotníku. Kurtzkeho skóre (EDSS – expanded disability status scale) bylo 2,0. Počet leukocytů v mozkomíšním moku byl 13/μl, přičemž 98 % tvořily mononukleáry. Index IgG byl zvýšen. Hladiny glukózy a proteinů v mozko-míšním moku byly normální, titry borrelie a treponema pallidum byly nulové. T-2 vážené obrazy mozkové MRI prokázaly přítomnost izolovaných lézí v bílé hmotě v blízkosti pravé postranní mozkové komory. Nebyly přítomny žádné infraten-toriální léze. Pátevní mícha byla na protonově-denzní a turbo spinové-echo MRI normální. Neurofyzilogické vyšetření prokázalo prolongované centrální převodní časy motorických a somatosensorických evokovaných potenciálů. Hematologické a biochemické krevní vyšetření byly normální.

Ve věku 27 let si pacient začal stěžovat na rozostřené vidění pravého oka v průběhu cvičení. Oftalmologické vyšetření bylo normální. Jeho diskriminační čítí bylo redu-

kováno a v obou dolních končetinách se objevila ztráta schopnosti vnímat vibrace. Ve věku 29 let se rozvinula postupně progredující ataxie chůze a porušená koordinace dolních končetin. Neurologické vyšetření odhalilo mírnou spastickou parézu pravé dolní končetiny s plantární extenzní odpovědí, střední ataxii chůze a mírnou ataxii dolní pravé končetiny. EDSS bylo 4.0. Nedostával žádnou medikaci. V anamnéze nebyla přítomna denní spavost nebo záchvaty.

Ve věku 30 let, tedy 11 let po počátku příznaků, uleh pacient zcela rutinně na lůžko, v návaznosti na zcela normální den. Uprostřed noci pacientovu ženu vzbudily atypické dechové fenomény, přičemž při bližším prozkoumání zjistila, že je pacient v kómatu. V průběhu 10 minut dorazila rychlá záchranná služba, jejíž pracovníci u pacienta konstatovali srdeční zástavu. Pokusy o oživení pacienta nebyly úspěšné.

Pitevní nález ukázal těžký plicní edém a stázu krve ve slezině. Nebyly nalezeny žádné známky cizích těles v dýchacích cestách, zánětu plic, sarkoidózy nebo kardiomyopatie. Všechny ostatní vnitřní orgány byly bez patologického nálezu. Rozsáhlé toxikologické vyšetření krve, likvoru, moči, jater a svalové tkáně bylo negativní. Při histologickém vyšetření mozkové tkáně bylo nalezeno celkem 18 drobných lézí v bílé hmotě, sestávajících z denzních perivaskulárních lymfocytárních infiltrátů, obklopených lemlem demyelinizovaných axonů. U dalších 18 nalezených perivaskulárních lymfocytárních infiltrátů nebyly nalezeny žádné známky demyelinizace. Perivaskulární lymfocytární infiltráty sestávaly z přibližně stejného počtu T-lymfocytů a B-lymfocytů, s mírným zastoupením plazmatických buněk a makrofágů. Kromě toho byly nalezeny 4 neaktivní léze v blízkosti postranních komor. Ojedinelé léze byly nalezeny v šedé hmotě v různých částech mozku. Důležitým zjištěním byla přítomnost 3 lézí v blízkosti nucleus tractus solitarii, přítomnost mikrogliálních shluků v oblasti retikulární formace mozkového kmene a pěti lézí v oblasti nucleus dorsalis nervi vagi.

Pacientova forma roztroušené sklerózy nejvíce připomínala transientní progredující formu. Perivaskulární lymfocytární infiltráty v tomto případě odrážely nejpravděpodobněji akutní těžkou exacerbaci roztroušené sklerózy, označovanou v literatuře jako maligní exacerbaci roztroušené sklerózy (Bramow et al., 2008). Ostatní diagnózy typu akutní diseminované encephalomyelitidy nebo lymfomu se podařilo vyloučit. Rovněž se nejednalo o vaskulární změny typu velkobuněčného granulomu nebo trombotického postižení. Důležitým zjištěním je skutečnost, že s výjimkou popsaného postižení centrálního nervového systému nebyly nalezeny žádné známky postižení ostatních orgánů, které by napovídaly na původ plicního edému, což svědčí pro diagnózu edému neurogenního. Tomu napovídá i poměrně výrazný výskyt lézí v oblasti mozkového kmene, zejména prodloužené míchy, kde se nachází spouštěcí zóny neurogenního plicního edému (viz kap. 5). Ve světě byl popsán podobný případ neurogenního plicního edému, který charakterizovalo podobné rozložení lézí v mozkovém kmene (Juba, 1939). V případě remitující-relabující formy roztroušené sklerózy byl neurogenní plicní edém asociován s plicní hypertenzí a přítomností lézí v blízkosti nucleus tractus solitarii (Simon et al., 1991). V etiopatogenezi tohoto stavu hraje roli ztráta inhibiční funkce reti-

kulární formace mozkového kmene a některých jeho jader, která vede k hyperaktivaci center, spouštěcích nekontrolovatelnou autonomní odpověď, vedoucí k rozvoji neurogenního plicního edému. Vzhledem k velmi ojedinělému výskytu tohoto stavu u pacientů s roztroušenou sklerózou je nutno se domnívat, že lokalizace příslušné léze je vysoce specifická. Dalším mechanismem, který je nutno uvážit v diferenciální diagnostice a který mohl vést ke smrti tohoto pacienta je výskyt fatální centrální apnoické pauzy, která vznikla na podkladě příslušných lézí a vedla k ischemii jader v mozkovém kmeni, jehož ostatní součásti takto po ztrátě inhibičního vlivu spustily kaskádu, vedoucí k fatálnímu neurogennímu plicnímu edému. Tato možnost je pravděpodobná, neboť syndrom centrální spánkové apnoe se vyskytuje až u 8 % pacientů s roztroušenou sklerózou (Ferinistrambi et al., 1994).

Kazuistika č. 3 – neurogenní plicní edém u dítěte se zlomeninou báze lebni (Bjelakovic et al., 2006)

Osmiletý chlapec byl přijat do nemocnice v důsledku poranění hlavy a ztráty vědomí. Hodinu před přijetím na něho spadlo břevno fotbalové branky, které bylo příčinou jeho stavu. Při přijetí byl pacient komatózní, cyanotický, s miotickými zorničkami bez reakce na osvit, afebrilní, hypotenzivní s krevním tlakem 90/60, tepovou frekvencí 100/minutu, Cheyne-Stokesovým dýcháním a slabým a nepravidelným pulzem. Fyzikální vyšetření odhalilo rozsáhlý levostranný otok frontoparietální oblasti a výraznou ipsilaterální otoliquorrhoeu. Auskultace plic odhalila vlhké chropy při bazích a ve střední části obou plic. Poslech srdce odhalil tlumené vedlejší srdeční fenomény. Na RTG hrudníku byl patrný srdeční stín normálních rozměrů a bilaterální, vločkovité alveolární infiltráty charakteru motýlovité distribuce. Nebyly patrné žádné známky poranění hrudníku. Aspirace z dýchacích cest ukázala plynovitou narůžovělou tekutinu, typickou pro plicní edém. Hodinu po hospitalizaci bylo provedeno CT, které ukázalo tříštivou zlomeninu frontoparietální a occipitálních částí levé pyramidové oblasti. Rovněž byl patrný generalizovaný edém mozku, mozkového kmene a krvácení z čichových sklípků. Počáteční analýza krevních plynů ukázala smíšenou respirační a metabolickou acidózu, pH=7,20, parciální tlak oxidu uhličitého 55 mm Hg, parciální tlak kyslíku 62,7 mm Hg, base excess -6,5, ionty hydrogenkarbonátu 15,2 mmol/l a saturaci krve kyslíkem 61 %. V důsledku zhoršujících se respiračních parametrů byl pacient intubován a hyperventilován 50 % kyslíkem. Pacientovi byl intravenózně aplikován dexametazon v dávce 4 mg každých 6 hodin, furosemid 1 mg/kg a osmoterapie 20 % manitolem v dávce 1,5 g/kg. Již při přijetí byl zaveden žilní katétr a prováděny pravidelné krevní odběry. V době 6 hodin po přijetí bylo provedeno EKG vyšetření, které ukázalo difúzní oploštělé T vlny a prodloužený interval QT.

Následující den se stav pacienta významně nezlepšil. Byl komatózní, afebrilní, mechanicky ventilovaný, hypotenzivní s tlakem 90/50 a tepovou frekvencí 100/min. Analýza krevních plynů ukázala pH=7,31, parciální tlak oxidu uhličitého 30,6 mm Hg, parciální tlak kyslíku 82 mm Hg, base excess -2,5, ionty hydrogenkarbonátu 18,2 mmol/l a saturaci hemoglobinu kyslíkem 83 %. EKG ukázalo oploštělou T vlnu ve všech svodech, patologické Q ve svodech D1 a aVL a patologické R ve svodech

V2-V4. V důsledku EKG změn byla rovněž monitorována hladina CK-MB, která byla maximálně zvýšena 33 hodin po hospitalizaci na hodnotu 162 jednotek/litr.

Třetí den se stav navzdory intenzivní terapii neupravil. Vyšetření EKG ukázalo patologické Q vlny ve svodech D1 a aVL, patologické QS ve svodech V2-V4 a difuzně oploštělé T vlny ve všech svodech. Hladina CK-MB byla 88 jednotek/l. Tento stav trval 2 týdny bez zásadních změn. V průběhu celé hospitalizace byl pacient vysoce komatózní při Glasgow coma scale (viz tab. 5.1.) o hodnotě 7. Vykazoval rozličné poruchy acidobazické rovnováhy, koagulačních faktorů, vodního a elektrolytového hospodářství, které byly průběžně sledovány a normalizovány.

Patnáctý den hospitalizace se začalo pacientovi vracet vědomí a ostatní parametry se začaly normalizovat, včetně krevního tlaku o hodnotě 125/75 mm Hg. Šestnáctý den hospitalizace se stav vědomí pacienta vylepšil natolik, že mohl být extubován. Dvacátý den hospitalizace byl propuštěn z jednotky intenzivní péče na oddělení rehabilitace.

Nález vysokých hladin CK-MB isoenzymu je pro rozsáhlé poškození centrálního nervového systému poměrně typický a souvisí s reakcí srdečního svalu na rozsáhlé hemodynamické změny, indukované poškozením centrálního nervového systému. Nicméně změny v EKG obraze nejsou pro neurogení plicní edém typické a v tomto případě byly pravděpodobně vyvolány celkově rozsáhlými hemodynamickými změnami, působícími na relativně nezralý srdeční sval, jehož dočasné poškození způsobily. U tohoto pacienta naznačovaly EKG změny transmurální anterolaterální ischemické změny, které naštěstí nebyly provázeny zásadními následky. Vzhledem k tomu, že u pacienta nebyla v anamnéze zjištěna srdeční vada, musí být tyto změny připsány na vrub poranění mozku.

Kazuistika č. 4 – náhlé úmrtí na neurogení plicní edém v důsledku mozkového nádoru (Bunai et al., 2008)

Dříve zdravý 9letý chlapec navštívil praktického lékaře kvůli 2 dny trvající bolesti hlavy a zvracení. Lékař zjistil zvýšenou teplotu na 37°, diagnostikoval chřipkové onemocnění a pacienta odeslal domů s antipyretickou a antibiotickou medikací. Stav se nezlepšoval a dva dny poté chlapec zvracel v průběhu oběda a tak byla domácí ošetřovatelkou zavolána jeho matka. V okamžiku jejího příchodu chlapec hovořil nesouvisle a byl výrazně spavý. Matka jej uložila ke spánku. Po osmi hodinách jej však našla mrtvého. Okamžitě zavolala rychlou záchrannou službu a do jejího příjezdu poskytovala chlapci první pomoc. Všechny pokusy o chlapcovo oživení však selhaly.

Pitva prokázala přítomnost těžkého edému a krvácení v obou plicích. Dýchací cesty byly vyplněny růžovou zpěněnou tekutinou bez přítomnosti cizích těles. Srdce a velké cévy nevykazovaly žádné abnormality. Pravá mozková hemisféra byla větší než levá. Na příčném řezu pravou hemisférou byl přítomen hematoma o rozsahu 3,2 x 3,7 x 5,2 cm uvnitř pravé postranní mozkové komory. Uvnitř hematomu byl nalezen

kulovitý útvar o průměru 0,5 cm, vycházející z plexus choroideus ventriculi lateralis cerebri. Mozková tkáň při okraji tumoru vykazovala nekrotické změny. Laterální komory byly uloženy asymetricky, přičemž dorsální partie pravé postranní komory byla zvětšena v důsledku hydrocefalu z obstrukce toku likvoru hematodem. Likvor v postranních komorách byl sangvinolentní. Histologická diagnóza prokázala hemangiopericytom grade II. Histologická diagnostika plicní tkáně prokázala bilaterální intraalveolární plicní edém s výraznou hemoragickou složkou a vysokým obsahem proteinů.

Uvedená kazuistika naznačuje stále podceňovanou zákeřnost neurogenního plicního edému, který je schopen pacienta během několika hodin usmrtit ze subjektivně plného zdraví. Případy náhlého úmrtí v důsledku intrakraniálního tumoru představují sice pouze 0,11 – 0,24 % všech případů intrakraniálních tumorů, vzhledem k rostoucímu počtu případů neurogenního plicního edému jako příčiny těchto úmrtí můžeme vyslovit důvodné podezření, že se neurogenní plicní edém podílí na tomto číslu vysokým procentem. Nebezpečí hemangiopericytomu tkví v poměrně vysokém procentu spontánních krvácení do tumoru, které se pohybuje okolo 23 % všech těchto tumorů. V tomto případě vedl k rychlému zhoršení neurogenního plicního edému pravděpodobně tlak nádorem vyvolaného hematomu a/nebo zvýšeného tlaku likvoru v komorovém systému mozku na centra neurogenního plicního edému (viz kap. 5). U tohoto pacienta nebyly při pitvě pozorovány známky mozkové herniace, proto se můžeme domnívat, že největší zvýšení intrakraniálního tlaku nastalo v místech třetí a čtvrté mozkové komory, ve kterých jsou uložena centra neurogenního plicního edému a nebylo tedy vyjádřeno rovnoměrně ve všech částech mozku. Předchozí zvracení a bolesti hlavy pacienta byly pravděpodobně způsobeny postupně narůstajícím intrakraniálním tlakem, avšak neurogenní plicní edém pravděpodobně nastal až v okamžiku několik hodin před smrtí, kdy začal být pacient spavý v důsledku vznikající hypoxie, podmíněné hromaděním tekutiny v plicích v kombinaci s rostoucím intrakraniálním tlakem.

Kazuistika č. 5 – neurogenní plicní edém způsobený selháním ventrikuloperitoneálního shuntu (Hofstetter et al., 2007)

Devětadvacetiletá pacientka s anamnézou vrozené myelomeningokély, hydrocefalu a Arnord-Chiariho malformace s paraplegií distálně od úrovně L3, léčené nejprve ventrikuloatriálním a následně ventrikuloperitoneálním shuntem byla přijata se symptomy dušnosti a bolesti hlavy a krku. V anamnéze nebyla žádná kardiovaskulární porucha. Hrudní RTG vyšetření ukázalo bilaterální plicní edém bez známek pneumonie nebo embolizace. Vyšetření CT prokázalo zvětšení komorového systému mozku. Neurochirurgické obnovení průchodnosti ventrikuloperitoneálního shuntu odstranilo u pacientky bolesti hlavy a krku i plicní obtíže. Pacientka byla po 10 dnech propuštěna do domácího ošetřování. Čtyři měsíce po revizi V-P shuntu byla pacientka znovu přijata s dušností, bolestí hlavy a krku a parestezií obou rukou. Byla somnolentní, avšak adekvátně reagovala na bolestivé stimuly. Fyzikální vyšetření odhalilo vlhké chropy a vrzoty na plicích. RTG vyšetření hrudníku odhalilo masivní bilaterální plicní edém. Byly přítomny klinické i laboratorní známky

kardiorespiračního selhávání. Pacientka byla intubována a mechanicky ventilována 100 % kyslíkem s pozitivním end expiračním tlakem 14 cm H₂O. Analýza arteriální krve odhalila výraznou respirační alkalózu: pH=7,08 a parciální tlak oxidu uhličitého 63 mm Hg. Koncentrace proteinů v plicní tekutině byla 47,3 g/l, zatímco v séru 48 g/l, což naznačovalo, že tekutina v plicích odpovídá obsahem proteinů krevní plazmě. Echokardiografie prokázala difuzní hypokinezu bez dilatace levé komory. Ejekční frakce byla redukována na 35 %. Anamnesticky byla vyloučena aspirace, intoxikace a trauma. Kontrolní CT vyšetření hlavy ukázalo asymetrickou dilataci mozkových komor s dislokací komorového katétru. Cestou Rickhamova rezervoáru nebylo možno aspirovat likvor. V průběhu druhé revize proximální části V-P shuntu byla naměřena intrakraniální hypertenze o hodnotě 35 cm H₂O. S pomocí neuroendoskopu bylo prokázáno, že v komoře byla uložena pouze špička shuntu, zatímco postranní otvory shuntu byly umístěny v mozkové tkáni a tudíž neprůchodné. S pomocí endoskopu byl do příslušného místa zaveden nový shunt. Mikrobiologické vyšetření likvoru bylo negativní. V návaznosti na druhou revizi V-P shuntu se pacientka rychle zotavovala. Po týdnu mohla být bez obtíží odpojena od mechanické ventilace. Pacientka byla následně propuštěna do domácího ošetřování. Kontrolní CT vyšetření po dvou měsících ukázalo výrazné zlepšení hydrocefalu. Ve sledovaném období, trvajícím 2 roky od druhé operace, nebyly pozorovány známky recidivy neurogenního plicního edému nebo porušení funkce V-P shuntu.

U této pacientky hrála nejvýznamnější etiopatogenetickou úlohu přítomnost Arnold-Chiariho malformace, která vyústila v přímou kompresi prodloužené míchy proti tvrdému okolí v okamžiku dysfunkce ventrikuloperitoneálního shuntu, což způsobilo hyperaktivaci center neurogenního plicního edému i drah do těchto míst vedoucích (viz kap. 5). Tato kazuistika rovněž naznačuje, že pro rozvoj neurogenního plicního edému není nezbytně nutné strukturální postižení, typické pro trauma, tumor nebo krvácení. Opakovaný výskyt neurogenního plicního edému u téže pacientky při stejné příčině je rovněž zajímavý a ukazuje, že se nejednalo o koincidenci dvou nezávislých jevů, nýbrž přesně definovanou etiopatogenetickou osu. Zajímavé je, že v tomto případě byl rozsah neurogenního plicního edému přímo úměrný zvýšení intrakraniálního tlaku.

Kazuistika č. 6 – neurogenní plicní edém v důsledku obstrukce arteria basilaris (Marshall a Nyquist, 2008)

Dříve zdravá 41letá žena se dostavila do nemocnice s anamnézou jeden den trvající těžké bolesti v týlní oblasti, intermitentní dysartrií, dvojitým viděním a progresivní slabostí všech čtyř končetin. EKG a echokardiografie při přijetí byly bez patologického nálezu. Již od přijetí se její stav začal rychle zhoršovat, až dospěla do stadia soporu. Zornice měla bilaterálně o průměru 1 mm, bez přímé i nepřímé fotoreakce. Neuroophthalmologické vyšetření ukázalo deviaci očních pohybů, avšak nikoli nystagmus. V důsledku zhoršujících se dechových funkcí a saturace klesající k 80 %, které byly prisuzovány její poruše vědomí, byla intubována a připojena na mechanickou ventilaci. Vyšetření CT ukázalo přítomnost krve v subarachnoidálním prostoru mozku, CT angiografie ukázala kompletní obstrukci *arteria basilaris*,

kteřá byla potvrzena digitální subtrakční angiografií. V důsledku tohoto nálezů bylo intraarteriálně aplikováno 100.000 jednotek urokinázy, která vedla k plně rekanalizaci. Po tomto výkonu se však stav pacientky výrazně zhoršil. Objevil se u ní fulminantní plicní edém natolik masivní, že bylo z jejích dýchacích cest odsáto více než 2 litry tekutiny. Pacientka byla připojena na 100 % kyslík a ventilována při PEEP 20 cm H₂O. Její saturace hemoglobinu kyslíkem však stále klesala. Vyšetření krevních plynů ukázalo respirační acidózu o pH=7,21, parciální tlak oxidu uhličitého 56 mm Hg, parciální tlak kyslíku 40 mm Hg a saturaci 58 %. RTG hrudníku ukázalo bilaterální difuzní plicní edém s bilaterálními pleurálními efuzemi. V důsledku jejího špatného celkového stavu nebylo možné provést echokardiografii. Byl zaveden Schwannův-Ganzův katétr, který odhalil kardiální index 1,8. Nastavení PEEP bylo testováno na více různých úrovních bez zásadní změny dechových parametrů pacientky. Navzdory poměrně agresivní diuretické terapii bolusovými dávkami Furosemidu 40, 80 a 120 mg i.v. v intervalech 2 hodin, úsilí o změnu nastavení ventilačních parametrů, podávání intravenózních nitrátů a noradrenalinu se stav pacientky stále zhoršoval. V důsledku zhoršujícího se stavu respiračních funkcí bylo rozhodnuto uložit pacientku do polohy na břicho. V průběhu následujících 30 minut se stav pacientky zásadně vylepšil. Po 45 minutách od změny polohy se vylepšily i hodnoty krevních plynů na pH=7,35, parciální tlak oxidu uhličitého 36 mm Hg, parciální tlak kyslíku 247 mm Hg a saturace hemoglobinu kyslíkem 90 %. V průběhu následujících 6 hodin byl vysazen noradrenalin. V průběhu následujících 24 hodin bylo možno konstatovat, že nejhorší fázi plicního edému má pacientka za sebou. Následně byla uložena zpět do polohy na zádech a PEEP bylo redukováno na 10 cm H₂O. V období od změny polohy na břicho byla diuretika použita pouze jednou v dávce 40 mg Furosemidu. Po 72 hodinách se její RTG hrudníku normalizoval a pacientka byla úspěšně extubována. Echokardiografické vyšetření, provedené 36 hodin po trombolytické terapii ukázalo známky generalizované hypokinézy a redukce ejekční frakce, odpovídající poškození myokardu v důsledku hemodynamických změn. Při propuštění vykazovala pacientka ataxii chůze, mírnou dysartrii a perzistující levostrannou intranukleární ophtalmoplegii. Magnetická resonance odhalila infarktová ložiska v oblasti *pons Varoli*, mozečku a oblasti kmene zásobené *arteria cerebri posterior*.

U této pacientky byl neurogenní plicní edém způsoben poměrně rapidní revaskularizační terapií kmenových struktur, která pravděpodobně vedla k prudkým změnám neuropilu v příslušných kmenových strukturách a jejich hyperaktivaci. Tato kazuistika rovněž ukazuje velmi výrazný terapeutický potenciál správného polohování, které v tomto případě téměř jistě zachránilo pacientce život, i při dostupnosti nejmodernějšího anesteziologicko-resuscitačního vybavení. Jak je uvedeno v kap. 7, mechanismus terapeutického úspěchu polohy na břicho není zcela jasný, předpokládá se však redistribuce výměny plynů do oblastí méně postižených plicním edémem a zároveň zmírnění poškození plic způsobené umělou plicní ventilací. V budoucnu snad experimentální a klinické studie lépe vysvětlí, proč dochází k tak výraznému zlepšení stavu pacienta právě při poloze na břicho.

Kazuistika č. 7 – neurogení plicní edém jako komplikace stereotaktické biopsie (Roth et al., 2007)

U 79letého pacienta se náhle projevila pravostranná hemiparéza. Pacient před 2 lety prodělal náhradu aortální chlopně. Rovněž prodělal hypertenzní krizi a paroxysmální fibrilaci a v rámci antiagregační léčby proto užíval aspirin. Fyzikální vyšetření ukázalo Karnofského skóre 60 a pravostrannou hemiparézu. Mozkové CT odhalilo hluboko uloženou levostrannou lézi parietálně s malým okolním projasněním. Pacient prodělal stereotaktickou biopsii. Oblast vstupu a trajektorie biopsie byly předoperačně naplánovány pomocí neuronavigace. V lokální anestezii 200 mg lidocainu a 100 mg bupivacainu s hlavou fixovanou ve stereotaktickém rámci byl vytvořen otvor v lebce o průměru 3,2 mm, kaogulováno krvácení z dura mater a bioptická jehla byla zavedena po příslušné trajektorii. Byly získány dva vzorky tkáně. Po vyhodnocení vzorků peroperačním bioptickým zpracováním byly odebrány další dva vzorky a jehla odstraněna. Rána byla uzavřena. Pacient se z výkonu zotavoval dobře. Okamžité pooperační CT odhalilo krev a plyn uvnitř léze. Pacient byl propuštěn po 36 hodinách, avšak uzávěr rány byl omylem odstraněn příliš brzy. Po osmi hodinách byl pacient přijat na pohotovostní oddělení s respirační poruchou a hypoxií. Nebyly přítomny žádné známky neurologického poškození. Místo biopsie bylo otevřeno, avšak nebyly patrné žádné známky úniku likvoru. Únik jakékoli tekutiny z oblasti rány rovněž potvrdili doprovázející rodinní příslušníci. RTG vyšetření hrudníku ukázalo bilaterální alveolární infiltráty. Nebyly nalezeny žádné změny v EKG nebo kardiálních enzymech. Mozkové CT odhalilo pneumocephalus. Nebyla přítomna žádná fraktura. V dráze bioptické jehly byl nalezen plyn. Chirurgická rána byla opět uzavřena a hermeticky překryta. Pacient byl přijat na jednotku intenzivní péče, kde byl mechanicky ventilován. Vyšetření vyloučila mikrobiální kultury v krvi, moči nebo likvoru. Echokardiografie neukázala žádné patologické změny. Pacient byl léčen empiricky diuretiky a antibiotiky a pomalu se zotavoval. Po 4 dnech ukázalo CT vyšetření spontánní resoluci pneumocephalu. Konečná patologická diagnóza zněla anaplastický astrocytom Grade III.

Kazuistika má význam pro uvědomění si, že ve skutečnosti neexistuje žádná rutinní a běžná procedura, u které nejsou komplikace. Patofyziologický mechanismus, vedoucí k neurogenímu plicnímu edému v tomto případě vznikl na podkladě netěsnosti uzávěru rány, insulflaci vzduchu do intrakrania a lokálnímu zvýšení tlaku v oblasti hlubokých parietálních struktur, které morfologicky souvisí s hypothalamem a jeho prostřednictvím i s centry pro kontrolu autonomního nervového systému. Zda se uplatňovalo i post-bioptické krvácení, které je udáváno jako komplikace až u 8 % pacientů podstupujících biopsii mozku, se můžeme pouze dohadovat. Vzhledem k medikaci aspirinem mohlo mít určitý vliv.

9. NEUROGENNÍ PLICNÍ EDÉM V EXPERIMENTU

Neurogenní plicní edém je navzdory své vysoké mortalitě a dosud ne zcela dokonale poznané patofyziologii a poměrně omezeným terapeutickým možnostem relativně málo experimentálně studovanou oblastí. Výzkum neurogenního plicního edému se ve světě omezuje nejčastěji na publikaci kazuistik z klinické praxe, retrospektivních studií, přehledových článků a pouze výjimečně na experimentální práce, kde je však problematika neurogenního plicního edému studována pouze okrajově nebo jako vedlejší fenomén. Vzhledem k tomu, že ve světě v této chvíli není vytvořena skupina vědců, která by tento problém cíleně studovala, může být příspěvek českých vědců a vytvoření experimentální skupiny pro studium etiopatogeneze neurogenního plicního edému na bázi spolupráce Ústavu experimentální medicíny AVČR, v.v.i. a Ústavu fyziologie AVČR, v.v.i., Centra buněčné terapie a tkáňových náhrad 2. LF UK a Centra pro výzkum srdce a cév, velmi přínosný.

Modely neurogenního plicního edému

Existuje několik experimentálních modelů neurogenního plicního edému. Jako modelová zvířata byla v minulosti využita - potkan, opice, ovce, koza, morče a kočka. Modelová zvířata jsou pro výzkum neurogenního plicního edému naprosto nezbytná, ostatní metody výzkumu typu tkáňových kultur mohou k tomuto tématu zatím přispět pouze velmi omezeně. Při aplikaci dat získaných ze studií využívajících modelová zvířata je vždy třeba určité opatrnosti a strážlivosti při interpretaci výsledků. Je důležité zdůraznit, že zvířata s bohatším plicním vaskulárním autonomním systémem, jako např. potkan a morče, jsou více náchylní k rozvoji neurogenního plicního edému než zástupci rodů s méně bohatým autonomním systémem plic, mezi které patří například pes (Malik, 1985). Rozvoj plicní vasokonstrikce v závislosti na intrakraniální hypertenzi byl pozorován u kozy, kočky a opice, její výrazné zvýšení však nebylo pozorováno u psů a ovce. Menší zvířata mají obecně vyšší tepovou frekvenci, proto se zde edém často rozvíjí rychleji než u větších zvířat nebo u člověka (Šedý et al., 2008b, 2009b). Dávky farmak jsou rovněž často rozdílné u experimentálních zvířat – často jsou i několikanásobně vyšší než při následné aplikaci v klinické praxi.

Fibrinový experimentální model plicního edému u potkanů je indukován vpravením fibrinu (fibrinogen+trombin) do *cisterna magna*. Fibrin zde pravděpodobně působí obturaci *foramen Magendi* a *foramina Luschkae* a jejich prostřednictvím i rozvoj nitrolební hypertenze. **Veratrinový model** plicního edému u psů je indukován vpravením veratrinu (směs alkaloidů z rostlin čeledi lilkovitých; název získal podle kýchavice bílé – *Veratrum album*) opět do *cisterna magna*. Naopak, podání plazmy, séra, heparinizované krve, trombinu nebo fibrinogenu do *cisterna magna* nemá žádný efekt. Injekce alkaloidu **akonitinu** do oblasti ventrálního hypo-

thalamu u ovcí je rovněž schopna indukovat neurogenní plicní edém (Minnear a Connel, 1981). **Balónkový kompresní míšný model** neurogenního plicního edému je příspěvkem naší experimentální skupiny a jako takový je popsán v kap. 11.

Vyhodnocení stupně neurogenního plicního edému

Stupeň neurogenního plicního edému lze posuzovat celou řadou způsobů. Nejčastěji se používají metody, kdy je pokusné zvíře usmrceno a plíce analyzovány separátně. Plíce jsou vyjmuty, zváženy a dále zpracovány. Pro minimalizaci posmrtných změn na plicích a vyvarování se jejich poškození musí být proces vyjímání plic ještě před započítáním pokusů nacvičen tak, aby netrval déle než 30 sekund. Při vyjímání plic má být brán zřetel na zachování celistvosti plicního parenchymu a odstřížení cév plicního hilu v úrovni jejich výstupu z plic za účelem minimalizace změny jejich hmotnosti pro následné stanovení plicního indexu. Na závěr má být provedena pitva zvířete.

Stupeň subpleurálního krvácení do plic je hodnocen makroskopicky, bezprostředně po vyjmutí plic z hrudníku potkana a jejich zvážení. Každá plíce je posuzována zvlášť a zařazena do jednoho z následujících stupňů:

- zdravá plíce (žádné krvácení na povrchu plic),
- Grade I (maximálně 10 % povrchu plic je prokrváčeno),
- Grade II (25-50 % povrchu plic prokrváčeno) a
- Grade III (více než 50 % povrchu plic je prokrváčeno).

Mírný stupeň krvácení v oblasti plicního hilu, cca 2 mm v průměru, je standardním nálezem, souvisejícím s odříznutím plicních cév.

Ke zjišťování stupně plicního edému může být použita jednoduchá, avšak velmi citlivá technika stanovení tzv. **plicního indexu** (Leal Filho et al., 2005a, 2005b), který odráží relativní hmotnost plic. Tento index je možné spočítat jako podíl mokré hmotnosti plic a tělesné hmotnosti zvířete v gramech. Normální hodnoty plicního indexu se pohybují mezi 0,44 – 0,49. Plicní index mezi 0,50 – 0,55 svědčí o zvýšeném množství tekutiny na úkor intersticiálního edému a vaskulární kongesce a odpovídá lehkému stupni neurogenního plicního edému. Plicní index nad 0,55 je již známkou středně těžkého neurogenního plicního edému, u kterého je již vyjádřena intraalveolární složka, plicní index nad 0,8 již vypovídá o velmi těžkém stupni plicního edému, na který pokusná zvířata často umírají. Výhodou použití plicního indexu je navíc i fakt, že plicní tkáň lze dále histologicky zpracovávat (Šedý et al., 2007a, 2007b). Možnou alternativou ke stanovení plicního indexu je stanovení suché a mokré váhy plic.

Klasické a nejjednodušší vyhodnocení stupně neurogenního plicního edému provádíme pomocí standardního histologického zpracování plicní tkáně a jejím obarvením hematoxylinem-eosinem. Toto zpracování však s sebou přináší změnu hydratačního stavu tkáně v průběhu fixace, dehydratace a zalévání do parafinu. Zvážené a posouzené plíce byly fixovány 4 % paraformaldehydem ve fosfátovém pufru

imerzí po dobu 1-2 dní. Tkáně byly odvodněny vzestupnou řadou ethanolů, prosyceny benzenem a dále parafinem a nakonec zality do parafinu. Parafinové řezy, silné 5 μm byly připevněny na sklíčko pomocí směsi bílku s glycerinem na tepelné destičce. Dále byly řezy odparafinovány pomocí xylenu, rehydratovány pomocí sestupné řady alkoholů a barveny hematoxylinem-eosinem.

Pro zjištění stupně edému alveolární stěny může být rovněž využito vybraných parafinových řezů, barvených hematoxylinem-eosinem. Vyhodnocení řezů je prováděno mimo hilovou oblast. U každého reprezentativního řezu je změřena tloušťka všech alveolárních stěn v daném poli s použitím specializovaného softwaru, například programu Neurolucida (MicroBrightField, Inc., USA), dokud není dosaženo 100 měření. Z jednotlivých měření je vypočítán průměr a směrodatná odchylka. Data z jednotlivých skupin jsou následně srovnána pomocí statistických metod (Šedý et al., 2007a, 2007b).

Ke stanovení stupně plicního edému in vivo lze využít RTG zobrazení s použitím přístroje Image Station In-Vivo FX System (Kodak, Německo). Potkani byli, 1 hodinu po skončení zákroku, narkotizováni pentobarbitalem (50 mg/kg) a uloženi do přístroje, pomocí kterého byl zhotoven RTG snímek.

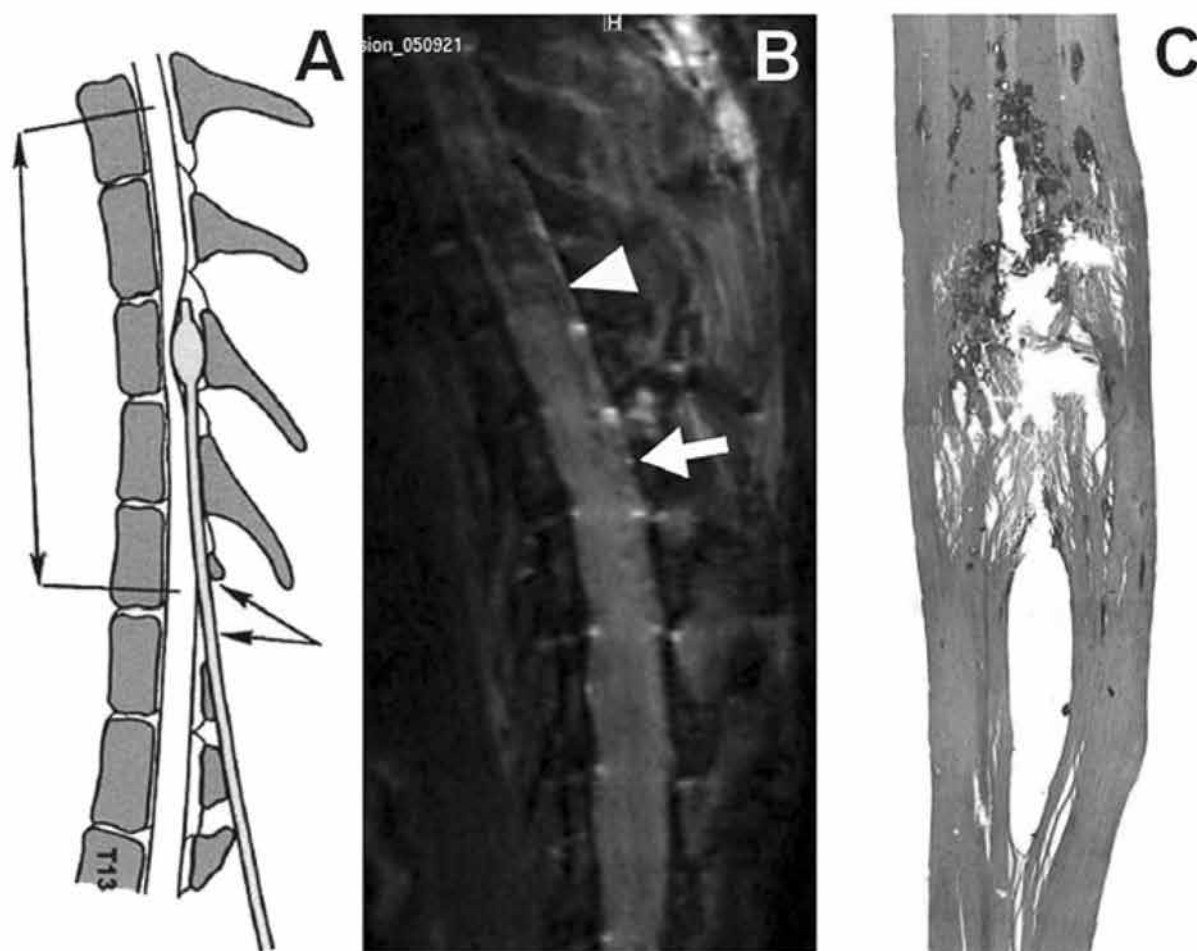
10. VLASTNÍ VÝSLEDKY

V České republice nebyl dosud neurogenní plicní edém systematicky zkoumán. Jeho výzkum začal na AVČR ve skupině, jež se dlouhodobě systematicky zabývá výzkumem patofyziologie a terapie míšního poranění. U těchto zvířat byla opakovaně pozorována do té doby nevyjasněná úmrtí na plicní komplikace v návaznosti na provedení experimentálního výkonu na míše. V okamžiku, kdy jsme tento problém začali detailně zkoumat, zjistili jsme, že příčinou je neurogenní plicní edém. Následně byl vytvořen spolehlivý a reprodučibilní model neurogenního plicního edému, který odstartoval sérii experimentů a umožnil další detailní studium etiopatogeneze, patofyziologie a možnosti terapeutického ovlivnění neurogenního plicního edému v experimentálních podmínkách.

Model neurogenního plicního edému

Vychází z modelu balónkové kompresní míšní léze, který byl popsán pro studium patofyziologických mechanismů a terapeutických možností poranění míchy (Vanický et al., 2001). Model byl popsán pro samce potkanů kmene Wistar o celkové hmotnosti 300-330 g. Zvíře uvedeme do celkové inhalační anestezie 1,5 % isofluranem ve vzduchu při rychlosti průtoku anestetické směsi 300 ml/min. V poloze na břicho používáme k navození míšního poškození dříve popsáný model epidurální balónkové kompresní míšní léze (Vanický et al., 2001). Operace je provedena v aseptických podmínkách. V anestezii jsou pokusnému zvířeti oholena záda a provedena povrchová desinfekce kůže 70 % etanolem. Je proveden sagitální řez v délce 3 cm kraniálně od místa, kde se poslední pár žeber připojuje na páteř. Podkoží je protnuto a následně i povrchové fascie. Hluboké zádové svalstvo je skalpelem oboustranně odříznuto od sloupce *processus spinosi* a odsunuto laterálně. S použitím Lueroových kleští odstraníme *processus spinosi* Th10 a Th11. Spinální výběžek obratlů Th8-9 je zachycen do zahnutého peánu, uchyceného do stojanu a zvíře nadzvednuto. Tímto manévrem dosáhneme dorsálního ohnutí páteře a zvětšení epidurálního prostoru pro následné zasunutí katétru (obr. 1.). Za pomoci stereomikroskopu (Leica S6, Švýcarsko) a zubní vrtačky (W&H, MF Perfecta, Rakousko) s kuličkovým vrtáčkem je do středu *arcus vertebrae* vyvrtán otvor o průměru 1,5 mm. Pomocí dvou ostrých pinzet je šetrně odstraněn periost a zkontrolováno neporušení *dura mater*. Na oblouku obratle Th11 zubní vrtačkou vytvoříme žlábek, který slouží ke správnému zavedení Fogartyho katétru (2-French Fogarty catheter, Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA, USA) do epidurálního prostoru. Střed balónku je zasunut do hloubky 1 cm, čímž je dosaženo míšního segmentu Th8-9. Fogartyho katétr je naplněn sterilní destilovanou vodou a napojen na 50 µl plynotěsnou Hamiltonovu stříkačku (typ 1705, TLL - TEFLON® Luer Lock). Stříkačka je uchycena v mikromanipulátoru, který umožňuje přesné dávkování 15 µl tekutiny, potřebné pro naplnění balónku. Z celého systému jsou ještě před započatím experimentu odstraněny vzduchové bubliny. Poškození míchy je vyvoláno okamžitým nebo postupným nafouknutím balónku na dobu 5 minut. Po uplynutí této doby je balónek vyfouknut a odstraněn z epidurálního prostoru. Důležité je, aby byl balónek

Fogartyho katétru před výkonem zkontrolován s ohledem na přítomnost vzduchových bublin. Jeho správné a rovnoměrné nafouknutí je třeba ověřit s použitím stereomikroskopu vždy před a po provedení balónkové léze. Na správné provedení balónkové léze lze usuzovat i podle průvodních známek míšního poranění – svalových tonicko-klonických křečí zádového a končetinového svalstva a velmi často rovněž krátkodobé zástavy dechu. Operační ránu šijeme ve vrstvách. Reproducibilita modelu epidurální balónkové míšní léze byla v našich experimentálních podmínkách mnohokrát prokázána (Syková et al., 2005; Jendelová et al., 2004; Syková a Jendelová, 2005; Urdzиковá a Vanický, 2005; Urdzиковá, 2006; Vanický et al., 2002).



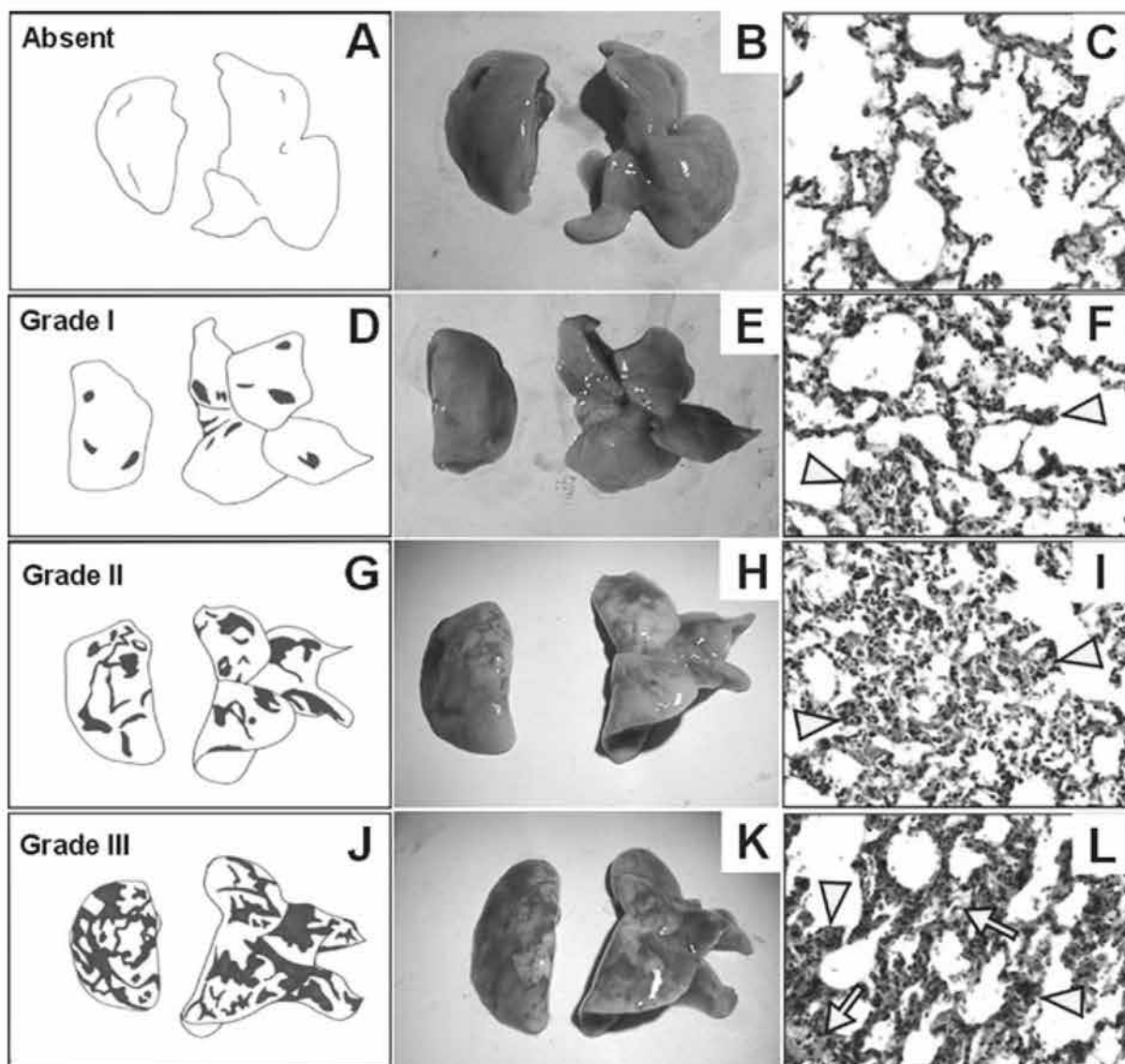
Obr. 1. Balónková kompresní míšní léze. **A.** Schematické znázornění chirurgického výkonu. Místo zavedení balónku je znázorněno dvěma šipkami na pravé straně; část míchy použitá pro morfometrickou analýzu je vyznačena šipkou na levé straně. **B.** Sagitální řez páteří míchou v MRI obraze, kde byla před 24 hodinami provedena balónková kompresní míšní léze (hlavička šipky). Šipka – místo zavedení katétru. **C.** Řez míchou v místě provedení balónkové kompresní míšní léze, barvený hematoxylinem-eosinem.

Stupeň subpleurálního krvácení odpovídá stupni neurogenního plicního edému
 Když jsme změřili průměrnou tloušťku alveolární steny u různých stupňů subpleurálního krvácení (chybějící, Grade I, II, III), zjistili jsme mezi těmito parametry

korelaci (tabulka 11.1., obr. 2.). Pokud subpleurální krvácení chybělo, byla průměrná tloušťka alveolárních stěn srovnatelná s kontrolou. V případě Grade I byla síla alveolární stěn o 81 % vyšší než u kontrol ($p = 0,003$), v případě Grade II byla o 105 % vyšší ($p = 0,0007$) a v případě Grade III o 271 % vyšší ($p = 0,00002$) (tabulka 11.1.). Kromě toho jsme pozorovali nárůst počtu buněk a stupeň intraalveolárního edému s rostoucím stupněm subpleurálního krvácení (obr. 2.).

Tabulka 11.1. *Tloušťka alveolární stěny (μm) v plicích zvířat s chybějícím nebo přítomným (Grade I-III) neurogenním plicním edémem a u kontrolní skupiny. Statisticky významný rozdíl je označen hvězdičkou ($p < 0,05$). Kontrolní zvířata jsou bez poranění míchy, usmrcená okamžitě po navození anestezie.*

| Subpleurální krvácení | Tloušťka alveolární stěny (μm) |
|-----------------------|---------------------------------------------|
| Chybí | 33,24 \pm 12,53 |
| Grade I | 59,66 \pm 21,70 * |
| Grade II | 67,34 \pm 21,60 * |
| Grade III | 122,06 \pm 30,87 * |
| Kontrola | 32,89 \pm 12,50 |



Obr. 2. Metodika posouzení stupně subpleurálního krvácení (absent = NPE chybí, Grade I, II a III) a histologické vyšetření plicní tkáně. **A,B,C.** Subpleurální krvácení chybí. Histologický obraz (C) odpovídá normální plicní tkáni. **D,E,F.** Grade I subpleurálního krvácení, kde není postiženo více než 10 % plicního povrchu drobnými hemoragiemi. Tloušťka alveolárních stěn odráží počínající intersticiální edém (hlavička šipky v F) a občasnou extravazaci erytrocytů. **G,H,I.** Grade II subpleurálního krvácení, kde je postiženo 11-50 % povrchu plic krvácením. Histologický obraz (I) odráží ztlustění alveolárních stěn (hlavička šipky v I) a krvácení. **J,K,L.** Grade III subpleurálního krvácení, kde je postiženo více než 51 % povrchu plic krvácením. Patrné je masivní zesílení alveolárních stěn (hlavička šipky v L), intersticiální a intraalveolární edém (šipky v L) a masivní extravazace erytrocytů.

Sledování nástupu neurogenního plicního edému

Ke stanovení času, v němž vzniká neurogenní plicní edém, jsme nejdříve odhalili *pleura parietalis* a *in vivo* sledovali rozvoj neurogenního plicního edému na plicním parenchymu během následné balónkové léze. Zvířata byla narkotizována 1,5 %

isofluranem a umístěna do polohy na břicho. Dorsolaterální kožní řez byl proveden v rozsahu Th7-9, povrchové svaly hrudní stěny byly prořaty kolmo na svalové snopce a odsunuty do stran. Následně byly odstraněny *musculi intercostales* a žebra v příslušných segmentech a *pleura parietalis* očištěna. Krvácení z mezižeberních tepének a žil bylo stavěno jemným zhmožděním stěny cévy s následnou tamponádou jemnými kousky buničiny. Elektrokauterizace nebyla využita v důsledku snahy o zachování maximální translucence pleury. Speciální péče byla věnována prevenci rozvoje pneumothoraxu. Následně byla provedena balónková léze a v jejím průběhu a po něm byl sledován plicní parenchym. Čas, kdy začínal plicní parenchym měnit barvu a zejména čas, kdy se objevilo subpleurální krvácení byl zaznamenán. Neurogenní plicní edém se vytvořil rychle po nafouknutí balónku v páteřním kanále. První známky zastínění plicního parenchymu se objevily v době $6,67 \pm 0,47$ minut po nafouknutí balónku v páteřním kanále, zatímco první známky hemoragie se objevily v době $8,00 \pm 0,82$ minut po nafouknutí balónku.

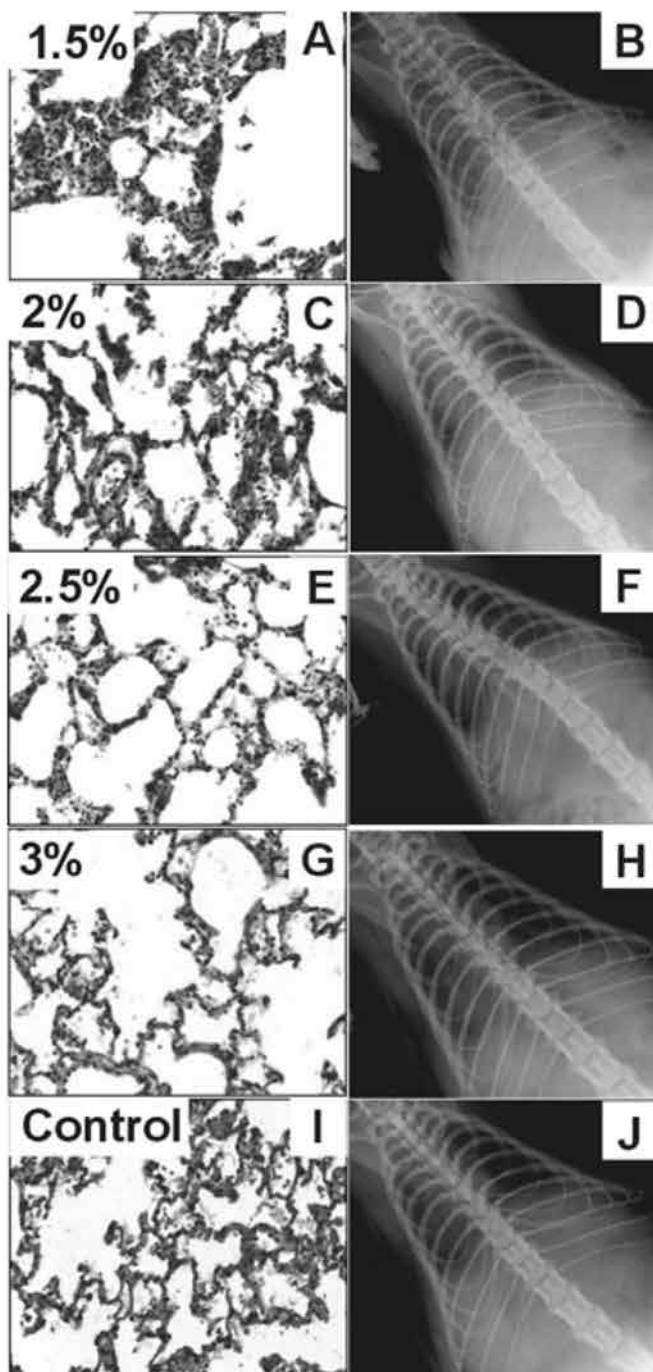
Role anestezie při rozvoji neurogenního plicního edému

V této části jsme se zabývali problematikou koncentrace použité anestezie na rozvoj neurogenního plicního edému. Před započítím experimentů jsme stanovili minimální a maximální koncentraci isofluranu, kterou mohou být zvířata bezpečně narkotizována. Při použití nižší anestezie než 1,5 % isofluranu ve vzduchu byly pozitivní reakce na bolest při kompresi prstů na pánevních končetinách a konci ocasu (angl. digital pinch reflex, tail pinch reflex) a současně na korneální reflex, nebylo tedy etické podrobovat zvířata nižší anestezii. Při použití více než 4 % isofluranu ve vzduchu umírala zvířata na předávkování anestetikem. K anestezii zvířat byl použit isofluran (Forane, Abbot Laboratories, Ltd., Queenborough, Velká Británie). K jeho aplikaci byla použita nosní maska domácí výroby, připojená na přístroj Isoflurane Vapor 19.3 (Drägerwerk AG Lübeck, Německo). Zvířata byla zvážena a uložena do uzavíratelné plastické nádoby o průměru 16,5 cm a výšce 13 cm, do které byl zaveden přívod z odpařovače isofluranu a zahájena anestezie 5 % isofluranem ve vzduchu při proudu 300 ml inhalační směsi za minutu. Po navození narkózy byli potkani vyjmuti a připojeni na nosní masku s definovanou koncentrací isofluranu ve vzduchu 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 4 % nebo 5 % při proudu 300 ml inhalační směsi za minutu.

Všechna zvířata narkotizovaná nízkými koncentracemi isofluranu (1,5 – 2 %) rozvinula neurogenní plicní edém. Plicní subpleurální krvácení se rozvinulo u všech zvířat narkotizovaných 1,5 % a 2 % isofluranem. V 77 % vyšetřených plic byl nalezen Grade III subpleurálního krvácení. V ostatních vyšetřených plicích byl přítomen buď Grade II (17 %) nebo Grade I (6 %) subpleurálního krvácení (tabulka 11.2., obr. 2. a 3.). U všech těchto zvířat se plicní index lišil signifikantně od kontrol: u skupiny narkotizované 2 % isofluranem byl o 64 % vyšší ve srovnání s kontrolními zvířaty ($p = 0,0000005$), zatímco u skupiny narkotizované 1,5 % isofluranem byl ještě vyšší – o 101 % ($p = 0,0000008$).

Tabulka 11.2. Postižení plic po poranění míchy u potkanů narkotizovaných 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 4 % nebo 5 % isofluranem a kontrolní skupina. Dokumentována je přítomnost (Grade I-III) nebo chybějící subpleurální krvácení. Každá plíce je posouzena zvlášť a spočítáno procento ze všech plic v dané skupině. Signifikantní ($p < 0,05$) zvýšení plicního indexu (průměr \pm směrodatná odchylka) je označeno hvězdičkou. Výskyt úmrtí na následky neurogenního plicního edému je prezentován jako celkový počet úmrtí a procento ze všech zvířat v dané skupině. Kontrolní zvířata jsou bez poranění míchy, usmrcená okamžitě po navození anestezie. N – počet potkanů. 2N – počet plic.

| Isofluran | N | Chybění (% 2N) | Grade I (% 2N) | Grade II (% 2N) | Grade III (% 2N) | Plicní index | Úmrtí (% N) |
|-----------|----|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| 1,5 % | 12 | - | - | 1 (4,17 %) | 23 (95,83 %) | 0,92 \pm 0,18* | 5 (41,67 %) |
| 2 % | 12 | - | 3 (12,50 %) | 7 (29,17 %) | 14 (58,33 %) | 0,74 \pm 0,11* | - |
| 2,5 % | 12 | 15 (62,50 %) | 6 (25,00 %) | 3 (12,50 %) | - | 0,51 \pm 0,06 | - |
| 3 % | 16 | 26 (81,25 %) | 4 (12,50 %) | 2 (6,25 %) | - | 0,50 \pm 0,06 | - |
| 4 % | 3 | 6 (100,00 %) | - | - | - | 0,48 \pm 0,01 | 3 (100,00 %) |
| 5 % | 3 | 6 (100,00 %) | - | - | - | 0,47 \pm 0,02 | 3 (100,00 %) |
| Kontrola | 12 | 24 (100,00 %) | - | - | - | 0,45 \pm 0,02 | - |



Obr. 3. Neurogení plicní edém u potkanů narkotizovaných 1,5 %, 2 %, 2,5 % nebo 3 % isofluranem. **A.** Histologický obraz ukazuje masivní neurogení plicní edém se ztluštěním alveolárních stěn, intersticiálním edémem a masivním krvácením u potkanů narkotizovaných 1,5 % isofluranem. **B.** RTG obraz znázorňující difuzní zastínění obou plicních polí s maximem v perihilární oblasti, které odráží neurogení plicní edém u potkanů narkotizovaných 1,5 % isofluranem. **C.** Histologický obraz rozvinutého neurogeního plicního edému se ztluštěním alveolárních stěn a občasným krvácením u potkanů narkotizovaných 2 % isofluranem. **D.** RTG obraz ukazující difuzní stín v obou plicních polích s maximem v perihilární oblasti, které odráží neurogení plicní edém u potkanů narkotizovaných 2 % isofluranem. **E.** Občasné krvácení bez zřetelného plicního edému u potkanů narkotizovaných

2,5 % isofluranem. **F.** RTG obraz normálních plic u potkanů narkotizovaných 2,5 % isofluranem. **G.** Občasné okrsky krvácení bez zřetelného plicního edému u potkanů narkotizovaných 3 % isofluranem. **H.** RTG obraz normálních plic u potkanů narkotizovaných 2,5 % isofluranem. **I.** Histologický obraz plicní tkáně kontrolního zvířete. **J.** RTG obraz plic kontrolního zvířete.

Pět ze dvanácti zvířat (42 %) ze skupiny narkotizované 1,5 % isofluranem zemřelo v době $7,50 \pm 3,15$ minut (rozptyl od 5 do 12 minut) od nafouknutí balónku v páteřním kanálu (tabulka 11.2.). Několik minut před smrtí začala zvířatům klesat dechová frekvence a začali vykazovat známky selhávání dýchacího systému v podobě „smrtného chropotu“, typického pro neurogenní plicní edém. Následně se jejich dýchání zastavilo a po několika sekundách jim z nozder začala vytékat zpěněná sanguinolentní tekutina. Jejich srdeční akce následně ustala. Na rozdíl od této skupiny, žádné ze zvířat narkotizovaných 2 % isofluranem na následky neurogenního plicního edému nezemřelo (tabulka 11.2.).

Mikroskopické vyšetření plic ukázalo, že použití nízkých koncentrací isofluranu způsobilo edém alveolární membrány, porušení integrity tenkých kapilárních stěn, masivní krvácení a únik intravaskulární tekutiny do intersticia i lumen alveolů. Kombinace intersticiálního a intraalveolárního úniku transsudátu, doprovázená intraparenchymálním krvácením, odpovídala typickému obrazu neurogenního plicního edému (obr. 2. a 3.). U skupiny narkotizované 1,5 % isofluranem byla tloušťka alveolárních membrán o 264 % vyšší než u kontrol (p = 0,0004), zatímco u skupiny narkotizované 2 % isofluranem o 199 % vyšší ve srovnání s kontrolními zvířaty (p = 0,006) (tabulka 11.3.). In vivo zobrazení pomocí RTG odhalilo difuzní zastínění v obou plicích s maximem v hilární a perihilární oblasti (obr. 3.). Na základě těchto výsledků můžeme usoudit, že použití nízkých hladin anestezie má kauzální vztah k rozvoji těžkého neurogenního plicního edému u potkanů s poraněním míchy.

Tabulka 11.3. Tloušťka alveolární stěny (μm) v plicích zvířat s poraněním míchy, narkotizovaných 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 4 % nebo 5 % isofluranem a kontrolní skupiny. Statisticky významný rozdíl proti kontrolní skupině je označen hvězdičkou (p < 0,05). Kontrolní zvířata jsou bez poranění míchy, usmrcená okamžitě po navození anestezie.

| Isofluran | Tloušťka alveolární stěny (μm) |
|-----------|---------------------------------------------|
| 1,5 % | $119,78 \pm 32,30$ * |
| 2 % | $98,30 \pm 39,24$ * |
| 2,5 % | $42,69 \pm 21,00$ * |
| 3 % | $38,67 \pm 18,54$ |
| 4 % | $38,00 \pm 12,06$ |
| 5 % | $28,57 \pm 11,02$ |
| Kontrola | $32,89 \pm 12,50$ |

Více než 28 % zvířat narkotizovaných středními koncentracemi isofluranu ve vzduchu (2,5 % a 3 %) rozvinulo plicní hemoragie, avšak žádný z těchto případů nedosáhl grade II nebo III. V 72 % případů nebyly přítomny žádné známky subpleurálního krvácení (tabulka 11.2., obr. 2. a 3.). Hodnoty plicního indexu byly lehce zvýšené jak u skupiny zvířat narkotizovaných 2,5 % isofluranem, tak u skupiny narkotizované 3 % isofluranem (tabulka 11.2.), avšak žádný z těchto rozdílů nedosáhl statistické významnosti ($p = 0,07$ a $p = 0,06$).

Makroskopické vyhodnocení stupně subpleurálního krvácení ukázalo, že zvířata narkotizovaná 3 % isofluranem rozvinula známky lehkého neurogenního plicního edému méně často než zvířata narkotizovaná 2,5 % isofluranem – rozdíl ve výskytu subpleurálního krvácení byl téměř 20 % (19 % u 3 % skupiny vs. 38 % u 2,5 % skupiny) (tabulka 11.2.). Plicní index byl však u obou skupin srovnatelný (0,50 vs. 0,51) a rozdíl mezi oběma skupinami ani rozdíl proti kontrolám nedosáhl statistické významnosti ($p=0,06$ a $p=0,07$) (tabulka 11.2.). Histologické vyšetření zvířat narkotizovaných středními koncentracemi isofluranu (2,5 – 3 %) vykazovalo téměř normální parametry plicního parenchymu s lehkým stupněm ztlustění alveolárních stěn a omezenou extravazací krevních elementů (obr. 2. a 3.). V případě skupiny narkotizované 2,5 % isofluranem ve vzduchu byla tloušťka alveolárních membrán o 30 % silnější ve srovnání s kontrolou, zatímco v případě skupiny narkotizované 3 % isofluranem byla o 18 % vyšší (tabulka 11.3.). Pouze u skupiny narkotizované 2,5 % isofluranem došlo ke statisticky významnému zesílení tloušťky alveolární stěny ($p = 0,03$). In vivo RTG vyšetření ukázalo plicní kresbu srovnatelnou s kontrolami (obr. 3.). Zvířata narkotizovaná středními koncentracemi isofluranu tedy rozvinula pouze velmi mírný stupeň neurogenního plicního edému. Kromě toho můžeme říci, že koncentrace isofluranu 3 % lze posuzovat jako nejbezpečnější pro provádění balónkové kompresní míšní léze.

Všechna zvířata ze skupin narkotizovaných vysokými koncentracemi isofluranu (4 % a 5 %) zemřela v důsledku předávkování anestetikem (tabulka 11.2.). Zvířata ze skupiny narkotizované 4 % isofluranem umírala v době průměrně $15,33 \pm 2,81$ minut od začátku anestezie, zatímco zvířata narkotizovaná 5 % isofluranem v době $6,33 \pm 2,52$ minut od začátku anestezie. V průběhu anestezie nebyly přítomny žádné vedlejší fenomény typu smrtelného chropotu nebo svalových křečí. Dýchací činnost zvířat pomalu ustávala až se zcela zastavila. Postmortální makroskopické a mikroskopické vyšetření plic neukázalo žádné známky neurogenního plicního edému (tabulka 11.2. a 11.3., obr. 2.). V žádném z případů se nevyskytlo subpleurální krvácení a průměrný plicní index byl srovnatelný s kontrolními zvířaty (tabulka 11.2.).

Nepozorovali jsme žádné známky plicního edému u zvířat bez balónkové kompresní míšní léze, která byla narkotizována po dobu 40 minut 1,5 %, 2 %, 2,5 % nebo 3 % isofluranem ve vzduchu. Všechna zvířata vykazovala absenci subpleurálního krvácení a jejich plicní index byl srovnatelný s kontrolními zvířaty ($0,45 \pm 0,01$ u 1,5 % skupiny, $0,44 \pm 0,02$ u 2 % skupiny, $0,49 \pm 0,06$ u 2,5 % skupiny a $0,44 \pm 0,02$ u 3 % skupiny). Vyšetření pomocí RTG ani histologické vyšetření včetně měření tloušťky alveolárních stěn byly rovněž normální. Žádné z těchto zvířat nezemřelo.

Nízké koncentrace isofluranu tedy umožňují vznik neurogenního plicního edému u potkanů s kompresním poraněním míchy. Saeki et al. (1996) prokázali, že účinky isofluranu na útlum spontánní renální sympatické nervové aktivity a baroreflexní reakce se zvyšují s jeho dávkou. Tyto účinky působí prokazatelně na úrovni převodu informace uvnitř sympatického nervového systému a nikoli periferních baroreceptorů (Saeki et al., 1996; Lee et al., 2002). Vznik neurogenního plicního edému tedy pravděpodobně tkví v celkově zvýšené připravenosti organismu reagovat na všechny změny.

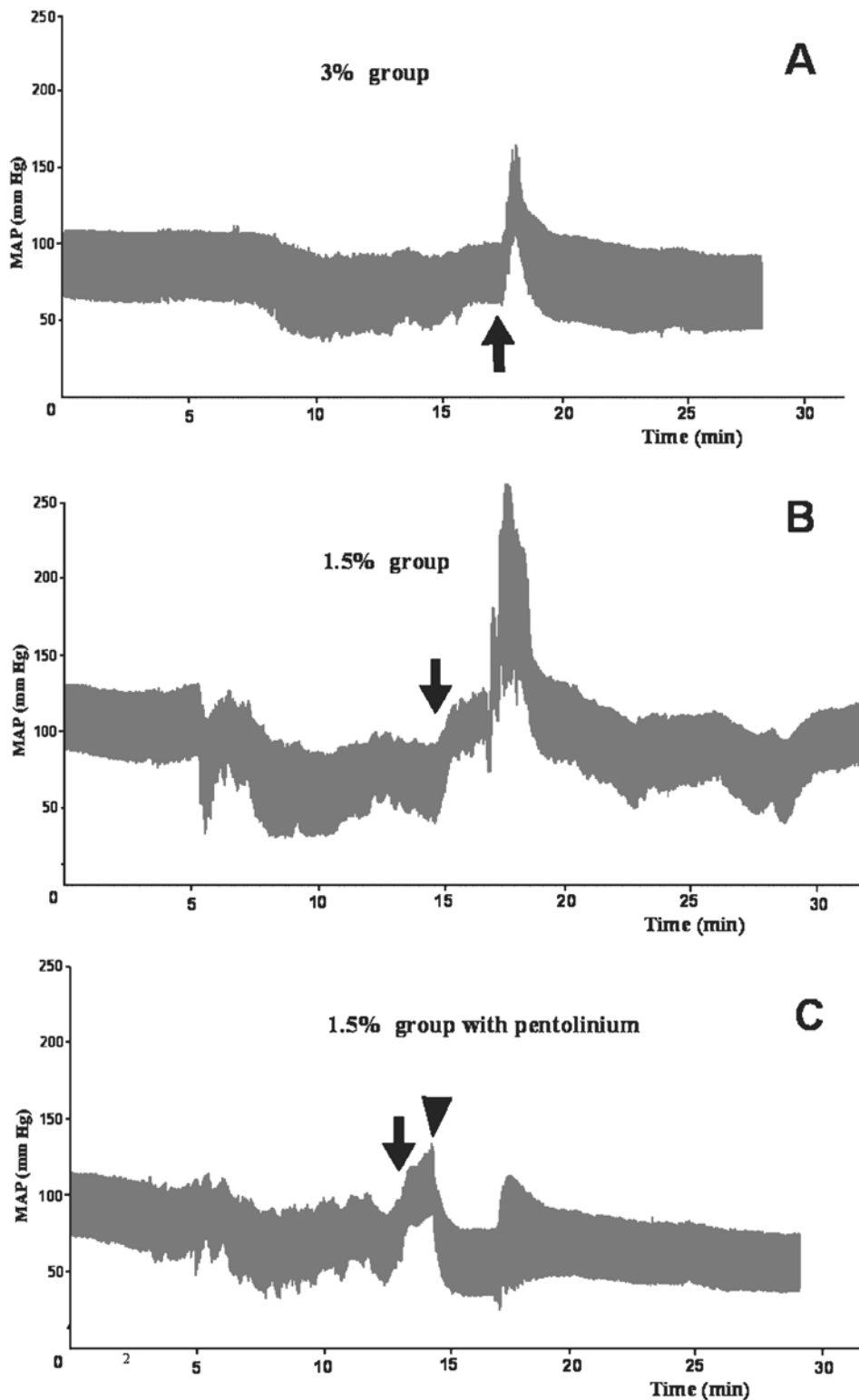
Hemodynamické změny při rozvoji NPE

Pro lepší pochopení hemodynamických změn v průběhu rozvoje neurogenního plicního edému jsme u zvířat narkotizovaných 1,5 % nebo 3 % isofluranem ve vzduchu, podrobených balónkové kompresní míšní lézi, měřili systolický, diastolický a střední tlak, společně s tepovou frekvencí pomocí PowerLab systému (AD Instruments, Colorado Springs, USA). V anestezii byl zvířatům skrz kožní řez na krku zaveden katétr do levé arteria carotis communis a vyveden v mezilopatkové oblasti. Zvíře bylo uloženo do polohy na břicho, ve které byla provedena balónková kompresní míšní léze. Systolický, diastolický a střední tlak (mm Hg), společně s tepovou frekvencí (bpm) byly monitorovány po dobu 5 minut před výkonem, v průběhu celého výkonu a následně 10 minut po výkonu. Získané hodnoty byly (1) bazální hodnota, (2) minimální hodnota v průběhu kožního řezu, (3) minimální hodnota v průběhu zásahu do svalové tkáně, (4) maximální hodnota v průběhu nafouknutí balónku v páteřním kanále, (5) hodnota nafouknutého balónku, získaná jako průměr 2minutového intervalu po nafouknutí balónku a (6) hodnota v době 10 minut po konci procedury (Šedý et al., 2007a).

Bazální hodnoty středního tlaku a tepové frekvence se lišily signifikantně u zvířat s 1,5 % a 3 % isofluranovou anestézií (tabulka 11.4.). Balónkové kompresní poranění míchy vedlo ke zvýšení systolického i diastolického krevního tlaku u všech experimentálních zvířat. Typický průběh zahrnoval počáteční pokles krevního tlaku i tepové frekvence v průběhu provádění chirurgického přístupu, následovaný rychlým vzestupem krevního tlaku a baroreflexně indukovaným poklesem tepové frekvence jako reakce na nafouknutí balónku v páteřním kanále (obr. 4., tabulka 11.4.). Po odeznění akutní fáze míšního poranění krevní tlak opět klesal pod bazální úroveň (tabulka 11.4.).

Tabulka 11.4. Střední arteriální tlak a tepová frekvence – bazální hodnoty i hodnoty v příslušných etapách provádění balónkové kompresní míšní léze u zvířat narkotizovaných 1,5 % a 3 % isofluranem. Statisticky signifikantní rozdíly (párový Studentův t-test, $p < 0,05$) uvnitř jednotlivých skupin ve vztahu k bazální hodnotě jsou znázorněny hvězdičkou, zatímco signifikantní rozdíly (nepárový Studentův t-test, $p < 0,05$) oproti skupině narkotizované 3 % isofluranem jsou označeny \$. Relativní procentuální změny oproti bazálním hodnotám jsou vyznačeny v závorkách.

| Střední arteriální tlak (mm Hg) | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | 3 % isofluran | 1,5 % isofluran | 1,5 % isofluran-pentolinium |
| Bazální hodnota | 78 ± 9 | 93 ± 13 ^s | 97 ± 3 ^s |
| Kožní řez | 73 ± 8 * (-6 %) | 85 ± 11 ^s (-9 %) | 77 ± 9 * (-21 %) |
| Svalový řez | 55 ± 3 * (-29 %) | 58 ± 3 * ^s (-38 %) | 66 ± 11 * ^s (-32 %) |
| Aplikace pentolinia | - | - | 55 ± 3 * (-43 %) |
| Nafouknutí balónku – max. | 127 ± 20 * (+63 %) | 155 ± 21 * ^s (+67 %) | 75 ± 10 * ^s (-3 %) |
| Nafouknutí balónku – 2 min | 97 ± 15 * (+24 %) | 126 ± 21 * ^s (+35 %) | 67 ± 8 * ^s (-31 %) |
| Zotavení | 60 ± 6 * (-23 %) | 77 ± 18 * ^s (-17 %) | 55 ± 4 * (-43 %) |
| Tepová frekvence (bpm) | | | |
| | 3 % isofluran | 1,5 % isofluran | 1,5 % isofluran-pentolinium |
| Bazální hodnota | 380 ± 27 | 433 ± 39 ^s | 402 ± 26 |
| Kožní řez | 383 ± 24 (+1 %) | 430 ± 31 ^s (-1 %) | 438 ± 23 * ^s (+9 %) |
| Svalový řez | 355 ± 19 * (-7 %) | 396 ± 30 * ^s (-9 %) | 425 ± 34 ^s (+6 %) |
| Aplikace pentolinia | - | - | 313 ± 40 * (-22 %) |
| Nafouknutí balónku – max. | 359 ± 32 (-6 %) | 283 ± 73 * (-35 %) | 386 ± 48 (-4 %) |
| Nafouknutí balónku – 2 min | 378 ± 16 (-1 %) | 327 ± 48 * ^s (-25 %) | 370 ± 47 (-8 %) |
| Zotavení | 341 ± 30 * (-10 %) | 357 ± 38 * (-18 %) | 317 ± 47 * ^s (-21 %) |



Obr. 4. Časový průběh křivky krevního tlaku v průběhu celého chirurgického výkonu, balónkové kompresní míšní léze a období zotavení u zvířat narkotizovaných 3 % isofluranem (A), 1,5 % isofluranem (B) a u zvířat narkotizovaných 1,5 % isofluranem s gangliovou blokadou pentoliníem (C). Šipky – nafouknutí balónku. Hlavičky šipek – aplikace pentolinia. MAP – střední arteriální tlak. Time – čas.

Potkani narkotizovaní 1,5 % isofluranem, kteří vykazovali přítomnost neurogenního plicního edému (plicní index = $0,72 \pm 0,13$), dosahovali signifikantně vyšších hodnot středního arteriálního tlaku před, v průběhu a po chirurgickém výkonu (tabulka 11.4.) než potkani ze skupiny narkotizované 3 % isofluranem, u kterých se neurogenní plicní edém nevytvářel (p-index = $0,41 \pm 0,05$). Rozdíl mezi průměrným středním arteriálním tlakem mezi skupinou narkotizovanou 1,5 % a 3 % isofluranem dosahoval od 5 % (v průběhu řezu svalovou tkání) do 30 % (v průběhu 2minutového intervalu po nafouknutí balónku). Maximální hodnoty středního arteriálního tlaku byly pozorovány po nafouknutí balónku. V průběhu celého chirurgického výkonu byly změny krevního tlaku vzhledem k bazální hodnotě výraznější u zvířat narkotizovaných 1,5 % isofluranem, což ukazovalo na jejich obecně vyšší senzitivitu ke všem manipulacím. Hodnoty tepové frekvence byly vyšší u 1,5 % zvířat do okamžiku nafouknutí balónku, kdy tyto hodnoty prudce poklesly. Tento baroreflexně indukovaný pokles tepové frekvence nebyl pozorován u skupiny narkotizované 3 % isofluranem (tabulka 11.4.), což ukazuje zásadní význam reflexní bradykardie na vznik NPE.

V průběhu monitorování krevního tlaku a tepové frekvence zemřelo jedno zvíře z 1,5 % skupiny na následky neurogenního plicního edému. Navzdory tomu, že bazální hodnoty jeho středního krevního tlaku (88 mm Hg) byly obdobné jako průměrné hodnoty dosahované v naší studii (rozsah 67-105 mm Hg), jeho bazální tepová frekvence (472 tepů/minutu) byla vůbec nejvyšší v naší studii (377-463 tepů/minutu). V průběhu celé procedury se hodnoty krevního tlaku i tepové frekvence pohybovaly v rozmezích typických pro ostatní zvířata – ani maximální hodnota středního arteriálního tlaku v období bezprostředně po nafouknutí balónku v páteřním kanále (167 mm Hg) nebyla nejvyšší ve srovnání s ostatními zvířaty v 1,5 % skupině (dvě zvířata dosáhla hodnoty 170 mm Hg). Po přibližně 4 minutách po nafouknutí balónku se začaly hodnoty krevního tlaku a tepové frekvence u příslušného zvířete přibližovat k typickým hodnotám zvířat 1,5 % skupiny. Zvíře zemřelo v průběhu druhé minuty po vyfouknutí balónku.

Vliv neurogenního plicního edému na návrat neurologických funkcí

Zvířatům určeným k behaviorálním studiím byla provedena sutura rány a po operaci byla umístěna do klecí po dvou pro minimalizaci sociálního stresu a pro lepší rehabilitaci po poškození míchy. Všichni potkani byli krmeni standardní dietou a pramenitou vodou *ad libitum*. Jednou z hlavních komplikací po poškození míchy je porucha vyprazdňování močového měchýře (dyssynergie detruzoru-sfinkteru), jež vede jednak k mechanickému poškození jeho stěny, jednak k infekčním komplikacím (Urdzíková, 2006). Jelikož dochází po poškození míchy k přerušení drah, které kontrolují jeho vyprazdňování, bylo nutno potkanům močový měchýř manuálně vyprazdňovat. Vyprazdňování bylo prováděno nejprve 2x denně, posléze 1x denně, dokud se zvířatům nevrátilo spontánní vyprazdňování močového měchýře.

Pro testování hybnosti pánevních končetin zvířat po míšním poranění jsme použili BBB test (BBB score), který je dnes považován za zlatý standard behaviorálního

testování laboratorních potkanů s poškozením míchy (Basso et al., 1995). BBB test je udáván od 0 (žádný pohyb pánevních končetin) do 21 (plná pohyblivost pánevních končetin), a to pro každou končetinu zvlášť (tabulka 11.5.). Výsledná hodnota je aritmetickým průměrem hodnot pro pravou a levou pánevní končetinu. BBB test lze hrubě rozdělit na tři fáze podle stupně zotavení (angl. recovery) – **rannou fázi** (0-7), **střední fázi** (8-13) a **pozdní fázi** (14-21).

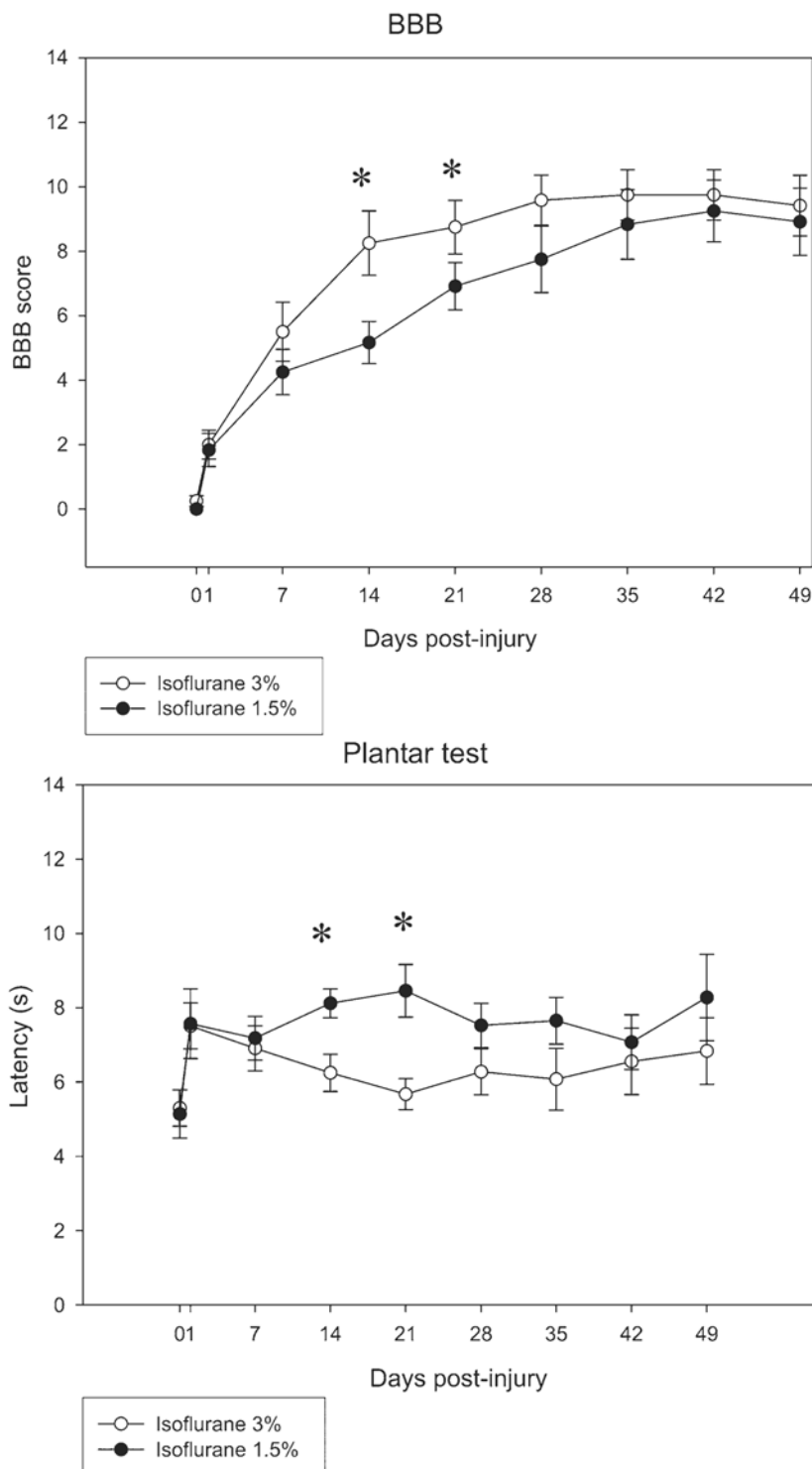
Potkani s traumatickým poškozením míchy byli testováni před zákrokem, 24 hodin po zákroku a dále po 7, 14, 21, 28, 35, 42 a 49 dnech. Zvířata byla testována na rovném povrchu ve vymezeném kruhovém prostoru s průměrem 90 cm. Testování provádějí vždy dva testující, kteří stojí proti sobě, aby mohli pozorovat pohyby končetin ze dvou stran. Hodnotí se jen volní pohyby, nikoli pohyby reflexní.

Tabulka 11.5. BBB test (Basso et al., 1995)

| Číslo | Charakteristika |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0 | Žádný viditelný pohyb pánevní končetiny |
| 1 | Nepatrný pohyb jednoho nebo dvou kloubů, obvykle kyčle a/nebo kolene |
| 2 | Výrazný pohyb jednoho kloubu Výrazný pohyb jednoho kloubu a nepatrný pohyb dalšího kloubu |
| 3 | Výrazný pohyb dvou kloubů |
| 4 | Nepatrný pohyb všech tří kloubů |
| 5 | Nepatrný pohyb dvou kloubů a současně výrazný pohyb třetího |
| 6 | Výrazný pohyb dvou kloubů a současně nepatrný pohyb třetího |
| 7 | Výrazný pohyb všech tří kloubů |
| 8 | Zametání bez váhové podpory Plantární umístění pracky bez váhové podpory |
| 9 | Plantární umístění pracky s váhovou podporou pouze ve stoji Občasná, častá nebo konzistentní chůze po dorsum pedis s váhovou podporou a absence plantárního umístění pracky |
| 10 | Občasné plantární umístění pracky s váhovou podporou a žádná předozadní koordinace |
| 11 | Časté až konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a žádná předozadní koordinace |
| 12 | Časté až konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a občasná předozadní koordinace |
| 13 | Časté až konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a častá předozadní koordinace |
| 14 | Konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Pracka je rotována zevně nebo navnitř při zdvihnutí pracky a při prvním kontaktu. Časté plantární umístění pracky s váhovou podporou, konzistentní předozadní koordinace a občasná chůze po dorsum pedis s váhovou podporou |

| | |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 15 | Konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Žádné nebo občasné zvedání prstů. Pracka je paralelně k tělu při prvním kontaktu. |
| 16 | Konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Časté zvedání prstů. Pracka je paralelně k tělu při prvním kontaktu a rotována ve fázi zdvihnutí. |
| 17 | Konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Časté zvedání prstů. Pracka je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zdvihnutí. |
| 18 | Konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Pracka je paralelně k tělu při prvním kontaktu a rotována ve fázi zdvihnutí. |
| 19 | Konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Pracka je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zdvihnutí. Ocas je při zemi část nebo celou dobu. |
| 20 | Konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Pracka je paralelně k tělu při prvním kontaktu i ve fázi zdvihnutí. Nestabilita trupu. Konzistentní zvedání ocasu. |
| 21 | Konzistentní plantární umístění pracky s váhovou podporou a konzistentní předozadní koordinace. Konzistentní zvedání prstů. Stabilita trupu. Konzistentní zvedání ocasu. |

U všech 24 zvířat (12 ze skupiny narkotizované 1,5 % isofluranem a 12 ze skupiny narkotizované 3 % isofluranem) se v návaznosti na balónkové kompresní poškození míchy rozvinula kompletní paraplegie, korespondující BBB skóre 0-1. V průběhu následující fáze se zvířata, v průběhu výkonu narkotizovaná 3 % isofluranem zotavovala rychleji než zvířata narkotizovaná v průběhu výkonu 1,5 % isofluranem (obr. 5.). Tento rozdíl dosáhl statistické významnosti v průběhu 2 a 3 týdnů po poranění ($p = 0,04$ v obou případech) (obr. 5.). Rovněž je třeba poznamenat, že stejného BBB skóre jako dosáhla zvířata z 3 % skupiny 14 dní po poranění, dosáhla zvířata z 1,5 % skupiny až 31. den po poranění.



Obr. 5. Zotavení neurologických funkcí u zvířat narkotizovaných 1,5 % a 3 % isofluranem. **A.** BBB skóre jsou signifikantně vyšší u potkanů narkotizovaných 3 % isofluranem (bez neurogenního plicního edému) ve srovnání s potkany narkotizovanými 1,5 % isofluranem (s neurogenním plicním edémem). **B.** Návrat sensitivních funkcí, který odráží latenci reakce na tepelné podráždění v průběhu plantárního testu je signifikantně kratší u potkanů narkotizovaných 3 % isofluranem. Latency – čas. Days post injury – období po poranění míchy.

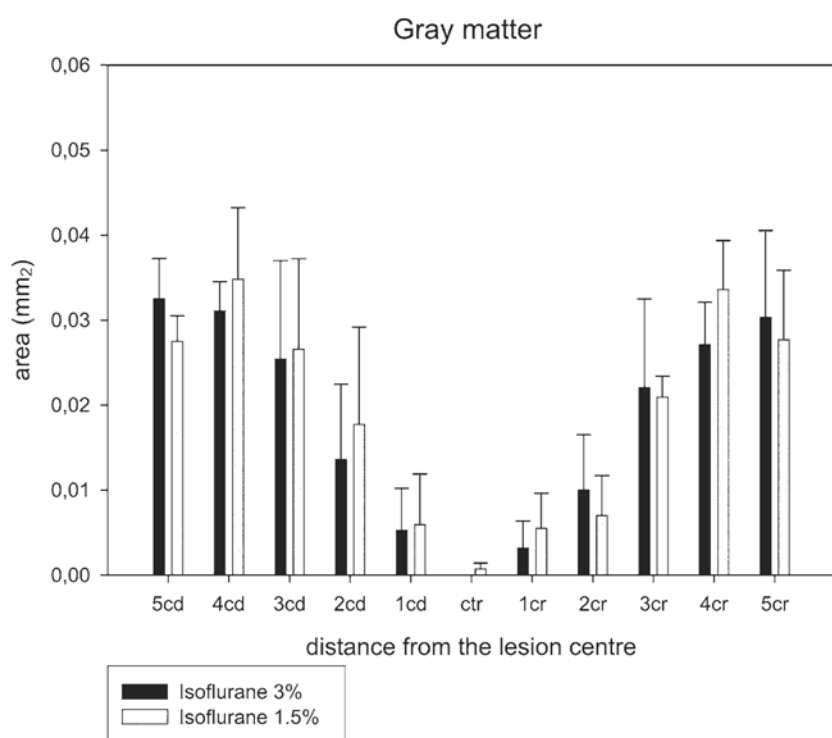
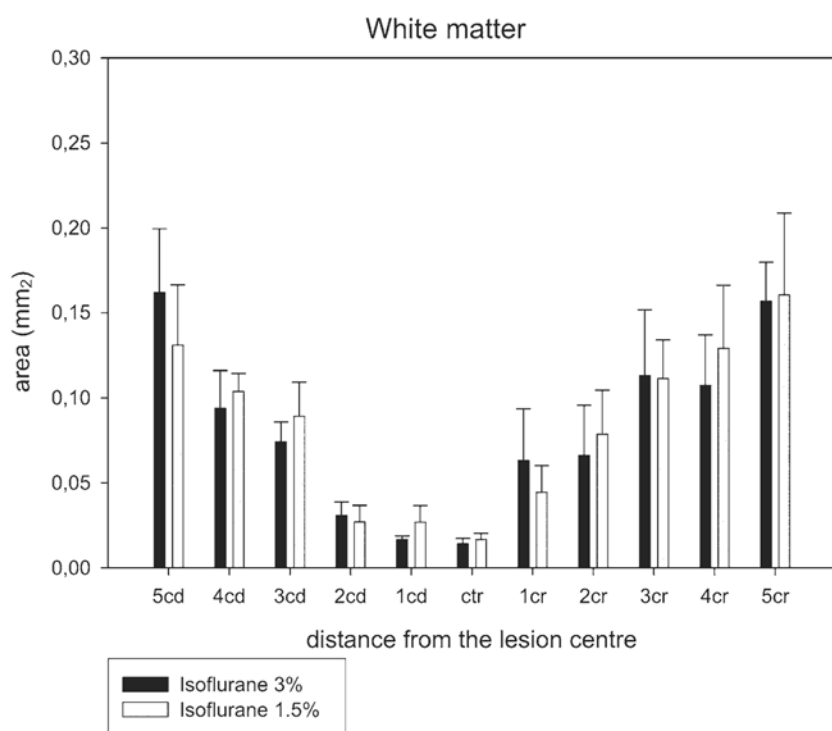
K testování sensitivity potkanů s poškozenou míchou jsme využili Plantární test (Plantar test – Ugo Basile, Comerio, USA). Tento test umožňuje kvantifikovat stupeň citlivosti pánevní končetiny na podráždění tepelným podnětem v podobě času, které potkan potřebuje k odtažení pracky. Potkani s traumatickým poškozením míchy byli testováni před zákrokem, 24 hodin po zákroku a dále po 7, 14, 21, 28, 35, 42 a 49 dnech.

Návrat sensitivních funkcí měl podobný průběh jako v případě BBB testu (obr. 5.). Od druhého týdne po poranění se začínala zvířata z 3 % skupiny zotavovat rychleji než zvířata ze skupiny při výkonu narkotizované 3 % isofluranem. V 2. a 3. týdnu po poranění dosáhl tento rozdíl statistické významnosti ($p = 0,04$ a $p = 0,02$). Zvířata narkotizovaná 3 % isofluranem se tedy po výkonu zotavovala rychleji než zvířata narkotizovaná 1,5 % isofluranem. Zajímavé bylo, že rozdíl byl nejvíce patrný v období 2. a 3. týdne po poranění, pravděpodobně v důsledku obecně horšího celkového zdravotního stavu zvířat z 1,5 % skupiny.

Vliv neurogenního plicního edému na zachování šedé a bílé hmoty míšni

V dalším experimentu jsme stanovovali vliv neurogenního plicního edému na zachování bílé a šedé hmoty míšni. Z míchy byl excidován 2 cm dlouhý úsek s poškozeným místem uprostřed. Před odvodněním a prosycením parafinem byla excidovaná mícha zafixována na pevné podložce, aby nedocházelo k jejímu ohýbání. Celý 2 cm dlouhý segment byl zalit do paraplastu s použitím speciální formy na odlévání 2 cm vysokého bloku. Příčné 5 μm silné řezy byly připraveny na sáňkovém mikrotomu a natahovány na podložní želatinou-potažená sklíčka. Následné barvení probíhalo na těchto sklíčkách. Pro následnou morfometrickou analýzu bylo použito barvení Luxol Fast Blue a Cresyl Violet. Toto barvení zobrazuje kontrastním způsobem šedou a bílou hmotu míchy i při malém zvětšení, což je výhodné při zakreslování plochy zachovalé tkáně a následné morfometrické měření (Urdžiková, 2006). Rozsah léze byl kvantifikován jako objem zachované bílé a šedé hmoty v poškozeném míšním segmentu. Použili jsme sérii řezů s odstupem 1 mm. Z odebraného segmentu jsme získali sérii cca 20 řezů. V každém z těchto řezů byla obkreslena část zbývající šedé a bílé hmoty, jejichž plochu jsme odměřili pomocí programu pro analýzu obrazu *Image Tool for Windows 2.00*. Sebraná data tvořily v diagramu U křivku, ve které jsme definovali střed léze jako řez, který rozděloval tuto U křivku na co nejsymetričtější poloviny. Pro účely analýzy jsme brali do úvahy jen oblast míchy, ve které byla hlavní oblast léze. Objem zachovalé tkáně v analyzovaném segmentu byl vypočítán jako součet ploch z jednotlivých řezů, vynásobených vzdáleností mezi řezy.

Morfometrická analýza objemu zachovalé šedé a bílé hmoty v místě léze ukázala, že není rozdíl mezi skupinou narkotizovanou 1,5 % a 3 % isofluranem (obr. 6.). Léze u obou skupin vykazovaly hyperintenzivní signál na T2-vážených obrazech, což odpovídalo období formování pseudocystických kavit (obr. 1.). In vivo srovnání velikosti léze mezi oběma skupinami rovněž neprokázalo odlišnosti. V tomto případě se tedy projevilo behaviorální poškození výrazněji a nemělo typický morfologický korelát.



Obr. 6. Oblast zachované šedé hmoty (gray matter) a bílé hmoty (white matter) v mm² v místě léze (area) u potkanů s balónkovou kompresní míšní lézí, narkotizovaných 1,5 % nebo 3 % isofluranem. Mezi těmito dvěma skupinami nebyly nalezeny signifikantní rozdíly.

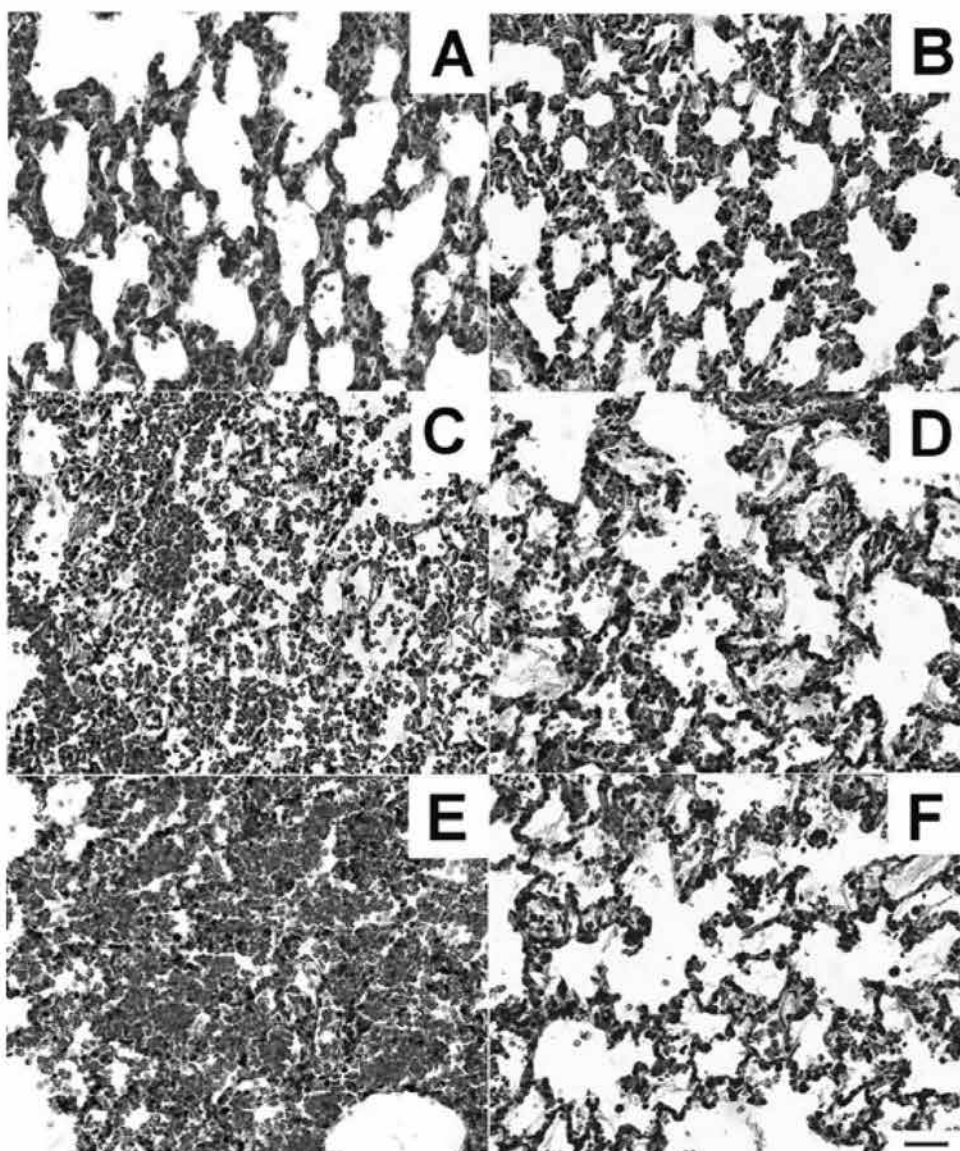
Neurogení plicní edém u modelu transekce míchy

Abychom srovnali efekt jiných typů léze a vyloučili nebo potvrdili efekt míšního hrudního poškození per se, provedli jsme u zvířat narkotizovaných 1,5 % isofluranem úplné ostré přetětí neboli transekci míchy. Výkon byl proveden ve stejné výši jako balónková kompresní míšní léze, tedy v úrovni míšní Th8. V aseptických podmínkách jsme zvíře narkotizovali jako v předchozích případech, provedli 2 cm dlouhou kožní incizi v mediální rovině v oblasti obratlů Th6-Th8. Musculi erectores trunci byly v příslušné výši ostře odříznuty od sloupce processus spinosi a odtaženy laterálně. Lamina vertebralis obratle Th7 byla odstraněna. Následně byla provedena rychlá ostrá transekce míchy pomocí skalpelu.

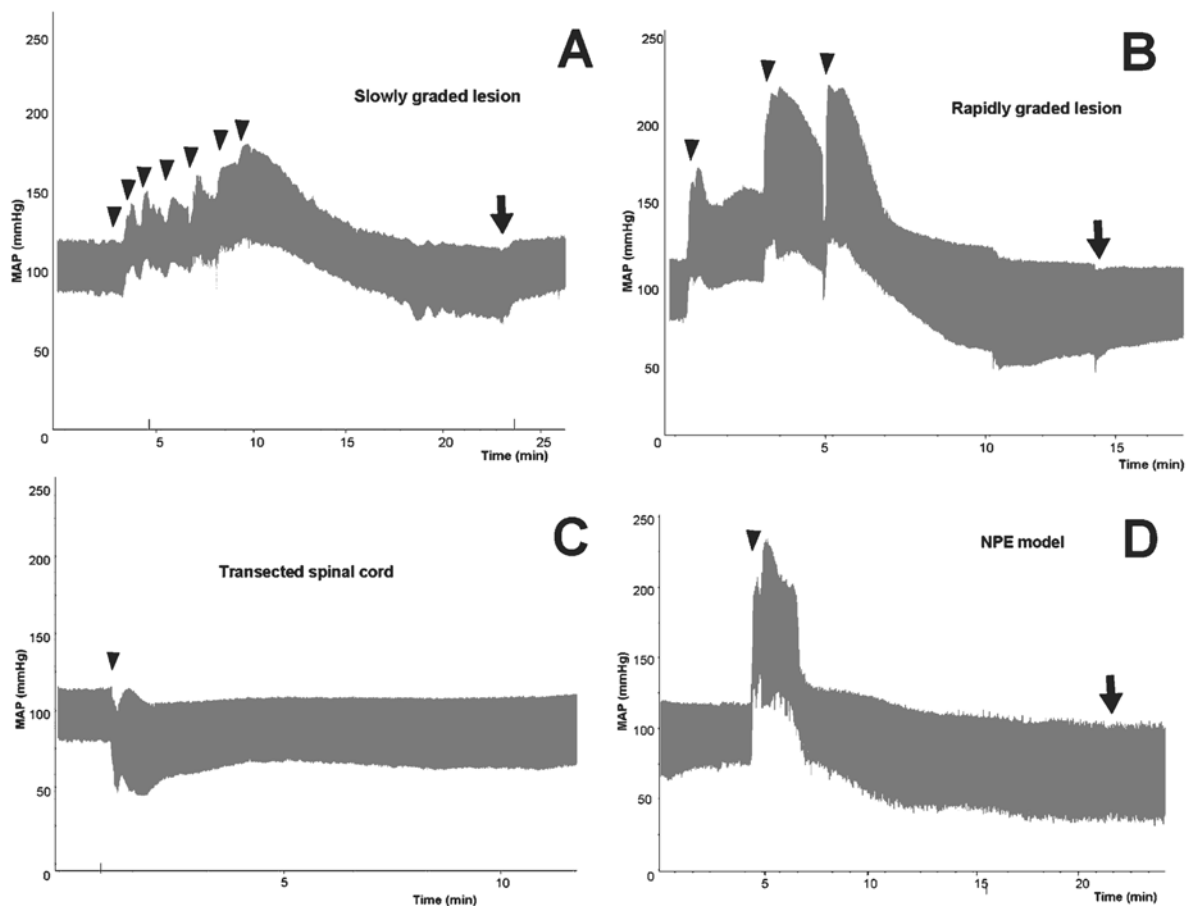
Transekce míchy na stejné úrovni jako balónková kompresní léze nezpůsobovala neurogení plicní edém. U všech zvířat chyběly byť jen náznaky subpleurálního krvácení a plicní index byl srovnatelný s kontrolami. Histologie plicní tkáně neprokázala známky plicního edému (obr. 7., tabulka 11.6.). Transekce míchy nezpůsobila zásadní změny krevního tlaku nebo tepové frekvence. Jako nejdůležitější hemodynamický faktor vnímáme skutečnost, že chybělo ostré zvýšení krevního tlaku a následný hluboký pokles tepové frekvence, jež jsou typické pro balónkovou kompresní míšní lézi (obr. 8.).

Tabulka 11.6. *Tloušťka alveolární stěn (μm) v plicích u modelu NPE, u zvířat s postupným rychlým a pomalým nafukování balónku, u nekompletní komprese míchy, u míšní transekce a u kontrolní skupiny. Statisticky významný rozdíl je označen hvězdičkou ($p < 0,05$). Kontrolní zvířata jsou bez poranění míchy, usmrčená okamžitě po navození anestezie. Relativní změny proti kontrolám jsou uvedeny v závorkách.*

| Skupina | Tloušťka alveolární stěny (μm) |
|---------------|---------------------------------------------|
| NPE model | 94,18 \pm 4,37 * (+161 %) |
| 5-5-5 | 62,61 \pm 4,17 * (+71 %) |
| 3-2-2-2-2-2-2 | 38,62 \pm 2,12 (+5 %) |
| Okamžitý 5 | 37,32 \pm 2,94 (+ 2 %) |
| Okamžitý 10 | 35,99 \pm 1,95 (-2 %) |
| Transekce | 39,63 \pm 3,02 (+8 %) |
| Kontrola | 36,71 \pm 2,57 |



Obr. 7. Změny v histologickém obraze plicní tkáně u potkanů s postupnou balónkovou kompresní míšní lézí nebo transekcí míchy. **A.** Občasné krvácení bez zřetelného plicního edému u potkanů s pomalou postupnou balónkovou kompresní míšní lézí. **B.** Občasné krvácení bez zřetelného plicního edému u potkanů s neúplnou balónkovou kompresní míšní lézí. **C.** Histologické vyšetření plic s obrazem masivního neurogenního plicního edému se ztlustěním alveolárních stěn, intersticiálním plicním edémem a masivním krvácení u potkanů s rychlou postupnou balónkovou kompresní míšní lézí. **D.** Histologický obraz bez známek neurogenního plicního edému u potkanů po provedení transekce míchy. **E.** Histologické vyšetření plic s obrazem masivního neurogenního plicního edému se ztlustěním alveolárních stěn, intersticiálním plicním edémem a masivním krvácení u NPE modelu. **F.** Histologie plicní tkáně u kontrolní skupiny. Měřítko v F = 200 μm .



Obr. 8. Časový průběh křivky krevního tlaku v průběhu celého chirurgického výkonu, balónkové kompresní míšní léze až do dosažení konečných 15 μ l. Každý krok nafouknutí balónku je označen hlavičkou šipky v A,B a D. Šipky ukazují vyfouknutí balónku v A,B a D. **A.** Pomalá postupná balónková kompresní míšní léze. **B.** Rychlá postupná balónková kompresní míšní léze. **C.** Průběh křivky krevního tlaku před, v průběhu a po transekcii míchy (hlavička šipky). **D.** Průběh křivky krevního tlaku u modelu NPE (okamžité nafouknutí balónku na konečný objem 15 μ l). MAP – střední arteriální tlak. Time – čas.

Vliv rychlosti provedení míšní léze na rozvoj neurogenního plicního edému

Při stejném uspořádání experimentu jako v předchozích případech jsme u zvířete narkotizovaného 1,5 % isofluranem provedli rychlé postupné nafouknutí balónku (5 μ l - 5 μ l - 5 μ l), pomalé postupné nafouknutí balónku (3 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l) nebo standardní NPE model (viz výše). Ve všech případech byl balónek nafouknut na finálních 15 μ l. Časový interval mezi každými dvěma nafouknutími byl 30 sekund. Nafouknutí balónku tedy trvalo 1 minutu u rychlého postupného nafouknutí balónku a 3 minuty u pomalého postupného nafouknutí balónku. Kromě toho jsme provedli experiment, kde jsme nafoukli balónek okamžitě na 5 μ l nebo 10 μ l. Ve všech případech byl balónek po dosažení konečného objemu ponechán na místě po dobu 5 minut. Následně byl balónek vyfouknut a vyjmut (Šedý et al., 2009a).

V případech, kdy byl balónek postupně pomalu nafukován (3 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l - 2 μ l), se neurogenní plicní edém nerozvíjel. V 64 % případů zcela chybělo subpleurální krvácení. Ve zbývajících případech dosahovalo Grade I (tabulka 11.7.). Plicní index a průměrné hodnoty tloušťky alveolárních stěn se nelišily signifikantně od kontrol (tabulka 11.7. a 11.6.). Histologický obraz plicní tkáně byl srovnatelný s kontrolou – nebyly zde přítomny téměř žádné známky intraalveolárního nebo intersticiálního edému nebo hemoragií (obr. 7.).

Tabulka 11.7. Poškození plic po poranění míchy u modelu NPE, u zvířat s postupným rychlým a pomalým nafukování balónku, u nekompletní komprese míchy a u míšní transekce. Dokumentována je přítomnost (Grade I-III) nebo chybějící subpleurální krvácení. Každá plíce je posouzena zvlášť a spočítáno procento ze všech plic v dané skupině. Signifikantní ($p < 0,05$) zvýšení plicního indexu (průměr \pm směrodatná odchylka) je označeno hvězdičkou. Výskyt úmrtí na následky neurogenního plicního edému je prezentován jako celkový počet úmrtí a procento ze všech zvířat v dané skupině. Kontrolní zvířata byla bez poranění míchy usmrcena okamžitě po navození anestezie. N – počet potkanů. 2N – počet plic.

| Skupina | N | Chybění (% z 2N) | Grade I (% z 2N) | Grade II (% z 2N) | Grade III (% z 2N) | Plicní index |
|---------------|----|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|------------------|
| NPE model | 19 | - | - | 1 (3 %) | 37 (97 %) | 0,86 \pm 0,09* |
| 5-5-5 | 7 | - | - | 6 (43 %) | 8 (57 %) | 0,77 \pm 0,08* |
| 3-2-2-2-2-2-2 | 14 | 18 (64 %) | 10 (36 %) | - | - | 0,49 \pm 0,03 |
| Okamžitý 5 | 3 | 6 (100 %) | - | - | - | 0,46 \pm 0,04 |
| Okamžitý 10 | 3 | 6 (100 %) | - | - | - | 0,46 \pm 0,03 |
| Transekce | 5 | 10 (100 %) | - | - | - | 0,43 \pm 0,06 |
| Kontrola | 14 | 28 (100 %) | - | - | - | 0,45 \pm 0,02 |

Navzdory tomu, že konečný objem byl stejný jako v předchozím případě, vedlo rychlé postupné nafukování balónku (5 μ l - 5 μ l - 5 μ l) k těžkému neurogennímu plicnímu edému, který byl srovnatelný s plicním edémem, pozorovatelným u standardního modelu NPE. Ačkoli nebyl výskyt subpleurálního krvácení stupně Grade III tak častý jako v případě našeho NPE modelu, byl vždy přítomen alespoň stupeň Grade II (tabulka 11.7.). Podobně se ani hodnoty plicního indexu u skupiny s rychlým postupným nafouknutím balónku signifikantně nelišily od standardního modelu neurogenního plicního edému. Na druhou stranu se tyto hodnoty signifikantně lišily od kontrolních zvířat bez plicního edému ($p = 0,0001$). Mikroskopické vyšetření plicní tkáně prokázalo, že rychlé postupné nafouknutí balónku způsobilo edém alveolární membrány, perforaci

kapilárních stěn, masivní krvácení a únik intravaskulární tekutiny do lumina alveolů – tedy typický obraz neurogenního plicního edému (obr. 7.). Kromě toho jsme zjistili, že průměrná tloušťka alveolárních stěn je u skupiny s rychlým postupným nafouknutím balónku signifikantně vyšší ve srovnání s kontrolou (tabulka 11.6.).

Všechny kroky postupného nafukování balónku byly doprovázeny signifikantním vzestupem středního arteriálního tlaku (tabulka 11.8.). Postupná léze byla doprovázena typickou stupňovitě vzrůstající křivkou středního arteriálního tlaku (obr. 8.). Nepozorovali jsme žádné signifikantní rozdíly ve středním arteriálním tlaku v průběhu a po nafouknutí balónku v páteřním kanálu na konečných 15 μ l mezi skupinou s postupným rychlým a pomalým nafukováním balónku (tabulka 11.8.), a to navzdory tomu, že rozdíl ve stupni neurogenního plicního edému byl mezi těmito dvěma skupinami vysoce signifikantní (tabulka 11.7.) (Šedý et al., 2009a).

Tabulka 11.8. Střední arteriální tlak – bazální hodnoty i hodnoty v příslušných etapách provádění balónkové kompresní míšní léze u NPE modelu a zvířat s pomalým a rychlým postupným prováděním balónkové kompresní míšní léze. Statisticky signifikantní rozdíly (párový Studentův t-test, $p < 0,05$) uvnitř jednotlivých skupin ve vztahu k bazální hodnotě jsou znázorněny hvězdičkou. Relativní procentuální změny oproti bazálním hodnotám jsou vyznačeny v závorkách.

| Střední arteriální tlak (mm Hg) | | | |
|------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| | NPE model | 5-5-5 | 3-2-2-2-2-2 |
| Bazální hodnoty | 85 \pm 6 | 97 \pm 4 | 97 \pm 2 |
| 3 μl | - | - | 108 \pm 4* (+11 %) |
| 5 μl | - | 113 \pm 6* (+16 %) | 130 \pm 6* (+34 %) |
| 7 μl | - | - | 141 \pm 6* (+45 %) |
| 9 μl | - | - | 143 \pm 5* (+47 %) |
| 10 μl | - | 153 \pm 6* (+58 %) | - |
| 11 μl | - | - | 147 \pm 5* (+52 %) |
| 13 μl | - | - | 148 \pm 4* (+53 %) |
| 15 μl | 154 \pm 7* (+81 %) | 155 \pm 3* (+60 %) | 150 \pm 4* (+55 %) |
| 15 μl – bod zvratu | 144 \pm 6* (+69 %) | 138 \pm 3* (+42 %) | 133 \pm 3* (+37 %) |
| Bod zvratu - vyfouknutí | 86 \pm 5 (+1 %) | 90 \pm 4 (-7 %) | 97 \pm 3 (\pm 0 %) |

Rozsah neurogenního plicního edému se více odrážel ve změnách tepové frekvence. U skupiny s rychlým postupným nafukováním balónku, u které se rozvíjel těžký neurogenní plicní edém, byl více vyjádřen pokles krevního tlaku v průběhu nafukování balónku než u skupiny s pomalým postupným nafukováním balónku, kde jsme pozorovali pouze pomalý postupný pokles tepové frekvence (tabulka 11.9.). Kromě toho byly změny tepové frekvence po nafouknutí balónku na konečných 15 μ l více vyjádřeny u skupiny s rychlým postupným nafouknutím balónku než u skupiny s pomalým postupným nafukováním (tabulka 11.9.). Pokud tyto výsledky shrneme, můžeme konstatovat, že čím rychlejší nafouknutí balónku, tím více je vyjádřen pokles tepové frekvence a zároveň i stupeň neurogenního plicního edému (Šedý et al., 2009a).

Tabulka 11.9. *Tepová frekvence – bazální hodnoty i hodnoty v příslušných etapách provádění balónkové kompresní míšňí léze u NPE modelu a zvířat s pomalým a rychlým postupným prováděním balónkové kompresní míšňí léze. Statisticky signifikantní rozdíly (párový Studentův t-test, $p < 0,05$) uvnitř jednotlivých skupin ve vztahu k bazální hodnotě jsou znázorněny hvězdičkou. Relativní procentuální změny oproti bazálním hodnotám jsou vyznačeny v závorkách.*

| Tepová frekvence (bpm) | | | |
|------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | NPE model | 5-5-5 | 3-2-2-2-2-2-2 |
| Bazální hodnoty | 385 \pm 9 | 380 \pm 14 | 410 \pm 5 |
| 3 μl | - | - | 384 \pm 11 (-6 %) |
| 5 μl | - | 364 \pm 16* (-4 %) | 383 \pm 7* (-7 %) |
| 7 μl | - | - | 394 \pm 6 (-4 %) |
| 9 μl | - | - | 394 \pm 8 (-4 %) |
| 10 μl | - | 322 \pm 30* (-15 %) | - |
| 11 μl | - | - | 394 \pm 8 (-4 %) |
| 13 μl | - | - | 391 \pm 8 (-5 %) |
| 15 μl | 253 \pm 30* (-34 %) | 222 \pm 23* (-42 %) | 389 \pm 11 (-5 %) |
| 15 μl – bod zvratu | 313 \pm 21* (-19 %) | 282 \pm 16* (-26 %) | 371 \pm 10* (-10 %) |
| Bod zvratu - vyfouknutí | 361 \pm 11 (-6 %) | 336 \pm 15* (-12 %) | 387 \pm 8 (-6 %) |

Nafouknutí balónku na konečný objem 10 μ l bylo doprovázeno nízkým stupněm svalových kontrakcí, nafouknutí balónku na konečný objem 5 μ l nezpůsobilo prakticky žádnou reakci. Okamžité nafouknutí balónku na 5 μ l nebo 10 μ l nezpůsobilo neurogenní plicní edém. Žádné ze zvířat z těchto dvou skupin nemělo subpleurální krvácení a jejich plicní index nebo průměrná tloušťka alveolárních stěn se signifikantně nelišily od kontrol (tabulka 11.6. a 11.7.).

Je možné konstatovat, že pomalé postupné nafouknutí balónku v hrudním epidurálním prostoru zabrání rozvoji neurogenního plicního edému, pravděpodobně v důsledku adaptace organismu na zvýšený sympatický tonus a následné hemodynamické změny typu redistribuce objemu krve, zvýšení krevního tlaku a aktivace baroreflexu.

Role sympatického nervového systému v rozvoji neurogenního plicního edému

Abychom prokázali vliv sympatického nervového systému na rozvoj neurogenního plicního edému, provedli jsme experiment, při kterém jsme pokusným zvířatům těsně před nafouknutím balónku v hrudním epidurálním prostoru intravenózně aplikovali gangliový blokátor pentolinium v dávce 5 mg/kg. Ostatní parametry operace byly stejné jako v případě NPE modelu (viz výše). Akutní inhibice sympatického nervového systému odstranila vzestup krevního tlaku, indukovaný kompresí hrudní míchy u zvířat narkotizovaných 1,5 % isofluranem. Změny tepové frekvence těchto zvířat byly srovnatelné s odpovědí zvířat narkotizovaných 3 % isofluranem (obr. 4., tabulka 11.4.). Hodnoty plicního indexu ($0,42 \pm 0,01$) indikovaly nepřítomnost neurogenního plicního edému. Zároveň nebylo u těchto zvířat přítomno žádné subpleurální krvácení. Můžeme tedy shrnout, že akutní inhibice sympatického nervového systému, indukovaná pomocí gangliového blokátoru pentolinia těsně před nafouknutím balónku v epidurálním prostoru hrudní míchy, kompletně zabránila rozvoji neurogenního plicního edému (Šedý et al., 2007a). V jiném pokuse jsme sledovali vzestup adrenalinu, noradrenalinu a neuropeptidu Y po nafouknutí balónku v páteřním kanále. Po nafouknutí balónku jsme pozorovali téměř okamžitý 18násobný vzestup hladiny cirkulujícího adrenalinu a 64násobný vzestup hladiny cirkulujícího noradrenalinu. V případě neuropeptidu Y nebyl pozorován zásadní vzestup jeho hladiny. V období zotavení se hladiny katecholaminů opět normalizovaly. Tato data potvrzují klíčovou úlohu sympatického nervového systému v rozvoji NPE.

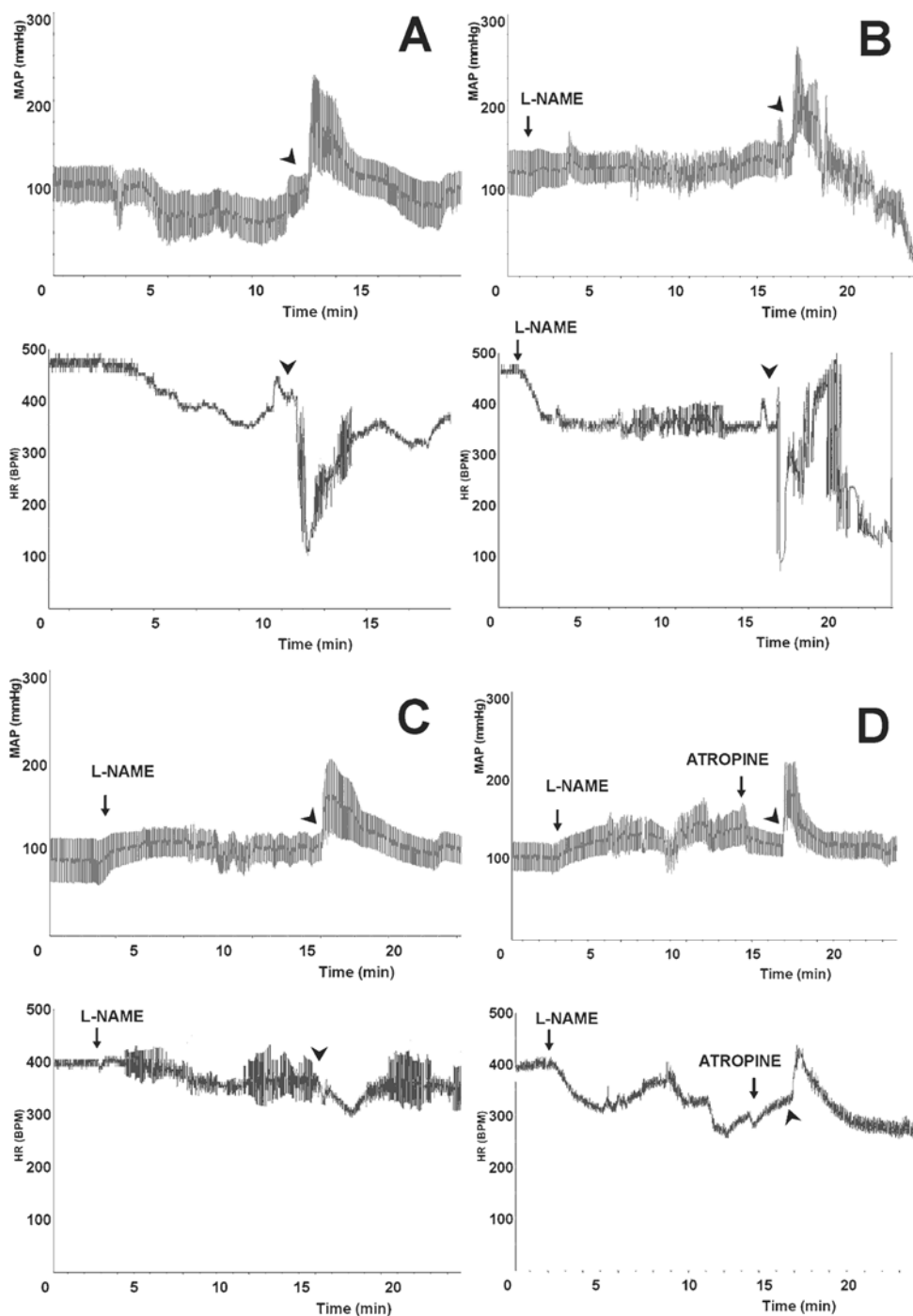
Role oxidu dusnatého v rozvoji neurogenního plicního edému

Cílem této studie bylo i) posoudit roli oxidu dusnatého (NO) při rozvoji neurogenního plicního edému u potkanů s kompresním poraněním míchy a ii) otestovat platnost hypotézy o klíčovém významu baroreflexně indukovaného zpomalení srdečního rytmu, vyskytujícího se krátce po kompresi míchy, na rozvoj neurogenního plicního edému. Použili jsme kompetitivní inhibitor NO-syntázy N^G-nitro-L-arginine (L-NAME), který jsme experimentálním zvířatům podali buď akutně (bezprostředně před poraněním míchy) nebo chronicky (po dobu 4 týdnů před poraněním). Kromě toho jsme některým zvířatům podali atropin (kompetitivní antago-

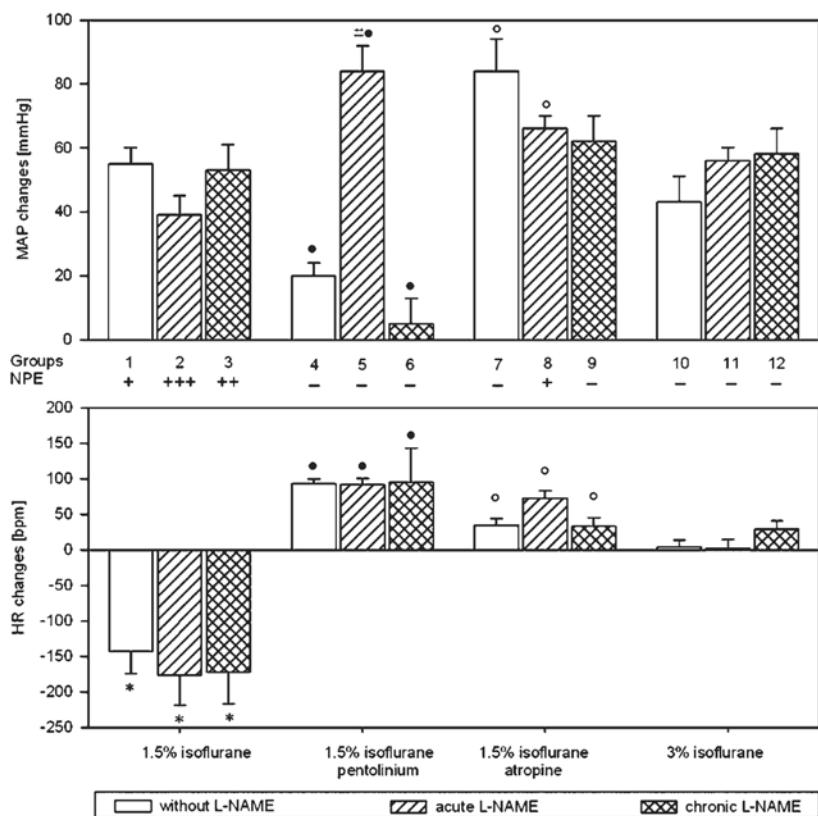
nista muskarinových receptorů) v dávce 4 mg/kg za účelem odstranění baroreflexně indukovaného poklesu tepové frekvence (Šedý et al., 2009c).

Zvířata byla rozdělena do 14 experimentálních skupin v závislosti na následujících kritériích: (1) přítomnost poranění míchy, (2) dávka isofluranové anestezie, (3) akutní nebo chronické podání L-NAME, (4) podání atropinu. Zvířata byla narkotizována buď 1,5 % nebo 3 % isofluranem ve vzduchu (proud anestetické směsi 300 ml/min) a byl jim zaveden arteriální katétr pro kontinuální monitorování krevního tlaku a tepové frekvence do *arteria carotis communis* a zároveň jim byl zaveden centrální žilní katétr pro podání farmak do *vena jugularis interna*. Oba katétrů byly vyvedeny na povrch těla v dorsální části krku a zvíře bylo uloženo do polohy na břicho. Byla provedena balónková kompresní míšň léze a zvíře bylo 10 minut po vyfouknutí balónku usmrceno. Plíce byly posouzeny pomocí plicního indexu, stupně subpleurálního krvácení a histologického obrazu. Kontroly tvořila zdravá zvířata bez poranění, která byla usmrcena okamžitě po nástupu anestezie.

Akutní podání L-NAME před poraněním míchy bylo spojeno s 83 % mortalitou v návaznosti na poranění míchy. Všechna zvířata zemřela v průběhu 10 minut po nafouknutí balónku v epidurálním prostoru hrudní míchy v důsledku rychlého rozvoje neurogenního plicního edému. Několik minut před smrtí se snížila jejich dechová frekvence a začal se rozvíjet "smrtelný chropot". Následně se jejich respirační úsilí zastavilo a po několika sekundách jim z nozder začala vytékat zpěněná krev. Po několika dalších sekundách se jejich srdce zastavilo. Množství vytékající zpěněné krve bylo signifikantně vyšší než v případě modelu NPE. Plicní index byl signifikantně zvýšen jak proti kontrolám, tak proti NPE modelu. Akutní podání L-NAME způsobilo středně významný vzestup krevního tlaku (20 mm Hg), doprovázený přibližně 10 % poklesem tepové frekvence. U těchto zvířat způsobilo pouhé zasunutí balónku do epidurálního prostoru páteřního kanálu mírný vzestup krevního tlaku, pozorovatelný rovněž u zvířat s následným podáním pentolinia nebo atropinu. Akutní podání L-NAME oslabilo vzestup krevního tlaku, avšak zvýraznilo pokles tepové frekvence, který vzestup krevního tlaku krátce po poranění míchy doprovázel (obr. 9B a 10.).



Obr. 9. Časový průběh křivky krevního tlaku (nahore) a tepové frekvence (dole) v průběhu celého chirurgického výkonu, balónkové kompresní míšní léze (hlavička šipky) a fáze zotavení u reprezentativních případů z příslušných experimentálních skupin. A. Balónková kompresní míšní léze u zvířete narkotizovaného 1,5 % isofluranem (NPE model). B. Balónková kompresní míšní léze u zvířat po akutním podání L-NAME, narkotizovaných 1,5 % isofluranem. C. Balónková kompresní míšní léze u zvířat po akutním podání L-NAME, narkotizovaných 3 % isofluranem. D. Balónková kompresní míšní léze u zvířat po akutním podání L-NAME, narkotizovaných 1,5 % isofluranem, léčených atropinem. MAP – střední arteriální tlak. Time – čas.



Obr. 10. Změny krevního tlaku (MAP) a tepové frekvence (HR), způsobené u jednotlivých experimentálních skupin balónkovou kompresní míšní lézí. Data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka. Jednocestný test ANOVA s post-hoc LSD testem ukazují přítomnost signifikantních rozdílů v případě MAP ($F_{11,62} = 10,7$, $LSD = 19$ mm Hg) i HR ($F_{11,62} = 19,9$, $LSD = 69$ bpm). Signifikantní rozdíly ($p < 0,05$): * vs. odpovídající skupina narkotizovaná 3 % isofluranem, # efekt akutního podání L-NAME vs. odpovídající skupina bez L-NAME, • efekt podání pentolinia vs. odpovídající skupina narkotizovaná 1,5 % isofluranem, ° efekt podání atropinu vs. odpovídající skupina narkotizovaná 1,5 % isofluranem.

Chronické podávání L-NAME po dobu 4 týdnů způsobilo střední pokles bazálního krevního tlaku podobně jako v případě akutního podání L-NAME, avšak rozvoj neurogenního plicního edému ovlivnilo výrazně méně než akutní podání L-NAME. Pouze 33 % zvířat s chronicky podávaným L-NAME zemřelo na následky neurogenního plicního edému a jejich plicní index byl signifikantně nižší ve srovnání se zvířaty, kterým byl podáván L-NAME akutně. Nicméně nebyl plicní index významně zvýšen, pokud jsme jej srovnali s plicním indexem zvířat, představujících NPE model. Vzestup krevního tlaku a pokles tepové frekvence v návaznosti na poranění míchy byl srovnatelný se zvířaty po akutním podání L-NAME. Nicméně významný pokles tepové frekvence, doprovázející vzestup krevního tlaku i tak vedl k rozvoji těžkého neurogenního plicního edému u zvířat s poraněním míchy po chronickém podávání L-NAME.

Gangliová blokáda pomocí pentolinia zabránila vzestupu krevního tlaku, bradykardii a rozvoji neurogenního plicního edému u zvířat narkotizovaných 1,5 % isofluranem (viz výše). Tento preventivní účinek jsme rovněž prokázali u zvířat po akutním i chronickém podání L-NAME. Ve skutečnosti nastal u všech zvířat po předchozím podání pentolinia mírný vzestup srdeční frekvence namísto jejího baroreflexně indukovanému poklesu, jako v případě NPE modelu nebo po akutním nebo chronickém podání L-NAME (obr. 10.). Tyto výsledky ukazují na význam poklesu tepové frekvence v terénu vzestupu krevního tlaku na rozvoj neurogenního plicního edému.

Intravenózní podání atropinu v období 2 minut před nafouknutím balónku v páteřním kanálu způsobilo signifikantní pokles krevního tlaku, bez ovlivnění tepové frekvence. U NPE modelu způsobila tato farmakologická intervence kompletní zábranu rozvoje neurogenního plicního edému, zatímco u zvířat po akutním podání L-NAME tento plicní edém výrazně oslabila, což se projevilo signifikantním poklesem mortality i plicního indexu. Na druhou stranu, u zvířat s chronicky podávaným L-NAME zabránilo podání atropinu rozvoji neurogenního plicního edému. Významné bylo, že u všech skupin s podáním atropinu nenaštal pokles tepové frekvence, ačkoli vzestup krevního tlaku, vyskytujících se krátce po poranění míchy, nastal. Vzestup krevního tlaku, indukovaný poraněním míchy, byl u zvířat po podání atropinu významnější, než u zvířat bez podání atropinu (obr. 10.). Po podání atropinu nezpůsobila balónková kompresní míšní léze charakteristickou bradykardii, nýbrž jen hraniční zvýšení tepové frekvence (obr. 9D), která byla méně vyjádřená u zvířat po podání atropinu než u zvířat po podání pentolinia (obr. 10.). Tato studie (Šedý et al., 2009c) prokázala zásadní úlohu reflexní bradykardie na vznik NPE.

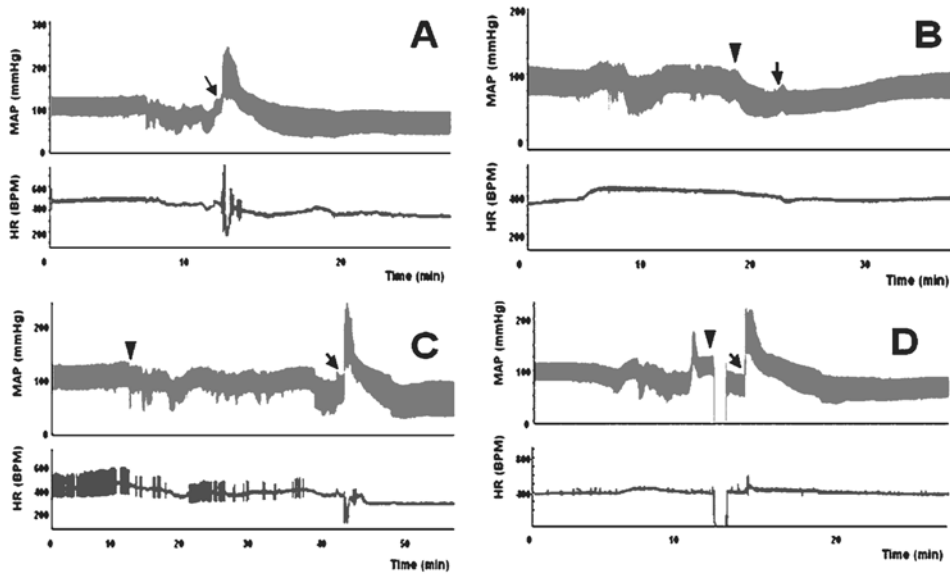
Akutní ani chronické podání L-NAME nezpůsobilo neurogenní plicní edém u zvířat narkotizovaných 3 % isofluranem ve vzduchu. Hodnoty plicního indexu byly nižší u zvířat po podání L-NAME ve srovnání se zvířaty bez podání L-NAME. Navzdory tomu, že se neurogenní plicní edém nerozvinul u žádné ze skupin narkotizovaných 3 % isofluranem (bez ohledu na podání L-NAME), byla změna krevního tlaku podobná jako u odpovídajících skupin, narkotizovaných 1,5 % isofluranem. Důležitým poznatkem však bylo, že tepová frekvence u žádné ze skupin narkotizovaných 3 % isofluranem v návaznosti na poranění míchy nepoklesla, což opět nepřímou potvrzuje klíčovou roli baroreflexně indukované bradykardie v průběhu hypertenzní reakce na rozvoj neurogenního plicního edému.

V dalším experimentu jsme zkoumali, zda je možné neurogennímu plicnímu edému zabránit v období 2 minut po provedení kompresní míšní léze. Pokud jsme v tomto období podali zvířatům atropin v dávce 4 mg/kg, nedokázali jsme zabránit rozvoji neurogenního plicního edému. Plicní index byl stále vysoký ($0,78 \pm 0,04$). U této skupiny jsme pozorovali podobný vzestup krevního tlaku ($+51 \pm 4$ mm Hg) a pokles tepové frekvence (-138 ± 29 bpm) po balónkové kompresní lézi jako u standardního modelu NPE.

Naše výsledky ukazují, že rozvoj neurogenního plicního edému je u zvířat podrobených 1,5 % isofluranové anestezii závislý na výrazném poklesu tepové frekvence v podmínkách vzestupu krevního tlaku, způsobeného aktivací sympatického nervového systému. Tento circulus vitiosus může být přerušen gangliovou blokádou, která oslabí vliv sympatického nervového systému, nebo blokádou muskarinových cholinergních receptorů, která odstraní pokles tepové frekvence. Tyto hemodynamické změny jsou významně vyjádřeny zejména u potkanů po akutním podání inhibitoru NO syntázy. Oxid dusnatý má tedy parciální protektivní vliv na rozvoj neurogenního plicního edému, neboť oslabuje sympatikem řízenou vasokonstriktci, vzestup krevního tlaku a následnou baroreflexně indukovanou bradykardii, které vznikají v návaznosti na poranění míchy. Další výzkum by měl odhalit terapeutické možnosti atropinu a/nebo dalších parasympatolytických látek u jiných modelů neurogenního plicního edému.

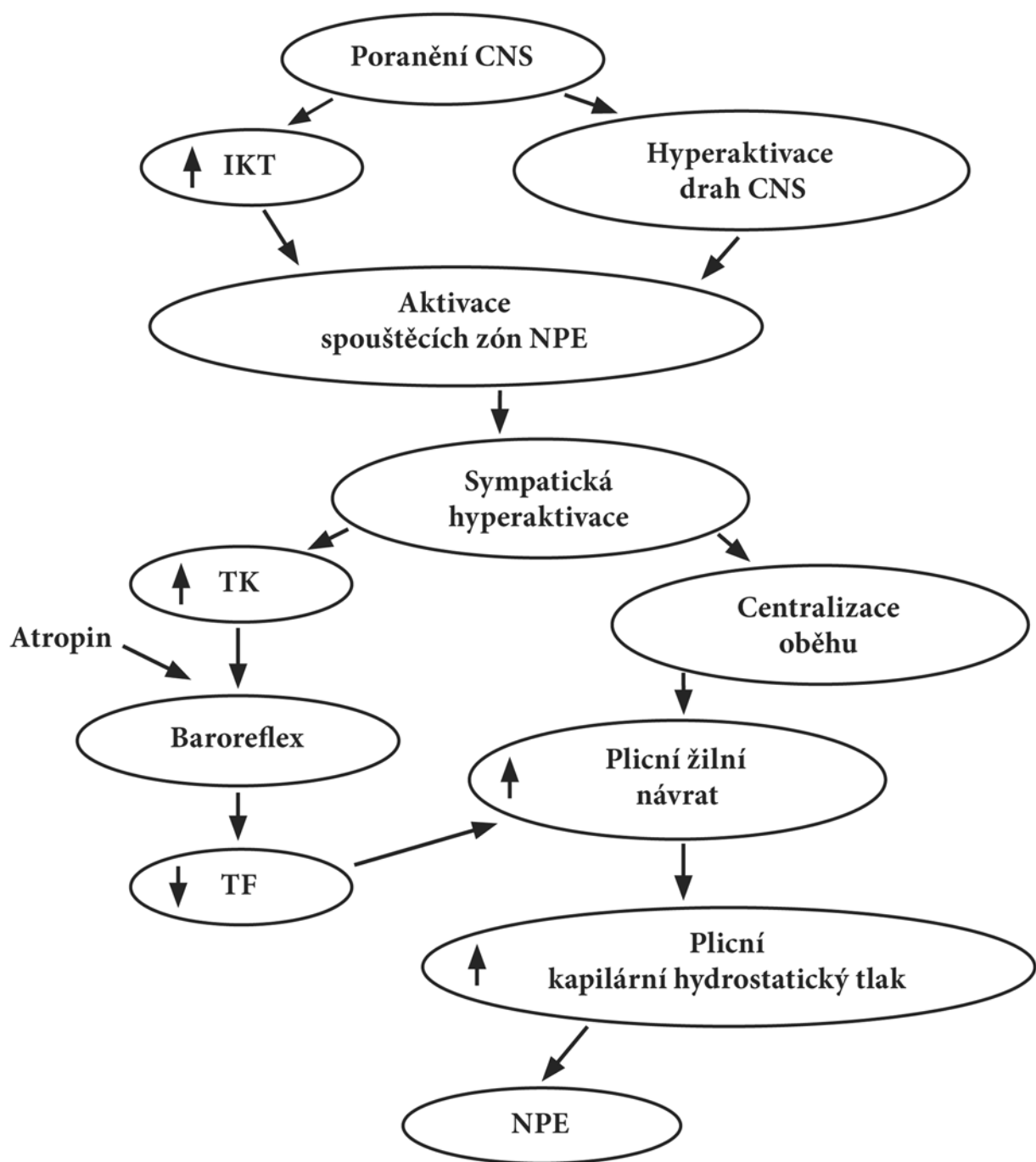
Role hyperaktivace spinálních drah a zvýšeného intrakraniálního tlaku v rozvoji neurogenního plicního edému

V této části jsme zkoumali roli spinálních drah a intrakraniálního tlaku v rozvoji neurogenního plicního edému. Pokud jsme před nafouknutím balónku v páteřním kanálu potkanům aplikovali epidurálně mesocain (10 mg/ml), dokázali jsme rozvoj neurogenního plicního edému zabránit. Ani plicní index ani stupeň subpleurálního krvácení se signifikantně nelišily od kontrolních zvířat. Epidurální anestezie zabránila vzestupu krevního tlaku i poklesu tepové frekvence (obr. 11). Tento výsledek ukazuje, že pro spuštění etiopatogenetické kaskády neurogenního plicního edému je nutná aktivace ascendentních nervových spinálních drah. Podobného výsledku jsme dosáhli preventivním odběrem 10 % žilní krve. U těchto zvířat způsobilo nafouknutí balónku zvýšení krevního tlaku, avšak nikoli pokles tepové frekvence (obr. 11).



Obr. 11. Časový průběh krevního tlaku (nahore, MAP) a tepové frekvence (dole, HR) v průběhu chirurgického výkonu, balónkové kompresní míšní léze (šipky) a zotavovací periody u reprezentativních zvířat z různých experimentálních skupin. Hlavičky šipek ukazují příslušné experimentální zásahy:
A. Zvířata narkotizovaná 1,5 % isofluranem (NPE model)
B. Preventivní epidurální anestezie.
C. Preventivní cervikální dekomprese.
D. Preventivní ztráta 10 % krevního objemu.

Tento výsledek naznačuje, že je zapotřebí určitého volumu krve k dosažení prahové hodnoty pro aktivaci neurogenního plicního edému. Pokud jsme provedli preventivní dekompresi subarachnoidálního prostoru v oblasti krční míchy, nepodařilo se nám neurogennímu plicnímu edému zabránit. Rychlá aktivace spinálních drah se proto zdá být v rozvoji neurogenního plicního edému výrazně klíčovější než náhlý vzestup intrakraniálního tlaku. Na základě všech těchto výsledků byla vytvořena hypotéza vzniku neurogenního plicního edému (obr. 12).



Obr. 12. Hypotéza vzniku neurogenního plicního edému, vytvořená na základě vlastních experimentálních výsledků

11. ZÁVĚR

Neurogení plicní edém je relativně málo častá, avšak závažná klinická jednotka. Poprvé byl popsán Shanahanem v roce 1908 jako komplikace opakovaných epileptických záchvatů. Jeho rozvoj je vázán na závažné poškození centrálního nervového systému. Centrem vzniku neurogeního plicního edému je s největší pravděpodobností skupina jader rostrální ventrolaterální prodloužené míchy, které jej spouští na podkladě kombinace hyperaktivace jejich aferentních drah a náhle zvýšeného intrakraniálního tlaku. V patogenezi neurogeního plicního edému hraje zásadní roli sympatický nervový systém, který spouští rychlou kaskádu dějů, vedoucích k intersticiálnímu a intraalveolárnímu edému, který doplňuje výrazná hemoragická složka. V diagnostice neurogeního plicního edému má zásadní význam fyzikální vyšetření a RTG hrudníku. Diferenciálně diagnostická úvaha není snadná, avšak šance na správnou diagnózu výrazně rostou, pokud lékař dá do souvislosti poškození centrálního nervového systému a plicní potíže. Cílená kurativní léčba neurogeního plicního edému dosud neexistuje, proto je smyslem terapeutických snah zejména léčba podpůrná a symptomatická. Jako nejdůležitější opatření se jeví kontinuální monitorování stavu pacienta, polohování pacienta a podpora ventilace a oxygenace. V současné době existuje několik experimentálních modelů, které je možné využít pro studium etiopatogeneze i léčby neurogeního plicního edému. Hlavním cílem experimentálních snah je získání preventivního a terapeutického přístupu, který umožní zabránit a včas léčit neurogení plicní edém. Z tohoto hlediska je zatím nejvíce slibný atropin.

12. LITERATURA

Aberle R, Wiener P, Webb R. Hydrostatic versus increased permeability pulmonary edema. Diagnosis based on radiographic criteria in critically ill patients. *Radiology* 1988, 168: 73-75.

Ahrens J, Capelle HH, Przemek M. Neurogenic pulmonary edema in a fatal case of subarachnoid hemorrhage. *J Clin Anesth* 2008, 20: 129-132.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995, 12: 1-21.

Baumann A, Audibert G, McDonnell J, Mertes PM. Neurogenic pulmonary edema. *Acta Anaesth scand* 2007, 51: 447-455.

Bergofsky EH. Humoral control of the pulmonary circulation. *Annu Rev Physiol*. 1980, 42: 221-233.

Bjelakovic B, Vukomanovic V, Saranac L, Stefanovic I. ECG changes in 8-year-old boy with pulmonary edema after head injury. *Scientific World Journal* 2006, 6: 571-576.

Blessing WW, West MJ, Chalmers J. Hypertension, bradycardia, and pulmonary edema in the conscious rabbit after brainstem lesions coinciding with the A1 group of catecholamine neurons. *Circ Res* 1981, 49: 949-958.

Bowers RE, McKeen CR, Park BE, Brigham KL. Increased pulmonary vascular permeability follows intracranial hypertension in sheep. *Am Rev Respir Dis*. 1979, 119: 637-641.

Bracken MB. Treatment of acute spinal cord injury with methylprednisolone : results of a multicenter, randomized clinical trial. *J Neurotrauma* 1991, 8: S47-S50.

Bracken MB, Sheprad MJ. Administration of MPS alebo tirilazid mesylate after 24 – 48 hours in a treatment of SCI. Results of the NASICS III. *JAMA* 1997, 277: 1597-1604.

Bramow S, Faber-Rod JC, Jacobsen C, Kutzelnigg A, Patrikios P, Sorensen PS, Lassmann H, Laursen H. Fatal neurogenic pulmonary edema in a patient with progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008, 14: 711-715.

Bratton SL, Davis RL. Acute lung injury in isolated traumatic brain injury. *Neurosurgery*. 1997, 40: 707-712.

Broderick TW, Reinke RT, Goldman E. Salicylate-induced pulmonary edema. *AJR Am J Roentgenol* 1976, 127: 865-866.

Brouwers FM, Lenders JW, Eisenhofer G, Pacak K. Pheochromocytoma as an endocrine emergency. *Rev Endocr Metab Disord* 2003, 4: 121-128.

Bunai Y, Akaza K, Tsujinaka M, Nakamura I, Nagai A, Jiang WX, Mizoguchi Y, Ohya I. Sudden death due to undiagnosed intracranial hemangiopericytoma. *Am J Forensic Med Pathol* 2008, 29: 170-172.

Chang SJ, Yen YS, Huo AP, Lee SS, Huang DF. Acute massive pulmonary hemorrhage after craniotomy in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Microbiol Immunol Infect* 2005, 38: 69-72.

Chen HI, Chai CY. Integration of the cardiovagal mechanism in the medulla oblongata of the cat. *Am J Physiol* 1976, 231: 454-461.

Chen HI, Sun SC, Chai CY. Pulmonary edema and hemorrhage resulting from cerebral compression. *Am J Physiol* 1973, 224: 223-229.

Colgan FJ, Sawa T, Teneyck LG, Izzo JL Jr. Protective effects of beta blockade on pulmonary function when intracranial pressure is elevated. *Crit Care Med* 1983, 11: 368-372.

Colice GL. Neurogenic pulmonary edema. *Am Rev Respir Dis* 1984, 130: 941-948.

Cushing H. Concerning a definitive regulatory mechanism of the vasomotor center which controls blood pressure during cerebral compression. *John Hopkins Hosp Bull* 1901, 12: 290.

Darnell JC, Jay SJ. Recurrent postictal pulmonary edema: a case report and review of the literature. *Epilepsia* 1982, 23: 71-83.

Dauber IM, Weil JV. Lung injury edema in dogs. Influence of sympathetic ablation. *J Clin Invest* 1983, 72: 1977-1986.

Ferini-Strambi L, Filippi M, Martinelli V, Oldani A, Rovaris M, Zucconi M, Comi G, Smirne S. Nocturnal sleep study in multiple sclerosis – correlations with clinical and brain magnetic resonance imaging findings. *J Neurol Sci* 1994, 125: 194-197.

Fisher A, Aboul-Nasr HT. Delayed nonfatal pulmonary edema following subarachnoid hemorrhage. Case report. *J Neurosurg* 1979, 51: 856-859.

Fletcher SJ, Atkinson JD. Use of prone ventilation in neurogenic pulmonary oedema. *Br J Anaesth* 2003, 90: 238-240.

Fontes RB, Aguiar PH, Zanetti MV, Andrade F, Mandel M, Teixeira MJ. Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesthesiol* 2003, 15: 144-150.

Frاند UI, Shim CS, Williams MH Jr. Methadone-induced pulmonary edema. *Ann Intern Med.* 1972, 76: 975-979.

Ganter BG, Jakob SM, Takala J. Pulmonary capillary pressure. A review. *Minerva Anesthesiol* 2006, 72: 21-36.

Guerin C. Ventilation in the prone position in patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2006, 12: 50-54.

Hakim TS, van der Zee H, Malik AB. Effects of sympathetic nerve stimulation on lung fluid and protein exchange. *J Appl Physiol.* 1979, 47: 1025-1030.

Hall SR, Wang L, Milne B, Ford S, Hong M. Intrathecal lidocaine prevents cardiovascular collapse and neurogenic pulmonary edema in a rat model of acute intracranial hypertension. *Anesth Analg* 2002, 94: 948-953

Hoff JT, Nishimura M, Garcia-Uria J, Miranda S. Experimental neurogenic pulmonary edema. Part 1: The role of systemic hypertension. *J Neurosurg* 1981, 54: 627-631.

Hofstetter T, Mirzayan MJ, Krauss JK. Ventriculoperitoneal shunt dysfunction in a patient presenting with neurogenic pulmonary edema. Case report. *J Neurosurg* 2007, 106: 701-703.

Jendelová P, Herynek V, Urdzíkóvá L, Glogarová K, Kroupová J, Andersson B, Bryja V, Burian M, Hájek M, Syková E. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res* 2004, 76: 232-243.

Juba A. Die maligne exacerbation der multiplen Sklerose. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1939, 109: 727-743.

Kithreotis P. Noncardiogenic pulmonary edema, ARDS, acute respiratory failure. *Hellenic Respiratory Society publications* 2000: 452-458.

Krasney JA, Koehler RC. Heart rate and rhythm and intracranial pressure. *Am J Physiol* 1976, 230: 1695-1700.

Lagerkranser M, Pehrsson K, Sylven C. Neurogenic pulmonary oedema: a review of the pathophysiology and clinical and therapeutic implications. *Acta Med Scand* 1982, 212: 267-271.

Landolt CC, Matthay MA, Albertine KH, Roos PJ, Wiener-Kronish JP, Staub NC. Overperfusion, hypoxia, and increased pressure cause only hydrostatic pulmonary edema in anesthetized sheep. *Circ Res* 1983, 52: 335-341.

Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, Cambiucci EC, Metze K, Borges G, Gontijo JA. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* 2005a, 63: 990-996.

Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, Cambiucci EC, Borges G, Gontijo JA, Metze K. Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci Lett* 2005b, 373: 165-170.

Lee JS, Morrow D, Andresen MC, Chang KS. Isoflurane depresses baroreflex control of heart rate in decerebrate rats. *Anesthesiology* 2002, 96: 1214-1222.

Leestma JE, Walczak T, Hughes JR, Kalelkar MB, Teas SS. A prospective study on sudden unexpected death in epilepsy. *Ann Neurol* 1989, 26: 195-203.

Malik AB. Mechanisms of neurogenic pulmonary edema. *Circ Res* 1985, 57: 1-18.

Mancebo J, Fernández R, Blanch L, Rialp G, Gordo F, Ferrer M, Rodríguez F, Garro P, Ricart P, Vallverdú I, Gich I, Castaño J, Saura P, Domínguez G, Bonet A, Albert RK. A multicenter trial of prolonged prone ventilation in severe acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 173: 1233-1239.

Maron MB. A canine model of neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1985, 59: 1019-1025.

Maron MB. Effect of elevated vascular pressure transients on protein permeability in the lung. *J Appl Physiol* 1989, 67: 305-310.

Maron MB. Pulmonary vasoconstriction in a canine model of neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1990, 68: 912-918.

Maron MB. Dose-response relationship between plasma epinephrine concentration and alveolar liquid clearance in dogs. *J Appl Physiol* 1998, 85: 1702-1707.

Maron MB, Holcomb PH, Dawson CA, Rickaby DA, Clough AV, Linehan JH. Edema development and recovery in neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1994, 77: 1155-1163.

Maron MB, Dawson CA. Pulmonary venoconstriction caused by elevated cerebrospinal fluid pressure in the dog. *J Appl Physiol* 1980, 49: 73-78.

Marshall SA, Nyquist P. A Change of Position for Neurogenic Pulmonary Edema. *Neurocrit Care* 2009, 10: 213-217.

McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev* 2002, 26: 91-107.

Milne EN, Pistolesi M, Miniati M, Giuntini C. The radiologic distinction of cardiogenic and noncardiogenic edema. *AJR Am J Roentgenol* 1985, 144: 879-894.

Minnear FL, Connell RS. Prevention of aconitine-induced neurogenic pulmonary edema (NPE) with hypovolemia or methylprednisolone. *J Trauma* 1982, 22: 121-128.

Mulroy JJ, Mickell JJ, Tong TK, Pellock JM. Postictal pulmonary edema in children. *Neurology* 1985, 35: 403-405.

Muroi C, Keller M, Pangalu A, Fortunati M, Yonekawa Y, Keller E. Neurogenic pulmonary edema in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol* 2008, 20: 188-192.

Naveilhan P, Canals JM, Arenas E, Ernfors P. Distinct roles of the Y1 and Y2 receptors on neuropeptide Y-induced sensitization to sedation. *J Neurochem* 2001, 78: 1201-1207.

Naveilhan P, Canals JM, Valjakka A, Vartiainen J, Arenas E, Ernfors P. Neuropeptide Y alters sedation through a hypothalamic Y1-mediated mechanism. *Eur J Neurosci* 2001, 13: 2241-2246.

Nečas E a kol. *Patologická fyziologie orgánových systémů. Část I. Praha – Karolinum, 2009, 379 s.*

Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DK, Rose AG, Reichart B. Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon. *Ann Thorac Surg* 1986, 41: 520-524.

Ohlmacher AP. Acute pulmonary edema as a terminal event in certain forms of epilepsy. *Am J Med Sci* 1910, 139: 417.

Peterson BT, Ross JC, Brigham KL. Effect of naloxone on the pulmonary vascular responses to graded levels of intracranial hypertension in anesthetized sheep. *Am Rev Respir Dis.* 1983, 128: 1024-1029.

Popp AJ, Shah DM, Berman RA, Paloski WH, Newell JC, Cooper JA, Rahm RL, Gottlieb ME, Bourke RS, Malik AB. Delayed pulmonary dysfunction in head-injured patients. *J Neurosurg* 1982, 57: 784-790.

Rassler B. The role of catecholamines in formation and resolution of pulmonary oedema. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targ* 2007, 7: 27-35.

Reis DJ, Doba N, Snyder DW, Nathan MA. Brain lesions and hypertension: chronic lability and elevation of arterial pressure produced by electrolytic lesions and 6-hydroxydopamine treatment of nucleus tractus solitarii (NTS) in rats and cats. *Prog Brain Res* 1977, 47: 169-188.

Reynolds RW. Pulmonary edema as a consequence of hypothalamic lesions in rat. *Science* 1963, 141: 930-932.

Rosell S. Neuronal control of microvessels. *Annu Rev Physiol* 1980, 42: 359.

Roth J, Avneri I, Nimrod A, Kanner AA. Stereotactic biopsy complicated by pneumocephalus and acute pulmonary edema. *Surg Neurol* 2007, 68: 573-576.

Saeki Y, Hasegawa Y, Shibamoto T, Yamaguchi Y, Hayashi T, Tanaka S, Wang HG, Koyama S. The effects of sevoflurane, enflurane, and isoflurane on baroreceptor-sympathetic reflex in rabbits. *Anesth Analg* 1996, 82: 342-348.

Schmitt GH, Meyers FH. Characterization of the acute pulmonary edema that follows vagal section in the guinea pig. *Am J Physiol* 1957, 190: 89-92.

Schubert A. Cardiovascular therapy of neurosurgical patients. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2007, 21: 483-496.

Seow VK, Ko SY, Huang MK, Chong CF. Neurogenic pulmonary oedema misdiagnosed as acute myocardial infarction in a comatose patient. *Ann Acad Med Singapore* 2007, 36: 684-686.

Shanahan WT. Acute pulmonary edema as a complication of epileptic seizures. *N Y Med J*, 1908, 37: 54-56.

Simmons RL, Martin AR, Heisterkamp CA, Ducker TB. Respiratory insufficiency in combat casualties. II. Pulmonary edema following head injury. *Ann Surg* 1969, 170: 39-44.

Simmons RL, Heisterkamp CA 3rd, Collins JA, Bredenberg CE, Mills DE, Martin AM Jr. Respiratory insufficiency in combat casualties. IV. Hypoxemia during convalescence. *Ann Surg* 1969, 170: 53-62.

Simon RP, Gean-Marton AD, Sander JE. Medullary lesion inducing pulmonary edema: a magnetic resonance imaging study. *Ann Neurol* 1991, 30: 727-730.

Simon RP. Neurogenic pulmonary edema. *Neurol Clin* 1993, 11: 309-323.

Smith WS, Matthay MA. Evidence for a hydrostatic mechanism in human neurogenic pulmonary edema. *Chest* 1997, 111: 1326-1333.

Starling EG. *The Linacre Lecture on the Law of the Heart*. London: Longmans, Green and Company. 1918.

Steinberg AD, Karliner JS. The clinical spectrum of heroin pulmonary edema. *Arch Intern Med* 1968, 122: 122-127.

Syková E, Jendelová P. Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Ann N Y Acad Sci* 2005, 1049: 146-160.

Šedý J. Acute spinal ischemia might cause the pulmonary edema. *Am J Emerg Med*. 200a, 26: 963-964.

Šedý J. The rapidity of intracranial pressure increase reflects the grade of neurogenic pulmonary edema. *J Clin Anesth* 2008b, 20: 479.

Šedý J. Possible role of anesthesia level in the development of hypoxia-induced neurogenic pulmonary edema. *Aviat Space Environ Med* 2008c, 79: 924.

Šedý J. Concomittant factors leading to neurogenic pulmonary edema development. *J Neurosurg Anesthesiol* 2009, 21: 67-8.

Šedý J, Urdzíková L, Hejčl A, Burian M, Likavčanová K, Jendelová P, Zicha J, Kuneš J, Syková E. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma* 2007a, 24: 1487-1501.

Šedý J, Urdzíková L, Likavčanová K, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neurosci Lett* 2007b, 423: 167-171.

Šedý J, Likavčanová K, Urdzíková L, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 2008, 70: 308-313.

Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Mechanism of neurogenic pulmonary edema development. *Physiol Res* 2008b, 57: 499-506.

Šedý J, Urdzíková L, Jendelová P, Syková E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev* 2008c, 32: 550-580.

Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Rapid but not slow spinal cord compression elicits neurogenic pulmonary edema in the rat. *Physiol Res* 2009a, 58: 269-277.

Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Syková E. Atropine prevents the neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 2009b, 73: 42-44.

Šedý J, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Syková E. The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats: the effect of preventive interventions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009c, 297: R1111-R1117.

Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998, 56: 341-358.

Tator, C.H., Fehlings, M.G.: (1991) Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*, 75: 15-26.

Thompson RK, Malina S. Dynamic axial brain-stem distortion as a mechanism explaining the cardiorespiratory changes in increased intracranial pressure. *J Neurosurg* 1959, 16: 664-675.

Touho H, Karasawa J, Shishido H, Yamada K, Yamazaki Y. Neurogenic pulmonary edema in the acute stage of hemorrhagic cerebrovascular disease. *Neurosurgery* 1989, 25: 762-768.

Trulock EP. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 155: 789-818.

Urdzíkova L, Jendelová P, Glogarová K, Burian M, Hájek M, Syková E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006, 23: 1379-1391.

Vanický I, Urdzíkova L, Saganová K, Čížková D, Gálik J. Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J Neurotrauma* 2001, 18: 1399-1407.

Vinš P. Plicní edém. *Interní medicína pro praxi* 2003, 11: 540-547.

Weir BK. Pulmonary edema following fatal aneurysm rupture. *J Neurosurg* 1978, 49: 502-507.

West JB, Mathieu-Costello O. Stress failure of pulmonary capillaries in the intensive care setting. *Schweiz Med Wochenschr* 1992, 122: 751-757.

West JB, Mathieu-Costello O. Stress failure of pulmonary capillaries: role in lung and heart disease. *Lancet* 1992, 340: 762-767.

West JB, Mathieu-Costello O. Vulnerability of pulmonary capillaries in heart disease. *Circulation* 1995, 92: 622-631. Review. – fulltext online

West JB, Mathieu-Costello O. Stress-induced injury of pulmonary capillaries. *Proc Assoc Am Physicians* 1998, 110: 506-512.

West JB, Mathieu-Costello O. Structure, strength, failure, and remodeling of the pulmonary blood-gas barrier. *Annu Rev Physiol* 1999, 61: 543-572.

Jiří Šedý
NEUROGENNÍ PLICNÍ EDÉM

Vydalo Spišské vydavateľstvo, Bratislava 2010
1. Vydanie

Grafický dizajn: Monitor Promotion, s.r.o.
Tlač: Ultra Print, s.r.o.

ISBN 978-80-970526-0-7

5. VŠEOBECNÁ DISKUSE

Neurogenní plicní edém je akutně vzniklý, život ohrožující intersticiální a/nebo intraalveolární edém plicní tkáně s výraznou hemoragickou složkou, který vzniká na podkladě předchozího poškození tkáně centrálního nervového systému (Fontes et al., 2003). Vzhledem k jeho „neurogenní“ povaze jej řadíme k nekardiogenním (extrakardiálním) plicním edémům.

Základem naší práce bylo vytvoření snadno proveditelného, reprodukovatelného a spolehlivého modelu neurogenního plicního edému u laboratorního potkana. Jeho hlavní předností je skutečnost, že vychází z poranění centrálního nervového systému, které je navíc provázeno akutním zvýšením sympatické aktivity, což přesně odpovídá situaci u pacientů. Za účelem výzkumu neurogenního plicního edému byla dříve připravena celá řada experimentálních modelů, které však ne vždy zcela vyhovují účelu, pro který byly navrženy. Příkladem jsou modely na bázi vstříkávání fibrinu (Ishikawa et al., 1988), veratrinu (Kondo et al., 2004; Maron, 1985) či akonitinu (Minnear a Connell, 1982) do *cisterna magna*. Zodpovědné za rozvoj plicního edému u těchto modelů je však považováno acetylcholinem zprostředkované zvýšení permeability cév (Bosso et al., 1990) a nikoli hyperaktivace sympatiku, podezřívána z rozvoje neurogenního plicního edému u pacientů (Fontes et al., 2003). Příkladem dalšího modelu je psí model intravenózní injekce kyseliny olejové (Dauber a Weil, 1983), který je ještě méně vhodný, neboť se pohybuje zcela mimo etiopatogenetický kontext. Náš model se pro experimentální studie jeví jako výhodnější, neboť je z patofyziologického hlediska výrazně bližší klinické situaci než jiné modely.

Prokázali jsme, že nízký stupeň isofluranové anestezie umožní rozvoj neurogenního plicního edému u potkanů s poraněním míchy, zatímco vysoký stupeň isofluranové anestezie naopak jeho rozvoji zabrání. I když je třeba tyto a další možnosti ovlivnění plicní tkáně a hemodynamických parametrů isofluranovou anestézií brát v potaz, v případě rozvoje neurogenního plicního edému předpokládáme spíše celkový vliv anestetik na inhibici sympatického nervového systému, jehož náhlá hyperaktivace je zodpovědná za rozvoj neurogenního plicního edému. Na podkladě našich výsledků považujeme za naprosto klíčovou diskusi o působení ostatních anestetik na rozvoj neurogenního plicního edému, což může mít zásadní dopad v klinické medicíně, např. v případě neurochirurgických operací. Recentní práce, vycházející z naší laboratoře (Bencze et al., 2013) ukázala zásadně odlišnou roli jednotlivých typů anestezie na aktivitu sympatiku a hemodynamické parametry, což může ovlivňovat i rozvoj neurogenního plicního edému.

Naše výsledky demonstrují zásadní roli sympatického nervového systému v rozvoji neurogenního plicního edému. Prokázali jsme, že vyřazení sympatického nervového systému pomocí pentolinia zcela zabrání rozvoji neurogenního plicního edému. Podání alfablokátorů prazosinu a yohimbinu bezprostředně před poraněním míchy rovněž dokázalo zabránit rozvoji neurogenního plicního edému. Podobnou studii později provedli na potkanech Lu et al. (2014), kteří pomocí shodné alfa-adrenergní blokády zabránili rozvoji neurogenního plicního edému indukovaného bilaterální lézí *nucleus tractus solitarii*. Z hlediska použití alfa-adrenergní blokády máme již dostupné i klinické výsledky - ve studii Yan et al. (2017) autoři uplatnili úspěšně léčbu alfa-adrenergním blokátorem fentolaminem v léčbě plicního edému u onemocnění rukou, nohou a úst, kde je plicní edém považován za neurogenní, neboť je spouštěn enterovirem 71 podmíněnou aktivací endotelinových receptorů v centrálním nervovém systému (Tu et al., 2015; Yan et al., 2017).

Naopak beta-adrenergní blokáda měla pouze malý efekt, a to jak v našich studiích, tak v pozdější studii Lu et al. (2014). Preventivní efekt podání těchto látek se odrážel i v hemodynamické odpovědi na poranění míchy – u zvířat, kde bylo zabráněno rozvoji neurogenního plicního edému, byla snížena systémová tlaková odpověď a současně byla výrazně redukována až vyřazena baroreflexní bradykardie. S těmito výsledky korelovala dynamika změn plazmatické hladiny katecholaminů. Role sympatického systému při rozvoji neurogenního plicního edému byla přímo i nepřímo prokázána celou řadou experimentů s využitím nejrozličnějších experimentálních modelů. Příkladem je studie Novitzkyho et al. (1986), kteří na opičím modelu zabránili chirurgickou sympatektomií rozvoji neurogenního plicního edému, indukovaného nafouknutím balónku intrakraniálně. Farmakologickým korelátém této studie je naše zjištění, že preventivní podání gangliového blokátoru pentolinia zcela zabrání rozvoji neurogenního plicního edému u potkanů s poraněním míchy ([publikace 1](#)). Celkový pohled na tyto experimenty navíc ukazuje, že čím má pokusné zvíře více rozvinutý autonomní systém, tím pravděpodobněji a tím těžší se rozvine neurogenní plicní edém (Malik, 1985).

Také zjištění baroreflexní bradykardie jako vyvolávajícího faktoru neurogenního plicního edému považujeme za jeden z klíčových bodů výzkumu neurogenního plicního edému. Již dříve bylo pozorováno, že bradykardie vzniká souběžně s vzestupem systémového tlaku (Blessing et al., 1981). Bradykardie také přímo následuje po zvýšení intrakraniálního tlaku. Jádra mozkového kmene, odpovědná za tuto reakci, jsou patrně *nucleus tractus solitarii* a *nucleus ambiguus*. Bradykardii u neurogenního plicního edému je proto možné zrušit pomocí bilaterální vagotomie nebo léze *nucleus dorsalis nervi vagi* (Bosso et al., 1990; Hashiba et al., 1989).

Naše studie rovněž ukázaly zásadní protektivní vliv NO na rozvoj neurogenního plicního edému a zároveň potvrdila klíčovou úlohu sympatiku v jeho rozvoji. Tyto výsledky jsou v souladu s předpoklady jiných autorů. Například Hamdy et al. (2001) ukázali, že injekce inhibitoru NO synthasy L-NAME do *cisterna magna* zhorší rozvoj neurogenního plicního edému, což je ve shodě s naším pozorováním. Mechanismus, který zprostředkuje negativní efekt nedostatku NO na rozvoj neurogenního plicního edému, je pravděpodobně podmíněn chyběním tlumivého působení NO, které by mohlo částečně omezovat sympatikem spouštěnou vazokonstrikci, snižovat vzestup krevního tlaku a tím zmírnit baroreflexně indukovanou bradykardii (Matsumura et al., 1998; Zanzinger et al., 1994, 1995). V naší studii je nejdůležitějším nálezem další prohloubení bradykardie u zvířat s akutně podaným L-NAME, které přesně koreluje s naším předchozím zjištěním o klíčové roli baroreflexní bradykardie ve vývoji neurogenního plicního edému.

Z našich studií vyplývá, že intervence, které nepůsobí náhlou hyperaktivací míšních drah zapojených do regulace sympatiku jako jsou transekce míchy, hemisekce míchy nebo balónková kompresní míšní léze v bederní oblasti míchy, nepůsobí neurogenní plicní edém. Navíc jsme již dříve ukázali, že pouze rychlá a nikoliv pomalá stupňovitá míšní léze je schopná vyvolat neurogenní plicní edém. Celá řada klinických zkušeností ukazuje, že okamžik náhlé hyperaktivace míšních a mozkových nervových drah se úzce shoduje s okamžikem vzniku neurogenního plicního edému (Baumann et al., 2007; Fontes et al., 2003). Je tedy zřejmé, že v rozvoji neurogenního plicního edému hraje roli jak rozsah, tak rychlost působení stimulu. Chen et al. (1973) a Dragosavac et al. (1997) ukázali, že mozková komprese vedla k systémové arteriální hypertenzi a plicnímu edému, přičemž této odpovědi bylo možné zabránit transekcí míchy v úrovni C₇, avšak nikoliv decerebrací. Na druhé straně jsme nepozorovali rozvoj neurogenního plicního edému při nafouknutí balónku v páteřním kanálu v úseku, odpovídajícímu uložení bederní části míchy. Tato skutečnost je pravděpodobně důsledkem chybění sympatických nervových vláken a neuronů na této úrovni míchy. Experimentální data navíc ukazují, že anestezie, aplikovaná v našich studiích epidurálně nad oblast léze, nebo intrathekálně do místa léze ve studii Hall et al. (2002) může rozvoji neurogenního plicního edému zabránit, což je provázeno vymizením hemodynamické odpovědi. Naopak rozvoj neurogenního plicního edému můžeme potencovat, pokud míšní dráhy v této úrovni stimulujeme. Klíčovou roli intrakraniálního tlaku se zatím v sérii našich experimentů nepodařilo prokázat.

Preventivně–terapeutické podání atropinu se jeví jako velmi výhodné pro nízkou finanční náročnost a obecně širokou dostupnost tohoto léčiva na všech úrovních akutní péče. Rovněž

podání jeho vysokých dávek je možné, neboť se jedná o lék široce a často používaný, s dokonale poznanými účinky a lékovými interakcemi. V klinické medicíně může mít lépe aplikovatelný preventivní efekt, neboť časové okno mezi infarktem a rozvojem neurogenního edému je u člověka výrazně delší než u experimentálních zvířat.

6 ZÁVĚRY

- 1.** Nízká koncentrace isofluranu (1,5–2%) má kauzální vztah k rozvoji neurogenního plicního edému, nebo dokonce úmrtí na následky neurogenního plicního edému, u potkanů s provedenou epidurální balónkovou kompresní míšní lézí.
- 2.** Při koncentracích isofluranu vyšších než 4 % včetně, dochází k předávkování anestetikem a úmrtí potkanů, které však není v žádném vztahu s neurogenním plicním edémem.
- 3.** Nejbezpečnější koncentrace isofluranu pro provádění výkonů na míše v experimentu je 2,5–3% koncentrace isofluranu ve vzduchu, při proudu 300 ml inhalační směsi za minutu.
- 4.** Neurogenní plicní edém snižuje stupeň návratu motorických i sensitivních neurologických funkcí. Zatímco se tato skutečnost dobře odráží v behaviorálních testech, morfometricky pozorovatelná není.
- 5.** Získaná experimentální data je možné využít pro přípravu modelu těžkého neurogenního plicního edému u potkanů s poškozením míchy. Z tohoto hlediska se nejlépe jeví využití anestezie 2% isofluranem.
- 6.** Postupné vytváření balónkové kompresní míšní léze, transekce míchy nebo epidurální anestezie předcházející balónkové míšní lézi zabrání rozvoji neurogenního plicního edému.
- 7.** Balónková kompresní míšní léze, provedená za podmínek rozvoje neurogenního plicního edému, vede k signifikantnímu zvýšení hladiny noradrenalinu a adrenalinu v krvi.
- 8.** Rozvoj neurogenního plicního edému zmírní předchozí blokáda alfa-adrenergických receptorů a vápníkových kanálů, méně již využití beta blokátorů. V etiopatogenezi neurogenního plicního edému hraje zásadní roli sympatický nervový systém, zejména alfa-adrenergní a nifedipin senzitivní vazokonstrikce a baroreflex. Neurogenní plicní edém vzniká i u potkanů s hypertenzí, které před jeho rozvojem neochrání ani modulace baroreflexní odpovědi.
- 11.** Na základě dosažených výsledků a podrobného studia literárních pramenů byla formulována hypotéza o patofyziologickém mechanismu možného vlivu nízkých koncentrací anestetika na rozvoj neurogenního plicního edému a vlivu atropinu na rozvoj neurogenního plicního edému.
- 12.** Dosažené výsledky byly shrnuty v přehledových člancích a monografiích.

7 SHRNU TÍ

Neurogenní plicní edém je relativně málo častá, avšak závažná klinická jednotka. Poprvé byl popsán Shanahanem v roce 1908 jako komplikace opakovaných epileptických záchvatů. Jeho rozvoj je vázán na závažné poškození centrálního nervového systému. Centrem vzniku neurogenního plicního edému je s největší pravděpodobností skupina jader rostrální ventrolaterální prodloužené míchy, které jej spouští na podkladě kombinace hyperaktivace jejich aferentních drah a náhle zvýšeného intrakraniálního tlaku. V patogenezi neurogenního plicního edému hraje zásadní roli sympatický nervový systém, který spouští rychlou kaskádu dějů, vedoucích k intersticiálnímu a intraalveolárnímu edému, který doplňuje výrazná hemoragická složka. V diagnostice neurogenního plicního edému má zásadní význam fyzikální vyšetření a RTG hrudníku. Diferenciálně diagnostická úvaha není snadná, avšak šance na správnou diagnózu výrazně rostou, pokud lékař dá do souvislosti poškození centrálního nervového systému a plicní potíže. Cílená kurativní léčba neurogenního plicního edému dosud neexistuje, proto je smyslem terapeutických snah zejména léčba podpůrná a symptomatická. Jako nejdůležitější opatření se jeví kontinuální monitorace stavu pacienta, polohování pacienta a podpora ventilace a oxygenace. V současné době existuje několik experimentálních modelů, které je možné využít pro studium etiopatogeneze i léčby neurogenního plicního edému. Hlavním cílem experimentálních snah je získání preventivního a terapeutického přístupu, který umožní zabránit a včas léčit neurogenní plicní edém. Z tohoto hlediska je zatím nejvíce slibný atropin.

8 SUMMARY

Neurogenic pulmonary edema is a relatively infrequent, but important clinical entity. It was first described by Shanahan in 1908 as a complication of repeated epileptic seizures. Its development is related to severe injury of the central nervous system. The center of neurogenic pulmonary edema is most likely a group of rostral ventrolateral nuclei of the medulla oblongata, which trigger its development on the basis of the hyperactivation of afferent neural pathways and a sudden increase of intracranial pressure. In the pathogenesis of neurogenic pulmonary edema, the sympathetic nervous system plays a major role, starting a cascade of processes that lead to interstitial and intraalveolar edema, together with significant hemorrhage. In the diagnosis of neurogenic pulmonary edema, physical examination and X-ray imaging play a crucial role. The differential diagnosis of neurogenic pulmonary edema is not easy, but the chances of reaching the proper diagnosis are increased when central nervous system injury and pulmonary disturbances are found together. To date, no targeted curative treatment exists, thus therapy is mainly supportive and symptomatic. The most important treatment modalities are the continuous monitoring of the patient's status, the position of the patient and oxygenation and ventilation support. Currently, several neurogenic pulmonary edema models have been developed, which can be used to study the etiopathogenesis and treatment of neurogenic pulmonary edema. The main aim of experiments is to develop a preventive and therapeutic approach, able to prevent and treat neurogenic pulmonary edema. From this point of view, the most suitable is the use of atropine.

9 PLÁNY DO BUDOUCNA

Předkládaná habilitační práce prezentuje výsledky systematického výzkumu problematiky neurogenního plicního edému z let 2005–2015 a jako taková tvoří víceméně uzavřený celek části autorovy experimentální práce. Výzkum neurogenního plicního edému v ČR pokračuje preklinickými a klinickými studii pod vedením as. MUDr. Lukáše Pollerta ve Fakultní nemocnici Motol v Praze, které navazují na autorovy práce ze základního výzkumu a ve kterých autor působí jako konzultant.

Autor si do budoucna také předsevzal orientovat se na zlepšení vědecko-výzkumného i pedagogického profilu svého mateřského Ústavu normální anatomie LF UP v Olomouci. Hodlá především pokračovat v prohlubování jeho spolupráce s klinickými pracovišti, a to zejména: (1) dále rozvinout již úspěšně probíhající spolupráci s MDDr. Radovanem Žižkou, Ph.D. z Kliniky zubního lékařství LF UP v Olomouci, týkající se možností zlepšení regenerace endodontu, (2) pokračovat v úspěšné spolupráci s týmem Doc. MUDr. et MUDr. René Foltána, Ph.D., FEBOMFS ze Stomatologické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze na klinicko-anatomických aspektech ortognátní chirurgie a dalších chirurgických postupů v maxilofaciální oblasti, a v neposlední řadě (3) pokračovat v tvorbě dalších dílů úspěšné oborové monografie „Kompedium stomatologie“. Autor je toho názoru, že prohlubování další spolupráce s klinickými pracovišti skýtá pro Ústav normální anatomie i celou Lékařskou fakultu Univerzity Palackého v Olomouci velký potenciál, o čemž svědčí i dosavadní publikační výstupy, vypracované pod hlavičkou Ústavu normální anatomie LF UP v Olomouci, např.:

1. Žižka R, Buchta T, Voborná I, Harvan L, **Šedý J**. Root maturation in teeth treated by unsuccessful revitalization – two case reports. *J Endod* 2016, 42: 724–729. **IF=3,375**.
(původní práce v nejprestižnějším světovém časopise zabývajícím se problematikou endodoncie).
2. **Šedý J**. Kompedium stomatologie II. Triton – Praha, 2016, 1224 s. ISBN 978–80–7553–220–6.
(II. díl jediné oborové monografie v ČR)

10 LITERATURA

Aberle R, Wiener P, Webb R. Hydrostatic versus increased permeability pulmonary edema. Diagnosis based on radiographic criteria in critically ill patients. *Radiology* 1988, 168: 73–75.

Ahrens J, Capelle HH, Przemec M. Neurogenic pulmonary edema in a fatal case of subarachnoid hemorrhage. *J Clin Anesth* 2008, 20: 129–132.

Anand IS, Prasad BAK, Chugh SS, Rao KRM, Cornfield DN, Milla CE, Singh N, Singh S, Selvamurthy W. Effects of inhaled nitric oxide and oxygen in high-altitude pulmonary edema. *Circ* 1998, 98: 2441–2445.

Ball CM, Phillips RS. *Akutní medicína do kapsy na základě medicíny založené na důkazech*. Grada, Praha, 2004, 196 s.

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 1995, 12: 1–21.

Baumann A, Audibert G, McDonnell J, Mertes PM. Neurogenic pulmonary edema. *Acat Anaest scand* 2007, 51: 447–455.

Bencze M, Behuliak M, Zicha J. The impact of four different classes of anesthetics on the mechanisms of blood pressure regulation in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol Res* 2013, 62: 471–478.

Bergofsky EH. Humoral control of the pulmonary circulation. *Annu Rev Physiol* 1980, 42: 221–233.

Bjelakovic B, Vukomanovic V, Saranac L, Stefanovic I. ECG changes in 8-year-old boy with pulmonary edema after head injury. *Scientific World Journal* 2006, 6: 571–576.

Blanco E, Martins-Pinge M, Oliveira-Sales E, Busnardo C. Involvement of nitric oxide pathways in neurogenic pulmonary edema induced by vagotomy. *Clinics (Sao Paulo)* 2011, 66: 1061–1066.

Blessing WW, West MJ, Chalmers J. Hypertension, bradycardia, and pulmonary edema in the conscious rabbit after brainstem lesions coinciding with the A1 group of catecholamine neurons. *Circ Res* 1981, 49: 949–958.

Bosso FJ, Lang SA, Maron MB. Role of hemodynamics and vagus nerves in development of fibrin-induced pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1990, 69: 2227–2232.

Bowers RE, McKeen CR, Park BE, Brigham KL. Increased pulmonary vascular permeability follows intracranial hypertension in sheep. *Am Rev Respir Dis* 1979, 119: 637–641.

Bouyssou S, Specchi S, Desquilbet L, Pey P. Radiographic appearance of presumed noncardiogenic pulmonary edema and correlation with the underlying cause in dogs and cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2017, 58: 259–265.

Bracken MB. Treatment of acute spinal cord injury with methylprednisolone : results of a multicenter, randomized clinical trial. *J Neurotrauma* 1991, 8: S47–S50.

Bracken MB, Sheprad MJ. Administration of MPS alebo tirilazid mesylate after 24 – 48 hours in a treatment of SCI. Results of the NASICS III. *JAMA* 1997, 277: 1597–1604.

Bramlett HM, Dietrich WD. Long-Term Consequences of Traumatic Brain Injury: Current Status of Potential Mechanisms of Injury and Neurological Outcomes. *J Neurotrauma* 2015, 32: 1834–1848.

Bramow S, Faber-Rod JC, Jacobsen C, Kutzelnigg A, Patrikios P, Sorensen PS, Lassmann H, Laursen H. Fatal neurogenic pulmonary edema in a patient with progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008, 14: 711–715.

- Bratton SL, Davis RL. Acute lung injury in isolated traumatic brain injury. *Neurosurgery* 1997, 40: 707–712
- Bravo G, Hong E, Rojas G, Guízar-Sahagún G. Sympathetic blockade significantly improves cardiovascular alterations immediately after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 2002, 319: 95–98.
- Broderick TW, Reinke RT, Goldman E. Salicylate-induced pulmonary edema. *AJR Am J Roentgenol* 1976, 127: 865–866.
- Brouwers FM, Lenders JW, Eisenhofer G, Pacak K. Pheochromocytoma as an endocrine emergency. *Rev Endocr Metab Disord* 2003, 4: 121–128.
- Brožek G, Herget J, Vízek M. Poznámky k přednáškám z fyziologie. První díl. H+H, Praha, 1999, 229 s.
- Bunai Y, Akaza K, Tsujinaka M, Nakamura I, Nagai A, Jiang WX, Mizoguchi Y, Ohya I. Sudden death due to undiagnosed intracranial hemangiopericytoma. *Am J Forensic Med Pathol* 2008, 29: 170–172.
- Cambria RP, Davison JK, Zannetti S, L'Italien G, Brewster DC, Gertler JP, Moncure AC, LaMuraglia GM, Abbott WM. Clinical experience with epidural cooling for spinal cord protection during thoracic and thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg* 1997, 25: 234–241.
- Colgan FJ, Sawa T, Teneyck LG, Izzo JL Jr. Protective effects of beta blockade on pulmonary function when intracranial pressure is elevated. *Crit Care Med* 1983, 11: 368–372.
- Colice GL. Neurogenic pulmonary edema. *Am Rev Respir Dis* 1984, 130: 941–948.
- Cruz AS, Menezes S, Silva M. Neurogenic pulmonary edema due to ventriculo-atrial shunt dysfunction: a case report. *Braz J Anesthesiol* 2016, 66: 200–203.
- Cushing H. Concerning a definitive regulatory mechanism of the vasomotor center which controls blood pressure during cerebral compression. *John Hopkins Hosp Bull* 1901, 12: 290.
- Čihák R. Anatomie 2. Grada publishing, Praha, 2002, 470 s.
- Dai S, Xue Q, Sun R, Wang S, Li C, Wu Y, Si Q, Hu S. Hemodynamic and nonhemodynamic mechanisms of experimental pulmonary edema in rats and the effect of anisodamine and tetramethylpyrazine. Part 1: Survival rate, pulmonary index, pathological change and pulmonary vascular permeability. *Chin Med Sci J* 1993a, 8: 72–76.
- Dai S, Su S, Cao Y, Sun R, Fan Y, Zhang H, Si Q, Xue Q. Hemodynamic and nonhemodynamic mechanism of experimental pulmonary edema in rats and the effect of anisodamine and tetramethylpyrazine – electron microscopic observation and measurement of pulmonary arterial, pulmonary arterial wedge and systemic arterial pressure (Part 2). *Chin Med Sci J* 1993b, 8: 129–133.
- Darnell JC, Jay SJ. Recurrent postictal pulmonary edema: a case report and review of the literature. *Epilepsia* 1982, 23: 71–83.
- Dauber IM, Weil JV. Lung injury edema in dogs. Influence of sympathetic ablation. *J Clin Invest* 1983, 72: 1977–1986.
- Dostál P et al. Základy umělé plicní ventilace. Maxdorf, Praha, 2005, 292 s.
- Dragosavac D, Falcao ALE, Araújo S, Terzi RGG. Neurogenic pulmonary edema: report of two cases. *Arq Neuropsiquiatr* 1997, 55: 305–309.
- Eliška O, Elišková M. Systematická, topografická a klinická anatomie. VII. Srdce a cévní systém. Karolinum, Praha, 1995, 207 s.
- Ferini-Strambi L, Filippi M, Martinelli V, Oldani A, Rovaris M, Zucconi M, Comi G, Smirne S. Nocturnal sleep study in multiple sclerosis – correlations with clinical and brain magnetic resonance imaging findings. *J Neurol Sci* 1994, 125: 194–197.

- Fisher A, Aboul-Nasr HT. Delayed nonfatal pulmonary edema following subarachnoid hemorrhage. Case report. *J Neurosurg* 1979, 51: 856–859.
- Fletcher SJ, Atkinson JD. Use of prone ventilation in neurogenic pulmonary oedema. *Br J Anaesth* 2003, 90: 238–240.
- Fontes RB, Aguiar PH, Zanetti MV, Andrade F, Mandel M, Teixeira MJ. Acute neurogenic pulmonary edema: case reports and literature review. *J Neurosurg Anesthesiol* 2003, 15: 144–150.
- Frand UI, Shim CS, Williams MH Jr. Methadone-induced pulmonary edema. *Ann Intern Med* 1972, 76: 975–979.
- Ganong WF. *Přehled lékařské fyziologie*. Galén, Praha, 2005, 890 s.
- Ganter BG, Jakob SM, Takala J. Pulmonary capillary pressure. A review. *Minerva Anesthesiol* 2006, 72: 21–36.
- Grim M, Druga R et al. *Základy anatomie*. 4a. Centrální nervový systém. Galén, Karolinum, Praha, 2014, 221 s.
- Grim M, Naňka O, Helekal I. *Atlas anatomie člověka*. Grada, Praha, 2017, 404 s.
- Guerin C. Ventilation in the prone position in patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2006, 12: 50–54.
- Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nature Reviews* 2006, 7: 335–346.
- Hakim TS, van der Zee H, Malik AB. Effects of sympathetic nerve stimulation on lung fluid and protein exchange. *J Appl Physiol* 1979, 47: 1025–1030.
- Hall SR, Wang L, Milne B, Ford S, Hong M. Intrathecal lidocaine prevents cardiovascular collapse and neurogenic pulmonary edema in a rat model of acute intracranial hypertension. *Anesth Analg* 2002, 94: 948–953
- Hamdy O, Nishiwaki K, Yajima M, Murakami HO, Maekawa H, Moy RT, Shimada Y, Hotta Y, Ishikawa N. Presence and quantification of neuropeptide Y in pulmonary edema fluids in rats. *Exp Lung Res* 2000, 26: 137–147.
- Hamdy O, Maekawa H, Shimada Y, Feng GG, Ishikawa N. Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats. *Crit Care Med* 2001, 29: 1222–1228.
- Hashiba Y, Ishikawa N, Sumita T, Takagi K, Hidaka H, Satake T. Capsaicin-sensitive nerves exert an inhibitory effect on the development of fibrin-induced pulmonary edema in rats. *Am Rev Respir Dis* 1989, 140: 652–658.
- Hejčl A, Urdziková L, Šedý J, Lesný P, Příkladný M, Michálek J, Burian M, Hájek M, Zamečník J, Jendelová P, Syková E. Acute and delayed implantation of positively charged 2-hydroxyethyl methacrylate scaffolds in spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg Spine* 2008, 8: 67–73.
- Hejčl A, Lesný P, Příkladný M, Šedý J, Zámečník J, Jendelová P, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 6: 3D hydrogels with positive and negative surface charges and polyelectrolyte complexes in spinal cord injury repair. *J Mater Sci Mater Med* 2009, 20: 1571–1577.
- Hironaga K, Hirooka Y, Matsuo I, Shihara M, Tagawa T, Harasawa Y, Takeshita A. Role of endogenous nitric oxide in the brain stem on the rapid adaptation of baroreflex. *Hypertension* 1998, 31: 27–31.
- Hoff JT, Nishimura M, Garcia-Uria J, Miranda S. Experimental neurogenic pulmonary edema. Part 1: The role of systemic hypertension. *J Neurosurg* 1981, 54: 627–631.

Hofstetter T, Mirzayan MJ, Krauss JK. Ventriculoperitoneal shunt dysfunction in a patient presenting with neurogenic pulmonary edema. Case report. *J Neurosurg* 2007, 106: 701–703.

Hulín I et al. *Hulínova patofyziológia. SAP, Bratislava, 2009, 1288 s.*

Chang SJ, Yen YS, Huo AP, Lee SS, Huang DF. Acute massive pulmonary hemorrhage after craniotomy in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Microbiol Immunol Infect* 2005, 38: 69–72.

Chen HI, Chai CY. Integration of the cardiovagal mechanism in the medulla oblongata of the cat. *Am J Physiol* 1976, 231: 454–461.

Chen HI, Sun SC, Chai CY. Pulmonary edema and hemorrhage resulting from cerebral compression. *Am J Physiol* 1973, 224: 223–229.

Iazzetti PE, Maciel RE. Effects of hyperbaric oxygen on the rat neurogenic pulmonary edema. *Braz J Med Biol Res* 1988, 21: 153–156.

Ishikawa N, Kainuma M, Furuta T, Sato Y. Factors influencing fibrin-induced pulmonary edema. *Jpn J Pharmacol* 1988, 46: 255–260.

Izumida H, Homma K, Sasaki J, Hori S. Pulmonary edema following tonic–clonic seizure. *Acute Med Surg* 2017, 4: 221–222.

Jendelová P, Herynek V, Urdzíkova L, Glogarová K, Kroupová J, Andersson B, Bryja V, Burian M, Hájek M, Syková E. Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J Neurosci Res* 2004, 76: 232–243.

Juba A. Die maligne exacerbation der multiplen Sklerose. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1939, 109: 727–743.

Kennedy JD, Hardin KA, Parikh P, Li CS, Seyal M. Pulmonary edema following generalized tonic clonic seizures is directly associated with seizure duration. *Seizure* 2015, 27: 19–24.

Khademi S, Frye MA, Jeckel KM, Schroeder T, Monnet E, Irwin DC, Cole PA, Bell C, Miller BF, Hamilton KL. Hypoxia mediated pulmonary edema: potential influence of oxidative stress, sympathetic activation and cerebral blood flow. *BMC Physiol* 2015, 9: 4.

Kithreotis P. Noncardiogenic pulmonary edema, ARDS, acute respiratory failure. *Hellenic Respiratory Society publications* 2000: 452–458.

Kondo H, Feng GG, Nishiwaki K, Shimada Y, Hirokawa M, Komatsu T, Yokochi T, Ishikawa N. A role for L-glutamate ionotropic receptors in the development of rat neurogenic pulmonary edema. *Eur J Pharmacol* 2004, 499: 257–263.

Koutsoukou A, Katsiari M, Orfanos SE, Kotanidou A, Daganou M, Kyriakopoulou M, Koulouris NG, Rovina N. Respiratory mechanics in brain injury: A review. *World J Crit Care Med* 2016, 5: 65–73.

Krasney JA, Koehler RC. Heart rate and rhythm and intracranial pressure. *Am J Physiol* 1976, 230: 1695–1700.

Laffon M, Jayr C, Barbry P, Wang Y, Folkesson HG, Pittet JF, Clerici C, Matthay MA. Lidocaine induces a reversible decrease in alveolar epithelial fluid clearance in rats. *Anesthesiology* 2002, 96: 392–399.

Lagerkranser M, Pehrsson K, Sylven C. Neurogenic pulmonary oedema: a review of the pathophysiology and clinical and therapeutic implications. *Acta Med Scand* 1982, 212: 267–271.

- Landolt CC, Matthay MA, Albertine KH, Roos PJ, Wiener-Kronish JP, Staub NC. Overperfusion, hypoxia, and increased pressure cause only hydrostatic pulmonary edema in anesthetized sheep. *Circ Res* 1983, 52: 335–341.
- Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, Cambiucci EC, Metze K, Borges G, Gontijo JA. Hemodynamic parameters and neurogenic pulmonary edema following spinal cord injury: an experimental model. *Arq Neuropsiquiatr* 2005a, 63: 990–996.
- Leal Filho MB, Morandin RC, de Almeida AR, Cambiucci EC, Borges G, Gontijo JA, Metze K. Importance of anesthesia for the genesis of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injury. *Neurosci Lett* 2005b, 373: 165–170.
- Lee JS, Morrow D, Andresen MC, Chang KS. Isoflurane depresses baroreflex control of heart rate in decerebrate rats. *Anesthesiology* 2002, 96: 1214–1222.
- Leestma JE, Walczak T, Hughes JR, Kalelkar MB, Teas SS. A prospective study on sudden unexpected death in epilepsy. *Ann Neurol* 1989, 26: 195–203.
- Lin X, Xu Z, Wang P, Xu Y, Zhang G. Role of PiCCO monitoring for the integrated management of neurogenic pulmonary edema following traumatic brain injury: A case report and literature review. *Exp Ther Med* 2016, 12: 2341–2347.
- Lu WH, Hsieh KS, Lu PJ, Wu YS, Ho WY, Cheng PW, Lai CC, Hsiao M, Tseng CJ. Different impacts of α - and β -blockers in neurogenic hypertension produced by brainstem lesions in rat. *Anesthesiology* 2014, 120: 1192–1204.
- Luize DS, Bosco AF, Bonfante S, de Almeida JM. Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2008, 23: 207–214.
- Mackersie RC, Christensen JM, Pitts LH, Lewis FR. Pulmonary extravascular fluid accumulation following intracranial injury. *J Trauma* 1983, 23: 968–975.
- Macleod AD. Neurogenic pulmonary edema in palliative care. *J Pain Symptom Manage* 2002, 23: 154–156.
- Malik AB. Mechanisms of neurogenic pulmonary edema. *Circ Res* 1985, 57: 1–18.
- Mancebo J, Fernández R, Blanch L, Rialp G, Gordo F, Ferrer M, Rodríguez F, Garro P, Ricart P, Vallverdú I, Gich I, Castaño J, Saura P, Domínguez G, Bonet A, Albert RK. A multicenter trial of prolonged prone ventilation in severe acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 173: 1233–1239.
- Maron MB. A canine model of neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1985, 59: 1019–1025.
- Maron MB. Effect of elevated vascular pressure transients on protein permeability in the lung. *J Appl Physiol* 1989, 67: 305–310.
- Maron MB. Pulmonary vasoconstriction in a canine model of neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1990, 68: 912–918.
- Maron MB. Dose-response relationship between plasma epinephrine concentration and alveolar liquid clearance in dogs. *J Appl Physiol* 1998, 85: 1702–1707.
- Maron MB, Dawson CA. Pulmonary venoconstriction caused by elevated cerebrospinal fluid pressure in the dog. *J Appl Physiol* 1980, 49: 73–78.
- Maron MB, Holcomb PH, Dawson CA, Rickaby DA, Clough AV, Linehan JH. Edema development and recovery in neurogenic pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1994, 77: 1155–1163.

- Marshall SA, Nyquist P. A Change of Position for Neurogenic Pulmonary Edema. *Neurocrit Care* 2009, 10: 213–217.
- Matsumura K, Tsuchihashi T, Fujishima M. Central nitric oxide attenuates the baroreceptor reflex in conscious rabbits. *Am J Physiol* 1998, 274: R1142–R1149.
- McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev* 2002, 26: 91–107.
- Mesquita MB, Moraes-Santos T, Moraes MF. Phenobarbital blocks the lung edema induced by centrally injected tityustoxin in adult Wistar rats. *Neurosci Lett* 2002, 332: 119–122.
- Mierzewska-Schmidt M, Gawecka A. Neurogenic stunned myocardium – do we consider this diagnosis in patients with acute central nervous system injury and acute heart failure? *Anaesthesiol Intensive Ther* 2015, 47: 175–180.
- Milne EN, Pistolesi M, Miniati M, Giuntini C. The radiologic distinction of cardiogenic and noncardiogenic edema. *AJR Am J Roentgenol* 1985, 144: 879–894.
- Minnear FL, Connell RS. Prevention of akonitine-induced neurogenic pulmonary edema (NPE) with hypovolemia or methylprednisolone. *J Trauma* 1982, 22: 121–128.
- Molliex S, Crestani B, Dureuil B, Rolland C, Aubier M, Desmonts JM. Differential effects of isoflurane and i. v. anaesthetic agents on metabolism of alveolar type II cells. *Br J Anaesth* 1999, 82: 767–769.
- Mulroy JJ, Mickell JJ, Tong TK, Pellock JM. Postictal pulmonary edema in children. *Neurology* 1985, 35: 403–405.
- Muroi C, Keller M, Pangalu A, Fortunati M, Yonekawa Y, Keller E. Neurogenic pulmonary edema in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol* 2008, 20: 188–192.
- Nastasovic T, Milakovic B, Marinkovic JE, Grujicic D, Stosic M. Could cardiac biomarkers predict neurogenic pulmonary edema in aneurysmal subarachnoid hemorrhage? *Acta Neurochir (Wien)* 2017, 159: 705–712.
- Nathan MA, Reis DJ. Fulminating arterial hypertension with pulmonary edema from release of adrenomedullary catecholamines after lesions of the anterior hypothalamus in the rat. *Circ Res* 1975, 37: 226–235.
- Naveilhan P, Canals JM, Arenas E, Ernfors P. Distinct roles of the Y1 and Y2 receptors on neuropeptide Y-induced sensitization to sedation. *J Neurochem* 2001, 78: 1201–1207.
- Naveilhan P, Canals JM, Valjakka A, Vartiainen J, Arenas E, Ernfors P. Neuropeptide Y alters sedation through a hypothalamic Y1-mediated mechanism. *Eur J Neurosci* 2001, 13: 2241–2246.
- Nečas E et al. *Patologická fyziologie orgánových systémů. Část I.* Praha, Karolinum, 2009, 379 s.
- Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DK, Rose AG, Reichart B. Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon. *Ann Thorac Surg* 1986, 41: 520–524.
- Ohlmacher AP. Acute pulmonary edema as a terminal event in certain forms of epilepsy. *Am J Med Sci* 1910, 139:417.
- Ochiai H, Yamakawa Y, Kubota E. Deformation of the ventrolateral medulla oblongata by subarachnoid hemorrhage from ruptured vertebral artery aneurysms causes neurogenic pulmonary edema. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2001, 41: 529–534
- Pandey CK, Mathur N, Singh N, Chandola HC. Fulminant pulmonary edema after intramuscular ketamine. *Can J Anaesth* 2000, 47: 894–896.

- Park ES, Son HW, Lee AR, Lee SH, Kim AS, Park SE, Cho YW. Inhaled nitric oxide for the brain dead donor with neurogenic pulmonary edema during anesthesia for organ donation: a case report. *Korean J Anesthesiol* 2014, 67: 133–138.
- Peterson BT, Ross JC, Brigham KL. Effect of naloxone on the pulmonary vascular responses to graded levels of intracranial hypertension in anesthetized sheep. *Am Rev Respir Dis.* 1983, 128: 1024–1029.
- Popp AJ, Shah DM, Berman RA, Paloski WH, Newell JC, Cooper JA, Rahm RL, Gottlieb ME, Bourke RS, Malik AB. Delayed pulmonary dysfunction in head-injured patients. *J Neurosurg* 1982, 57: 784–790.
- Poulat P, Couture R. Increased pulmonary vascular permeability and oedema induced by intrathecally injected endothelins in rat. *Eur J Pharmacol* 1998, 344: 251–259.
- Rassler B. The role of catecholamines in formation and resolution of pulmonary oedema. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targ* 2007, 7: 27–35.
- Reis DJ, Doba N, Snyder DW, Nathan MA. Brain lesions and hypertension: chronic lability and elevation of arterial pressure produced by electrolytic lesions and 6-hydroxydopamine treatment of nucleus tractus solitarius (NTS) in rats and cats. *Prog Brain Res* 1977, 47: 169–188.
- Reynolds RW. Pulmonary edema as a consequence of hypothalamic lesions in rat. *Science* 1963, 141: 930–932.
- Rezaiguia-Delclaux S, Jayr C, Luo DF, Saïdi NE, Meignan M, Duvaldestin P. Halothane and isoflurane decrease alveolar epithelial fluid clearance in rats. *Anesthesiology* 1998, 88: 751–760.
- Rogers FB, Shackford SR, Trevisani GT, Davis JW, Mackersie RC, Hoyt DB. Neurogenic pulmonary edema in fatal and nonfatal head injuries. *J Trauma* 1995, 39: 860–866.
- Rosell S. Neuronal control of microvessels. *Annu Rev Physiol* 1980, 42: 359.
- Roth J, Avneri I, Nimrod A, Kanner AA. Stereotactic biopsy complicated by pneumocephalus and acute pulmonary edema. *Surg Neurol* 2007, 68: 573–576.
- Saeki Y, Hasegawa Y, Shibamoto T, Yamaguchi Y, Hayashi T, Tanaka S, Wang HG, Koyama S. The effects of sevoflurane, enflurane, and isoflurane on baroreceptor-sympathetic reflex in rabbits. *Anesth Analg* 1996, 82: 342–348.
- Sakakibara H, Hashiba Y, Taki K, Kawanishi M, Shimada Y, Ishikawa N. Effects of sympathetic nerve stimulation on lung vascular permeability in the rat. *Am Rev Respir Dis* 1992, 145: 685–692.
- Satoh E, Tagami T, Watanabe A, Matsumoto G, Suzuki G, Onda H, Fuse A, Gemma A, Yokota H. Association between serum lactate levels and early neurogenic pulmonary edema after nontraumatic subarachnoid hemorrhage. *J Nippon Med Sch* 2014, 81: 305–312.
- Schmitt GH, Meyers FH. Characterization of the acute pulmonary edema that follows vagal section in the guinea pig. *Am J Physiol* 1957, 190: 89–92.
- Schoultz TW, DeLuca DC. Alterations in spinal cord norepinephrine levels following experimentally produced trauma in normal and adrenalectomized cats. *Life Sci* 1974, 15: 1485–1495.
- Schubert A. Cardiovascular therapy of neurosurgical patients. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2007, 21: 483–496.
- Seow VK, Ko SY, Huang MK, Chong CF. Neurogenic pulmonary oedema misdiagnosed as acute myocardial infarction in a comatose patient. *Ann Acad Med Singapore* 2007, 36: 684–686.
- Shanahan WT. Acute pulmonary edema as a complication of epileptic seizures. *N Y Med J*, 1908, 37: 54–56.

- Simard JM, Popovich PG, Tsybalyuk O, Gerzanich V. Spinal cord injury with unilateral versus bilateral primary hemorrhage - effects of glibenclamide. *Exp Neurol* 2012, 233: 829–835.
- Simmons RL, Martin AR, Heisterkamp CA, Ducker TB. Respiratory insufficiency in combat casualties. II. Pulmonary edema following head injury. *Ann Surg* 1969a, 170: 39–44.
- Simmons RL, Heisterkamp CA 3rd, Collins JA, Bredenberg CE, Mills DE, Martin AM Jr. Respiratory insufficiency in combat casualties. IV. Hypoxemia during convalescence. *Ann Surg* 1969b, 170: 53–62.
- Simon RP, Gean-Marton AD, Sander JE. Medullary lesion inducing pulmonary edema: a magnetic resonance imaging study. *Ann Neurol* 1991, 30: 727–730.
- Simon RP. Neurogenic pulmonary edema. *Neurol Clin* 1993, 11: 309–323.
- Smith WS, Matthay MA. Evidence for a hydrostatic mechanism in human neurogenic pulmonary edema. *Chest* 1997, 111: 1326–1333.
- Starling EG. *The Linacre Lecture on the Law of the Heart*. London: Longmans, Green and Company. 1918.
- Steinberg AD, Karliner JS. The clinical spectrum of heroin pulmonary edema. *Arch Intern Med* 1968, 122: 122–127.
- Syková E, Jendelová P. Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Ann N Y Acad Sci* 2005, 1049: 146–160.
- Syková E, Jendelová P: Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener Dis* 2006, 3: 62–67.
- Syková E, Homola A, Mazanec R, Lachmann H, Konrádová SL, Kobylka P, Pádr R, Neuwirth J, Komrská V, Vávra V, Stulík J, Bojar M. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant* 2006, 15: 675–687.
- Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998, 56: 341–358.
- Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991, 75: 15–26.
- Theodore J, Robin ED. Speculations on neurogenic pulmonary edema. *Am Rev Respir Dis* 1976, 113: 405–411.
- Thompson RK, Malina S. Dynamic axial brain–stem distortion as a mechanism explaining the cardiorespiratory changes in increased intracranial pressure. *J Neurosurg* 1959, 16: 664–675.
- Touho H, Karasawa J, Shishido H, Yamada K, Yamazaki Y. Neurogenic pulmonary edema in the acute stage of hemorrhagic cerebrovascular disease. *Neurosurgery* 1989, 25: 762–768.
- Trulock EP. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, 155: 789–818.
- Tu YF, Lin CH, Lee HT, Yan JJ, Sze CI, Chou YP, Ho CJ, Huang CC. Elevated cerebrospinal fluid endothelin 1 associated with neurogenic pulmonary edema in children with enterovirus 71 encephalitis. *Int J Infect Dis* 2015, 34: 105–111.
- Tzelepis GE, McCool FD. Respiratory dysfunction in multiple sclerosis. *Respir Med* 2015, 109: 671–679.
- Urdziková L, Jendelová P, Glogarová K, Burian M, Hájek M, Syková E. Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006, 23: 1379–1391.

- Vanický I, Urdzíkova L, Saganová K, Čížková D, Gálik J. Simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation of the rat. *J Neurotrauma* 2001, 18: 1399–1407.
- Vinš P. Plicní edém. *Interní medicína pro praxi* 2003, 11: 540–547.
- Weir BK. Pulmonary edema following fatal aneurysm rupture. *J Neurosurg* 1978, 49: 502–507.
- Weiss G, Meyer F. Neurogenic pulmonary edema induced by subarachnoid hemorrhage: case report on diagnostic and therapeutic implications. *Polsko Przegląd Chirurgiczny* 2015, 87: 189–193.
- West JB, Mathieu-Costello O. Stress failure of pulmonary capillaries in the intensive care setting. *Schweiz Med Wochenschr* 1992a, 122: 751–757.
- West JB, Mathieu-Costello O. Stress failure of pulmonary capillaries: role in lung and heart disease. *Lancet* 1992b, 340: 762–767.
- West JB, Mathieu-Costello O. Vulnerability of pulmonary capillaries in heart disease. *Circulation* 1995, 92: 622–631.
- West JB, Mathieu-Costello O. Stress-induced injury of pulmonary capillaries. *Proc Assoc Am Physicians* 1998, 110: 506–512.
- West JB, Mathieu-Costello O. Structure, strength, failure, and remodeling of the pulmonary blood–gas barrier. *Annu Rev Physiol* 1999, 61: 543–572.
- Wiener-Kronish JP, Gropper MA. Halogenated anesthetics and the injured lung: clouds on the horizon? *Anesthesiology* 1998, 88: 1435–1436.
- Williams PL, Bannister H. (Eds.). *Gray`s anatomy*. 38th Ed. New York: Churchill Livingstone, 1995, 1314 p.
- Yan Z, Shang Y, Li F, Xie F, Qian H, Zhang Y, Yue B. Therapeutic efficacy of phentolamine in the management of severe hand, foot and mouth disease combined with pulmonary edema. *Exp Ther Med* 2017, 13: 1403–1407.
- Zanzinger J, Czachurski J, Seller H. Inhibition of sympathetic vasoconstriction is a major principle of vasodilation by nitric oxide in vivo. *Circ Res* 1994, 75: 1073–1077.
- Zanzinger J, Czachurski J, Seller H. Inhibition of basal and reflex-mediated sympathetic activity in RVLM by nitric oxide. *Am J Physiol* 1995, 268: R958–R962.
- Zhang L, Yao J, Zhang T, Jin J, Zeng X, Yue Z. Stellate ganglion block may prevent the development of neurogenic pulmonary edema and improve its outcome. *Med Hypotheses* 2013, 80: 158–161.

11. PŘEHLED PUBLIKACÍ AUTORA

A. Práce vztahující se k habilitační práci:

- [1] **Šedý J**, Urdzíkova L, Hejčl A, Burian M, Likavčanová K, Jendelová P, Zicha J, Kuneš J, Syková E. Low concentration of isoflurane promotes the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Neurotrauma* 2007, 24: 1487–1501. **IF=3,640**
- [2] **Šedý J**, Urdzíkova L, Likavčanová K, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. A new model of severe neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *Neurosci Lett* 2007, 423: 167–171. **IF=2,085**
- [3] **Šedý J**, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Rapid but not slow spinal cord compression elicits neurogenic pulmonary edema in the rat. *Physiol Res* 2009, 58: 269–277. **IF=1,505**
- [4] **Šedý J**, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Syková E. The role of nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats: the effect of preventive interventions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009, 297: R1111–R1117. **IF=3,272**
- [5] **Šedý J**, Zicha J, Nedvídková J, Kuneš J. The role of sympathetic nervous system in the development of neurogenic pulmonary edema in spinal cord injured rats. *J Appl Physiol* 2012, 112:1–8. **IF=1,225**
- [6] **Šedý J**, Zicha J, Kuneš J. Neurogenic pulmonary edema induced by spinal cord injury in spontaneously hypertensive and Dahl salt hypertensive rats. *Physiol Res* 2011, 60: 975–979. **IF=1,653.**
- [7] **Šedý J**, Likavčanová K, Urdzíkova L, Zicha J, Kuneš J, Hejčl A, Jendelová P, Syková E. Low degree of anesthesia increases the risk of neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 2008, 70: 308–313. **IF=1,416**
- [8] **Šedý J**, Zicha J, Kuneš J, Syková E. Atropine prevents the neurogenic pulmonary edema development. *Med Hypotheses* 2009, 73: 42–44. **IF=1,276**
- [9] **Šedý J**, Zicha J, Kuneš J, Jendelová P, Syková E. Mechanism of neurogenic pulmonary edema development. *Physiol Res* 2008, 57: 499–506. **IF=1,653**
- [10] **Šedý J**, Zicha J, Kuneš J. Pathogenetic mechanisms of neurogenic pulmonary edema. *J Neurotrauma* 2015, 32: 1135–1145. **IF=1,653**
- [11] **Šedý J**, Urdzíkova L, Jendelová P, Syková E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neurosci Biobehav Rev* 2008, 32: 550–580. **IF=7,804.**
- [12] **Šedý J**. Neurogenní plicní edém. *Čas Lék Čes* 2011, 150: 147–155.
- [13] **Šedý J**. Neurogenní plicní edém. Spišské vydavatelstvo, Bratislava, 2011, 91 s. ISBN 978–80–970526–0–7. Recenze: Dr. Zicha, prof. Syková.

B. Ostatní práce autora (výběr; abstrakta nezahrnuta):

- [1] **Šedý J**, Szeder V, Walro JM, Ren ZG, Naňka O, Tessarollo L, Sieber–Blum M, Grim M a Kucera J. Pacinian corpuscle development involves multiple Trk signaling pathways. *Dev Dyn* 2004, 231:551–563. **IF = 2,868.**
- [2] Adámek S, Libánský P, Naňka O, **Šedý J**, Pafko P. Surgical Therapy of Primary Hyperparathyroidism and its Complications. Experience with 453 Patients. *ZentralblChir* 2005, 130:109–113. **IF=0,331.**
- [3] **Šedý J**, Naňka O, Walro JM, Belišová M, Jarolím L. Sulcus nervi dorsalis penis/clitoridis : Anatomic structure and clinical significance. *Eur Urol* 2006, 50: 1079–1085. **IF=4,850.**
- [4] **Šedý J**, Tseng S, Walro JM, Grim M, Kucera J. ETS transcription factor ER81 is required for the Pacinian corpuscle development. *Dev Dyn* 2006, 235:1081–1089. **IF=3,169.**
- [5] Li LY, Wang Z, **Šedý J**, Qauzi R, Walro JM, Frank E, Kucera J. Neurotrophin–3 ameliorates sensory–motor deficits in Er81–deficient mice. *Dev Dyn* 2006, 235:3039–3050. **IF=3,169.**
- [6] Naňka O, **Šedý J**, Jarolím L. Sulcus nervi dorsalis penis: site of origin of Alcock’s syndrome in bicycle riders? *Med Hypotheses* 2007, 69:1040–5. **IF=1,276.**
- [7] Hardy WR, Li LY, Wang Z, **Šedý J**, Fawcett J, Frank E, Kucera J, Pawson T. Combinatorial ShcA docking interactions support diversity in tissue morphogenesis. *Science* 2007, 317: 251–256. **IF=26,372.**
- [8] Hejčl A, Urdzíkova L, **Šedý J**, Lesný P, Přádný M, Michálek J, Burian M, Hájek M, Zámečník J, Jendelová P, Syková E. Acute and delayed implantation of positively charged HEMA scaffolds in spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg Spine* 2008, 8: 67–73. **IF=1,403.**

- [9] Foltán R, Hoffmannová J, Donev F, Vlk M, Šedý J, Kufa R, Bulík O. The Impact of Le Fort I Advancement and Bilateral Sagittal Split Osteotomy Setback on Ventilation during Sleep. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009, 38:1036–1040. **IF=1,225.**
- [10] Libánský P, Astl J, Adámek S, Naňka O, Pařko P, Špačková J, Foltán R, Šedý J*. Surgical Treatment of primary hyperparathyroidism in children: report of 10 cases. *Int J Pediatr Otorinolaryngol* 2008 72:1177–1182. **IF=1,118.**
- [11] Foltán R, Klíma K, Špačková J, Šedý J*. Mechanism of traumatic neuroma development. *Med Hypotheses* 2008, 71: 572–576. **IF=1,416.**
- [12] Jarolím L, Šedý J, Schmidt M, Naňka O, Foltán R, Kawaciuk I. Gender reassignment surgery in male-to-female transsexualism: a retrospective 3 month follow-up study with anatomical remarks. *J Sex Med* 2009, 6: 1635–1644. **IF=6,199.**
- [13] Hejčl A, Lesný P, Příkladný M, Šedý J, Zámečník J, Jendelová P, Michálek J, Syková E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 6: 3D hydrogels with positive and negative surface charges and polyelectrolyte complexes in spinal cord injury repair. *J Mater Sci Mater Med* 2009, 20:1571–1577. **IF=1,581.**
- [14] Šedý J, Foltán R, Horká E, Špačková J, Dušková J. Mechanism of increased mortality in hemodialysed patients with periodontitis. *Med Hypotheses* 2010, 74: 374–376. **IF=1,276.**
- [15] Šedý J, Horká E, Pavlíková G, Bulík O, Foltán R. Myosin heavy chain proteins are responsible for the development of obstructive sleep apnea syndrome. *Med Hypotheses* 2009, 73: 1014–1016. **IF=1,276.**
- [16] Hejčl A, Šedý J, Kapcalová M, Arboleda Toro D, Amemori T, Lesný P, Likavčanová–Mašínová K, Burian M, Krumbholcová E, Příkladný M, Michálek J, Hájek M, Jendelová P, Syková E. HPMA–RGD hydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury. *Stem Cell Dev* 2010,19: 1535–1546. **IF=3,273.**
- [17] Hoffmannová J, Foltán R, Vlk M, Šipoš M, Horká E, Pavlíková G, Kufa R, Bulík O, Šedý J. Hemimandibulectomy and therapeutic neck dissection with Radiotherapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma involving mandible: a critical review of treatment protocol in the years 1994–2004. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010, 39: 561–567. **IF=1,225.**
- [18] Hanzelka T, Foltán R, Horká E, Šedý J. The reduction of negative influence of patient motion on quality of CBCT scan. *Med Hypotheses* 2010, 75: 610–612. **IF=1,276.**
- [19] Foltán R, Hoffmannová J, Pavlíková G, Hanzelka T, Klíma K, Horká E, Adámek S, Šedý J*. The Influence of orthognathic surgery on ventilation during sleep. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011, 40: 146–149. **IF=1,225.**
- [20] Urdziková L, Likavčanová–Mašínová K, Vaněček V, Růžička J, Šedý J, Syková E, Jendelová P. FLT3 ligand synergizes with granulocyte–colony stimulating factor in bone marrow mobilization to improve functional outcome after spinal cord injury in the rat. *Cytotherapy* 2011, 13:1090–104. **IF=2,204.**
- [21] Hanzelka T, Foltán R, Pavlíková G, Horká E, Šedý J*. The role of intraoperative positioning of the inferior alveolar nerve on postoperative paresthesia after bilateral sagittal split osteotomy of the mandible – prospective clinical study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011, 40:901–916. **IF=1,225.**
- [22] Pavlíková G, Foltán R, Burian M, Horká E, Adámek S, Hejčl A, Hanzelka T, Šedý J*. Piezosurgery prevents brain tissue damage: an experimental study on a new rat model. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011; 40: 840–844. **IF=1,225.**
- [23] Machoň V, Šedý J*, Klíma K, Hirjak D, Foltán R. Arthroscopic lysis and lavage in patients with temporomandibular anterior disc displacement without reduction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012, 41: 109–113. **IF=1,225.**
- [24] Vaněček V, Klíma K, Kohout A, Foltán R, Jiroušek O, Šedý J, Štulík J, Syková E, Jendelová P. The combination of mesenchymal stem cells and a bone scaffold in the treatment of vertebral body defects. *Eur Spine J* 2013, 22: 2777–2786. **IF=2,133.**
- [25] Hanzelka T, Dušek J, Ocásek F, Kučera J, Šedý J, Beneš J, Pavlíková G, Foltán R. Movement of the patient and the cone beam computed tomography scanner: objectives and possible solutions. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol* 2013, 116: 769–773. **IF=1,265.**
- [26] Klíma K, Vaněček V, Kohout A, Jiroušek O, Foltán R, Štulík J, Machoň V, Pavlíková G, Jendelová P, Syková E, Šedý J*. Stem cells regenerative properties on new rat spinal fusion model. *Physiol. Res.* 64: 119–128, 2015. **IF=1,487.**
- [27] Polanecký O, Adámek S, Šedý J, Skořepa J, Hladík P, Smejkal M, Pařko P, Lischke R. Postoperative rectal anastomotic complications. *Bratisl Lek Listy* 2014, 115: 781–785. **IF=0,345.**
- [28] Žižka R, Buchta T, Voborná I, Harvan L, Šedý J. Root maturation in teeth treated by unsuccessful revitalization – two case reports. *J Endod* 2016, 42: 724–729. **IF=3,375.**

- [29] Libánský P, Adámek S, Broulík P, Fialová M, Kubinyi J, **Šedý J**, Pafko P, Yershov D, Lischke R. Measurement of intact parathormone during operation for primary hyperparathyroidism. *Bratisl Med J* 2017, 118: 255–257. **IF=0,68.**
- [30] **Šedý J**, Naňka O, Špačková J, Jarolím L. Clinical implications of a close vicinity of nervus dorsalis penis/clitoridis and os pubis. *J Sex Med* 2008, 5: 1572–1581. **IF=5,393.**
- [31] Pavlíková G, Foltán R, Horká M, Hanzelka T, Borunská H, **Šedý J***. Piezosurgery in oral and maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011, 40: 451–457. **IF=1,225.**
- [32] Žižka R, **Šedý J**. Paradigm shift from stem cells to cell–regenerative endodontic procedures: a critical review. *Stem Cells Dev* 2017, 26: 147–153. **IF=3,777.**
- [33] **Šedý J**. An incidental finding of the accessory inferior thyroid artery. *Internat J Anat Variat* 2008, 1: 10–11.
- [34] Foltán R, **Šedý J***. Behavioral changes of patients after orthognathic surgery develop on the basis of the loss of vomeronasal organ. *Head Face Med* 2009, 5: 5.
- [35] Jarolím L, **Šedý J**, Jerie J, Naňka O, Kawaciuk I. Metody a výsledky chirurgické konverze pohlaví u pacientů s mužským transsexualismem. *Urológia* 14,2008,2,8–13.
- [36] Horká E, Foltán R, Hanzelka T, Pavlíková G, Klíma K, **Šedý J***. Etiopathogenesis of post–endodontic periapical scar formation. *Dent Hypotheses* 2012, 3: 5–15.
- [37] Machoň V, Řehořová M, **Šedý J**, Foltán R. Platelet–rich plasma in temporomandibular joint osteoarthritis therapy: a 3–month follow–up pilot study. *J Arthritis* 2013, 2: 2.
- [38] **Šedý J**. Sulcus nervi dorsalis penis/clitoridis: anatomical and clinical implications. *Neuroanatomy* 2007, 8: 58–62.
- [39] Naňka O, **Šedý J**, Vítková I, Libánský P, Adámek S. Surgical anatomy of parathyroid glands with emphasis on parathyroidectomy. *Prague Med Rep* 2006, 107:261–272.
- [40] **Šedý J**, Naňka O, Walro JM, Špačková J, Jarolím L. Sulcus nervi dorsalis penis/clitoridis: Nový marker pohlavního dimorfismu os pubis. *Čes Urol* 2006, 1: 48–54.
- [41] Libánský P, Broulík P, Křížová H, Naňka O, Pozniak J, **Šedý J**, Adámek S. Význam předoperačních a peroperačních lokalizačních vyšetření u primární hyperparathyreózy. *DMEV* 2006, 2: 78–82.
- [42] Naňka O, Libánský P, **Šedý J**, Pozniak J, Adámek S. Chirurgicko–anatomická studie jako součást problematiky operačního řešení primární hyperparathyreózy. *Rozhl Chir* 2006, 85: 618–623.
- [43] Naňka O, **Šedý J**, Jarolím L. Sulcus nervi dorsalis penis/clitoridis: its reliability as a character for gender determination of isolated human pubic bones. *Prague Med Rep* 2007;108:167–176.
- [44] Adámek S, Libánský P, Kabát J, **Šedý J**, Pafko P, Naňka O. Problematika reoperací pro perzistující a rekurentní primární hyperparatyreózu. *Rozhl Chir* 2007, 86: 150–154.
- [45] **Šedý J**, Navrátilová B. Blokáda nervus alveolaris inferior u 284 pacientů se semiretinovanými a retinovanými dolními zuby moudrosti: naše zkušenosti. *Čes Stomatologie* 2008, 108: 4–8.
- [46] Libánský P, Adámek S, **Šedý J**, Pafko P, Naňka O. Miniinvazivní videoasistovaná parathyroidektomie – naše první zkušenosti. *Rozhl Chir* 2007, 86: 457–460.
- [47] Libánský P, Astl J, Adámek S, Naňka O, Pafko P, Špačková J, Foltán R, **Šedý J***. Ectopic parathyroid adenoma in child. *Prague Med Rep* 2008, 109: 200–203.
- [48] Jarolím L, **Šedý J**, Marek Schmidt, Jan Jerie, Kateřina Bartoníčková, Matúš Chocholatý. Anatomické aspekty chirurgické konverze pohlaví u pacientek s male–to–female transsexualismem a výsledky hodnocené tři měsíce po výkonu. *Čes Urol* 2010, 14: 55–63.
- [49] Horká E, Foltán R, Hanzelka T, **Šedý J**. Využití cone beam CT v endodoncii. *LKS* 2011, 21: 56–61.
- [50] **Šedý J**, Horká E, Horká M. Torus mandibularis. *LKS* 2012, 22: 16–19.
- [51] **Šedý J**. Příčina neúspěchu anestezie prvního dolního moláru. *LKS* 2011, 21: 78–79.
- [52] Hanzelka T, Kučera J, **Šedý J**, Beneš J, Foltán R. Redukce artefaktů podmíněných pohybem pacienta na CBCT vyšetření. *LKS* 2013, 23: 102–105.
- [53] Libánský P, Broulík P, Fialová M, Kubinyi J, Lischke R, Táborská D, Tvrdoň J, **Šedý J**, Adámek S. Videothorakoskopické odstranění mediastinálně uloženého adenomu příštítného tělíska při primární hyperparathyreóze. *Rozhl Chir* 2016, 95: 245–248.
- [54] Žižka R, **Šedý J**, Voborná I. Jak úspěšně napravit neúspěch. Test 9: Dentální traumatologie. *LKS* 2016, 26: 197–199.
- [55] Žižka R, **Šedý J**, Škrdlant J. Jak úspěšně napravit neúspěch. Test 11: Špatně diagnostikovaná pulpoparodontální léze. *LKS* 2016, 26: 247–249.
- [56] Žižka R, **Šedý J**, Škrdlant J, Voborná I. Ortográdní mikrochirurgické ošetření dens invaginatus. *LKS* 2017, 27: 76–78.
- [57] Žižka R, Škrdlant J, **Šedý J**. Jak úspěšně napravit neúspěch. Test 17: Endodoncie – komplikace při opracování kořenových kanálků. *LKS* 2017, 27: 117–120.

- [58] Žižka R, Mutňanský J, **Šedý J**. Jak úspěšně napravit neúspěch. Test 18: Mikrochirurgické retrográdní endodontické ošetření. LKS, 2017, 27: 145–147.
- [59] Jarolím L, Teršipová L, Rejchrt M, Schmidt M, Kaliská V, Pročková M, Bartoníčková K, Hanek P, **Šedý J**, Naňka O. Transsexualizmus a chirurgická konverze pohlaví. Urol List 2006, 4: 36–42.
- [60] **Šedý J**, Naňka O, Jarolím L. Sulcus nervi dorsalis penis/clitoridis: klinické a forensní aspekty. Čas Lék Česk 2006, 145: 844–847.
- [61] **Šedý J**, Naňka O, Špačková J, Jarolím. Klinická anatomie sulcus nervi dorsalis penis/clitoridis. Urol Listy 2007, 3: 22–25.
- [62] Pavlíková G, Foltán R, Horká E, Hanzelka T, **Šedý J***. Piezochirurgie v orální a maxilofaciální oblasti. Čes Stomatol 2010, 110: 33–40.
- [63] **Šedý J**. Primární hyperparatyreóza: patofyziologie a význam pro praxi. LKS, 2014, 24: 56 – 62.
- [64] Žižka R, **Šedý J**, Škrdlant J, Němcová N. Maturogeneze část 1. Úvod, anatomie, kmenové buňky, tkáňové faktory, vnitřní matrice. Čes Stomat 2016, 116: 20–26.
- [65] Žižka R, **Šedý J**, Škrdlant J, Anděl T, Němcová N. Maturogeneze část 2. Výplachové protokoly, medikace uvnitř kanálku. Prakt Zub Lék 2016, 64: 19–24.
- [66] Žižka R, **Šedý J**, Škrdlant J, Němcová N, Buchta T. 1 Maturogeneze část 3. Klinický protokol. Prakt Zub Lék 2016, 64: 39–45.
- [67] Žižka R, **Šedý J**, Škrdlant J, Němcová N. Apexlokátor v praxi zubního lékaře. LKS 2016, 26: 162–166.
- [68] Foltán R, Pavlíková G, Klíma K, Hoffmanová J, Vlk M, **Šedý J**. Způsoby náhrady kostních defektů v implantologii. Stomatochirurgický občasník ČSČHS 2008: 5–8.
- [69] **Šedý J**, Foltán R, Pánek T. Nové pohledy na funkci temporomandibulárního skloubení. Progresdent 2012, 5: 16–23.
- [70] **Šedý J**, Borunská H, Kučera J. Klasifikace ortodontických anomálií. 1. část: anomálie zubů. Progresdent 2013, 2: 18–29.
- [71] **Šedý J**, Borunská H, Kučera J. Klasifikace ortodontických anomálií. 2. část: anomálie skupin zubů. Progresdent 2013, 3–4: 28–37.
- [72] **Šedý J**. Chirurgická anatomie hernií. Triton 2007. 120 s. ISBN 978–80–7254–923–8. Recenze: prof. Pešková, prof. Eliška.
- [73] **Šedý J** et al. Klinická anatomie penisu. Triton 2010, 88 s. ISBN: 978–80–7387–320–2. Recenze: Dr. Navrátil, Doc. Naňka.
- [74] **Šedý J**. Kompendium stomatologie I. Triton – Praha, 2012, 1196 s. ISBN 978–80–7387–543–5. Recenze: kolektiv 59 recenzentů.
- [75] **Šedý J**. Kompendium stomatologie II. Triton – Praha, 2016, 1224 s. ISBN 978–80–7553–220–6. Recenze: kolektiv 19 recenzentů.
- [76] Adámek S, Naňka O, **Šedý J**, Libánský P, Vítková I. Vlastní výsledky, sestavy a kazuistiky pacientů operovaných pro primární hyperparathyreózu. In: Primární hyperparathyreóza – diagnostika a terapie. Adámek S, Naňka O (Eds.). Galén, Praha, 2006: 159–176. ISBN 80–7262–440–7.
- [77] Adámek S, **Šedý J**. Transplantace a replantace přístítných tělísek. In: Primární hyperparathyreóza – diagnostika a terapie. Adámek S, Naňka O (Eds.). Galén, Praha, 2006: 177–180. ISBN 80–7262–440–7.
- [78] Adámek S, **Šedý J**, Naňka O, Libánský P, Vítková I. Chirurgicko–anatomická studie. In: Primární hyperparathyreóza – diagnostika a terapie. Adámek S, Naňka O (Eds.). Galén, Praha, 2006: 181–192. ISBN 80–7262–440–7.
- [79] **Šedý J**. Anatomie a fyziologie čelistního kloubu. In: Machoň V, Hirjak D et al. Atlas léčby onemocnění temporomandibulárního kloubu. Triton, Praha, 2014: 12–23. ISBN 9788073878078.
- [80] **Šedý J**. Význam NT3/TrkC signalizace pro vývoj Paciniho tělísek u myši. 2002. Sborník prací 3. studentské vědecké konference 1. LF UK. Praha. str. 38–42.
- [81] **Šedý J**. Klinická anatomie přístítných žláz. 2003. Sborník prací 4. studentské vědecké konference 1. LF UK. Praha. str. 63–66.
- [82] **Šedý J**. Nadměrná exprese neurotrophinu–3 ve svalech myši s vyřazeným genem *Er81* zachrání axonální projekce proprioceptivních neuronů k motoneuronům. 2003. Sborník prací 4. studentské vědecké konference 1. LF UK. Praha. str. 54–57.
- [83] **Šedý J**. Role neurotrophinů a jejich receptorů ve vývoji Paciniho tělísek. 2004. Sborník prací 5. studentské vědecké konference 1. LF UK. Praha. str. 45–48.
- [84] **Šedý J**. Close proximity of pubic bone and dorsal nerve of penis/clitoris: a pathogenic factor in a sub–group of patients with pudendal nerve entrapment syndrome? Neurourol Urodyn 2007, 27: 96. IF= 2,671.

- [85] Šedý J. An additional site of pudendal nerve compression? *Neurophysiol Clin* 2008, 38: 145. **IF=1,160.**
- [86] Šedý J. Acute spinal ischemia might cause the pulmonary edema. *Am J Emerg Med.* 2008, 26: 963–964. **IF=1,188.**
- [87] Šedý J. The rapidity of intracranial pressure increase reflects the grade of neurogenic pulmonary edema. *J Clin Anesth* 2008, 20: 479. **IF=1,351.**
- [88] Šedý J. Re: Variations of the internal pudendal artery as a congenital contributing factor to age at onset of erectile dysfunction in Japanese. *BJU Int* 2008, 102: 259. **IF=2,704.**
- [89] Šedý J. Possible role of anesthesia level in the development of hypoxia-induced neurogenic pulmonary edema. *Aviat Space Environ Med* 2008, 79: 924. **IF=0,774.**
- [90] Šedý J. Concomittant factors leading to neurogenic pulmonary edema development. *J Neurosurg Anesthesiol* 2009, 21: 67–8. **IF=2,530.**
- [91] Šedý J. Elevation of parathormone levels in children who underwent parathyroidectomy for hyperparathyroidism. *Arch Surg* 2009, 144: 92–93. **IF=3,485.**
- [92] Šedý J. Re: Severe haemoptysis associated with seizures in a dog. *N Z Vet J.* 2008, 56: 252. **IF=0,890.**
- [93] Šedý J. Glut-1 expression confirms the reactive nature of traumatic neuroma. *Oral Dis* 2009; 15: 244. **IF=1,945.**
- [94] Šedý J. Re: Vaze et al.: Determining course of dorsal nerve of clitoris. *Urology* 2009, 73: 684. **IF=2,134.**
- [95] Šedý J. Successful treatment of traumatic neuroma. *World J Surg* 2009, 33: 1782. **IF=1,778.**
- [96] Šedý J. The danger of publishing „unnamed“ in anatomy. *Br J Oral Maxillofac Surg.* In press. **IF=0,834.**
- [97] Šedý J. Significant difference between apples and pears. *Physiol Res* 2010, 59: 145. **IF=1,653.**
- [98] Šedý J. Etiopathogenesis of neurogenic pulmonary edema. *Wien Med Wochenschr* 2010, 160: 152–154. **IF=0,747.**
- [99] Šedý J. Traumatic neuroma and scar tissue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010, 39: 310. **IF=1,359.**
- [100] Foltán R, Šedý J. The influence of orthognathic surgery on upper airway function is still unknown. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endodont* 2011, 111: 3. **IF=1,265.**
- [101] Šedý J, Foltán R. The origin of traumatic neuroma development. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011, 40: 125–126. **IF=1,359.**
- [102] Šedý J, Foltán R. The impact of maxillary advancement on breathing parameters in class III patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012, 41: 410–411. **IF=1,359.**
- [103] Šedý J, Foltán R. Time dependency of traumatic neuroma development: Comments on "Reduction of posttraumatic neuroma and epineural scar formation in rat sciatic nerve by application of microcrystalline chitosan". *Microsurgery* 2012, 32: 590. **IF=2,421.**
- [104] Šedý J. Intravenous lumen prevents traumatic neuroma development. *J Bone Joint Surg Br Online*, 10 Sep 2009. **IF=3,35.**
- [105] Šedý J, Skalná M. Incidental finding of multiple Pacinian neuroma in hand. *Journal of Dermatology* 2015; 42: 1–2. **IF=2,354.**
- [106] Šedý J. Úloha neurotrofinů a ETS faktorů ve vývoji mechanoreceptorů. Diplomová práce. Obhajoba 7. 7. 2004. Oponenti: prof. Šonka, prof. Druga. Výborně.
- [107] Šedý J. Úloha isofluranu při rozvoji neurogenního plicního edému u potkanů s poškozenou míchou. Diplomová práce na 1. LF UK v rámci studia Zubního lékařství. Obhajoba 10. 9. 2007. Oponenti: prof. Farghalli, prof. Vízek. Výborně.
- [108] Šedý J. Neurogenní plicní edém u potkanů s poraněním míchy. Disertační práce na 2. LF UK. Obhajoba 6. 10. 2008. Oponenti: prof. Rokyta, prof. Herget.
- [109] Šedý J. Možnosti zefektivnění provozu privátní stomatologické ordinace – vliv poskytování slev příbuzným a známým. Diplomová práce na Czech Management Institute Prague, ESMA, obor MBA. Obhajoba 2. 3. 2011. Oponenti: ing. Boráková, ing. Sýkora.
- [110] Šedý J. The Entrapment of Dorsal Nerve of Penis/Clitoris Under the Pubis: An Alternative Source of Pudendal Neuralgia. *Pain Physician* 2008, 11: 381–381. **IF=4,766.**
- [111] Šedý J, Foltán R. *Klinická anatomie zubů a čelistí.* Triton, Praha, 2010, 175 s. ISBN 978–80–7387–312–7. Recenze: prof. Mazánek.
- [112] Šedý J. *Zubař nejlepší přítel člověka.* ALMI, Brno, 2014, 139 s. Populárně–naučná monografie. ISBN 9788087494103.
- [113] Šedý J. Česká republika má zástupce v ADI. *LKS* 2011, 21: S109.
- [114] Šedý J. Substituční hormonální léčba zabraňuje ztrátě zubů u postmenopauzálních žen. *LKS* 2017, 27: 18.

- [115] **Šedý J.** Proteomická analýza zubů jako předpoklad rezistence vůči zubnímu kazu. LKS 2017, 27: 66.
- [116] **Šedý J.** Composite inlays and onlays. Recenze. LKS 2017, 27: 97.
- [117] **Šedý J,** Žižka R. Zánětlivé faktory parodontitidy – nové objevy švédských autorů. LKS 2017, 27: 121.
- [118] **Šedý J.** Úspěch autologních kostních štěpů v implantologii. LKS 2017, 27: 152.
- [119] Žižka R, Krejčí P, **Šedý J.** Porovnání terapie stálých zubů s nedokončeným vývojem a nekrotickou dření apexifikací hydroxidem vápenatým a maturogenezí. Čes Stomatol 2017, 117: 52–59.
- [120] **Šedý J.** Anatomie zubů. Galén, Praha. V tisku. Recenze: dr. Žižka.
- [121] **Šedý J,** Žižka R. Orofacial anatomy. Galén, Praha. V tisku. Recenze: Mr. Guy Haydon, doc. Miklošová, doc. Naňka.

12. Udělená ocenění

| | Typ ocenění | Důvod | Rok |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1. | 2. místo na 3. studentské vědecké konferenci 1. LF UK | Ocenění studentské vědecké práce | 2002 |
| 2. | 1. místo na 4. studentské vědecké konferenci 1. LF UK | Ocenění studentské vědecké práce | 2003 |
| 3. | 2. místo na 4. studentské vědecké konferenci 1. LF UK | Ocenění studentské vědecké práce | 2003 |
| 4. | 3. místo na Slovenské a České studentské vědecké konferenci lékařských fakult | Ocenění studentské vědecké práce | 2003 |
| 5. | 1. místo na 5. studentské vědecké konferenci 1. LF UK | Ocenění studentské vědecké práce | 2004 |
| 6. | Výroční cena České Anatomické společnosti za nejlepší publikaci roku 2004 | Nejlepší anatomická publikace | 2005 |
| 7. | Cena za nejlepší poster kongresu ČUS ČLS JEP 2005 v Praze (spoluautor) | Cena za popis klinické anatomie chirurgické léčby transsexualismu | 2005 |
| 8. | Cena České Společnosti pro Neurovědy za nejlepší publikaci roku 2004 | Cena za molekulární popis vývoje mechanoreceptorů | 2005 |
| 9. | Cena České Společnosti histo- a cytochemické za nejlepší publikaci roku 2005 | Cena za molekulární popis vývoje mechanoreceptorů | 2006 |
| 10. | Cena Jana Opletala pro nejlepšího studenta 1. LF UK | Ocenění studentské vědecké práce | 2007 |
| 11. | Čestné uznání za prezentaci vědecké práce, ČFS | Cena za popis vlivu anestezie na rozvoj plicního edému | 2007 |
| 12. | Písemné blahopřání rektora UK k publikaci v Science | Reakce na publikaci v Science | 2007 |
| 13. | 3. místo nadace Scientia za nejlepší publikaci roku 2007 | Ocenění studentské vědecké práce | 2008 |
| 14. | 1. cena ČSKEF za nejlepší publikaci autorů do 35 let | Cena za popis farmakologického vlivu na rozvoj plicního edému | 2008 |
| 15. | 3. cena nadace Blood pressure za nejlepší publikaci | Cena za popis etiopatogeneze rozvoje neurogenního plicního edému | 2008 |
| 16. | Cena Josefa Hlávky pro nejlepší studenty veřejných vysokých škol | Ocenění studentské vědecké práce | 2008 |
| 17. | Visegrad group academies young researcher award 2009 | Cena za popis etiopatogeneze rozvoje neurogenního plicního edému | 2009 |
| 18. | Lékař roku 2008 – Jesseniova cena. | Cena za lékařskou práci | 2009 |
| 19. | 2. cena České Urologické společnosti za nejlepší publikaci roku 2008 | Cena za klinicko–anatomickou studii urologické oblasti | 2009 |
| 20. | 3. cena České Urologické společnosti za nejlepší publikaci roku 2008 | Cena za unikátní popis anatomické struktury | 2009 |
| 21. | Česká hlava, kategorie Doctorandus | Cena za popis etiopatogeneze rozvoje neurogenního plicního edému | 2009 |
| 22. | Mimořádná cena rektora UK | Cena za vědeckou práci vykonanou na půdě UK | 2009 |
| 23. | 1. cena v soutěži mladých fyziologů za přednášku na 86. fyziologických dnech. | Cena za nejlepší přednášku týkající se etiopatogeneze rozvoje neurogenního plicního edému | 2010 |
| 24. | Cena Učené společnosti České Republiky | Cena za popis etiopatogeneze rozvoje neurogenního plicního edému | 2010 |

| | | | |
|-----|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 25. | 1. cena České Urologické společnosti za nejlepší publikaci roku 2009 | Cena za unikátní popis anatomické struktury a objasnění jejího forezního a klinického významu | 2010 |
| 26. | 2. cena nadace Blood pressure za nejlepší publikaci | Cena za popis etiopatogeneze rozvoje neurogenního plicního edému | 2010 |
| 27. | 1. cena v soutěži mladých fyziologů za přednášku na 89. fyziologických dnech | Cena za popis etiopatogeneze rozvoje neurogenního plicního edému | 2013 |
| 28. | 1. cena za poster. Kongres České ortodontické společnosti Plzeň (spoluautor) | Cena za popis pohybu pacienta při snímání CBCT přístrojem | 2014 |
| 29. | Cena děkana LF UP za významnou publikační činnost v roce 2016 | Cena za oborovou monografii „Kompéndium stomatologie“ | 2017 |

