

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni

Studijní program: Fyziologie a patologická fyziologie

**Vliv vybraných patologických stavů na funkci mitochondrií v savčích
buňkách a tkáních**

Mitochondriální dysfunkce v sepsi

Effect of selected pathological states on mitochondrial function

in mammalian cells and tissues

Mitochondrial dysfunction in sepsis

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Jitka Kuncová, Ph.D.

Plzeň, 2021

Mgr. Michaela Kohoutová

Prohlášení:

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

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

V Plzni, 19.4.2021

Mgr. Michaela Kohoutová

Podpis:

Finanční podpora:

- SVV UK 260 538, Patofyziologie a diagnostika neuro-patologických a zánětlivých stavů (2020 - 2022)
- OP VVV CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787, Centrum výzkumu infekčních onemocnění - FIND (2018 - 2022)
- projekt programu UK Progres Q39, Náhrada, podpora a regenerace životně důležitých tkání a orgánů (2017 - 20121)
- SVV UK 260 394, Patofyziologie a experimentální terapie zánětlivých a neuropatologických stavů (2018 - 2019)
- GAČR 17-17636S, Identifikace nových prognostických markerů a terapeutických cílových molekul u sarkomu měkkých tkání (2017 - 2020)
- MŠMT NPU I LO1503, BIOMEDIC (2015 - 2020)
- SVV UK 260 394, Patofyziologie a experimentální terapie zánětlivých a neuropatologických stavů (2017)
- SVV UK 260 281, Dynamika metabolické a informační aktivity srdce a mozku (2016)
- GAČR 15-15716S, Úloha autonomního nervového systému v rozvoji sepse (2015 - 2017)
- SVV UK 260 175, Experimentální studie metabolických vlastností a regeneračního potenciálu vybraných tkání a orgánů (2015)
- Projekt programu UK PRVOUK P36, Náhrada, podpora a regenerace funkce některých životně důležitých tkání a orgánů (2013 - 2016)
- GAUK 966 120, Vliv fyzické námahy na mitochondriální funkce u Alzheimerovy choroby (2020-2022)

Poděkování

Na tomto místě bych z celého srdce ráda poděkovala své školitelce doc. MUDr. Jitce Kuncové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, obrovskou podporu, pomoc a především za možnost pracovat na velice zajímavých výzkumných projektech. Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z Ústavu fyziologie, biologie, fyziky Lékařské fakulty v Plzni a Experimentální laboratoře intenzivní medicíny Biomedicínského centra, především vedoucímu Ústavu fyziologie prof. MUDr. Milanovi Štenglvi a svému kolegovi MUDr. Lukášovi Nalosoovi, Ph.D., za mnoho cenných rad a pomoc, a to nejen v rámci mé výzkumné činnosti.

Obrovské poděkování patří také celé mé rodině a hlavně manželovi, našemu báječnému synovi Martínkovi i tomu maličkému pokladu, který je na cestě, za obrovskou trpělivost, pomoc a pochopení. Bez vás bych to nezvládla!

Abstrakt

Sepse neboli život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená deregulovanou odpovědí hostitelského organismu na přítomnost infekce je celosvětově jednou z hlavních příčin úmrtí na infekční choroby. Ročně sepsí onemocní přibližně 31,5 milionu pacientů a z toho 5,3 milionu zemře. Pro sepsi je charakteristická homeostatická dysbalance, která se může rozvinout v septický šok či dokonce může vést ke smrti. Vlivem sepse dochází také k rozvoji multiorgánové dysfunkce neboli poškození několika orgánů současně. Mezi orgány poškozené sepsí patří především srdce, ledviny, játra, plíce, centrální nervový systém a krevní elementy. Jedním z často postižených orgánů je srdce, jehož poškození je doprovázené rozvojem deprese myokardu, která přispívá k nárůstu úmrtnosti na sepsi. Přesné mechanismy vedoucí k septické myokardiální depresi doposud nejsou zcela objasněny, ale ukazuje se, že důležitou roli v tomto procesu nejspíše sehrávají mitochondrie. Vlivem sepse dochází totiž k narušení mnoha mitochondriálních funkcí, které se následně projeví vyčerpáním buněčných energetických zdrojů, což posléze vede až k depresi myokardu.

V našich laboratořích se podařilo vytvořit klinicky relevantní velký zvířecí model sepse a septického šoku, konkrétně sepsi vyvolanou fekální peritonitidou u prasete domácího, což následně umožnilo studovat buněčné mechanismy sepse, septické myokardiální deprese, a především roli mitochondrií v těchto procesech se zaměřením na změny mitochondriální respirace. V rámci našeho výzkumu bylo prokázáno, že sepsi způsobuje v permeabilizovaných vláknech levé srdeční komory pokles mitochondriální respirace, a to zejména na úrovni komplexů II a IV. Na stejném experimentálním modelu byl následně zkoumán účinek dvou terapeutických přístupů, konkrétně vliv stimulace bloudivého nervu a aplikace mezenchymálních kmenových buněk na hemodynamické parametry, orgánové a mitochondriální funkce. V rámci výzkumu se nám podařilo jako prvním prokázat, že stimulace bloudivého nervu má řadu příznivých účinků na průběh sepse u prasat, a to především na funkce kardiovaskulárního systému a na energetický metabolismus. Stimulace bloudivého nervu částečně či zcela zabránila rozvoji hyperlaktátemie, hyperdynamické cirkulace, buněčné deprese myokardu, vedla k výraznému poklesu SOFA skóre (sekvenční skóre hodnocení selhání orgánů) a také odvrátila pokles mitochondriální respirace permeabilizovaných vláken levokomorové srdeční svaloviny způsobený sepsí. Získaná data proto poukazují na slibný terapeutický potenciál stimulace

bloudivého nervu u sepse či septického šoku. Na našem prasečím modelu sepse se však nepodařilo prokázat žádné příznivé účinky aplikace mezenchymálních kmenových buněk na depresi myokardu vyvolanou sepsí, deregulovanou imunitní a zánětlivou odpověď ani dysfunkci mitochondrií. Aplikace mezenchymálních kmenových buněk nedokázala zvrátit inhibici mitochondriální respirace komplexu II ani pokles aktivity komplexu IV permeabilizovaných vláken levokomorové srdeční svaloviny vyvolanou sepsí. Nelze však vyloučit příznivý účinek aplikace těchto buněk v některém z jiných orgánů případně na jiné mitochondriální parametry, které nebyly předmětem našeho výzkumu.

Klíčová slova: sepe, septická myokardiální deprese, mitochondrie, mitochondriální dysfunkce, vysoceúčinná respirometrie, bloudivý nerv, mezenchymální kmenové buňky

Abstract

Sepsis, or life-threatening organ dysfunction caused by deregulated host response to the presence of infection, is one of the most significant causes of death caused by infectious diseases worldwide. 31.5 million patients get sick with sepsis annually and 5.3 million of them die. Sepsis is characterised by homeostatic dysbalance, which can lead to septic shock or even to death. Sepsis may also result in development of multiorgan dysfunction or damage to several organs at the same time. Especially heart, kidneys, liver, lungs, central nervous system and blood elements belong among the organs affected by sepsis. One of the most affected organs is the heart, impairment of which is accompanied with the development of myocardial depression, which contributes to the increase of mortality from sepsis. The precise mechanisms leading to septic myocardial depression have not been fully explained yet, nevertheless mitochondria appear to play an important role in this process. Due to sepsis, many mitochondrial functions are disrupted, which is subsequently manifested by the depletion of cellular energy stores, resulting in myocardial depression.

In our laboratories, we managed to create a clinically relevant model of sepsis and septic shock, specifically sepsis caused by fecal peritonitis in domestic pigs, that allowed us to study the cellular mechanisms of sepsis, septic myocardial depression and especially the role of mitochondria in these processes focusing on mitochondrial respiration. In our research, it was shown that sepsis causes a decrease of mitochondrial respiration in the permeabilized fibers of the left ventricle, in particular at the level of complexes II and IV. On the same experimental model, the effects of two therapeutic approaches were subsequently investigated, namely the effect of vagus nerve stimulation and the application of mesenchymal stem cells on hemodynamic parameters, organ and mitochondrial functions. We were the first to prove, that stimulation of the vagus nerve has a number of beneficial effects on the course of sepsis in pigs, especially on the functions of the cardiovascular system and energy metabolism. Stimulation of the vagus nerve partially or completely prevented the development of hyperlactatemia, hyperdynamic circulation, myocardial cells depression, it led to a significant decrease in SOFA score (sequential score of organ failure assessment) and also reversed the decrease in mitochondrial respiration of permeabilized left ventricular muscle fibers caused by sepsis. Therefore, the obtained data indicate a promising therapeutic potential of the vagus nerve stimulation in sepsis or septic shock. However, in our porcine model of sepsis, no beneficial effects of mesenchymal stem cell administration

on sepsis-induced myocardial depression, deregulated immune and inflammatory response, or mitochondrial dysfunction were demonstrated. Application of mesenchymal stem cells failed to reverse the inhibition of mitochondrial respiration of the complex II or the decrease in complex IV activity of permeabilized left ventricular muscle fibres induced by sepsis. However, a beneficial effect of the application of these cells in other organs or on other mitochondrial parameters, which were not the subject of our research, cannot be ruled out.

Keywords: sepsis, septic myocardial depression, mitochondria, mitochondrial dysfunction, high resolution respirometry, vagus nerve, mesenchymal stem cells

Obsah

1	Popis současného stavu poznání.....	6
1.1	<i>Sepse.....</i>	6
1.1.1	Historie sepse	6
1.1.2	Vývoj současné definice sepse	7
1.1.3	Patofyziologie sepse	10
1.1.3.1	Septická myokardiální deprese.....	13
1.2	<i>Mitochondrie ve zdraví</i>	14
1.2.1	Struktura mitochondrií	14
1.2.1.1	Vnější mitochondriální membrána (OMM)	15
1.2.1.2	Mezimembránový prostor (IMS)	16
1.2.1.3	Vnitřní mitochondriální membrána (IMM).....	16
1.2.1.4	Mitochondriální matrix	17
1.2.1.5	Mitochondriální genom.....	17
1.2.2	Tvorba energie v mitochondriích	19
1.2.2.1	Krebsův cyklus.....	19
1.2.2.2	Elektrontransportní systém (ETS).....	21
1.2.2.3	Tvorba ATP v elektrontransportním systému	25
1.3	<i>Mitochondriální dysfunkce v sepsi</i>	28
1.3.1	Abnormality elektrontransportního systému	28
1.3.2	Změny mitochondriální dynamiky a struktury	34
1.3.2.1	Mitochondriální biogeneze.....	34
1.3.2.2	Změny mitochondriální struktury.....	35
1.3.2.3	Procesy fúze a dělení mitochondrií	36
1.3.3	Oxidativní a nitrosativní stres.....	37
1.3.4	Změny mitochondriální vápníkové homeostázy.....	38
2	Cíle práce a hypotézy	40
2.1	<i>Cíle práce.....</i>	40
2.2	<i>Hypotézy.....</i>	40
3	Materiál a metody	41
3.1	<i>Příprava experimentálního modelu prasete domácího</i>	41
3.1.1	Etické aspekty práce se zvířaty.....	41
3.1.2	Zvolený modelový organismus	41
3.1.3	Anestezie a instrumentace prasat.....	41

3.1.4	Indukce sepse u zvířat	42
3.1.5	Měření jednotlivých parametrů	42
3.1.6	Stanovení SOFA skóre	43
3.1.7	Stimulace bloudivého nervu (VNS)	43
3.1.8	Aplikace mezenchymálních kmenových buněk (MSC)	43
3.1.9	Délka experimentu a jeho ukončení	45
3.2	<i>Optimalizace přípravy vzorku myokardu pro respiometrické analýzy</i>	45
3.2.1	Permeabilizace vzorků levé srdeční komory PBI-Shredderem	45
3.2.2	Permeabilizace vzorků levé komory srdeční saponinem	46
3.3	<i>Analýza mitochondriální respirace</i>	47
3.3.1	Přístroj pro měření spotřeby O ₂ vysoce účinnou respiometrií	47
3.3.2	Měření mitochondriální respirace	48
3.3.3	Mitochondriální respirační stavy	50
3.4	<i>Stanovení aktivity enzymu citrátsyntázy</i>	53
3.5	<i>Statistická analýza naměřených dat</i>	53
4	Původní práce	54
5	Souhrn výsledků experimentálních prací a diskuze	55
6	Závěr	68
7	Seznam citované literatury	70
8	Přehled publikační činnosti	92
8.1	<i>Odborné publikace vztahující se k tématu dizertační práce</i>	92
8.2	<i>Ostatní odborné publikace</i>	92
8.3	<i>Prezentace výsledků na odborných setkáních a konferencích</i>	94
9	Přílohy	96

Seznam zkratek

•Q-	semichinonový radikál
ADP; D	adenosindifosfát
AmA	antimycin A
ANS	autonomní nervový systém
As	askorbát
ATP	adenosintrifosfát
Azd	azid
Bcl-2	z anglického B-cell lymphoma 2
bp	pár bází
CLP	cékální ligace a punkce
CO	srdeční výdej (z anglického Cardiac Output)
CoA; CoAS	koenzym A
cOR	cytochrom <i>c</i> oxidoreduktáza
CRP	C – reaktivní protein
CVP	centrální žilní tlak (z anglického Central Venous Pressure)
Cyt <i>c</i>; <i>c</i>	cytochrom <i>c</i>
DAMPs	molekulární vzory asociované s poškozením (z anglického Damage – Associated Molecular Patterns)
DhO	dihydroxyorotát
DM	<i>diabetes mellitus</i>
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Drp1	protein příbuzný s dynaminem (z anglického dynamin-related protein 1)
DTNB	kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová
e⁻	elektron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	z anglického Enzyme Commission number
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EKG	elektrokardiogram
ER	endoplazmatické retikulum
ETF	elektron přenášející flavoprotein
ETFQOR	elektron přenášející flavoprotein:ubichinonoxidoreduktáza
ETS	elektrontransportní systém

FAD	flavinadenindinukleotid
FADH₂	redukována forma flavinadenindinukleotidu
FEP	Teflon® fluorovaný ethylen-propylen
FeS	železo – sirná centra
FiO₂	inspirační frakce kyslíku
Fis1	mitochondriální štěpný protein 1 (z anglického mitochondrial fission protein 1)
FMN	flavinmononukleotid
G	guanosin
GDP	guanosindifosfát
Gp	glycerolfosfát
GSC	Glasgowská stupnice hloubky bezvědomí (z anglického Glasgow Coma Scale)
GTP	guanosintrifosfát
H⁺, +	proton
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
HMGB1	skupina vysoce mobilních proteinů boxu 1 (z anglického High – Mobility Group Box 1)
HSP	proteiny teplotního šoku (z anglického Heat Shock Proteins)
HV	hypervariabilní oblast
IL	interleukin
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (z anglického Inner Mitochondrial Membrane)
IMS	mezimembránový prostor (z anglického InterMembrane Space)
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
ISS	integrovaný sací systém
KI; I	komplex I elektrontransportního systému
KII; II	komplex II elektrontransportního systému
KIII; III	komplex III elektrontransportního systému
KIV; IV	komplex IV elektrontransportního systému
KV; V	komplex V elektrontransportního systému
LPS	lipopolysacharid
M	malát
MAM	membrána endoplazmatického retikula asociovaná s mitochondriemi (z anglického Mitochondrial – Asociated ER Membrane)
MAP	střední arteriální tlak
Mfn	mitofusin

mGPDH	mitochondriální glycerolfosfát dehydrogenáza
MIF	inhibiční faktor migrace makrofágů (Macrophage migration Inhibitory Factor)
miRNA	mikro ribonukleová kyselina
MOD	multiorgánová dysfunkce (z anglického Multiple Organ Dysfunction)
mPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti (z anglického Mitochondrial Permeability Transition Pore)
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MSC	mezenchymální kmenové buňky (z anglického Mesenchymal Stem Cells)
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NK	přírození zabíječi (z anglického Natural Killer)
NLR	receptor podobný oligomerizační doméně vázající nukleotid (z anglického Nucleotide – binding oligomerization domain – Like Receptors)
NOD	oligomerizační doména vázající nukleotid (z anglického Nucleotide – binding Oligomerization Domain)
NRF	z anglického Nuclear factor eRythroid-2-related Factor
O₂k	Oxygraph-2k
OMM	vnější mitochondriální membrána
Opa1	z anglického Optic atrophy 1
OSCP	z anglického Oligomycin Sensitivity Conferral Protein
OXPHOS	oxidativní fosforylace
P	pyruvát
PaCO₂	parciální tlak oxidu uhličitého v arteriální krvi
PAF	destičky aktivující faktor (z anglického Platelet – Activating Factor)
PAMPs	molekulární vzory asociované s patogenem (z anglického Pathogen – Associated Molecular Pattern)
PaO₂/FiO₂	poměr parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi a inspirační frakce kyslíku
PAOP	tlak v zaklínění z anglického Pulmonary Artery Occluded Pressure
PARP	poly(ADP-riboza) polymeráza
PBMC	mononukleární buňky periferní krve (z anglického Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PCT	procalcitonin
PEEP	pozitivní tlak na konci výdechu (z anglického positive end expiration pressure)
PG	prostaglandiny
PGC-1α	PPAR γ – koaktivátor - 1 α

P_i	anorganický fosfát
pO₂	parciální tlak kyslíku
POS	polarografický kyslíkový senzor
PPARα	z anglického Peroxisome Proliferator – Activated Receptor alpha
PRRs	receptory rozpoznávající specifický receptor (z anglického Pattern - Recognition receptors)
PVDF	polyvinylidendifluorid
Q	koenzym Q
QH₂	redukovaný koenzym Q
qSOFA	rychlé sekvenční skóre hodnocení selhání orgánu (z anglického quick Sequential/Sepsis – related Organ Failure Assesment)
RIG-1	gen indukovatelný kyselinou retinovou 1
RNA	ribonukleová kyselina
RNS	reaktivní formy dusíku (z anglického Reactive Nitrogen Species)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z anglického Reactive Oxygen Species)
Rot	rotenon
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
RyR	ryanodinový receptor
S	sukcinát
SERCA	vápníková pumpa sarkoplazmatického retikula
SIRS	syndrom systémové zánětlivé odpovědi
SOFA	sekvenční skóre hodnocení selhání orgánu (z anglického Sequential/Sepsis – related Organ Failure Assesment)
SQOR	sulfid:ubichinon oxidoreduktáza
SvO₂	smíšená žilní saturace kyslíkem
SVR	systémový vaskulární odpor (z anglického Systemic Vascular Resistance)
TIP₂k	titrační injekční pumpa
TLR	Toll-like receptory
TM; TMPD	N'-tetrametyl-p-fenylendiamin
TNF	tumor nekrotizující faktor
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
UCPs	rozpřahující proteiny (z anglického UnCoupling Proteins)
VNS	stimulace bloudivého nervu (z anglického Vagus Nerve Stimulation)
ZD	zemědělské družstvo
β_L	volný konformační stav ATP syntázy (z anglického loose)

β_o	otevřený konformační stav ATP syntázy (z anglického open)
β_T	těsný konformační stav ATP syntázy (z anglického tight)
$\Delta\Psi$	mitochondriální membránový potenciál

1 Popis současného stavu poznání

1.1 Sepse

Sepse, neboli **život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená deregulovanou odpovědí hostitelského organismu na přítomnost infekce**, patří mezi nejzávažnější hrozby v současné medicíně (Karvunidis a Matějovič 2019). Navzdory velkému pokroku v lékařské péči je sepsa i nadále hlavní příčinou úmrtí na infekční choroby. Každoročně sepsí celosvětově onemocní kolem 31,5 miliónu pacientů a z toho 5,3 miliónu zemře (Fleischmann et al. 2016).

1.1.1 Historie sepsy

Slovo sepsa je odvozeno z řečtiny a odkazuje na „rozklad“ či „rozpad“. Poprvé se objevilo již před 2700 lety v Homérových básních. Následně bylo použito ve 4. stol. př. n. l. v díle *Corpus Hippocraticum* proslulého řeckého lékaře a filozofa Hippokrata a následně o několik stovek let později i v pracích předního římského lékaře a filozofa Galena (Funk et al. 2009). Hippokrates poprvé popsal sepsi jako nemoc způsobenou materiálem, který „hnije“, jež začíná 7-14 dní po poranění jako horečka a končí smrtí. To poprvé v historii vyvolalo otázku, jak může lokální poranění vést k systémové odpovědi a které mediátory jsou za to zodpovědné. Hippokratova hypotéza, že k sepsi dochází prostřednictvím hniloby tkání, a tím uvolněných jedů, zůstala až do poloviny 19. století jediným patofyziologickým vysvětlením sepsy (Kreymann a Wolf 1996).

V roce 1847 se ve výzkumu sepsy významně uplatnil maďarský lékař Ignaz Semmelweis. Byl prvním, kdo experimentálně prokázal, že puerperální horečka (sepsi, která zabíjela ženy po porodu) lze zabránit zvýšenou hygienou rukou. Na základě tohoto zjištění zavedl ve své nemocnici ve Vídni pravidelné mytí rukou chloridem vápenatým, a díky tomu snížil úmrtnost žen na puerperální horečku z 16 % na méně než 1 %. Trvalo však ještě dlouhou dobu, než ostatní lékaři připustili, že jejich ruce by mohly být zdrojem nákazy a přistoupili ke zvýšení hygieny rukou. Prvními, kdo spojili přítomnost bakterií se sepsi, byli Carl Mayrhofer, Victor Feltz a Léon Coze. To následně potvrdil na základě svých objevů také Louis Pasteur, který měl díky své prestiži velký vliv na příjem opatření v prevenci šíření infekce. Inspiroval například i Josepha Listera, kterému se podařilo používáním

antiseptických metod významně snížit úmrtnost pacientů spojenou s chirurgickými zákroky, zejména amputacemi (Cavaillon a Chrétien 2019).

Také objevy 20. století výrazně přispěly k pochopení mechanismů sepse a vývoji první definice sepse. Na přelomu 19. a 20. století byl Richardem Pfeifferem na základě výzkumu *Vibrio cholerae* poprvé identifikován a popsán endotoxin. Následně italský patolog Eugenio Centanni objevil vztah mezi endotoxinem a schopností bakterií způsobovat horečku. Mary Jane Osborn a Hiroshi Nikaido navíc prokázali, že mnoho druhů bakterií používá endotoxin jako patogenní mediátor (Funk et al. 2009). V roce 1914 Hugo Schottmüller položil základy moderní definice sepse a jako první popsal, že základní složkou toho onemocnění je rozvoj infekce. O několik desetiletí později se změnilo chápání sepse díky myšlenkám Lewise Thomase, který stanovil, že „hostitelská reakce je to, co způsobuje onemocnění“ (Rittirsch et al. 2008). Díky stále častějšímu výskytu sepse na jednotkách intenzivní péče byl následně výzkum zaměřen hlavně na roli imunitní odpovědi pacienta a první definice sepse na sebe nenechala dlouho čekat (Bone et al. 1992).

1.1.2 Vývoj současné definice sepse

Stanovit definici sepse tak, aby byla dostatečně specifická a současně zahrnovala i méně obvyklý průběh onemocnění, je velice obtížné. Až značné množství nových poznatků získaných během posledních 30 let pomohlo zlepšit naše chápání patofyziologie sepse, včetně regulace zánětlivých cest a úlohy, kterou hraje imunitní suprese v průběhu sepse, a umožnilo postupně vzniknout nové definici sepse (viz Tabulka 1).

V roce 1991 se v Chicagu konala konference, jejímž cílem bylo stanovit soubor definic pro pacienty se sepsí a jejími následky. Na základě této konference byly navrženy definice pro syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS; z anlického systemic inflammatory response syndrome), sepsi, těžkou sepsí a septický šok. První definice sepse (SEPSE-1) poté vznikla v roce 1992, kdy byla sepse definována jako **syndrom systémové zánětlivé odpovědi (přítomnost alespoň 2 ze 4 SIRS kritérií) při potvrzené nebo předpokládané infekci** (viz Tabulka 1). Těžká sepse byla definována jako klinická sepse doprovázená orgánovou dysfunkcí, hypoperfuzí nebo hypotenzí a septický šok jako hypotenze spojená se sepsí rezistentní vůči tekutinové resuscitaci a vyžadující podávání vazopresorů (střední arteriální tlak ≤ 70 mmHg), (Bone et al. 1992). Použití 2 a více ze 4 kritérií SIRS pro identifikaci sepse se ukázalo jako nedostatečné. Změny tělesné teploty,

srdeční frekvence, počtu bílých krvinek a dechové frekvence patřící mezi SIRS kritéria nemusí vždy nutně znamenat, že daný pacient trpí dysregulovaným stavem ohrožujícím život. Bylo prokázáno, že tyto podmínky jsou splněny i u hospitalizovaných pacientů, u kterých se však nikdy nerozvinula infekce (Churpek et al. 2015).

V roce 2001 byla kritéria SIRS rozšířena o seznam mnoha dalších projevů a symptomů. Seps byla následně definována (**SEPSE-2**) jako **onemocnění způsobené potvrzenou nebo předpokládanou infekcí a zahrnující alespoň 2 kritéria SIRS** (Levy et al. 2003). Tato definice však byla vystavena kritice za nedostatečnou senzitivitu a specifitu, což bylo v nedávné době klinicky potvrzeno (Kaukonen et al. 2018). Proto byla v roce 2016 publikována v *Journal of American Medical Association* dosud poslední definice sepsy (**SEPSE-3**). Nově je tedy seps definována jako **život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená deregulovanou odpovědí hostitelského organismu na přítomnost infekce**. Podkladem pro tuto definici byla retrospektivní analýza dat od 1,2 miliónů pacientů, kteří onemocněli sepsí, s cílem zpřesnit a urychlit stanovení diagnózy sepsy a zároveň odlišit nekomplikovanou infekci od infekce vedoucí k orgánové dysfunkci (Singer et al. 2016). Pro rozpoznání akutní orgánové dysfunkce je využíváno tzv. SOFA (Sequential/Sepsis-related Organ Failure Assessment) skóre, které hodnotí 0-4 body respirační funkce, parametry koagulace, jaterní a renální funkce, hemodynamiku a stav vědomí (Vincent et al. 1998). Pro stanovení parametrů SOFA skóre je potřebná řada laboratorních vyšetření, z nichž některá mohou být časově náročná. Proto bylo pro urychlení posouzení případné orgánové dysfunkce způsobené sepsí zavedeno tzv. qSOFA skóre (quickSOFA). V tomto 3bodovém systému každý z bodů představuje odchylku v 1 vitálním parametru: nízký krevní tlak (systolický krevní tlak ≤ 100 mm Hg), tachypnoe (≥ 22 dechů/min) a změna vědomí (Glasgow Coma Scale < 15). Pokud má pacient s infekcí 2 nebo více bodů qSOFA, je u něj významně zvýšená pravděpodobnost sepsy a zároveň vyšší riziko nepříznivého průběhu onemocnění (Singer et al. 2016).

Tabulka 1 - Vývoj kritérií pro stanovení diagnózy sepse

SEPSE-1	SEPSE-2	SEPSE-3
Vznikla v roce 1992 Předpokládaná či potvrzená infekce + SIRS kritéria	Vznikla v roce 2003 Předpokládaná či potvrzená infekce + rozšířená SIRS kritéria	Vznikla v roce 2016 Předpokládaná či potvrzená infekce + SOFA skóre
<u>SIRS kritéria</u> (2 a více) • Tělesná teplota ($t < 36^{\circ}\text{C}$ nebo $t > 38^{\circ}\text{C}$) • Srdeční frekvence ($> 90\text{tepů/min}$) • Počet bílých krvinek ($> 12\,000/\mu\text{l}$ nebo $< 4\,000/\mu\text{l}$) • Dechová frekvence ($> 20/\text{min}$) nebo PaCO_2 ($< 32\text{ mm Hg}$)	<u>Rozšířená SIRS kritéria</u> (1 a více) Obecné příznaky: • Horečka ($t > 38,3^{\circ}\text{C}$) • Hypotermie ($t < 36^{\circ}\text{C}$) • Srdeční frekvence ($> 90\text{tepů/min}$) • Tachypnoe • Hyperglykémie bez DM • Změny stavu vědomí • Otoky Známky zánětu: • Leukocytóza ($> 12\,000/\mu\text{l}$) • Leukopenie ($< 4\,000/\mu\text{l}$) • $> 10\%$ nezralých forem • Vzestup CRP • Vzestup prokalcitoninu Hemodynamika: • Střední arteriální tlak (hypotenze) • Systolický krevní tlak • Smíšená žilní saturace kyslíkem ($\text{SvO}_2 > 70\%$) • Srdeční index ($> 3,5\text{ l/min/m}^2$) Orgánové dysfunkce: • Arteriální parciální tlak kyslíku (arteriální hypoxemie) • Produkce moči (nově vzniklá oligurie) • Koncentrace kreatininu (vzestup o $44,2\text{ }\mu\text{mol/l}$) • Koagulace (koagulopatie) • Počet krevních destiček (trombocytopenie) • Funkce jater (hyperbilirubinemie) • Gastrointestinální motilita (ileus) Tkáňová perfuze: • Koncentrace laktátu (hyperlaktatemie $> 1\text{ mmol/l}$) • Kapilární náplň (snížená kapilární náplň nebo mramoráž)	<u>SOFA skóre</u> (2 body a více) • Respirace/oxygenace ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) • Glasgowská stupnice hloubky bezvědomí • Hypotenze ($\text{MAP} < 65\text{ mmHg}$) nebo potřeba vazopresoru • Renální funkce (hladina sérového kreatininu – oligurie, anurie) • Jaterní funkce (bilirubin) • Počet krevních destiček (trombocytopenie) qSOFA: • Změny stavu vědomí • Systolický tlak krve ($< 100\text{ mm Hg}$) • Dechová frekvence ($> 22/\text{min}$)

SIRS - syndrom systémové zánětlivé odpovědi; PaCO_2 – parciální tlak oxidu uhličitého v arteriální krvi; DM – diabetes mellitus; CRP – C-reaktivní protein; SvO_2 – smíšená žilní saturace kyslíkem; SOFA – z anglického Sequential/Sepsis-related Organ Failure Assessment; $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ - poměr parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi a inspirační frakce kyslíku; MAP – střední arteriální tlak; qSOFA – rychlé SOFA (převzato a upraveno podle Horák et al. 2016).

1.1.3 Patofyziologie sepse

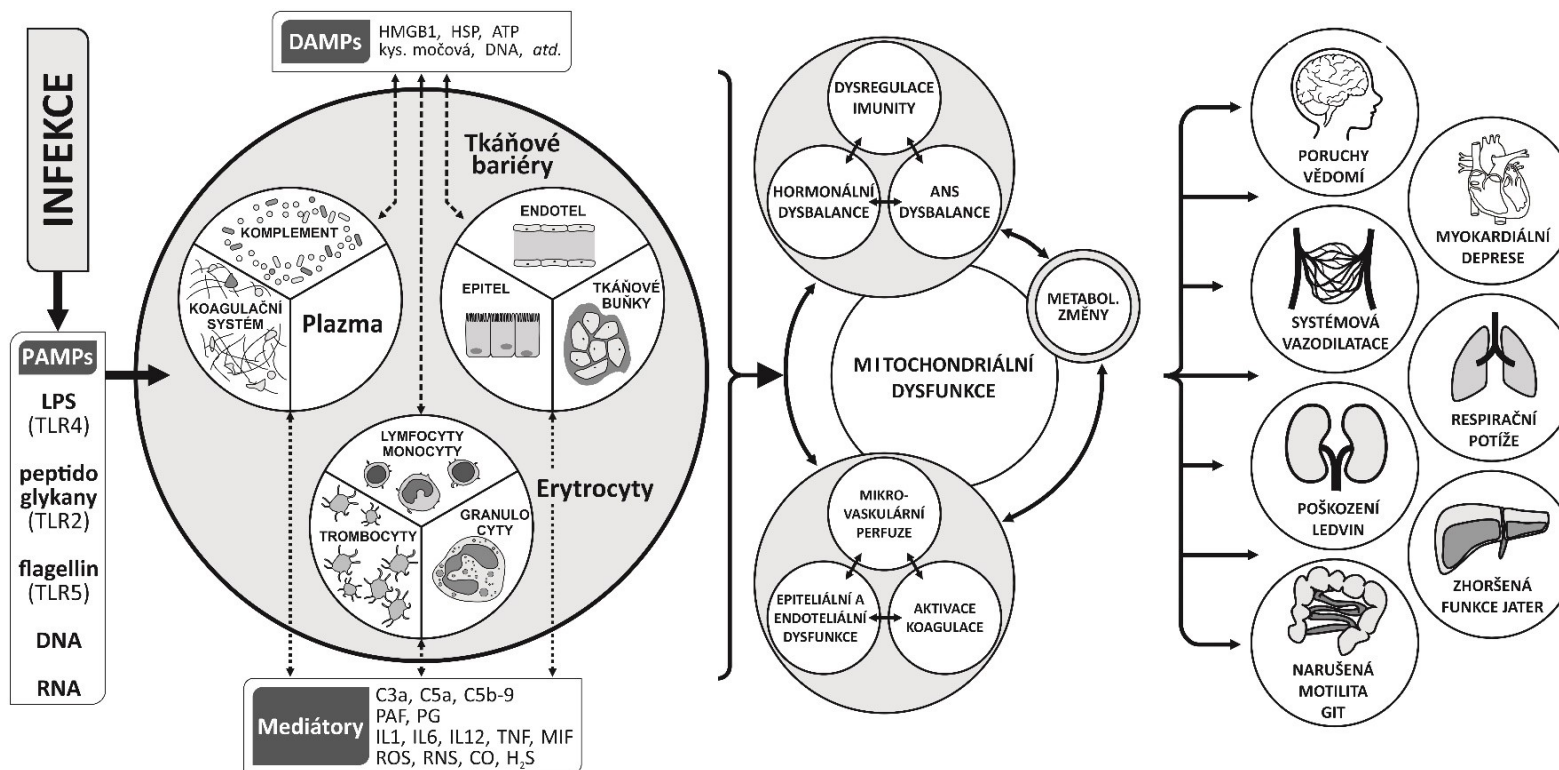
Sepse je charakterizována homeostatickou dysbalancí, která se může rozvinout v multiorgánovou dysfunkci (MOD, multiple organ dysfunction), septický šok či dokonce může vést ke smrti (viz Obrázek 1). Prvním krokem v iniciaci odpovědi hostitele na patogen je aktivace buněk nespecifických (vrozených) imunitních mechanismů, především makrofágů, monocytů, neutrofilů a NK buněk (NK, natural killer), (Vincent et al. 1996). K tomu dochází díky vazbě patogenů nebo jejich částí, tzv. molekulárních vzorů asociovaných s patogenem (PAMPs - pathogen-associated molecular pattern) na receptory rozpoznávající specifický molekulární vzor (PRRs, pattern-recognition receptors). Příkladem tohoto typu receptorů jsou toll-like receptory (TLR), které se nachází na buněčných membránách či buněčných organelách. PAMPs touto cestou stimulují komplement plazmy a koagulační systémy (Aziz et al. 2013). Mezi PAMPs patří lipopolysacharidy (vazba na TLR4), peptidoglykany (vazba na TLR2), lipoproteiny, flagelin (vazba na TLR5), DNA (vazba na TLR9) a jednořetězcová či dvouřetězcová RNA (Kakihana et al. 2016); zahrnují tedy typické součásti grampozitivních i gramnegativních bakterií, virů nebo dalších patogenů.

V důsledku buněčného poškození vlivem PAMPs dochází k uvolňování dalších specifických molekul z mrtvých či poškozených hostitelských buněk, tzv. molekulárních vzorů asociovaných s poškozením (DAMPs - damage-associated molecular patterns). Příkladem DAMPs jsou HMGB-1 (z anglického High-mobility group box 1), proteiny tepelného šoku (heat shock proteins, HSP), genomová či mitochondriální DNA, ATP, kyselina močová a další. DAMPs se vážou na specifické receptory na monocytech a makrofázích, například na TLR, receptory leptinu typu C, NLR (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors; NOD-like receptory) a receptory podobné RIG-1 (gen indukovatelný kyselinou retinovou 1), (Gyawali et al. 2019). To následně vede ke zvýšené expresi a uvolňování řady prozánětlivých mediátorů ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6) a markerů. Současné dochází také k aktivaci protizánětlivých mechanismů a k imunosupresi. Směr,

rozsah a doba trvání jednotlivých reakcí jsou určovány jak hostitelskými faktory (genetickými charakteristikami, věkem, probíhajícími chorobami, léky), tak i faktory patogenními (mikrobiálním zatížením a virulencí). Sepsa je téměř vždy spojena také se změnami srážení krve, což často vede až k diseminované intravaskulární koagulaci (Angus a van der Poll 2013).

Dysregulovaná odpověď imunitního systému společně s hormonální dysbalancí, ale také narušená aktivita autonomního nervového systému a dysfunkce epiteliálních a endoteliálních buněk vedou následně ke ztrátě těsnosti bariér, ke změnám v metabolismu a k narušení funkce orgánů (Kohoutová et al. 2018). Dysfunkce jednoho orgánu při sepsi je vzácná, obvykle je postiženo několik orgánů současně (MOD). Úmrtnost pacientů se sepsí následně koreluje s počtem postižených orgánů. Nejčastěji postiženými orgány jsou ledviny, játra, plíce, srdce, centrální nervový systém a krevní elementy. Z tohoto důvodu se MOD projevuje především respiračními potížemi, depresí myokardu, systémovou vazodilatací, akutním poškozením ledvin, zhoršenou funkcí jater, narušenou gastrointestinální motilitou a koagulopatií (Reinhart et al. 2012). Většina orgánových dysfunkcí je reverzibilní, cílem současné léčby sepsy je proto omezit rozvoj dysfunkce orgánů zajištěním rychlé kontroly průběhu infekce, hemodynamickou stabilizací a podpory orgánů tak, aby se pokud možno zajistilo obnovení jejich funkce (Lelubre a Vincent 2018).

V současné době je známo téměř 180 různých biomarkerů sepsy, žádný z nich však zatím není dostatečně specifický či senzitivní pro běžné použití v klinické praxi. Nejčastěji se používají tzv. CRP (C-reaktivní protein) či PCT (Procalcitonin), ale bohužel oba tyto markery mají omezenou schopnost rozlišit sepsi od jiných zánětlivých stavů či předpovědět průběh sepsy (Pierrakos a Vincent 2010).



Obrázek 1. Patofyziologie sepse. Molekulární vzory asociované s patogenem (PAMPs) se vážou na receptory rozpoznávající specifický vzor na buněčných membránách a buněčných organelách. Poté dojde k uvolnění s poškozením asociovaných molekulárních vzorů (DAMPs), které vede ke zvýšené expresi a uvolňování zánětlivých mediátorů a biomarkerů. Následná dysregulovaná odpověď hostitele zahrnuje narušenou regulaci imunitního, endokrinního a autonomního nervového systému, ztrátu těsnosti bariér, změny metabolismu a vede až k multiorgánové dysfunkci. PAMPs – molekulární vzory asociované s patogenem; LPS – lipopolysacharid; TLR – Toll-like receptor; DNA – deoxyribonukleová kyselina; RNA – ribonukleová kyselina; DAMPs – molekulární vzory asociované s poškozením; HMGB1 – skupina vysoce mobilních proteinů boxu 1; HSP – protein teplotního šoku; ATP – adenosin trifosfát; PAF – destičky aktivující faktor; PG – prostaglandiny; IL – interleukin; TNF – tumor nekrotizující faktor; MIF – inhibiční faktor migrace makrofágů; ROS – reaktivní formy kyslíku; RNS – reaktivní formy dusíku; CO – oxid uhelnatý; H₂S – sirovodík; ANS – autonomní nervový systém (převzato a upraveno podle Kohoutová et al. 2018).

1.1.3.1 Septická myokardiální deprese

Kardiovaskulární systém hraje klíčovou roli v rámci septické MOD. Častým projevem sepse i septického šoku je dysfunkce myokardu, která úzce souvisí se zvýšenou morbiditou a mortalitou. Bylo prokázáno, že přítomnost dysfunkce myokardu v sepsi vede k nárůstu úmrtnosti o 20-50% (Geri et al. 2019). Na patofyziologii myokardu se podílí poruchy koronární cirkulace, dysfunkce mitochondrií a přímá myokardiální deprese. Porucha průtoku krve myokardem je spojena s mikrovaskulární dysfunkcí či narušením endotelu (Habimana et al. 2020). Mechanismy dysfunkce mitochondrií v sepsi nejsou zcela objasněny, několik studií však potvrdilo, že narušená funkce mitochondrií, která vede k vyčerpání energie (ATP), je klíčovým faktorem v dysfunkci myokardu vyvolanou sepsí (Carré a Singer 2008, Jang et al. 2017). Myokard je orgán s vysokými energetickými nároky, které zajišťuje velké množství mitochondrií, proto se v něm jejich narušená funkce na rozdíl od jiných orgánů výrazně projeví.

V současné době neexistuje přesná definice myokardiální deprese. Tento stav však bývá popisován jako globální, ale vratná (systolická a diastolická) dysfunkce levé i pravé strany srdce (Antonucci et al. 2014). Pro septickou depresi myokardu jsou typické následující 3 charakteristiky: dilatace levé komory s normálním nebo sníženým plnicím tlakem (nejspíše způsobené vlivem zvýšené poddajnosti levé komory), snížená ejekční frakce a její normalizace za 7-10 dní (Parker et al. 1984). Bylo prokázáno, že se septickou kardiomyopatií je spojena řada různých mediátorů a informačních kaskád; její přesné příčiny a mechanismy patogeneze však zůstávají zatím nejasné. A to zřejmě hlavně proto, že většina studií je prováděna na různých experimentálních modelech (menších či větších zvířatech) a jen zřídka je možné použít výsledky těchto studií v klinické praxi u lidí. Při septické myokardiální depresi je myokard poškozen strukturně i funkčně, a to zejména vlivem systémových (hemodynamických) faktorů, genetických, molekulárních a metabolických změn (Antonucci et al. 2014).

1.2 Mitochondrie ve zdraví

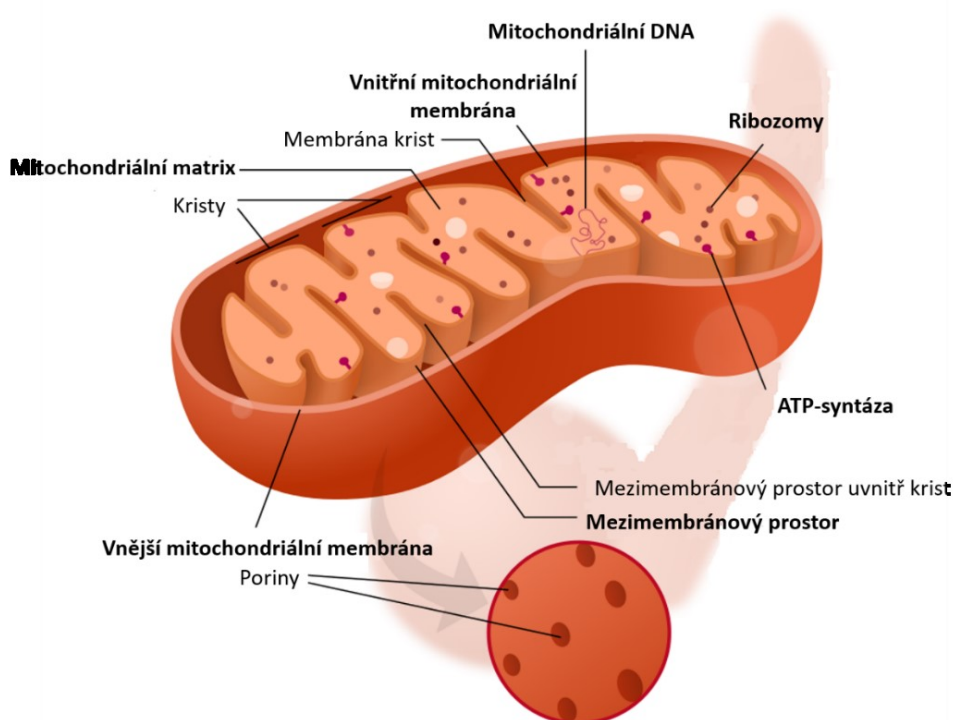
Mitochondrie jsou unikátní semiautonomní buněčné organely, které vznikly přibližně před jednou miliardou let endosymbiózou α -proteobakterie proto-eukaryotickou buňkou (Zimorski et al. 2014). Poprvé byly tyto organely popsány již v roce 1857 švýcarským fyziologem Rudolfem Albertem von Köllikerem při studiu lidských svalů, který mitochondrie nazval „sarcosomy“. Následně byly v roce 1886 přejmenovány německým patologem a histologem Richardem Altmannem na „bioblasty“ (živé bakterie). Až v roce 1898 dostaly mitochondrie svůj současný název díky německému mikrobiologovi Carlu Bendovi. Název mitochondrie pochází z řeckých slov „mitos“ (vlákno) a „chondros“ (granule). Od té doby jsou mitochondrie předmětem zájmu mnoha badatelů (Cogliati et al. 2016).

Mitochondrie v buňkách zastávají široké spektrum různých funkcí. Hrají zásadní roli v energetickém metabolismu, podílejí se na tvorbě makromolekul (nukleotidů, lipidů, hemu, železo-sírných sloučenin) a mají také důležitý význam při regulaci různých signálních drah. Podílejí se například na vápníkové homeostáze, genové expresi, buněčné diferenciaci, ale také na procesech buněčného stárnutí, a to včetně buněčné smrti (Vakifahmetoglu-Norberg et al. 2017). Vedlejším produktem mitochondriálního metabolismu je produkce reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS), (Murphy 2009). Bezesporu hlavní úloha mitochondrií v energetickém metabolismu však spočívá v syntéze ATP, nukleotidu sloužícího jako hlavní energetický zdroj pro buňky, prostřednictvím elektrontransportního systému (ETS), (Scheffler 2007).

1.2.1 Struktura mitochondrií

Velikost, množství a tvar mitochondrií se liší v závislosti na buněčném typu, metabolické aktivitě a stavu dané buňky. Množství mitochondrií se pohybuje od jednotek (krevní destičky), (Thon a Italiano 2012) přes desítky (spermie), (Amaral et al. 2013) až po několik tisíc na 1 buňku (srdeční sval). Mitochondrie v buňkách se obvykle nevyskytují jako samostatné struktury, ale jsou dynamické a vytváří takzvanou mitochondriální síť. Tato síť vzniká díky procesům fúze a dělení, za které je zodpovědná celá řada proteinů (Xie et al. 2018). Přestože mitochondrie mají různou velikost, obvykle ve fibroblastech, hepatocytech nebo kardiomyocytech mají klobásovitý tvar, jsou dlouhé 3-4 μm a mají průměr kolem 1 μm (Scheffler 2007). Vnitřní struktura mitochondrií však zůstává za fyziologických podmínek

vždy stejná. Skládají se ze 4 definovaných vzájemně propojených kompartmentů, z nichž dva tvoří dvě samostatné a funkčně oddělené membrány - vnější a vnitřní, které oddělují mezimembránový prostor a mitochondriální matrix (viz Obrázek 2). Díky prostorovému rozdělení vznikají v mitochondriích odlišná prostředí, ve kterých mohou probíhat různé metabolické procesy jako například Krebsův cyklus, β -oxidace mastných kyselin, ketogeneze, glukoneogeneze nebo metabolismus aminokyselin aj.



Obrázek 2. Model struktury mitochondrií. Za fyziologických podmínek se mitochondrie skládají ze 4 kompartmentů: vnější a vnitřní mitochondriální membrány, mezimembránového prostoru a mitochondriální matrix. Ve vnější mitochondriální membráně se nachází poriny, díky kterým je propustná pro mnoho látek. Vnitřní mitochondriální membrána vyčníhá v tzv. křisty, které zvětšují její plochu. Na této membráně se nachází komplexy elektrontransportního systému včetně ATP syntázy. Uvnitř mitochondriální matrix se nachází kruhová mtDNA a také mitochondriální ribozomy (převzato a upraveno podle Kelvinsong, CC0, via Wikimedia Commons).

1.2.1.1 Vnější mitochondriální membrána (OMM, z anglického outer mitochondrial membrane)

Vnější mitochondriální membrána odděluje cytosol od mezimembránového prostoru a díky tomu, že se v ní nachází velké množství integrálních proteinů tzv. porinů, je propustná pro různé metabolity a ionty, a to až do velikosti 5 kDa (Alberts 1998). Díky tomu je

umožněna vzájemná komunikace mezi cytosolem a mitochondrií. Stejně jako u většiny živočišných plazmatických membrán tvoří 50 % hmotnosti vnější mitochondriální membrány proteiny a 50 % lipidy (Monteiro et al. 2014).

Vnější mitochondriální membrána je ve velmi úzkém kontaktu s endoplazmatickým retikulem (ER). Bylo prokázáno, že toto propojení je výhodné pro přenos iontů a lipidů, signalizaci a také membránovou dynamiku (Csordás et al. 2018). V roce 2006 bylo prostřednictvím elektronové tomografie prokázáno, že mezi vnější mitochondriální membránou a subdoménami hladkého a drsného ER dochází ke vzniku různě tvarovaných a velkých propojení (Csordás et al. 2006), která se označují jako MAM (mitochondrial-associated ER membranes). Bylo zjištěno, že tato propojení jsou účinná v udržování vápníkové rovnováhy mezi ER a mitochondriemi, a slouží také k transportu lipidů (Hayashi et al. 2009).

1.2.1.2 Mezimembránový prostor (IMS, z anglického intermembrane space)

Mezimembránový prostor je oblast lokalizovaná mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou. Díky přenosu proteinů, lipidů a dalších metabolitů slouží k propojení procesů probíhajících v mitochondriích s ostatními procesy v buňce. Mezimembránový prostor je z důvodu značné propustnosti vnější mitochondriální membrány pro malé molekuly podobný svým složením cytosolu. Kromě ostatních molekul obsahuje velké množství cytochromu *c*, který slouží nejen jako molekula energetického metabolismu, ale hraje také důležitou roli v programované buněčné smrti neboli apoptóze. Za fyziologických podmínek je pro cytochrom *c* vnější mitochondriální membrána zcela nepropustná. Její permeabilizací, změnami koncentrace Ca^{2+} (Scorrano et al. 2003) či vlivem proteinů rodiny Bcl-2 (z anglického B-cell lymphoma-2), však dochází k uvolnění cytochromu *c* do cytosolu a k jeho interakci s dalšími kaspázami, a tím ke spuštění následných apoptotických procesů (Brenner a Mak 2009).

1.2.1.3 Vnitřní mitochondriální membrána (IMM, z anglického inner mitochondrial membrane)

Vnitřní mitochondriální membrána má oproti membráně vnější výrazně větší povrch. Toto zvětšení povrchu poskytující větší prostor pro průběh metabolických reakcí, je způsobeno vchlípením vnitřní mitochondriální membrány ve specifické struktury, které se označují jako kristy (Mannella 2006). Vnitřní mitochondriální membrána je podobně jako

většina buněčných membrán téměř nepropustná pro ionty a většinu malých molekul. Jejich přenos, a tím i propustnost vnitřní mitochondriální membrány, je regulován pomocí specifických proteinových přenašečů. Přítomnost těchto přenašečů a komplexů ETS odlišuje vnitřní mitochondriální membránu od vnější a také od ostatních plazmatických membrán, protože jí zajišťuje vysoký podíl proteinů (75 %) oproti lipidům. Uvádí se, že vnitřní mitochondriální membrána obsahuje dokonce kolem 21 % všech proteinů nacházejících se v mitochondrii, zatímco ve vnější mitochondriální membráně se nachází pouze 6 % proteinů (Alberts 1998).

1.2.1.4 Mitochondriální matrix

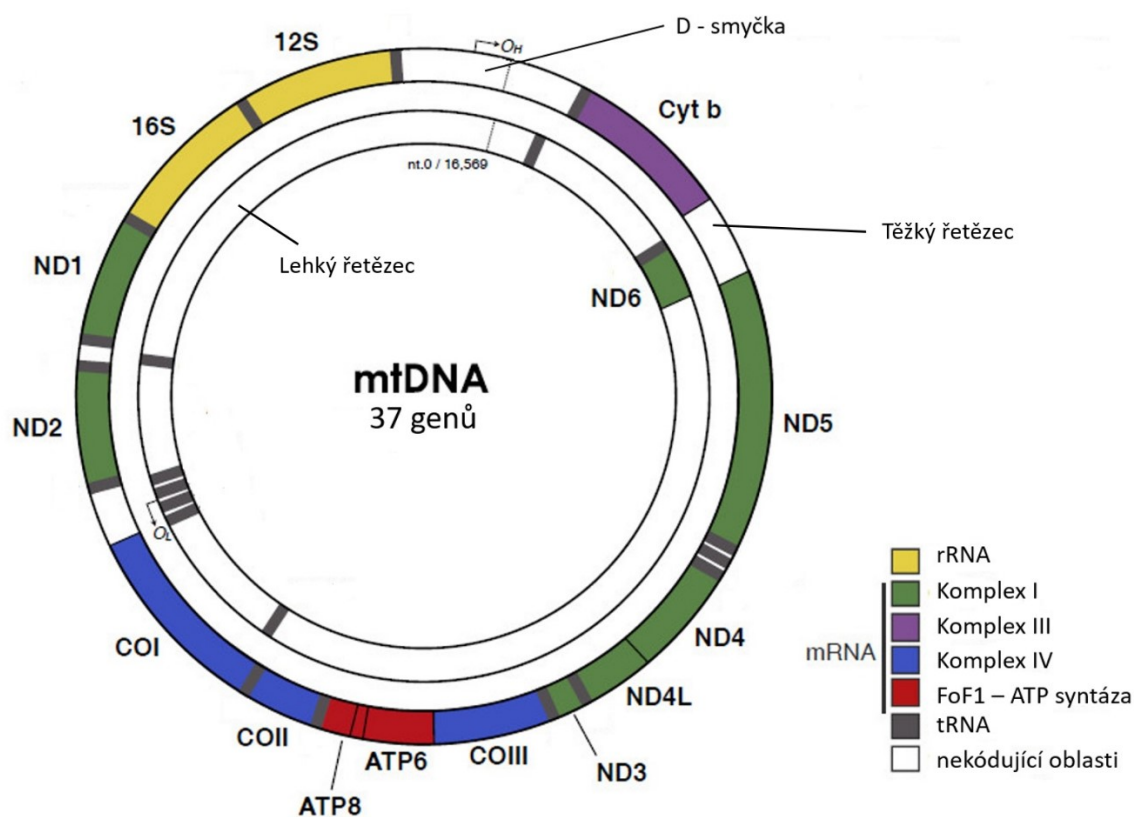
Jako mitochondriální matrix se označuje prostor ohraničený vnitřní mitochondriální membránou. Mitochondriální matrix je místem působení řady enzymů, které katalyzují četné metabolické procesy. Mezi hlavní z nich patří enzymy Krebsova cyklu. Matrix také obsahuje mitochondriální DNA (mtDNA), specifické ribozomy, tRNA a peptidy pro translaci mRNA (Alberts 1998).

1.2.1.5 Mitochondriální genom

Jednou z hlavních charakteristik odlišujících mitochondrie od ostatních buněčných organel je přítomnost vlastního kruhového genomu - mtDNA a specifických ribosomů umožňující lokální syntézu proteinů. Na základě proteomických, genomických a bioinformatických analýz bylo prokázáno, že savčí mitochondrie obsahují více než 1500 proteinů, které se liší v závislosti na typu tkáně (Nunnari and Suomalainen 2012). Mitochondriální DNA kóduje pouze 13 z těchto proteinů. Zbytek proteinů včetně těch, které jsou potřebné pro tvorbu mitochondriální RNA (polymeráza, ribozomální proteiny) a všechny enzymy Krebsova cyklu, byl během evoluce z mtDNA redukován přenosem genů do jádra. Jaderně kódované mitochondriální proteiny jsou syntetizovány v cytosolu a následně aktivně importovány a tříděny do jednotlivých mitochondriálních kompartmentů. Mitochondriální biogeneze tedy vyžaduje koordinaci exprese jaderných i mitochondriálních genů (Neupert a Herrmann 2007).

Lidská mtDNA je dvouvláknová kruhová molekula dlouhá 16 569 párů bází (bp). Mitochondriální DNA obsahuje 37 genů kódujících 2 rRNA, 22 tRNA a 13 polypeptidů. Jednotlivé řetězce mtDNA se rozdělují na lehký (L – z anglického light) a těžký (H – z anglického heavy) v závislosti na obsahu jednotlivých bází (viz Obrázek 3). Těžký

řetězec je výrazně obohacen o guanosiny (G), zatímco v lehkém řetězci je obsah G výrazně nižší. Lidský mitochondriální genom a mitochondriální genomy ostatních savců neobsahují introny a obsahují jen velmi málo nekódujících oblastí (Zinovkina 2019). Významnou součástí mtDNA je oblast, která se označuje jako D-smyčka (D-loop). Tato nekódující oblast je dlouhá 1124 bp a slouží jako promotor pro lehký i těžký řetězec mtDNA a obsahuje základní transkripční i replikační prvky. Oblast D-smyčky je častým místem změn mtDNA a obsahuje 2 hypervariabilní oblasti (HV1 a HV2), (Levin et al. 1999). Sekvenční analýza těchto 2 oblastí má široké využití nejen při forenzních analýzách, ale také při studiu evoluce člověka, příbuzenských vztahů nebo v diagnostice mitochondriálních onemocnění (Tran et al. 2020)



Obrázek 3. Genom lidské mitochondriální DNA. Dvouvláknová kruhová molekula dlouhá 16 569 bp obsahující 37 genů kódujících 2rRNA, 22tRNA a 13 polypeptidů. Zobrazen lehký (L), těžký řetězec (H) a D-smyčka. OH – počátek a směr syntézy těžkých řetězců při replikaci; OL - počátek a směr syntézy lehkých řetězců při replikaci (převzato a upraveno podle Amorim et al. 2019).

Mitochondriální DNA je přítomná ve vysokém počtu ($10^3 - 10^4$ molekul) téměř ve všech buňkách, její množství se může lišit v závislosti na fyziologickém stavu dané buňky či na typu tkáně. Převážná většina kopií mtDNA je dokonce při narození identická (Sharma

et al. 2005). Velký počet kopií a také dědičnost po mateřské linii jsou důležitými faktory, které výrazně odlišují mitochondriální genom od jaderného.

1.2.2 Tvorba energie v mitochondriích

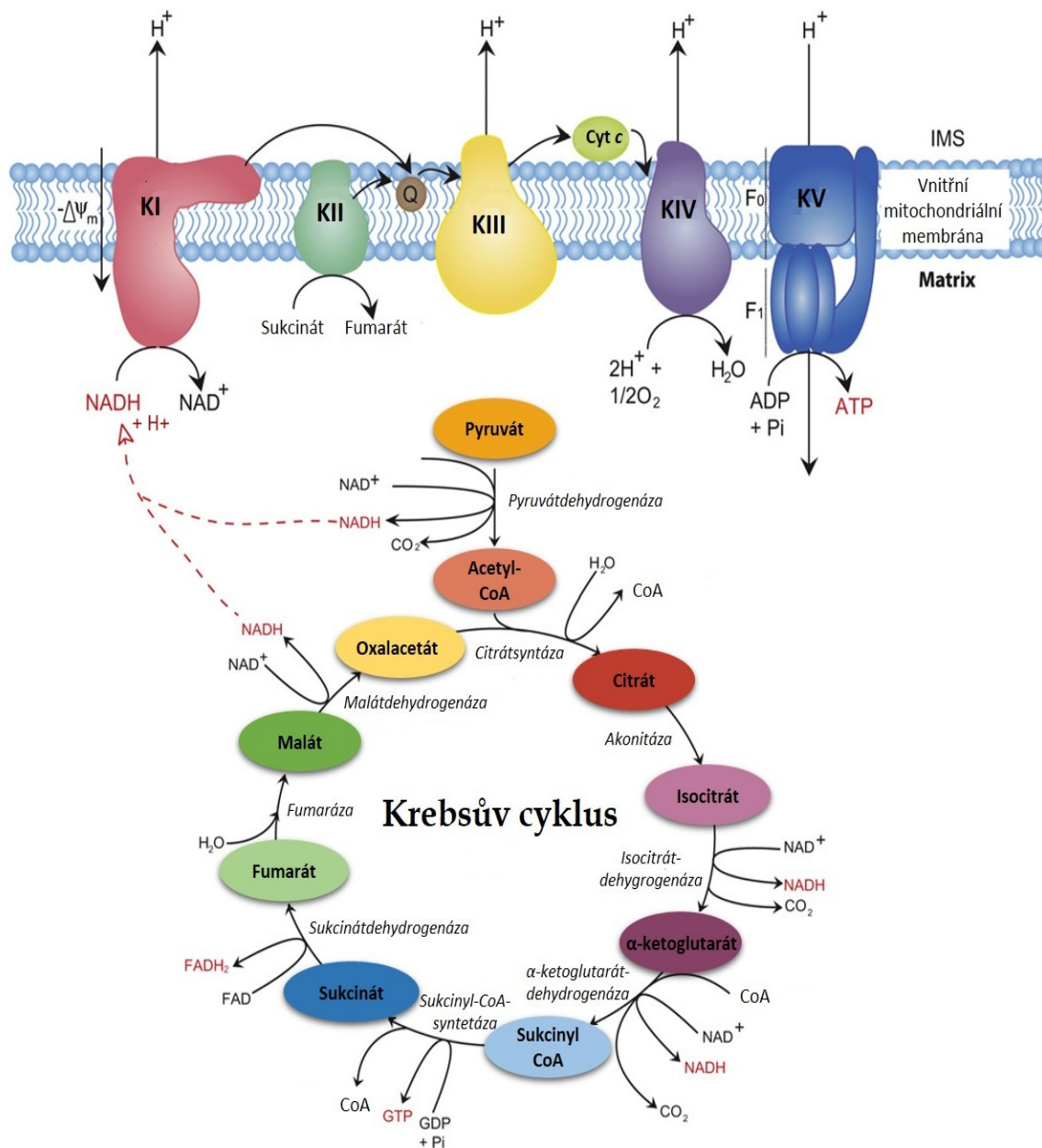
Mitochondrie jsou buněčné organely zodpovědné za produkci energie v buňkách. Tvorbu energie v mitochondriích popisuje chemiosmotická teorie, za kterou dostal Peter Mitchell v roce 1978 Nobelovu cenu za chemii. Pro tvorbu energie je důležitá vnitřní mitochondriální membrána, která je místem lokalizace sofistikovaného elektrontrasportního systému, jenž slouží k přenosu elektronů z vhodných substrátů přes jednotlivé komplexy systému dýhacího řetězce (komplex I – IV) s využitím 2 mobilních elektronových přenašečů (koenzymu Q a cytochromu *c*) až na finální akceptor elektronů, a to molekulární kyslík (viz Obrázek 4). Jednotlivé komplexy se liší velikostí redoxního potenciálu, a díky tomu je zajištěn správný směr toku elektronů. Energie, která je při tomto procesu postupně uvolňována, slouží k pumpování protonů (H^+) do mezimembránového prostoru, a tím se vytváří protonový gradient mezi mitochondriální matrix a mezimembránovým prostorem, který je využit ATP syntázou (označovanou též jako komplex V) k tvorbě ATP z ADP a P_i (Mitchell 1961).

1.2.2.1 Krebsův cyklus

Hlavními energetickými zdroji pro tvorbu ATP v mitochondriích jsou sacharidy, lipidy a proteiny. Tyto 3 zdroje energie mohou být katabolizovány na acetyl-CoA, který následně vstupuje v mitochondriální matrix do Krebsova cyklu. Počátek cesty jednotlivých substrátů je odlišný. Sacharidy jsou nejprve v cytosolu metabolizovány v procesu glykolýzy na pyruvát, který následně vstupuje do mitochondrií, kde je pyruvátdehydrogenázou přeměněn na acetyl-CoA. Mastné kyseliny jsou na acetyl-CoA přeměňovány na vnitřní ploše vnitřní mitochondriální membrány a v mitochondriální matrix v procesu β -oxidace (Bartlett a Eaton 2004). Cesta přeměny jednotlivých aminokyselin na pyruvát, acetyl-CoA či meziproducty Krebsova cyklu je složitější a existuje pro ni celá řada specifických enzymů.

V Krebsově cyklu je následně acetylová skupina acetyl-CoA přenesena na oxalacetát za vzniku molekuly citrátu. V následující sérii sedmi enzymatických kroků se citrát oxiduje zpět na oxalacetát. Přebývající 2 uhlíky z Krebsova cyklu odchází jako molekuly oxidu uhličitého a elektrony jsou přeneseny do kofaktorů nikotinamidadeninukleotidu (NADH

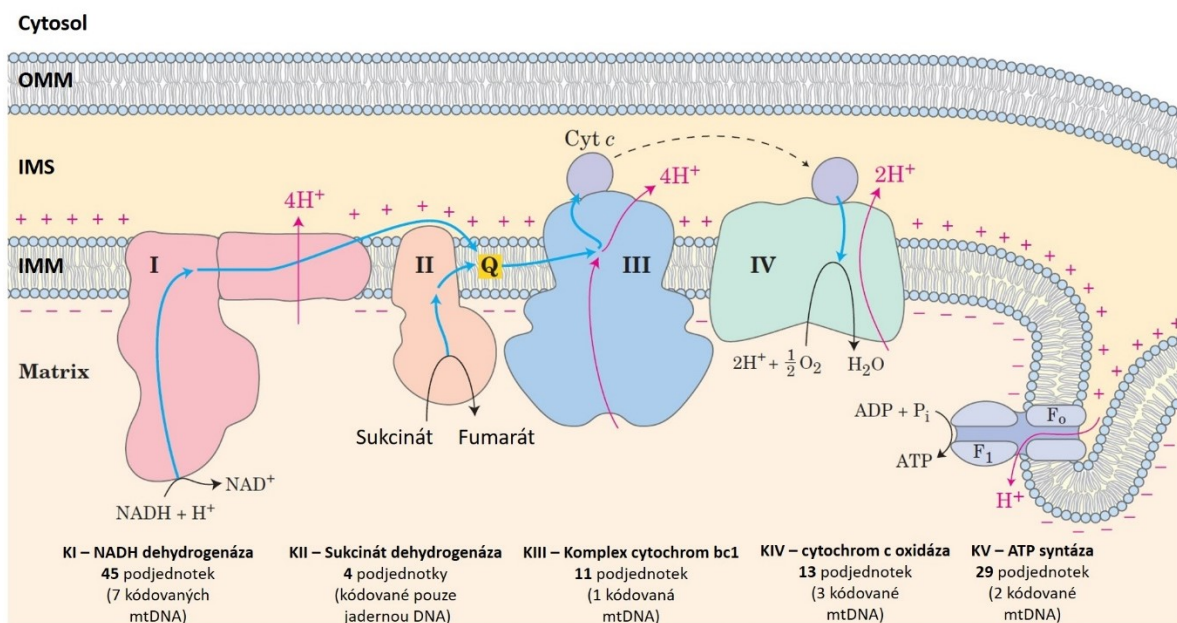
+ H⁺) a flavinadenindinukleotidu (FADH₂). Vzniklý oxalacetát znovu vstupuje do Krebsova cyklu (viz Obrázek 4), zatímco energie uvolněná ve formě NADH + H⁺ a FADH₂ je přenesena k elektrontransportnímu systému (shrnutí v Osellame 2012).



Obrázek 4. Bioenergetika elektrontransportního systému (ETS) a Krebsova cyklu. Pyruvát je metabolizován enzymy Krebsova cyklu na vysokoenergetické molekuly jako NADH, GTP a FADH₂. Vytvořený NADH je následně přeměněn komplexem I na NAD⁺, a tím je spuštěn přenos elektronů v ETS. Zároveň dochází k pumpování protonů do mezimembránového prostoru a vzniklý protonový gradient je využit ATP syntázou (KV) k tvorbě ATP. Q-koenzym Q; Cyt c – cytochrom c; H⁺ - proton; F₀ a F₁ – části KV; NADH – nikotinamidadenindinukleotid; ADP – adenosindifosfát; ATP – adenosintrifosfát; CoA – koenzym A, GDP – guanosindifosfát; GTP – guanosintrifosfát (převzato a upraveno podle Osellame 2012).

1.2.2.2 Elektrontransportní systém (ETS)

ETS či dýchací řetězec je systém proteinových komplexů lokalizovaný na vnitřní mitochondriální membráně, který se skládá ze série elektronových přenašečů. Většina z nich jsou integrální membránové proteiny, jejichž prostetické skupiny jsou schopné přijímat či odevzdávat jeden nebo dva elektrony. Kromě integrálních membránových proteinů jsou součástí ETS také 2 mobilní přenašeče (viz Obrázek 5). Jednotlivé komplexy ETS nejsou v membráně lokalizované izolovaně, ale tvoří tzv. superkomplexy, které přispívají ke katalytickému zesílení procesů v ETS, k účinnějšímu směřování substrátů či ke stabilizaci jednotlivých komplexů (Schägger 2001). Bylo zjištěno, že komplexy KI, KIII, KIV a KV tvoří superkomplexy různého zastoupení jednotlivých komplexů, například ATP syntáza vytváří dimery, které v kristách vytváří oligomerní řetězce. Jediným z komplexů, který superkomplexy nevytváří je KII (Chaban et al. 2014).



Obrázek 5. Mitochondriální elektrontransportní systém (ETS). ETS slouží k přenosu elektronů z jednotlivých substrátů přes 4 respirační komplexy (KI-KIV) a 2 mobilní přenašeče (koenzym Q a cytochrom *c*) na finální akceptor elektronů, molekulární kyslík. OMM – vnější mitochondriální membrána; IMS - mezimembránový prostor; IMM – vnitřní mitochondriální membrána; I, II, III, IV, V – komplexy ETS; H^+ - proton; Q – koenzym Q; Cyt *c* – cytochrom *c*, NADH – nikotinamidadenindinukleotid; O_2 – kyslík; H_2O – molekula vody; modré šipky - znázorňují cestu elektronů; - - elektron; + - proton; mtDNA – mitochondriální DNA (převzato a upraveno podle Lehninger et al., 2013).

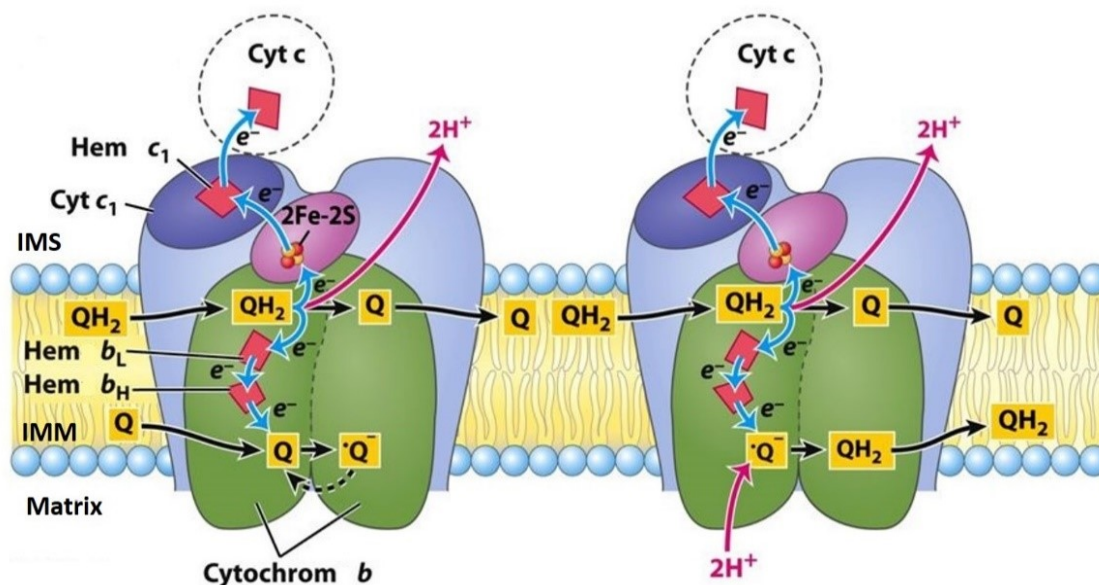
Cesta přenosu elektronů v elektrontransportním systému z NADH začíná na komplexu I (KI) neboli **NADH-ubichinonoxidoreduktáze** (EC 7.1.1.2)¹. Komplex I je jedním z největších membránově vázaných enzymů v buňce a největším z komplexů ETS s molekulární hmotností kolem 980 kDa. Tento enzym ve tvaru písmene L obsahuje hydrofobní doménu zanořenou do vnitřní mitochondriální membrány a hydrofilní rameno, které obsahuje vazebné místo pro NADH a směřuje do mitochondriální matrix (Sazanov a Walker 2000). Savčí komplex I se skládá ze 45 podjednotek (7 kódovaných mtDNA – ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 a ND6). Čtrnáct z těchto podjednotek je základních, obsahují katalytický aparát a jsou konzervované od bakterií po člověka; 31 podjednotek je specifických pouze pro savce (Zhu et al. 2016). Počátek tvorby energie v ETS začíná přenosem $2e^-$ z NADH na flavinmononukleotid (FMN) nacházející se v hydrofilním rameni KI. Tyto elektrony jsou poté přeneseny přes 9 FeS center až na mobilní přenašeč elektronů koenzym Q, který je následně přepraví až na další z komplexů ETS - na komplex III. Současně s přenosem $2e^-$ z NADH komplexem I dochází k translokaci $4 H^+$ z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru (Baradaran et al. 2013).

Další z komplexů ETS, který zprostředkovává přenos e^- , je komplex II (KII) neboli **sukcinátdehydrogenáza** (EC 1.3.5.1). Tento 123 kDa velký komplex je stejně jako KI lokalizovaný na vnitřní mitochondriální membráně a skládá se ze 4 podjednotek (kódovaných pouze jadernou DNA). Rozlišujeme u něj 2 domény, velkou (solubilní) a malou (ukotvující komplex ve vnitřní mitochondriální membráně), (Sun et al. 2005). Komplex II zprostředkovává 2 různé reakce, hraje důležitou roli v ETS a zároveň je součástí Krebsova cyklu, kde oxiduje sukcinát na fumarát, a díky tomu vytváří funkční propojení mezi těmito dvěma procesy. Hlavní funkcí KII v ETS je přenos $2 e^-$ uvolněných během oxidace sukcinátu na fumarát, které redukují kovalentně vázaný FAD na $FADH_2$. Elektrony dále pokračují přes jednotlivá FeS centra KII až na koenzym Q, který tím redukuje. Z koenzymu Q jsou následně elektrony přeneseny na komplex III. KII je jediným z komplexů ETS, u nějž nedochází k přenosu H^+ do mezimembránového prostoru (Bezawork-Geleta et al. 2017).

¹ EC (z anglického *Enzyme Commission number*) je klasifikační číslo daného enzymu přiřazené na základě chemické reakce, kterou katalyzuje

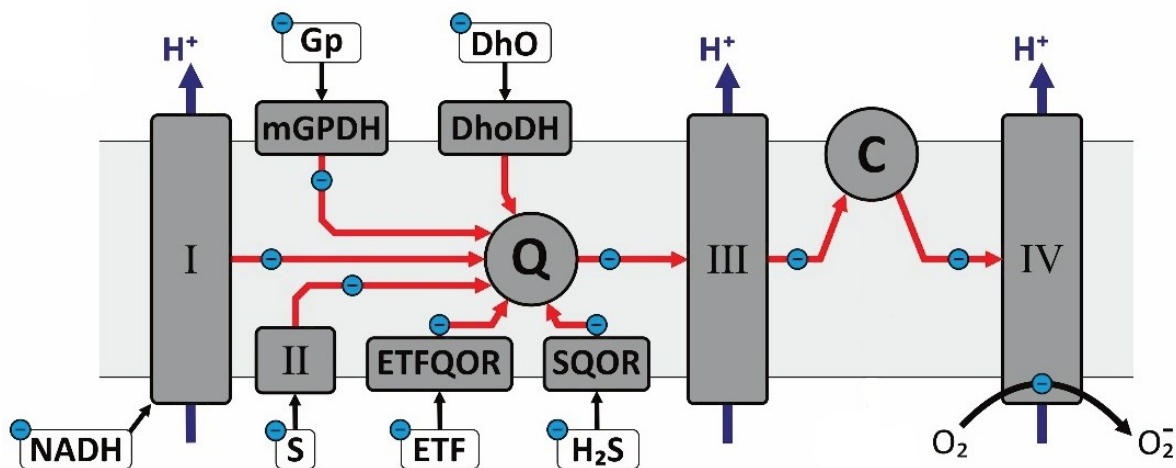
Koenzym Q redukovaný komplexem I nebo komplexem II volně difunduje vnitřní mitochondriální membránou a přenáší elektrony na komplex III (KIII) neboli komplex **cytochrom bc₁** (EC 7.1.1.8; ubichinol:cytochrom-*c*-oxidoreduktáza). Komplex III má molekulovou hmotnost 240 kDa a skládá se z 11 podjednotek, z nichž pouze 1 (cytochrom *b*) je kódovaná mtDNA (Horsefield et al. 2006). Přenos elektronů komplexem III z koenzymu Q na cytochrom *c* probíhá prostřednictvím tzv. **Q cyklu** (viz Obrázek 6). Redukovaný koenzym Q (QH₂) přináší na KIII 2e⁻, jejichž cesta komplexem je odlišná. První elektron putuje přes FeS centra tzv. Rieskeho proteinu, cytochrom *c_I* až na oxidovaný cytochrom *c*, který tím redukuje. Druhý elektron putuje přes 2 hemy cytochromu *b* (*b_L* a *b_H*) na oxidovaný koenzym Q (Q), který redukuje na semichinonový radikál (•Q⁻). Při tomto procesu se uvolní do mezimembránového prostoru 2H⁺. Následně dojde k vazbě dalšího QH₂. Jeden z elektronů opět putuje přes FeS centra, cytochrom *c_I* až na cytochrom *c*. Druhý elektron putuje přes cytochrom *b* na koenzym Q, který tím plně redukuje na QH₂. Na každé 2 QH₂, které vstoupí do Q cyklu, připadá regenerace jednoho QH₂. Zároveň při přenosu elektronů z druhého QH₂ dochází k uvolnění 2H⁺ do mezimembránového prostoru. Celkem se tedy přenosem 2e⁻ a cytochrom *c* uvolní do mezimembránového prostoru 4H⁺ (Crofts 2004).

Cytochrom *c* následně přenáší elektrony (vždy pouze 1) na komplex IV (KIV) neboli **cytochrom *c* oxidázu** (E.C. 7.1.1.9). Tento komplex o velikosti 204 kDa se skládá z 13 proteinových podjednotek, z nichž 3 jsou kódované mtDNA (CO1, CO2, CO3). Elektrony z cytochromu *c* jsou komplexem IV přeneseny přes měďnaté centrum Cu_A, hem *a*, hem *a*₃, dále přes 2. měďnaté centrum Cu_B až na finální akceptor elektronů, kterým je molekulární kyslík. Postupný přenos 4e⁻ z cytochromu *c* přes KIV umožní vznik dvou molekul H₂O z jedné molekuly O₂ a zároveň přenos 4H⁺ z mitochondriální matrix do mezimembránového prostoru (Brzezinski a Gennis 2008).



Obrázek 6. Q cyklus zobrazen ve 2 krocích. V 1. kroku (vlevo) se oxidovaný koenzym Q (Q) redukuje na semichinonový radikál ($\cdot Q^-$), který je ve 2. kroku (vpravo) plně redukován (QH_2). Mezitím jsou 2 molekuly QH_2 oxidovány na Q, čímž se uvolní na 1 molekulu QH_2 2 protony do mezimembránového prostoru (celkem na 2 molekuly QH_2 4protony). Každý QH_2 nesoucí $2e^-$ přenesse postupně $1e^-$ přes FeS centra na cytochrom c_1 , ze kterého putuje na cytochrom c a 2. elektron prostřednictvím cytochromu b na molekulu Q. IMS-mezimembránový prostor; IMM – vnitřní mitochondriální membrána; H^+ - proton; e^- - elektron; Q – oxidovaný koenzym Q; QH_2 – plně redukováná forma koenzymu Q; $\cdot Q^-$ - semichinonový radikál; 2Fe-2S – železo sirná centra; cyt c – cytochrom c ; dráha elektronů komplexem III znázorněna modrými šipkami (převzato a upraveno podle Lehninger et al. 2013).

Kromě substrátů vstupujících do ETS, které jsou přímo či nepřímo tvořeny převážně v mitochondriální matrix v metabolických procesech jako je Krebsův cyklus či β -oxidace mastných kyselin, existují i další zdroje elektronů jako například pyruvátdehydrogenázový komplex, sulfid oxidáza, glutamátdehydrogenáza, dihydroorotátdehydrogenáza, sulfid-ubichinonoxidoreduktáza nebo mitochondriální glycerolfosfátdehydrogenáza (Kohoutová et al. 2018), (viz Obrázek 7).



Obrázek 7. Komplexní pohled na ETS včetně dalších donorů elektronů. Zdroji elektronů ETS jsou substráty produkované v Krebsově cyklu či vznikající při β -oxidace mastných kyselin. Dalšími zdroji elektronů jsou pyruvátdehydrogenázový komplex, glutamátdehydrogenáza, mitochondriální glycerolfosfátdehydrogenáza, sulfidoxidáza, dihydroorotátdehydrogenáza, sulfidubichinon-oxidoreduktáza či cholindehydrogenáza (není zobrazena). II, III, IV – komplexy ETS; e^- – elektron; H^+ – proton; Q – koenzym Q; c – cytochrom c; O_2 – kyslík; NADH – nikotinamidadenindinukleotid; S – sukcinát; Gp – glycerolfosfát; DhO – hydroxyorotát; H_2S – hydrogensulfid; mGPDH – mitochondriální glycerolfosfát dehydrogenáza; ETF – elektron přenášející flavoprotein; SQOR – sulfid:ubichinon oxidoreduktáza; ETFQOR – elektron přenášející flavoprotein:ubichinon-oxidoreduktáza (Kohoutová et al. 2018).

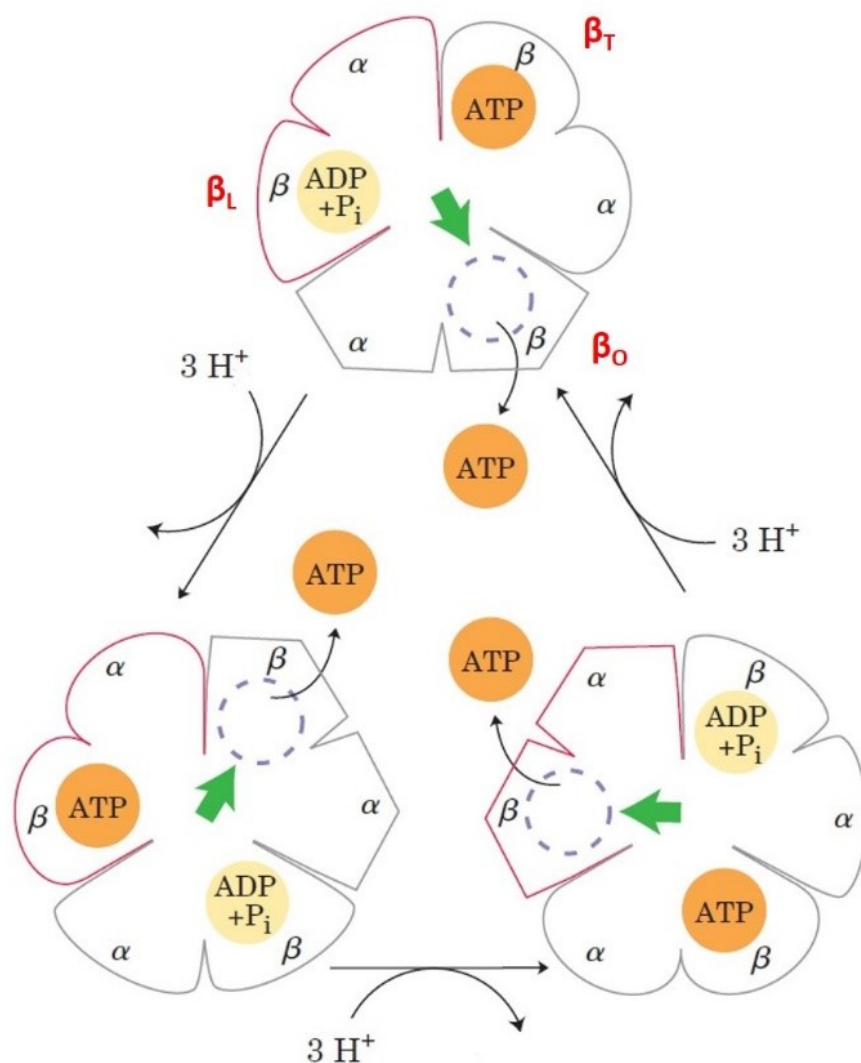
1.2.2.3 Tvorba ATP v elektrontransportním systému

Energie uvolněná přenosem elektronů přes jednotlivé komplexy ETS je zdrojem energie pro termodynamicky nepříznivé čerpání H^+ proti jejich koncentračnímu gradientu komplexy I, III a IV. Tím dochází k nárůstu protonového gradientu mezi mitochondriální matrix a mezimembránovým prostorem, který je následně využit komplexem V (KV) neboli **F_0F_1 -ATP syntázou** (EC 7.1.2.2) k syntéze ATP z ADP a anorganického fosfátu - P_i (Mitchell 1961). Lidská ATP syntáza je 592 kDa velký proteinový komplex složený z 29 podjednotek 18 různých typů, z nichž pouze 2 jsou kódované mtDNA (a a A6L). KV se skládá ze 2 funkčních domén: F_0 (označované jako stator) lokalizované ve vnitřní mitochondriální membráně a F_1 (označované jako rotor) směřující do mitochondriální matrix, které jsou propojené centrálním a periferním stonkem. Doména F_0 se skládá z 10 druhů podjednotek c, a, b, d, F_6 , OSCP (z anglického oligomycin sensitivity conferral protein) a doplňkových e, f, g a A6L. Doména F_1 obsahuje pouze 5 druhů podjednotek α , β , γ , δ , ϵ a inhibiční protein IF_1 . Podjednotky F_1 , γ , δ a ϵ tvoří tzv. centrální stonk komplexu V a podjednotky b, d, F_6 a OSCP tvoří stonk periferní (He et al. 2018).

Vzniklý protonový gradient mezi mitochondriální matrix a mezimembránovým prostorem je využit částí F_0 ATP syntázy k fosforylaci ADP. Přenos H^+ z mezimembránového prostoru zpět do mitochondriální matrix je totiž spojen s konformačními změnami jednotlivých podjednotek ATP syntázy. Protony nejprve prochází přes podjednotku a do prstence tvořeného podjednotkami c v F_0 části, což vyvolá rotaci γ podjednotky. Rotace γ podjednotky o 120° ve směru hodinových ručiček vede ke konformační změně v F_1 části, konkrétně v hexameru $\alpha_3\beta_3$ kde se na každém ze tří β podjednotek mění afinita pro jednotlivé substráty a produkty a může se z pevně navázaného ADP a P_i vytvořit ATP (viz Obrázek 8). Jednotlivé konformační stavy se označují jako otevřený stav β_o (z anglického open) kdy není navázáno nic, volný stav β_L (z anglického loose) kdy je navázáno ADP a P_i , a těsný stav β_T (z anglického tight) kdy je pevně vázáno ATP (Saraste 1999). Celý tento proces tvorby ATP lze popsat mechanismem vazebných změn, který poprvé popsal v roce 1975 Paul Boyer² (Boyer 1975).

Určit přesný počet protonů, a tedy i přesný počet molekul NADH či $FADH_2$, nutný k vytvoření 1 molekuly ATP, je obtížné. Záleží nejen na počtu podjednotek c F_0 části ATP syntázy, ale také na počtu e^- , které jsou úspěšně dopraveny ETS na cílový molekulární kyslík. Může docházet k úniku protonů přes vnitřní mitochondriální membránu, a tím k přeměně jejich energie na teplo. Tento proces se označuje jako odpojení oxidace od fosforylace. Odhaduje se však, že přenosem elektronů z 1 molekuly NADH vzniknou 3 molekuly ATP, zatímco z 1 molekuly $FADH_2$ pouze 2 molekuly ATP. Rozdíl je dán tím, že přenosem elektronů komplexem II nedochází k přenosu H^+ z matrix do mezimembránového prostoru (Ferguson 2010). Kromě toho, že v procesu ETS dochází k úniku protonů, může docházet také k úniku elektronů z jednotlivých komplexů ETS. Předčasný únik elektronů vede k jejich vazbě rovnou na kyslík a tím dochází ke vzniku superoxidu, který je vysoce reaktivní. Superoxid výrazně přispívá k oxidativnímu stresu, jenž hraje zásadní roli nejen v mnoha patologických stavech, ale také v procesech stárnutí (Cedikova et al. 2016).

² P. D. Boyer dostal společně s J.E. Walkerem a J. C. Skouem za objasnění syntézy ATP v roce 1997 Nobelovu cenu za chemii



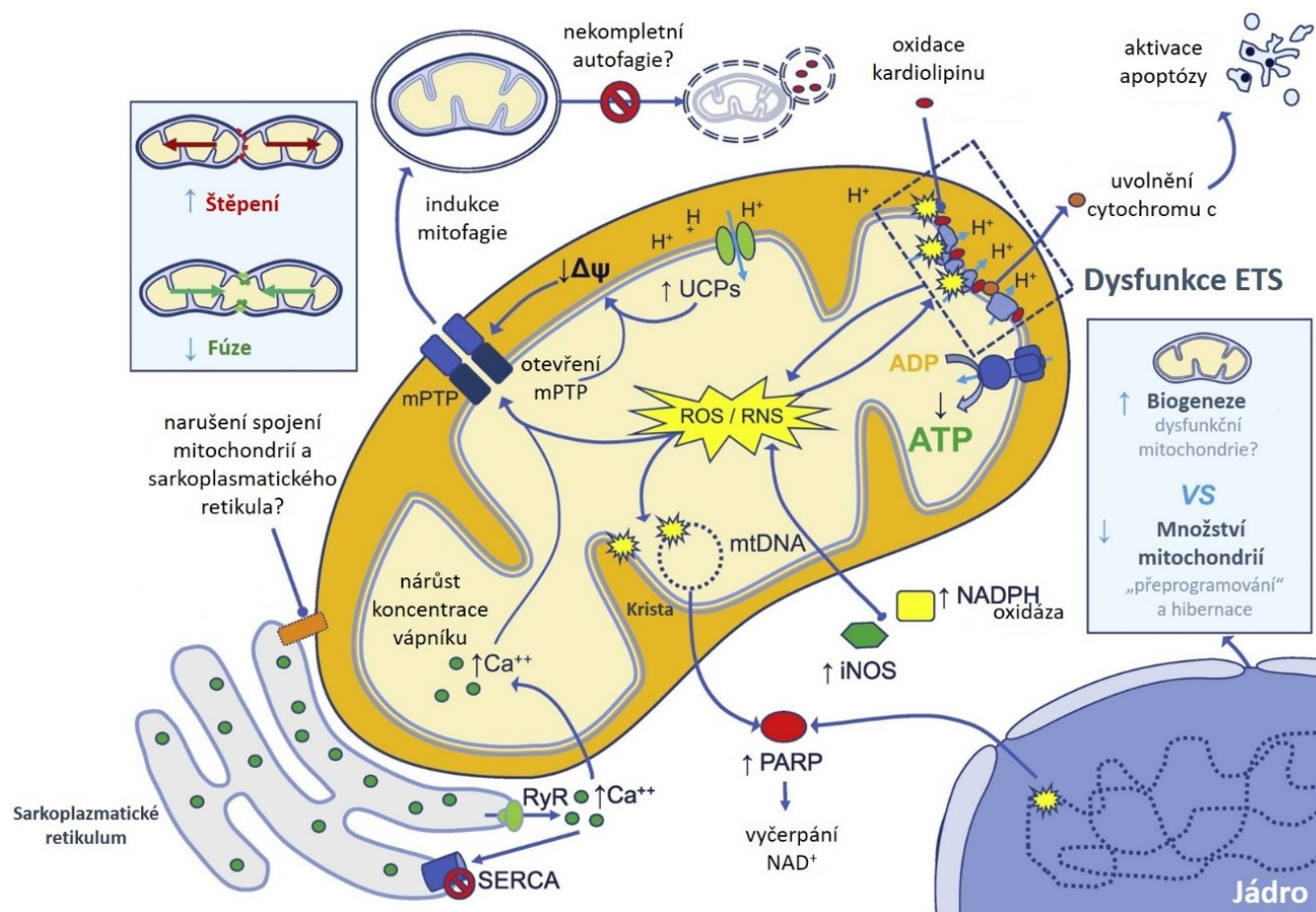
Obrázek 8. Model mechanismu vazebných změn ATP syntázy. F1 část ATP syntázy obsahuje 3 různá vazebná místa, jedno na každém páru α a β podjednotek. Jednotlivá vazebná místa se označují jako β_o – otevřené, kde není navázáno nic, β_L – volné, kde je navázáno ADP a P_i a β_T – těsné, kde je pevně vázáno ATP. Protonmotivní síla způsobí rotaci γ podjednotky (zelená šipka), která vyvolá konformační změnu dimeru α a β podjednotky. Tím se změní vazebné místo β_T na β_o a dojde k uvolnění ATP, β_o se změní na β_L , které je schopné vázat ADP a P_i a β_o se změní na β_T , které umožní vznik ATP z ADP a P_i (převzato a upraveno podle Lehninger et al. 2013).

1.3 Mitochondriální dysfunkce v sepsi

Navzdory obrovskému úsilí v preklinickém i klinickém výzkumu sepse, není její přesná patofyziologie stále do detailů objasněna. Zdá se však, že mitochondrie by v tomto procesu mohly hrát klíčovou roli. Stále častěji se totiž ukazuje, že v průběhu sepse dochází ke změnám mitochondriálních funkcí, a to na mnoha úrovních. Experimentální data naznačují, že dochází k ovlivnění mitochondriální produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku, biogeneze, obratu a struktury mitochondrií, vnitrobuněčné homeostázy vápníku, regulace apoptotických procesů a také k abnormalitám v ETS (viz Obrázek 9). Doposud nezodpovězenou otázkou však zatím zůstává, zda je narušená funkce mitochondrií primární příčinou, která vede k následné multiorgánové dysfunkci a sepsi, nebo zda se jedná pouze o jev průvodní, potenciálně zhoršující průběh onemocnění nebo naopak adaptační směřující k ochraně selhávajících orgánů.

1.3.1 Abnormality elektrontransportního systému

Za kritický jev ve vývoji multiorgánového selhání indukovaného sepsí jsou považovány abnormality v ETS, které mohou ovlivnit tvorbu ATP, což může následně způsobit až bioenergetický deficit (Singer 2014). Publikovaná data o změnách mitochondriální respirace u různých modelových organismů jsou však nehomogenní. Některá data poukazují na zjevné narušení mitochondriálních funkcí, u jiných studií nebyly pozorovány žádné změny či naopak bylo pozorováno jisté zvýšení. Narušená mitochondriální respirace byla pozorována například na zvířecích modelech sepse u prasat (Kozlov et al. 2010), koček (Crouser et al. 2002) a paviánů (Gellerich et al. 1999). Na rozdíl od toho většina experimentů provedených na hlodavcích neprokázala žádné změny mitochondriální respirace na úrovni jednotlivých orgánů, konkrétně v játrech, srdci a mozku. Pouze v několika málo případech byla pozorována snížená či dokonce zvýšená mitochondriální spotřeba kyslíku (Jeger et al. 2013). Většina studií naznačuje, že hlodavci jsou zřejmě méně náchylní k mitochondriální dysfunkci než prasata nebo kočky, a to i přesto, že u všech druhů došlo k propuknutí multiorgánové dysfunkce.



Obrázek 9. Soubor možných mechanismů vedoucích k mitochondriální dysfunkci v kardiomyopatii indukované sepsí . $\Delta\Psi$ – mitochondriální membránový potenciál; ETS – elektrontransportní systém; iNOS - inducibilní syntáza oxidu dusnatého; mPTP – mitochondriální pór přechodné propustnosti; PARP – poly(ADP-riboza) polymeráza ; RyR – ryanodinový receptor; SERCA – sarco/endoplazmatická vápníková ATPáza; UCPs – uncoupling proteiny; ADP – adenosindifosfát; ATP – adenosintrifosfát; H^+ - proton; Ca^{2+} - vápenaté ionty; ROS – reaktivní formy kyslíku; RNS – reaktivní formy dusíku; mtDNA – mitochondriální DNA (převzato a upraveno podle Stanzani et al. 2019).

Existují nejméně tři možná vysvětlení dysfunkce ETS spojené se sepsí a následné zhoršené produkce energie (Kohoutová et al. 2018), (viz Obrázek 10).

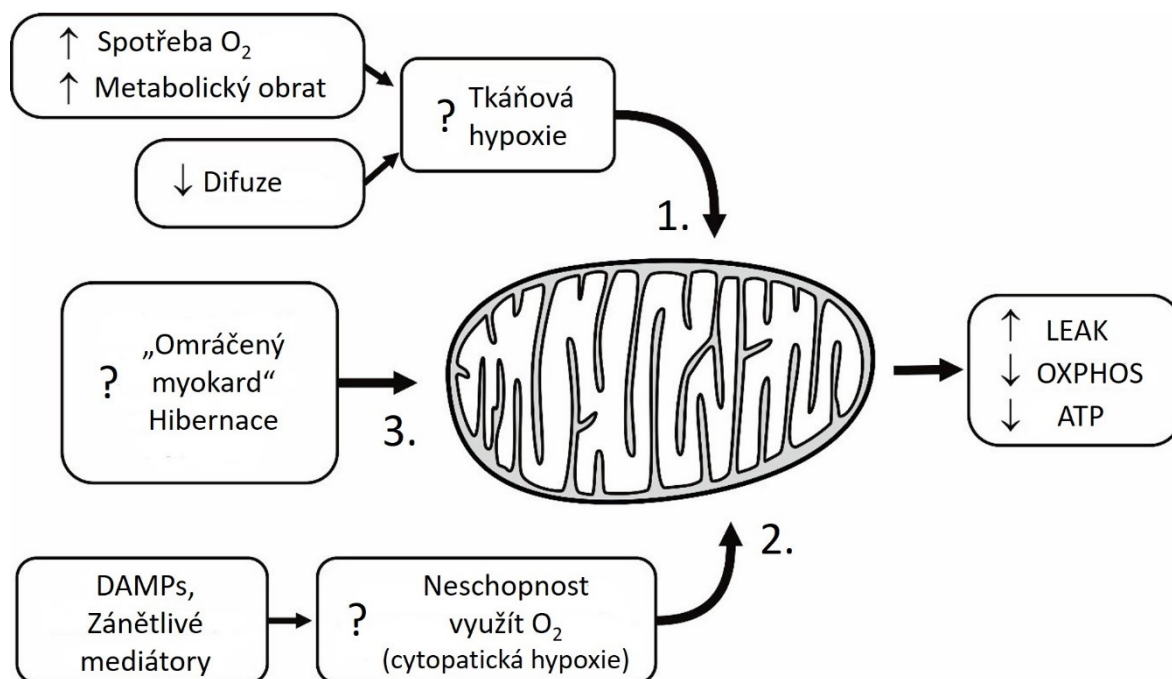
1. Výrazná variabilita respiračních funkcí u různých experimentálních modelů sepse naznačují, že poškození nemusí být primární, ale mohlo by být způsobeno sekundárními procesy vyvolanými dysregulovanou systémovou zánětlivou odpovědí (SIRS). Při SIRS dochází k nárůstu spotřeby kyslíku, který je vyvolán aktivací imunitního systému, zvýšenou tělesnou teplotou a nárůstem bazálního metabolismu. SIRS často vede i k oběhovým poruchám, což se může projevit zhoršeným prokrvením tkání a následnou sekundární hypoxií. V důsledku toho by mitochondriální snížení spotřeby kyslíku a tím doprovázený pokles tvorby ATP mohly souviset s **oběhovým selháním doprovázeným tkáňovou hypoxií** (Kozlov et al. 2017).

Bylo prokázáno, že u kriticky nemocných pacientů se sepsí dochází k nedostatečné produkci energie, která je spojena se zvýšenou rychlostí metabolismu, katabolismem bílkovin a tuků, negativní bilancí dusíku, hyperglykemií a inzulinovou rezistencí (Chioléro 1997). Souvislost těchto metabolických změn se změnami tělesné teploty či závažností onemocnění však nebyla prokázána, stejně jako souvislost s hyperdynamickou cirkulací typickou pro pacienty se SIRS (Kreymann et al. 1993). I přesto, že byly u pacientů se sepsí identifikovány změny průtoku krve v mikrocirkulaci (De Backer et al. 2002), pravá tkáňová hypoxie projevující se poklesem tkáňového pO_2 byla pozorována převážně v hypodynamické fázi sepse nebo u krátkodobého endotoxemického modelu sepse u hlodavců (Dyson et al. 2011). Navíc hodnota tkáňového pO_2 neodráží jen dodávku kyslíku do tkání, ale je spíše výsledkem rovnováhy mezi dodávkou kyslíku do tkání a jeho buněčnou spotřebou (Gattinoni et al. 1995, Hayes et al. 1997).

2. Další možnou příčinou by mohla být tzv. **cytopatická hypoxie** způsobená DAMPs a mediátory zánětu neboli stav, při kterém je snižena produkce ATP navzdory normálním hodnotám pO_2 v blízkosti mitochondrií (Fink 1997). Cytopatická hypoxie by mohla být zřejmě důsledkem několika různých avšak kompatibilních patogenních mechanismů jako například snížené dodávky klíčových substrátů (např. pyruvátu) do

energetického metabolismu (Vary 1996) nebo inhibice důležitých enzymů v Krebsově cyklu či ETS jako např. komplexu IV. Bylo prokázáno, že TNF α zřejmě prostřednictvím intracelulární signální kaskády vede k fosforylaci katalytické podjednotky I komplexu IV, což způsobí jeho inhibici, vede k poklesu mitochondriálního membránového potenciálu a ke snížení tvorby ATP (Samavati et al. 2008). Dalším z možných patogenních mechanismů cytopatické hypoxie je aktivace enzymu poly(ADP-ribóza)polymerázy-1 (PARP-1), který je za fyziologických podmínek aktivován jednovláknovými zlomy DNA a účastní se jejich oprav. Nadměrná aktivace enzymu PARP-1 může vést k vyčerpání buněčné energie, poškození mitochondrií a tkáňové dysfunkci (Huang a Shen 2009, Szabó et al. 1998). Posledním z mechanismů je zhroucení protonového gradientu mezi mezimembránovým prostorem a mitochondriální matrix, což se projeví odpojením oxidace od fosforylace (Fink 1997).

Mezi nálezy, které by podporovaly teorii cytopatické hypoxie, patří například nezměněný či dokonce zvýšený pO₂ v tkáních opakovaně pozorovaný v kosterním svalu pacientů (Boekstegers et al. 1991, Boekstegers et al. 1994) stejně jako snížená spotřeba kyslíku a tvorba ATP v mitochondriích kosterního svalstva (Brealey et al. 2002, Fredriksson et al. 2006). Data získaná z jiných tkání zvířecích modelů sepe však teorii cytopatické hypoxie příliš nepodporují. Byly zde totiž pozorován jak snížený tak i nezměněný pO₂ v játrech, ledvinách a střevní sliznici (Dyson et al. 2011, Lund et al. 1995). Zároveň ale výsledky studií mitochondriální respirace v těchto orgánech vykazují velkou míru variability, a proto neposkytují přesvědčivé důkazy o narušené utilizaci kyslíku před nástupem dysfunkce orgánů (Patil et al. 2014, Porta et al. 2006). Četné studie přesto naznačují, že různé mediátory zánětu jako například reaktivní formy kyslíku (Kozlov et al. 2017), dusíku, oxid uhelnatý (Duvigneau a Kozlov 2017) či sirovodík mohou výrazně ovlivnit zpracování kyslíku mitochondriemi (Módis et al. 2014), a tím teorii cytopatické hypoxie naopak podporují.



Obrázek 10. Role mitochondrií v sepsi. Tři možná vysvětlení dysfunkce ETS spojené se sepsi.

1. Zvýšená spotřeba kyslíku společně se zhoršenými difuzními procesy v mikrocirkulaci vede k tkáňové hypoxii projevující se sníženou spotřebou kyslíku a narušením produkce ATP. 2. Mitochondrie mohou být přímo vystaveny DAMPs a mediátorům zánětu, které způsobí tkáňovou hypoxii vedoucí k poklesu spotřeby kyslíku v podmínkách zachovaného tkáňového krevního toku a pO_2 . 3. Snížená spotřeba kyslíku by mohla souviset s aktivní rolí mitochondrií v řízení strategie přežití připomínající „omráčení“ či hibernaci. Tyto procesy mohou vést ke zvýšení mitochondriálního respiračního stavu LEAK, snížení oxidativní fosforylace a omezení produkce ATP. DAMPs – z anglického damage-associated molecular patterns; O_2 – kyslík; ATP – adenosin trifosfát (převzato a upraveno podle Kohoutová et al., 2018).

3. Pokles spotřeby kyslíku může být také zřejmě spojen s **metabolicko-bioenergetickým útlumem**, ve kterém sehrávají aktivní roli mitochondrie. Ty jsou schopné vyvinout speciální strategii přežití připomínající „**omráčení**“ nebo **hibernaci**, která se vyznačuje lokální kontraktilní dysfunkcí myokardu v důsledku zhoršeného zásobování O_2 (Singer 2017). Oba tyto jevy byly původně popsány v srdci vystavenému ischemii. Termín „**omráčený myokard**“ (z anglického stunned myocardium) se používá k popisu abnormální kontraktilní funkce levé komory, která přetrvávala hodiny nebo dny po koronární okluzi, jež netrvala déle než 15 minut a zároveň nebyla doprovázena buněčnou smrtí (Braunwald a Kloner 1982, Heyndrickx et al. 1975). Příčinou „omráčení“ myokardu je nejspíše vratné poškození vápníkového kanálu sarkoplazmatického retikula vlivem oxidačního stresu, což vede

k hromadění vápníku v cytoplasmě a následné inhibici aktomyozinového komplexu (Guaricci et al. 2018). Vnitrobuněčné vápníkové přetížení může aktivovat proteázy jako například kalpain I, která následně degraduje troponin I, což vede ke kontraktilní dysfunkci (Van Eyk a Murphy 2001). Při **hibernaci myokardu** dochází vlivem chronicky narušené koronární perfuze k poškození kontraktilní funkce levé komory, která může být revaskularizací obnovena (Braunwald a Rutherford 1986, Rahimtoola 1993). Hibernace myokardu vyvolaná ischemií je považována za regulační opatření udržující integritu myokardu (Heusch et al. 2005).

Na buněčné úrovni se oba procesy překrývají a jsou charakterizované metabolickou adaptací, konkrétně zpomalením metabolické aktivity a přesměrováním z aerobního metabolismu náročného na kyslík na anaerobní glykolýzu. Ta není energeticky příliš výhodná, ale zároveň není závislá na přísunu kyslíku. Různé faktory této metabolické adaptace byly pozorovány například na lidských a myších kardiomyocytech vystavených sepsi nebo endotoxémii. Byla u nich prokázána downregulace enzymů Krebsova cyklu, pokles katabolismu mastných kyselin, glukózy a ketonů, akumulace glykogenu a triacylglycerolů v srdci (Matkovich et al. 2017, Umbarawan et al. 2017), zvýšená aktivita pyruvátdehydrogenázy-kinázy vedoucí k potlačení funkce pyruvátdehydrogenázy (Standage et al. 2017) nebo snížená mitochondriální biogeneze (Lancel et al. 2009). Naopak v srdci septických potkanů byla detekována zvýšená biogeneze mitochondrií (Hotchkiss et al. 1991, Vanasco et al. 2014) a zároveň nebyly pozorovány změny v množství meziproduktů Krebsova cyklu. Studie zabývající se plazmatickými metabolomy a proteomy hospitalizovaných pacientů, kteří přežili sepsi prokázala, že větší kapacita katabolismu mastných kyselin je spojena s vyšší pravděpodobností přežití sepse (Langley et al. 2013).

Nejpravděpodobněji lze vysvětlit metabolicko-bioenergetický útlum tak, že adaptační snížení kontraktilní funkce myokardu vede k poklesu energetických nároků a slouží k udržení integrity a životaschopnosti myokardu (Heusch a Schulz 2000).

1.3.2 Změny mitochondriální dynamiky a struktury

Na základě mnoha experimentálních studií bylo prokázáno, že v průběhu sepse dochází také ke změnám v biogenezi, obratu a struktuře mitochondrií.

1.3.2.1 Mitochondriální biogeneze

Mitochondriální biogeneze je proces, který zajišťuje normální množství, distribuci a funkci mitochondrií v buňkách a který je aktivován řadou různých signálních drah. Klíčovou roli v biogenezi mitochondrií hraje protein PGC-1 α (PPAR γ -koaktivátor-1 α), který aktivuje transkripční faktory zodpovědné za produkci mitochondriálních proteinů (Ventura-Clapier et al. 2008). PGC-1 α aktivuje například jaderné respirační faktory 1 (NRF1) a 2 (NRF2) zodpovědné za regulaci transkripce jaderně kódovaných podjednotek ETS (Scarpulla et al. 2012). Mitochondriální biogeneze je aktivována v případech nízké produkce ATP, vlivem oxidačního stresu nebo přetížení vápníkem. Rovnováha v množství mitochondrií je kromě biogeneze zajištěna také procesy autofagie, a to nespecifickou autofagií i mitochondriálně specifickou autofagií (tzv. mitofagií), které odstraňují poškozené a nefunkční mitochondrie (Kubli a Gustafsson 2012).

Z dostupných experimentálních dat je patrné, že na počátku sepse dochází ke snížení počtu mitochondrií a následně k výrazné aktivaci mitochondriální biogeneze (Vanasco et al. 2014, Reynolds et al. 2009). Například v kardiomyocytech septických potkanů byl pozorován značný nárůst markerů biogeneze PGC-1 α a NRF1, a zároveň byla zjištěna stimulace autofagie (Hickson-Bick et al. 2008). Také u myši bylo prokázáno, že v průběhu zotavení se z bakteriální sepse dochází k aktivaci PGC-1 α a dalších faktorů, které vedou k nárůstu mitochondriální biogeneze. To zřejmě vede k obnovení oxidačního metabolismu a je důležitým faktorem pro přežití (Haden et al. 2007). Aktivace mitochondriální biogeneze byla prokázána také v kosterním svalu pacientů, kteří přežili sepsi (Carré et al. 2010). Mitochondriální biogeneze se tedy jeví jako zásadní krok v procesu zotavení se ze sepse. Zároveň bylo prokázáno, že s nárůstem markerů biogeneze je spojena také zvýšená exprese antioxidačního systému (konkrétně superoxiddismutázy). Pacienti, kteří na sepsi zemřeli, měli naopak prokazatelně sníženou expresi jaderných genů kódujících enzymy Krebsova cyklu a ETS (Matkovich et al. 2017). Přesné mechanismy, kterými se u septických pacientů mění transkripce genů kódujících mitochondriální proteiny, nejsou známy. Zdá se však, že

u septických pacientů mohou ROS způsobit poškození mtDNA a tím mohou být zodpovědné za určitou nedostatečnost mitochondriální transkripce a biogeneze (Suliman et al. 2004).

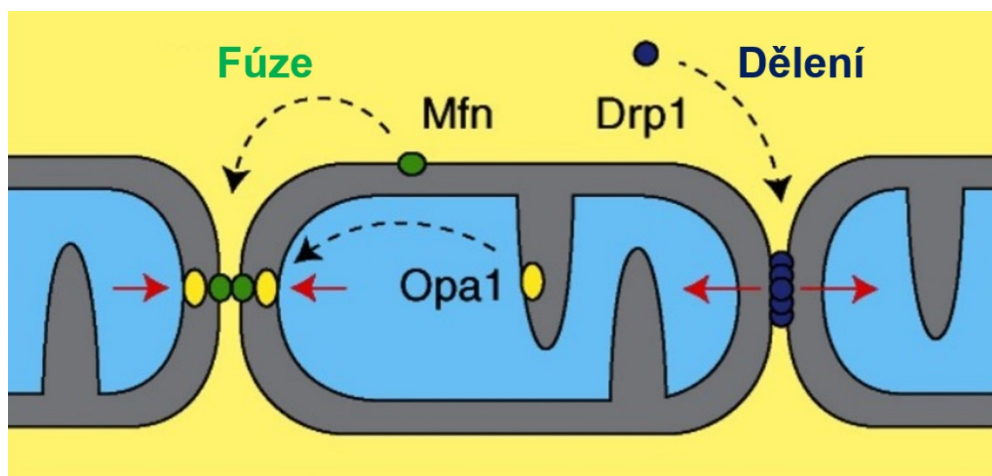
1.3.2.2 Změny mitochondriální struktury

V souvislosti se sepsí byly pozorovány odchylky od běžné fyziologické struktury mitochondrií. V srdci potkanů, kterým byla sepse indukována injekcí lipopolysacharidu (LPS), byly nalezeny výrazně „oteklé“ (anglicky swollen) mitochondrie s narušenou strukturou krist a obsahující vnitřní váčky (Vanasco et al. 2014). Crouser et al. pozorovali také „otok“ mitochondrií a zároveň ztrátu integrity mitochondriálních membrán v játrech koček po aplikaci LPS (Crouser et al. 2002). A také prokázali, že použití cyklosporinu A, vede k oslabení abnormalit mitochondriální struktury vyvolaných LPS, což naznačuje zapojení mitochondriálního póru přechodné propustnosti (mPTP z anglického mitochondrial permeability transition pore) v procesu „otékání mitochondrií“ (Crouser et al. 2004). Hypertrofické mitochondrie s nepravidelnými kristami byly nalezeny i v posmrtných vzorcích kriticky nemocných pacientů se sepsí (Vanhorebeek et al. 2005).

Naproti tomu v jiných studiích nebyly změny mitochondriální struktury pozorovány téměř vůbec. Ve vzorcích jater odebraných septickým pacientům měla většina mitochondrií normální vzhled a intaktní membránu, stejné výsledky byly potvrzeny také na myších (Watanabe et al. 2009). Změny mitochondriální struktury nebyly pozorovány ani v jaterní tkáni a izolovaných jaterních mitochondriích potkanů se sepsí indukovanou LPS (Kozlov et al. 2009). I v další studii provedené na myších, u kterých byla sepse vyvolaná cékální ligací a punkcí (CLP), měly pozorované jaterní mitochondrie normální strukturu, ale v hepatocytech byl zjištěn zvýšený počet intracelulárních váčků, které byly identifikované jako autofagosomy (Takahashi et al. 2013). Zvýšený počet intracelulárních váčků byl pozorován také v hepatocytech potkanů se sepsí indukovanou LPS, a to v blízkosti mitochondrií. Tyto váčky byly následně identifikovány jako dilatované ER (Nürnberg et al. 2012). Přesto, že mezi výsledky multiorgánové dysfunkce a ultrastruktury mitochondrií nepanuje zjevná shoda, data nepřímě naznačují zapojení mitochondrií. Zdá se tedy, že ne morfologické, ale spíše funkční změny mitochondrií mohou pomoci v pochopení patologických dopadů při sepsi.

1.3.2.3 Procesy fúze a dělení mitochondrií

Mitochondrie neustále mění svůj tvar prostřednictvím procesů fúze a dělení a také pohybem po cytoskeletu. Délka a tvar mitochondrií je dán rovnováhou mezi rychlostmi procesů fúze a dělení, které mohou být ovlivněny metabolickými a patologickými stavy buněk či mitochondrií. Štěpení a fúze jsou důležité pro růst, mitochondriální distribuci v rámci buňky, udržení mitochondriální sítě a hrají také důležitou roli při apoptóze a mitofagii. Hlavní proteiny zodpovědné za procesy fúze a dělení jsou převážně členové rodiny dynaminu. Jejich funkce jsou řízené adaptorovými proteiny na povrchu mitochondrií a řadou regulačních molekulárních procesů. Fúzi vnější mitochondrií membrány u savců zprostředkovávají mitofusiny - mitofusin 1 (Mfn1) a 2 (Mfn2), fúzi vnitřní mitochondriální membrány zprostředkovává Opa1 (z anglického optic atrophy 1). Mitochondriální dělení zajišťuje protein Drp1 (z anglického dynamin-related protein 1), který se pohybuje mezi cytosolem a vnější mitochondriální membránou (viz Obrázek 11), (van der Bliek et al. 2013).



Obrázek 11. Procesy fúze a dělení mitochondrií. Mitofusiny (mitofuzin 1 a 2) zprostředkovávají fúzi vnější mitochondriální membrány a Opa1 fúzi vnitřní mitochondriální membrány. Proces dělení mitochondrií zajišťuje protein Drp1 (převzato a upraveno podle van der Bliek et al. 2013).

Bylo prokázáno, že u myši po aplikaci LPS dochází k mitochondriální fragmentaci, a to zřejmě z důvodu narušené interakce proteinů Drp1/Fis1 (z anglického mitochondrial fission protein 1), která hraje zásadní roli v rozvoji srdečního oxidačního poškození a srdeční dysfunkce v sepsi (Haileselassie et al. 2019). Také v játrech potkanů po CLP byla pozorována nerovnováha mezi mitochondriálními procesy fúze a dělení, konkrétně zvýšená mitochondriální fragmentace, která v tomto případě přispívala k poškození buněk

a apoptóze. Použití inhibitoru Drp1 *in vivo* mělo příznivé účinky na mitochondriální funkce a apoptózu u tohoto modelu sepse (Gonzalez et al. 2014). Stejný inhibitor však bohužel nedokázal zlepšit mitochondriální a kontraktilní funkce v srdci endotoxemických myší, což poukazuje na orgánově specifické působení (Preau et al. 2016). Morfologické změny mitochondrií odpovídající změnám v procesech fúze a dělení byly detekovány také 24 hodin po podání endotoxinu v srdečních mitochondriích potkanů (Vanasco et al. 2014). I model těžké sepse indukované CLP vyvolal v myokardu myší nerovnováhu mezi procesy fúze a dělení doprovázenou aktivací Drp1 a downregulací OPA1, které byly spojené s abnormalitami mitochondriální struktury, mitochondriální dysfunkcí a poklesem srdeční kontraktility (Sánchez-Villamil et al. 2016). Aktivace Drp1 byla společně s menší velikostí mitochondrií, jejich zvýšenou fragmentací a abnormalitami morfologie a funkce, zaznamenána také u myší po aplikaci LPS (Preau et al. 2016). Zatímco u myší po subletální dávce LPS došlo k mírnému zvýšení exprese OPA1 (Piquereau et al. 2013). Tyto protichůdné výsledky mohou nejspíše odrážet rozdíly v indukci sepse, modelovém organismu a závažnosti onemocnění. Většina experimentálních dat však svědčí pro narušení mitochondriálních procesů fúze a dělení při sepsi.

1.3.3 Oxidativní a nitrosativní stres

Za fyziologických podmínek jsou mitochondrie hlavním zdrojem reaktivních forem kyslíku (ROS) v buňkách. ETS totiž není 100% účinný a při přenosu mohou elektrony uniknout ještě před tím, než doputují na komplex IV a reagovat s kyslíkem za vzniku superoxidového aniontu a peroxidu vodíku. Uvádí se, že za fyziologických podmínek dochází k odklonění 1-2 % elektronů, ze kterých vzniknou ROS (Chance et al. 1979). *In vivo* či za podmínek zvýšené poptávky však může být situace odlišná (Brand 2016). Nerovnováha mezi produkcí ROS a mitochondriálními antioxidačními procesy vede k postupné akumulaci ROS a nárůstu oxidačního stresu. Vysoké koncentrace ROS mohou narušovat signální kaskády, vést k vratnému či nevratnému poškození proteinů, lipidů nebo DNA (Dikalov 2011). Kromě toho může oxidační stres vést k indukci zlomů DNA, které aktivují enzym pro jejich opravu PARP. Jeho nadměrná aktivace následně může způsobovat vyčerpání buněčné energie a poškození mitochondrií (Bai et al. 2015). Kromě ROS může mitochondriální ETS produkovat oxid dusnatý (NO) případně jeho další vedlejší produkty nazývané reaktivní formy dusíku (RNS), (Catharina Duvigneau a Kozlov 2017). RNS mohou způsobovat oxidace, nitrosylace nebo nitrace proteinů, nukleových kyselin i antioxidantů jako například

glutathionu (Brown a Borutaite 2004). Oxidativní a nitrosativní stres či mitochondriální nárůst koncentrace vápníku mohou zvýšit propustnost mPTP. Jak již bylo zmíněno, vnitřní mitochondriální membrána je za fyziologických podmínek velmi málo propustná. Patologické otevření mPTP tak může způsobovat mitochondriální depolarizaci, narušení ETS, uvolňování vápníku a „bobtnání“ mitochondrií. To má za následek vyčerpání ATP, poškození vnější mitochondriální membrány a uvolnění proapoptotických faktorů, například cytochromu *c* (Bernardi a Di Lisa 2015).

Účinky oxidativního stresu v sepsi jsou popsány v mnoha studiích provedených na různých experimentálních zvířatech i u pacientů a jsou brány jako ústřední součást patofyziologie sepse. Bylo prokázáno například, že peroxidace mitochondriálního kardiolipinu, který se nachází ve vnitřní mitochondriální membráně a má zásadní funkci v udržení struktury krist a organizaci komplexů ETS do superkomplexů, vede k narušení komplexů ETS, uvolnění cytochromu *c* a následné inhibici mitochondriální respirace, zvýšení produkce ROS a aktivaci apoptózy (Paradies et al. 2014). Léčba mitochondriálním antioxidantem, který se selektivně váže na kardiolipin, vedla ke zmírnění mitochondriální dysfunkce, zánětu, k poklesu oxidačního stresu a apoptózy v mozku, plicích, játrech a ledvinách septických myší (Li et al. 2016, Wu et al. 2015). Na CLP modelu myší bylo popsáno, že zánětu myokardu předcházelo mitochondriální poškození a nárůst oxidačního stresu. Tyto abnormality byly odvráceny upregulací mitochondriálního antioxidačního systému (Haileselassie et al. 2017). V biopsických vzorcích kosterního svalu pacientů se sepsí byla detekována zvýšená produkce NO, vyčerpání antioxidační kapacity, mitochondriální dysfunkce a snížená produkce ATP, které prokazatelně souvisely se selháním orgánů pacientů (Brealey et al. 2002). Roli oxidativního a nitrosativního stresu v patofyziologii sepse potvrzují rovněž studie zaměřené na použití antioxidantů. Použití mitochondriálně cílených antioxidantů jako Mito-VitE (Yao et al. 2015) a MitoQ (Supinski et al. 2009) u zvířecích modelů sepse totiž vedlo prokazatelně ke zlepšení funkce mitochondrií a myokardu.

1.3.4 Změny mitochondriální vápníkové homeostázy

Mitochondrie hrají zásadní roli v udržování buněčné homeostázy vápníku, absorpci přebytečného cytosolického vápníku, a tím v zachování nízkých, netoxických hladin vápníku v cytosolu. Zároveň fyzická i funkční komunikace mezi mitochondriemi

a sarko/endoplazmatickým retikulem a optimální dynamika mitochondrií je velice důležitá pro vápníkovou homeostázu, a tím i mitochondriální metabolismus (Lopez-Crisosto et al. 2017). Vápník totiž společně s ADP jsou hlavními modulátory ETS. Vápník stimuluje ETS, a tím reguluje nárůst syntézy ATP. To je důležité například v kardiomyocytech, kde tento mechanismus umožňuje rychle reagovat na změny srdeční zátěže a energetické požadavky buněk (Brookes et al. 2004). Mitochondriální vápník je potřebný také pro udržení antioxidační kapacity v mitochondriích, protože reguluje tvorbu ROS vyvolanou nárůstem syntézy ATP (Kohlhaas et al. 2010). V přítomnosti oxidačního stresu může hrát vápník v mitochondriích negativní roli. Vlivem ROS může dojít k nahromadění vápníku v mitochondriích a k otevření mPTP, uvolnění cytochromu *c* z mitochondrií a následné aktivaci drah buněčné smrti (Halestrap et al. 1997). Není proto divu, že abnormality ve vnitrobuněčné homeostáze vápníku se mohou podílet na mnoha patologiích včetně sepsy.

Změny vápníkové homeostázy byly zkoumány převážně v septickém srdci, kde byl u většiny použitých modelů pozorován pokles cytosolického přechodného stavu vápníku (rozdíl mezi systolickou a diastolickou koncentrací vápníku), a to bylo spojeno s nárůstem koncentrace vápníku v cytoplasmě při diastole a poklesem množství vápníku v sarkoplazmatickém retikulu. Tyto změny byly nejspíše spojené se změnami vápníkové homeostázy v sarkoplazmatickém retikulu, konkrétně s nefunkčními ryanodinovými receptory (RyR) a sarco/endoplazmatickou vápníkovou-ATPázou (SERCA), u kterých došlo ke zvýšenému uvolňování a k poklesu vychytávání vápníku (Hobai et al. 2015). Změny mitochondriální koncentrace vápníku byly pozorovány i u endotoxemických potkanů, kde byl detekován nárůst mitochondriální koncentrace vápníku, abnormality v ETS, membránovém potenciálu a s tím související metabolické selhání a srdeční dysfunkce (Hassoun et al. 2008). U septických pacientů vápníková homeostáza v srdci nebyla zkoumána. Ale bylo prokázáno, že užívání blokátorů vápníkových kanálů je spojeno s poklesem úmrtnosti na sepsi (Wiewel et al. 2017).

2 Cíle práce a hypotézy

2.1 Cíle práce

Na velkém zvířecím modelu sepse, konkrétně u prasat s progresivní peritoneální sepsí:

1. Stanovit vliv klinicky relevantní sepse na mitochondriální respiraci permeabilizovaných vláken levokomorové srdeční svaloviny.
2. Zhodnotit účinky vagové stimulace na mitochondriální respiraci permeabilizovaných vláken levokomorové srdeční svaloviny.
3. Určit vliv experimentální terapie sepse pomocí mezenchymálních kmenových buněk na mitochondriální respiraci permeabilizovaných vláken levokomorové srdeční svaloviny.

2.2 Hypotézy

Na základě jednotlivých cílů jsme stanovili následující hypotézy:

1. První hypotézou je, že sepse může ovlivňovat mitochondriální respiraci myokardu prasete. V literatuře byly prokázány mnohačetné změny mitochondriální respirace myokardu u sepse indukované na malých laboratorních zvířatech.
2. U malých zvířecích modelů sepse byl pozorován příznivý účinek stimulace bloudivého nervu a aplikace mezenchymálních kmenových buněk na změny vyvolané sepsí. Proto i u velkého zvířecího modelu sepse předpokládáme, že po použití těchto terapeutických intervencí dojde ke zlepšení jednotlivých parametrů mitochondriální respirace ovlivněných sepsí.

3 Materiál a metody

3.1 Příprava experimentálního modelu prasete domácího

Experimentální model prasete domácího stejně jako veškeré intervence provedené na prasatech (indukce sepse, stimulace bloudivého nervu či aplikace mezenchymálních kmenových buněk) byly vykonány ve spolupráci s kolegy z Ústavu fyziologie a kolegy z Experimentální laboratoře intenzivní medicíny Biomedicínského centra LF UK v Plzni.

3.1.1 Etické aspekty práce se zvířaty

Při všech prováděných experimentech bylo se zvířaty zacházeno v souladu s Evropskou směrnicí na ochranu obratlovců používaných pro pokusné a jiné vědecké účely (86/609/EHS). Experimenty byly schváleny Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky. Veškeré experimenty na zvířatech byly prováděny v Biomedicínském centru Lékařské fakulty v Plzni na akreditovaném pracovišti Experimentální laboratoře intenzivní medicíny.

3.1.2 Zvolený modelový organismus

Pro experimenty bylo použito prase domácí (plemeno Přestické černostrakaté prase) obou pohlaví a podobné hmotnosti ($44,2 \pm 6,1$ kg) z konvenčního chovatelského zařízení (ZD Mladotice, Česká republika).

3.1.3 Anestezie a instrumentace prasat

Pokusná zvířata byla 18 hodin před experimentem držena na lačno s neomezeným přístupem k vodě. Anestezie byla zahájena intramuskulární aplikací tiletaminu-zolazepamu (4,4 mg/kg), xylazinu (2,2 mg/kg) a atropinu (0,05 mg/kg) a intravenózním podáním 2% propofolu (1-2 mg/kg). Následně byla provedena orotracheální intubace a byla zahájena umělá plicní ventilace (FiO_2 0,3; PEEP 8 cm H_2O ; dechový objem 10 ml/kg; respirační frekvence byla upravena tak, aby udržela koncentraci CO_2 na konci výdechu mezi 4 a 5 kPa). V průběhu chirurgické instrumentace byla anestezie udržována kontinuálním intravenózním podáváním propofolu (4-6 mg/kg/h) a fentanylu (8-10 $\mu\text{g/kg/h}$). Svalová relaxace byla navozena intravenózním podáváním rocuronia (0,2-0,4 mg/kg/h). Po instrumentaci byla

anestezie udržována propofolem (1-4 mg/kg/h) a fentanylem (5-10 µg/kg/h). V průběhu chirurgických zákroků byla pokusným zvířatům podávána infuze roztoku Ringerfundinu (B. Braun Melsungen AG, Německo) v množství 10 ml/kg/h která byla následně snížena na 7 ml/kg/h. Normoglykémie v arteriální krvi (4,5 – 7 mmol/l) byla udržována v průběhu celého experimentu infuzí 10% glukózy dle potřeby.

Prasatům byl zaveden femorální arteriální katetr umožňující nepřetržité monitorování krevního tlaku a odběr arteriálních krevních vzorků. Pro monitorování hemodynamických parametrů byly zvířatům zavedeny do venae jugulares externae centrální žilní katetr a plicní katetr (Swan-Ganzův katetr), (viz Obrázek 12). Laparotomicky byly zavedeny do Morrisonova a Douglasova anatomického prostoru dva silikonové drény pro následnou inokulaci výkalů (Jarkovska et al. 2016).

3.1.4 Indukce sepse u zvířat

U skupiny septických zvířat byla seps indukována fekální peritonitidou. Po chirurgické přípravě následovala 6hodinová fáze zotavení a až poté probíhala základní měření. Fekální peritonitida byla vyvolána aplikací 1g/kg autologních výkalů (odebraných před operací, rozpuštěných v 200 ml izotonického solného roztoku při teplotě 37 °C a udržovaných při teplotě 37 °C do doby aplikace) do břišní dutiny prostřednictvím připravených drenů. Kromě kontinuální infuze krystaloidního roztoku byly zvířatům podávány tekutinové bolusy (10 ml/kg Ringerfundinu) pro udržení normovolemie. Kontinuálně byl intravenózně podáván noradrenalin v případě, že střední arteriální tlak (MAP z anglického mean arterial pressure) klesl pod 65 mmHg a byl titrován pro udržení MAP nad 70 mmHg (Jarkovska et al. 2016).

3.1.5 Měření jednotlivých parametrů

V průběhu experimentu byly měřeny hemodynamické parametry jako CO (srdeční výdej z anglického Cardia Output), systémový vaskulární odpor (SVR z anglického systemic vascular resistance) a plnicí tlaky obou komor (CVP z anglického central venous pressure a PAOP z anglického pulmonary artery occluded pressure). V arteriální krvi získané před experimentem a 12, 18 a 24 a hodin po indukci sepse byly pomocí imunotestů stanoveny plazmatické hladiny tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF α) a interleukinu 6 (IL-6). Elektrokardiogram (EKG, konkrétně svod II) byl zaznamenáván za použití systému

Biopac (Biopac Systems Inc., Santa Barbara, USA). Vzorkovací frekvence byla 1000 Hz. V kontrolní skupině prasat (bez indukce sepse) byly registrovány 2 pětiminutové záznamy, a to před indukcí sepse a 24 h poté. V septické skupině prasat začal EKG záznam 30 minut před indukcí sepse a pokračoval dalších 24 hodin nebo do doby, než zvíře zemřelo. Dlouhodobé záznamy EKG byly rozděleny do 1hodinových částí, ve kterých byla analyzována variabilita srdeční frekvence (Jarkovska et al. 2016).

3.1.6 Stanovení SOFA skóre

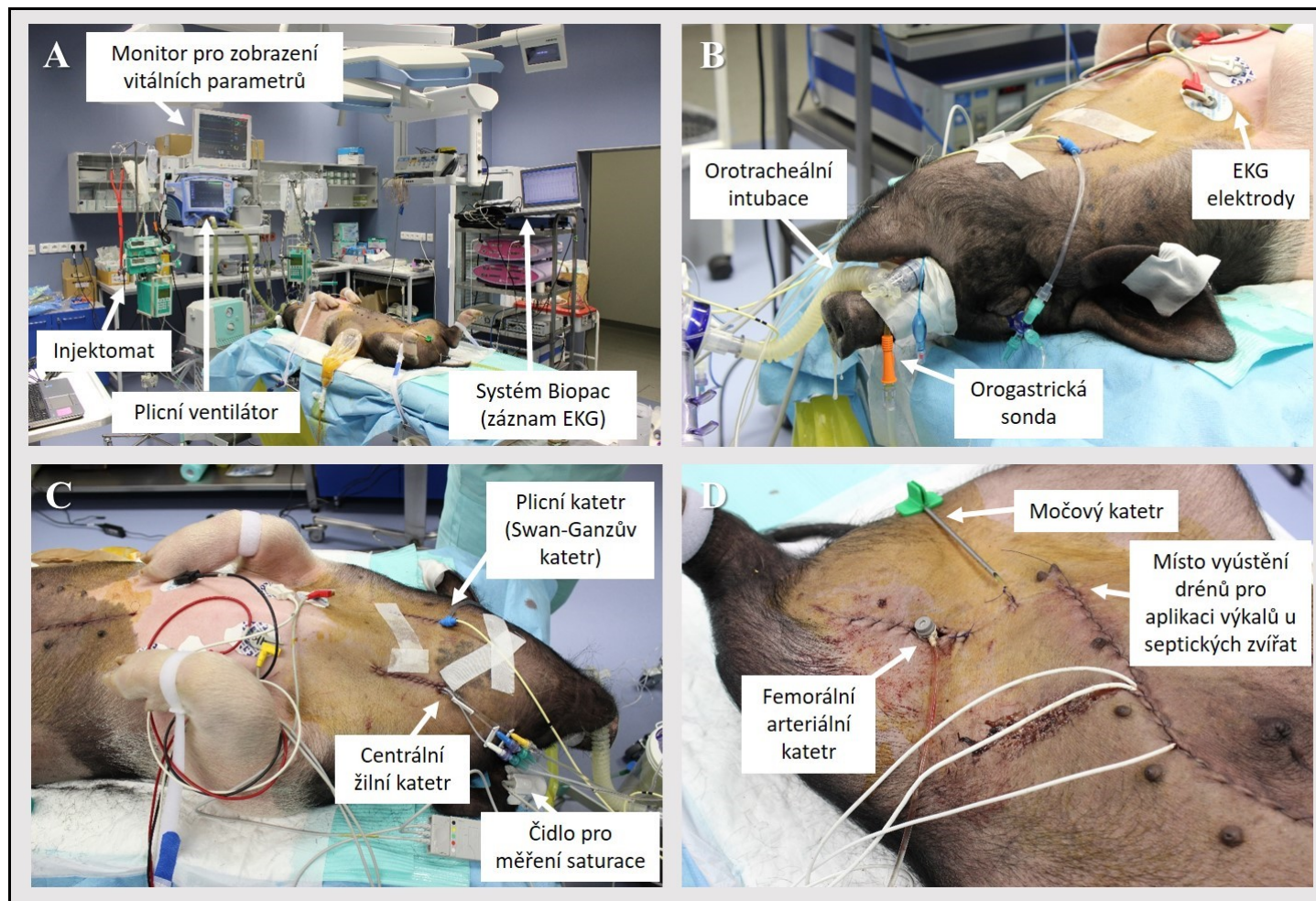
Modifikované skóre postupného selhání orgánů (SOFA skóre) bylo stanoveno na základě Třetí mezinárodní konsensuální definice pro sepsi a septický šok a modifikované vyloučením Glasgowské stupnice hloubky bezvědomí (GSC; z anglického Glasgow Coma Scale), (Singer et al. 2016).

3.1.7 Stimulace bloudivého nervu (VNS z anglického Vagus Nerve Stimulation)

Ve skupině zvířat kde byl stimulován bloudivý nerv, došlo v průběhu chirurgické přípravy nejprve k obnažení bloudivého nervu v krční oblasti a následně na něj byla připojena bipolární stimulační elektroda (Harvard Apparatus, Holliston, MA). Samotná stimulace začala 6 hodin po indukci peritonitidy a pokračovala až do konce experimentu. Bloudivý nerv byl stimulován obdélníkovými impulsy (frekvence 2 Hz, amplituda 5 mA, doba trvání 2 ms) s použitím izolátoru stimulů s konstantním proudem a s integrovaným generátorem impulsů (Isostim A320; WPI, Sarasota, FL).

3.1.8 Aplikace mezenchymálních kmenových buněk (MSC z anglického Mesenchymal Stem Cells)

Aplikované MSC byly izolované z kostní dřeně zdravých zvířat a zpracované dle současných standardů. U skupiny zvířat, kterým byly podávány MSC, došlo k pomalé infuzi MSC 6 hodin po indukci peritonitidy v klinicky relevantní dávce ($1 \times 10^6/\text{kg}$) během 10minut jednorázovou intravenózní aplikací do centrálního žilního katetru (Horak et al. 2020).



Obrázek 12. Instrumentace prasete domácího v průběhu experimentu. **A)** Instrumentované prase na operačním sále Experimentální laboratoře intenzivní medicíny. **B)** Prase se zavedenou orotracheální intubací, orogastrickou sondou a s EKG elektrodami. **C)** Místa lokalizace plicního (Swan-Ganzova) katetru, centrálního žilního katetru a čidla pro měření saturace. **D)** Místa zavedení femorální arteriálního katetru, močového katetru a lokalizace drénů pro aplikaci výkalů u septických zvířat (autor fotografií: MUDr. Lukáš Nalos, Ph.D.).

3.1.9 Délka experimentu a jeho ukončení

Celkově experimenty trvaly 34 hodin (z toho 4 hodiny chirurgická instrumentace, 6 hodin zotavení a následně 24 hodin po indukci peritonitidy). Na konci experimentu byla zvířata usmrcena předávkováním anestetiky a bylo jim opatrně vyjmuto srdce, které bylo vloženo do ledově chladného Tyrodova roztoku (složení: NaCl 137 mmol/l; KCl 4,5 mmol/l; MgCl₂ 1 mmol/l; CaCl₂ 2 mmol/l; glukóza 10 mmol/l; HEPES 5 mmol/l; pH bylo upraveno pomocí NaOH na 7,4).

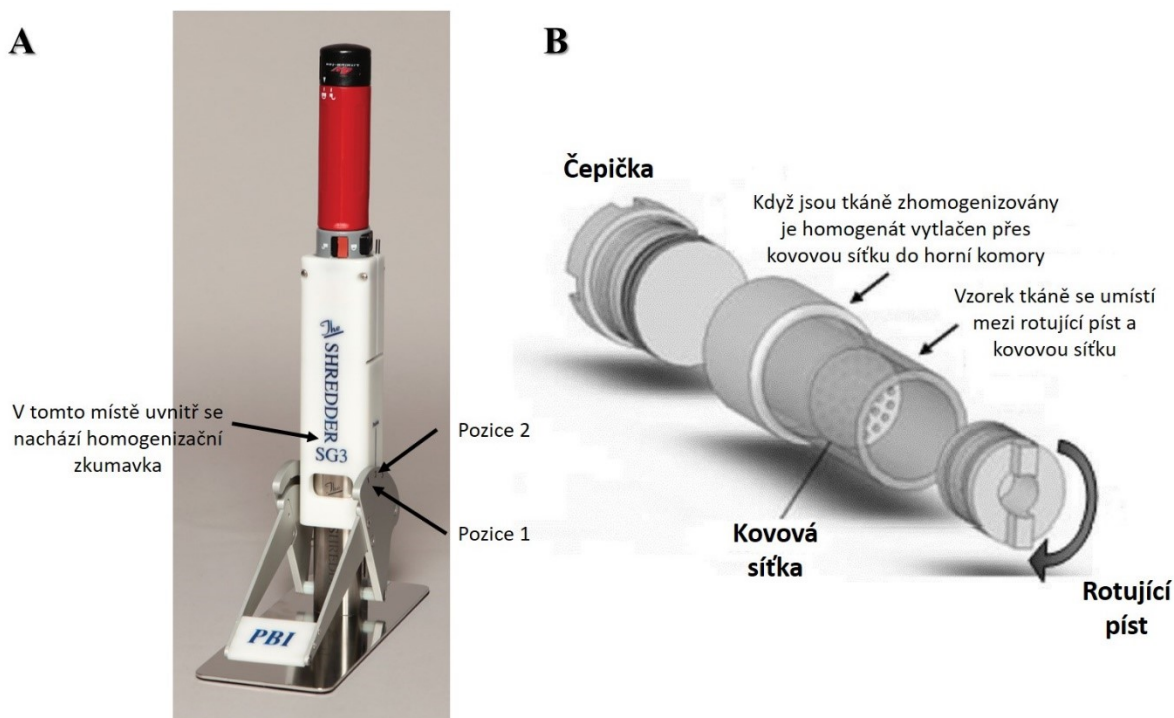
3.2 Optimalizace přípravy vzorku myokardu pro respirometrické analýzy

Z přední proximální části volné stěny levé komory byl vyříznut transmurální vzorek myokardu o přibližném objemu 1 cm³, který byl vložen do zkumavky (Falcon, 50ml) s ledově chladným roztokem BIOPS (složení: CaK₂EGTA 2,77 mmol/l; K₂EGTA 7,23 mmol/l; Na₂ATP 5,77 mmol/l; MgCl₂.6H₂O 6,56 mmol/l; taurin 20 mmol/l; Na₂fosfokreatin 15 mmol/l; imidazol 20 mmol/l; DTT 0,5 mmol/l; MES hydrát 50 mmol/l; pH bylo upraveno pomocí 5 mmol/l KOH na 7,1). Ze vzorků levé srdeční komory byly na ledu odříznuty vždy přibližně 1,5 - 2 mg tkáně, které byly zpracovány dvěma odlišnými způsoby. Polovina vzorků byla homogenizována s využitím PBI-Shredderu (Draxl et al. 2013), zatímco druhá polovina vzorků byla permeabilizována pomocí saponinu (Cantó a Garcia-Roves 2015).

3.2.1 Permeabilizace vzorků levé srdeční komory PBI-Shredderem

Zpracování vzorků s využitím PBI-Shredderu probíhalo tak, že do homogenizační zkumavky s kovovou síťkou (viz Obrázek 13) bylo napipetováno 500 µl respiračního média MiR05 (složení: EGTA 0,5 mmol/l; MgCl₂.6H₂O 3 mmol/l; laktobionát 60 mmol/l; taurin 20 mmol/l; KH₂PO₄ 10 mmol/l; HEPES 20 mmol/l; D-sacharóza 110 mmol/l; BSA 1g/l; pH bylo upraveno pomocí 5 mmol/l KOH na 7,1), byl vložen odvážený vzorek levé komory, který byl mechanicky narušen nůžkami na menší kousky, a zkumavka byla zavřena víčkem. Následně byla zkumavka vložena do PBI-Shredderu (viz Obrázek 13), na pozici 1 byl vzorek homogenizován 10 s a následně na pozici 2 pět sekund. Po homogenizaci byla zkumavka otevřena, homogenát byl odpipetován do připravené zkumavky (Falcon) a všechny části zkumavky byly důkladně omyty respiračním médiem MiR05 (1,5 ml), které bylo přidáno

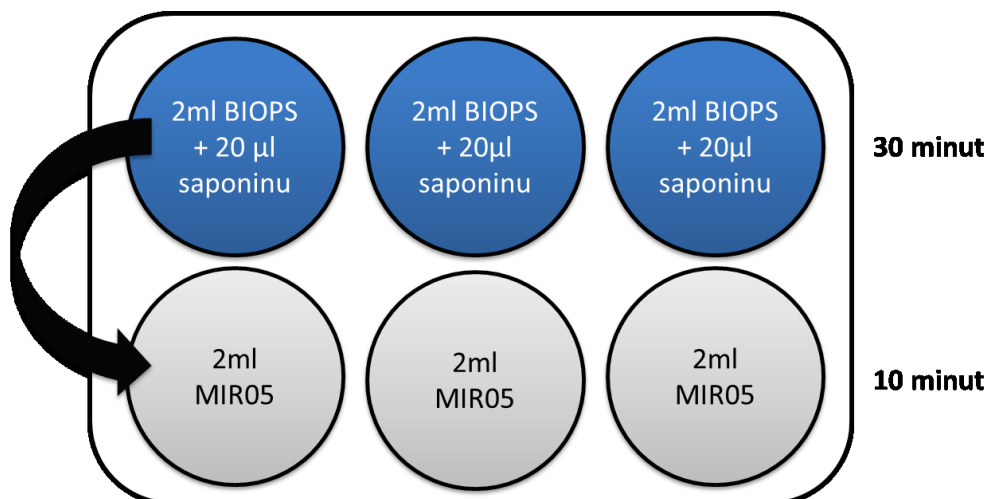
k homogenátu. Takto získaný homogenát byl ve zkumavce uložen na ledu a následně u něj byla analyzována mitochondriální respirace.



Obrázek 13. PBI-Shredder a homogenizační zkumavka s kovovou sítkou. A) Na obrázku je přístroj pro homogenizaci vzorků PBI-Shredder do kterého se dává homogenizační zkumavka se vzorkem a médiem a následně se v pozici 1 homogenizuje vzorek 10 sekund a poté v pozici 2 pět sekund. B) Schéma homogenizační zkumavky s kovovou sítkou. Do prostoru mezi rotující píst a kovovou sítku se umístí vzorek tkáně a roztoku, ve kterém se homogenizuje a poté je zhomogenizovaná tkáň vytlačena přes kovou sítku do horní komory (Gross et al. 2011).

3.2.2 Permeabilizace vzorků levé komory srdeční saponinem

Z důvodu větší šetrnosti ke tkáni byla jako vhodnější způsob přípravy vzorků zvolena permeabilizace saponinem. Do vícejamkové destičky umístěné na ledu a na kývačce byly do poloviny jamek napipetovány 2 ml roztoku BIOPS a 20 μ l saponinu (5mg/ml) a do druhé poloviny 2 ml respiračního média MiR05 (viz Obrázek 14). Následně byly odvážené vzorky levé komory o přibližné hmotnosti 1,5 - 2 mg pinzetou vloženy bez předchozí mechanické separace na 30 minut do jamek s BIOPSEM a saponinem (kývačka byla zapnuta) a poté byly vzorky přendány k oplachu na 10 minut do jamek s MiR05. U takto permeabilizovaných vzorků levé komory byly následně analyzovány mitochondriální respirační parametry.



Obrázek 14. Schéma rozmístění roztoků ve vícejamkové destičce pro permeabilizaci vzorků levé srdeční komory saponinem. Do poloviny jamek byly napipetovány 2 ml BIOPs + 20 µl saponinu, do druhé poloviny 2 ml respiračního média MIR05. Vzorky levé srdeční komory o přibližné hmotnosti 1,5 - 2 mg byly nejprve vloženy na 30 minut do jamek s BIOPsem a saponinem, následně byly přendány k oplachu do MIR05.

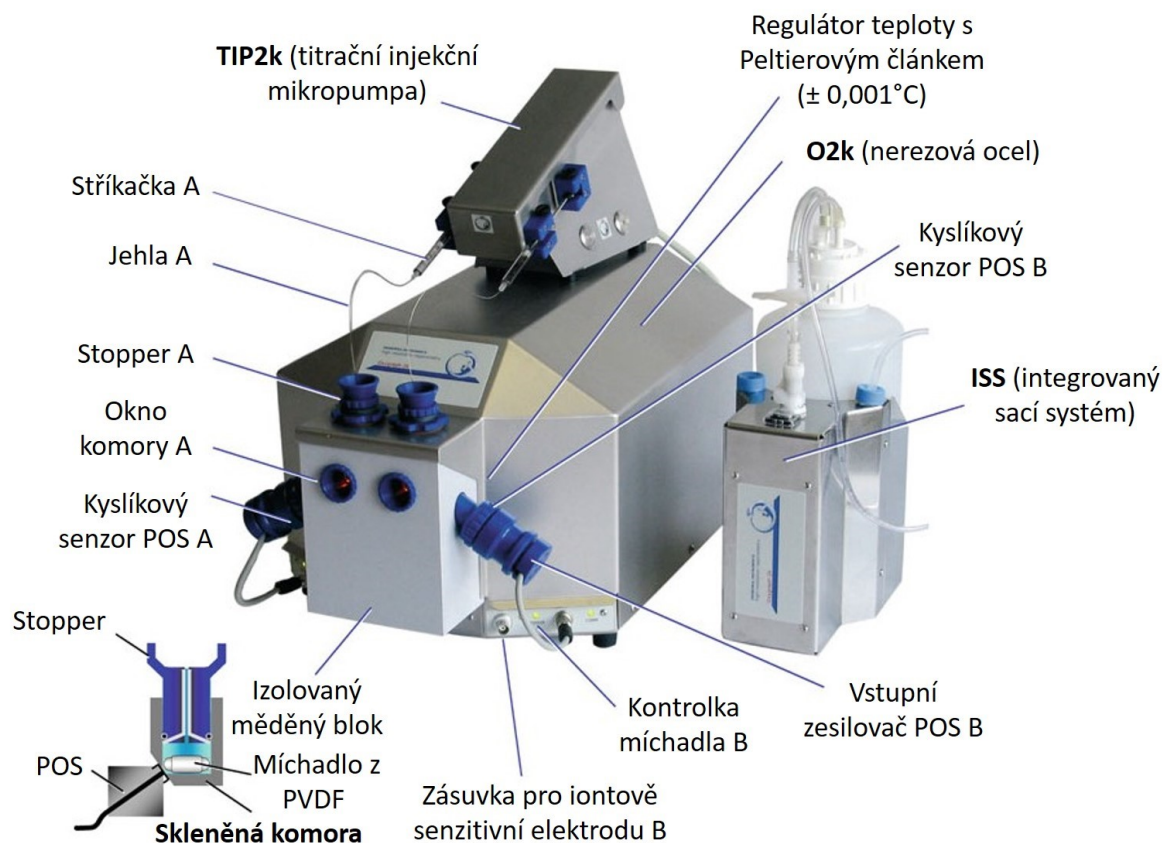
3.3 Analýza mitochondriální respirace

3.3.1 Přístroj pro měření spotřeby O₂ vysoce účinnou respirometrií

Mitochondriální respirace levé srdeční komory byla analyzována pomocí vysoce účinné respirometrie v přístroji Oxygraph-2k (OROBOROS, Oroboros Instruments, Rakousko, viz Obrázek 15). Tento přístroj funguje na principu Clarkovy kyslíkové elektrody. Koncentrace rozpuštěného kyslíku v uzavřených komorách o objemu 2 ml je měřena amperometricky pomocí polarografického kyslíkového senzoru (POS, z anglického polarographic oxygen sensor), který se skládá ze zlaté katody a Ag/AgCl anody. Elektrody jsou elektricky propojeny KCl elektrolytem (3 M) a odděleny od vzorku inertní tetrafluorovou FEP (Teflon® fluorovaný ethylen-propylen) membránou (0,25 µm), která propouští kyslík (Pesta a Gnaiger 2012). Polarizační napětí 0,8 V je využito k redukci O₂. V médiu rozpuštěný O₂ díky němu difunduje membránou ke katodě, kde se redukuje na H₂O, tím dochází k produkci proudu přímo úměrného parciálnímu tlaku O₂ v kontinuálně míchaném experimentálním roztoku. Přeměnou naměřeného proudu na napětí a zesílením je získán základní signál (1 V/µA), (Gnaiger a Forstner 1983).

Spotřeba kyslíku byla měřena a následně analyzována v programu DatLab7 (Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko) jako negativní časová derivace koncentrace

kyslíku v komoře, byla vyjádřena v $\text{pmol O}_2/(\text{s} \cdot \text{mg hmotnosti mokré tkáně})$ a korigována na respirační stav ROX (viz kapitola 3.3.2.).



Obrázek 15. Oxygraph-2k, přístroj pro analýzu mitochondriální respirace s vysokým rozlišením (O2k, Série C) s TIP2k a integrovaným sacím systémem (ISS). Dvě skleněné komory (A a B) jsou umístěny v izolovaném měděném bloku s elektronickou Peltierovou regulací teploty. Polarografické kyslíkové senzory (POS) jsou utěsněny butylovým pryžovým těsněním pod úhlem ke skleněným komorám. Míchadla z PVDF (polyvinylidendifluorid) jsou poháněna elektrickými pulzními magnety vloženými do měděného bloku. Uvnitř stopperů se nachází kapilára pro vytlačování bublin plynu a zavádění jehly pro manuální nebo automatickou titraci pomocí titrační injekční mikropumpy (TIP2k), (převzato a upraveno podle Pesta a Gnaiger 2012).

3.3.2 Měření mitochondriální respirace

Permeabilizované vzorky myokardu levé komory o hmotnosti 1,5 – 2 mg byly vloženy do komůrek přístroje Oxygraph, kde se již předtím kalibrovalo respirační médium MiR05 (na teplotu 37°C a atmosférickou koncentraci kyslíku). Analýza probíhala současně ve 4 přístrojích Oxygraph-2k, tedy v 8 komůrkách (viz Obrázek 16C). Komůrky byly po vložení vzorků uzavřeny a do každé z nich bylo přidáno 5 μl katalázy, tím bylo získáno respirační médium MiR06 (složením stejné jako MiR05 + kataláza o finální koncentraci

280 U/ml). Následně byl pro zvýšení koncentrace kyslíku do komůrek titrován H_2O_2 (200 mmol/l) tak, aby koncentrace O_2 v komůrkách dosáhla hodnoty kolem 400 - 500 mmol/l. V případě poklesu koncentrace O_2 pod 200 mmol/l v průběhu experimentu byl opětovně titrován H_2O_2 pro zvýšení koncentrace na hodnotu kolem 400 – 500 mmol/l. Po ustálení signálu byly do komůrek přístroje titrovány pomocí Hamiltonových injekčních mikrostříkaček (různých objemů, viz Obrázek 16A a 16B) substráty a inhibitory mitochondriálního respiračního systému (protokol titrace viz Tabulka 2) pro stanovení jednotlivých respiračních stavů. Po skončení měření byl odebrán celý objem komůrek do mikrozkuumavek a zamražen v -80°C pro následnou analýzu aktivity citrátsyntázy.



Obrázek 16. Vybavení pro měření mitochondriální respirace. **A)** Hamiltonovy injekční mikrostříkačky různých objemů pro přesné titrování přidávaných substrátů, inhibitorů a dalších látek v průběhu měření mitochondriální respirace v přístroji Oxygraph-2k. **B)** Postup titrace látky do komory O_2k pomocí Hamiltonovy injekční mikrostříkačky. Po propláchnutí a naplnění daným objemem přidávané látky je mikrostříkačka vložena do kapiláry ve stopperu a objem pomalu stříknut do komory O_2k tak, aby nedošlo ke vzniku nežádoucích bublinek plynu. **C)** Měření probíhalo současně ve 4 přístrojích Oxygraph-2k, tedy v 8 komorách (autor fotografií: Mudr. Lukáš Nalos Ph.D.).

Tabulka 2 - Protokol přidávaných substrátů a inhibitorů pro analýzu mitochondriální respirace ve vzorcích levé srdeční komory prasete

Pořadí	Název přidávaného substrátu/ inhibitoru (zkratka)	Koncentrace zásobního roztoku (rozpuštědlo)	Přidané množství (μl)	Výsledná koncentrace v komoře (ve 2 ml)	Teplota skladování zásobního roztoku (°C)	Objem Hamiltonovy injekční mikrostříkačky (μl)
1.	Glutamát (G)	2 M (H ₂ O)	10	10 mM	- 20	25
2.	Malát (M)	0,8 M (H ₂ O)	5	2 mM	- 20	25
3.	Pyruvát (P)	2 M (H ₂ O)	5	5 mM	vždy připraven čerstvý	25
4.	ADP (D)	0,5 M (H ₂ O)	20	1 mM	- 80	25
5.	Cytochrom <i>c</i> (Cyt)	4 mM (H ₂ O)	5	10 μM	- 20	25
6.	Sukcinát (S)	1 M (H ₂ O)	20	10 mM	- 20	50
7.	Rotenon (Rot)	1 mM (EtOH)	1	0,5 μM	- 20	10
8.	Antimycin A (AmA)	5 mM (EtOH)	1	2,5 μM	- 20	10
9.	Askorbát (As)	0,8 M (H ₂ O)	5	2 mM	- 20	25
10.	TMPD (TM)	0,2 M (H ₂ O)	5	0,5 mM	- 20	25
11.	Azid (Azd)	4 M (H ₂ O)	50	100 mM	- 20	50

3.3.3 Mitochondriální respirační stavy

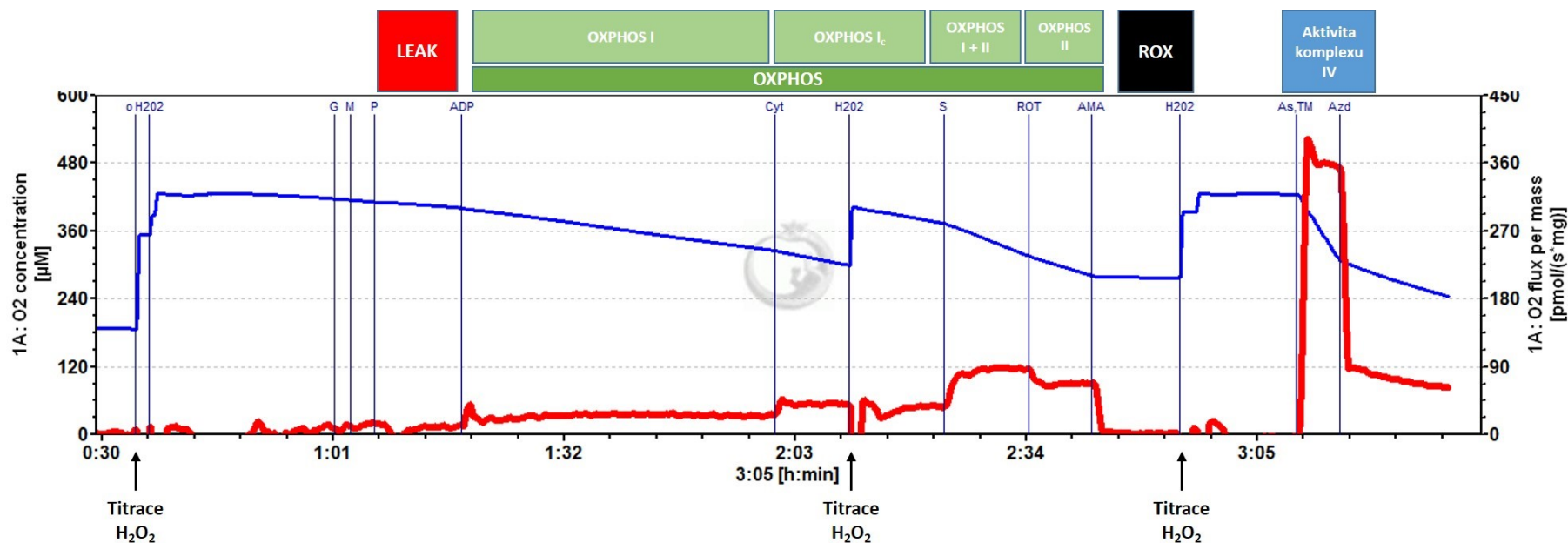
Přidáváním kombinace substrátů, inhibitorů a dalších látek do komory přístroje Oxygraph-2k byly analyzované jednotlivé respirační stavy mitochondrií levé srdeční komory prasat, konkrétně stav LEAK, OXPHOS I, OXPHOS I_c, OXPHOS I+II, OXPHOS II, ROX a aktivita komplexu IV (viz Obrázek 17).

Jako nefosforylační respirační stav **LEAK** (L, z anglického leak - únik) se označuje spotřeba kyslíku potřebná pro transport elektronů kompenzující únik protonů přes vnitřní mitochondriální membránu do mitochondriální matrix nezávisle na funkci ATP syntázy. LEAK respirace se měří v tzv. LEAK stavu, tedy v přítomnosti substrátů pro tvorbu redukovaných kofaktorů, v našem případě substrátů přinášejících elektrony na komplex I (glutamátu, malátu a pyruvátu), ale zároveň za absence ADP. Tento stav lze také navodit enzymatickou inhibicí fosforylačního systému použitím například přidáním oligomycinu, který inhibuje ATP syntázu. V tomto nefosforylačním klidovém stavu je elektrochemický protonový gradient zvýšen na maximum.

Respiračním stavem **OXPHOS** (P, z anglického oxidative phosphorylation - oxidativní fosforylace) se označuje situace, kdy je oxidace redukovaných substrátů spojena s přenosem elektronů na finální akceptor (molekulární kyslík) a zároveň chemiosmoticky propojena s fosforylací ADP na ATP. Pro navození respiračního stavu OXPHOS se k měřenému vzorku přidává ADP. V závislosti na tom, který z komplexů elektrontransportního systému byl aktivován danými substráty, hovoříme o několika různých stavech OXPHOS. Pro získání respiračního stavu **OXPHOS I** jsou do komory přístroje přidány substráty komplexu I (glutamát, malát a pyruvát) a zároveň ADP. Pro získání stavu **OXPHOS I_c** je k substrátům komplexu I a ADP přidán cytochrom *c*, který umožňuje ověřit stupeň permeabilizace buněčné membrány a vnější mitochondriální membrány. Stav **OXPHOS I+II** je navozen přidáním substrátů komplexu I, ADP a substrátu komplexu II sukcinátu. Respirační stav **OXPHOS II** odráží respirační aktivitu komplexu II a je vyvolán inhibicí komplexu I rotenonem.

Dalším z popisovaných respiračních stavů je zbytková spotřeba kyslíku neboli **ROX** (z anglického residual oxygen consumption). Tento stav je navozen inhibicí přenosu elektronů v elektrontransportním systému například přidáním inhibitoru komplexu III (antimycinu A) a je způsoben vedlejšími oxidačními reakcemi probíhajícími v mitochondriích či buňkách.

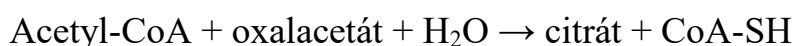
Posledním z respiračních stavů, který byl analyzován, je **aktivita komplexu IV**. Ta byla stanovena přidáním umělého substrátu TMPD (N,N,N',N'-tetrametyl-p-fenylendiamin dichlorid). Krátce před přidáním TMPD do komory přístroje byl přidán askorbát, který snižuje autooxidaci TMPD. Askorbát totiž udržuje TMPD v redukovaném stavu a proto po přidání askorbátu mohou elektrony z TMPD putovat přímo na cytochrom *c* a následně na komplex IV.



Obrázek 17. Reprezentativní záznam mitochondriální spotřeby kyslíku v respiračním médiu MiR06 ve vzorku levé srdeční komory prasete získaný v programu DatLab7. Modrá křivka zobrazuje aktuální koncentraci kyslíku v komoře (μM). Přidáním katalázy a následnou titrací H_2O_2 byla zvýšena koncentrace kyslíku v komoře na hodnoty 400 – 500 mmol/l. Červená křivka zobrazuje spotřebu kyslíku vztaženou na hmotnost tkáně ($\text{pmol}/(\text{s}\cdot\text{mg})$). Po vložení vzorku do komory přístroje a ustálení signálu byly přidány substráty glutamát (G), malát (M) a pyruvát (P) navozující respirační stav LEAK. Poté bylo přidáno ADP navozující stav OXPHOS I, cytochrom *c* (Cyt) stav OXPHOS I_c , sukcinát (S) stav OXPHOS I+II a rotenon (ROT) stav OXPHOS II. Přidáním inhibitoru komplexu III antimycinu A (AMA) byl vyvolán respirační stav ROX a následným přidáním askorbátu (As) a TMPD (TM) byla stanovena respirační aktivita komplexu IV. Přidáním azidu (Azd), inhibitoru komplexu IV byla v posledním kroku zainhibovaný přenos elektronů v systému ETS.

3.4 Stanovení aktivity enzymu citrátsyntázy

Citrátsyntáza je enzym Krebsova cyklu, který se nachází v mitochondriální matrix a stanovení jeho aktivity slouží jako marker množství mitochondrií. Aktivita citrátsyntázy se stanovuje spektrofotometricky. Princip jejího stanovení spočívá v měření SH skupiny volného CoAS (koenzymu A) pomocí Ellmanova činidla (neboli DTNB, kyselina 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová), (Eigentler 2020).



Aktivita citrátsyntázy byla stanovena ve všech vzorcích odebraných z komor oxygrafů. V průběhu měření byly vzorky uloženy na ledu. Nejprve byly jednotlivé vzorky komůrek homogenizovány, poté bylo z každého vzorku odebráno 200 μl a bylo k němu přidáno 800 μl média (složení: DNTB 0,1 mmol/l; 0,25 % Triton-X; 0,5 mmol/l oxalacetát; 0,31 mmol/l acetylkoenzym A; 5 $\mu\text{mol/l}$ EDTA; 5 mmol/l triethanolamin hydrochlorid a 0,1 mol/l Tris-HCl; pH 8,1). Následně byla vzniklá směs podrobena spektrofotometrickému měření při vlnové délce 412 nm, teplotě 30°C po dobu 200 s a byla stanovena výsledná hodnota aktivity citrátsyntázy, která byla vyjádřena v IU/g tkáně (Kuznetsov et al. 2002).

3.5 Statistická analýza naměřených dat

Výsledné hodnoty jednotlivých měření jsou uvedeny jako průměr $\pm$ směrodatná odchylka. K testování normality dat byl použit Shapiro-Wilkův test a následné statistické porovnání bylo provedeno pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu - ANOVA (jeden faktor opakovaných měření pro analýzu rozvoje parametru v čase a jeden meziskupinový faktor pro srovnání mezi kontrolní a septickou skupinou). Analýza byla provedena pomocí softwaru Origin 2017 (OriginLab, Corp., Northampton, USA) a STATISTICA Cz 8 (StatSoft, Inc., Praha, Česko). Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

4 Původní práce

- (I) JARKOVSKÁ D., **MARKOVÁ M.**, HORÁK J., NALOS L., BENEŠ J., AL-OBEIDALLAH M., TŮMA Z., ŠVÍGLEROVÁ J., KUNCOVÁ J., MATĚJOVIČ M. a ŠTENGL M. Cellular mechanisms of myocardial depression in porcine septic shock. 2018, **726(9)**. *Frontiers in Physiology*. ISSN 1664042X (**IF 3,201**)
- (II) **KOHOUTOVÁ M.**, HORÁK J., JARKOVSKÁ D., MARTÍNKOVÁ V., TÉGL V., NALOS L., VIŠTEJNOVÁ L., BENEŠ J., ŠVÍGLEROVÁ J., KUNCOVÁ J., MATĚJOVIČ M. a ŠTENGL M. Vagus nerve stimulation attenuates multiple organ dysfunction in resuscitated porcine progressive sepsis. 2019, **47(6)**, 461-469. *Critical Care Medicine*. ISSN 18029973 (**IF 7,414**)
- (III) HORÁK J., NALOS L., MARTÍNKOVÁ V., TÉGL V., VIŠTEJNOVÁ L., KUNCOVÁ J., **KOHOUTOVÁ M.**, JARKOVSKÁ D., DOLEJŠOVÁ M., BENEŠ J., ŠTENGL M. a MATĚJOVIČ M. Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study. 2020, **11**, 1-13. *Frontiers in Immunology*. ISSN 16643224 (**IF 5,085**)
- (IV) **KOHOUTOVÁ M.**, DEJMEK J., TŮMA Z. a KUNCOVÁ J. Variability of mitochondrial respiration in relation to sepsis-induced multiple organ dysfunction. 2018, **67 (Suppl 4)**, 577-592. *Physiological Research*. ISSN 18029973 (**IF 1,655**)

5 Souhrn výsledků experimentálních prací a diskuze

- (I) JARKOVSKÁ D., MARKOVÁ M., HORÁK J., NALOS L., BENEŠ J., AL-OBEIDALLAH M., TŮMA Z., ŠVÍGLEROVÁ J., KUNCOVÁ J., MATĚJOVIČ M. a ŠTENGL M. Cellular mechanisms of myocardial depression in porcine septic shock. 2018, **726(9)**. *Frontiers in Physiology*. ISSN 1664042X (IF 3,201)

Souhrn výsledků

V rámci této studie byly zkoumány buněčné mechanismy myokardiální deprese na velkém zvířecím modelu sepse a septického šoku. Experiment byl proveden na 16 anestetizovaných, mechanicky ventilovaných a instrumentovaných prasatech domácích (plemeno Přestické černostrakaté prase) obou pohlaví a obdobné váhy ($43,9 \pm 5,8$ kg). U 8 prasat byla indukována sepse pomocí fekální peritonitidy trvající 24 hodin a 8 prasat sloužilo jako kontroly, byl u nich proveden stejný experiment trvající 24 hodin bez indukce sepse. U všech zvířat byly v průběhu experimentu analyzovány systémové a plicní hemodynamické parametry, hladiny laktátu v arteriální krvi a bylo měřeno EKG. Na základě těchto parametrů bylo poté stanoveno modifikované SOFA skóre. Na konci experimentu po vyjmutí srdce byla provedena *in vitro* analýza srdečních funkcí, která zahrnovala měření akčních potenciálů a kontrakcí na trabekulách pravých srdečních komor, dále měření kontrakce sarkomer, měření vápníkových přechodů a vápníkového proudu v izolovaných kardiomyocytech, analýza mitochondriální respirace v permeabilizovaných vzorcích levé srdeční komory pomocí vysoce účinné respirometrie a stanovení aktivity citrátsyntázy.

U skupiny zvířat po indukci sepse se rozvoj sepse a septického šoku projevil významným zvýšením modifikovaného SOFA skóre a hladin laktátu v arteriální krvi, rozvojem hyperdynamické cirkulace se zvýšeným srdečním výdejem (způsobeným hlavně nárůstem srdeční frekvence) a periferní vazodilatací. Kontrolní skupina zvířat nevykazovala žádné známky systémové zánětlivé odpovědi, jejich modifikované SOFA skóre bylo v normě, stejně tak zůstaly v normě i hladiny laktátu po celou dobu experimentu a nezměnily se ani hodnoty hemodynamických parametrů. U trabekul septických zvířat došlo ke zkrácení doby akčního potenciálu a snížení síly kontrakce. V septických kardiomyocytech byla

potlačena kontrakce sarkomer, vápníkové přechody a vápníkový proud typu L za nezměněné citlivosti myofilament k vápníku.

V levé srdeční komoře septických zvířat byl detekován pokles mitochondriální respirace. Byl pozorován pokles mitochondriální spotřeby kyslíku ve stavu LEAK, tedy po přidání glutamátu, malátu a pyruvátu. Dále byla snížena mitochondriální respirace ve stavu OXPHOS I+II, tedy respirace za přítomnosti ADP a substrátů komplexu I (glutamátu, malátu, pyruvátu) a komplexu II (sukcinátu) a také došlo k poklesu aktivity cytochrom *c* oxidázy (komplexu IV) uměle stimulované TMPD. Pokles respirace ve stavu OXPHOS I+II byl způsoben hlavně inhibicí respirace komplexu II (OXPHOS II), aktivita komplexu I totiž nebyla významně ovlivněna. Aktivita citrátsyntázy nebyla u septických zvířat nijak změněna oproti kontrolám. V kontrolních vzorcích dosahovala aktivita citrátsyntázy hodnot $64,2 \pm 12$ IU/g a u septických zvířat hodnot $62,1 \pm 11$ IU/g.

Diskuze

V rámci této a předchozí studie (Jarkovska et al. 2016) se nám podařilo vytvořit klinicky relevantní model sepse a septického šoku vyvolaných fekální peritonitidou s typickými hyperdynamickými parametry sepse. Díky tomu jsme mohli komplexně analyzovat buněčné mechanismy septické myokardiální deprese u velkého zvířecího modelu sepse. V předchozích studiích byly buněčné mechanismy deprese myokardu (Dos Santos et al. 2010, Sepúlveda et al. 2017) i role mitochondrií v patogenezi sepse a septické kardiomyopatie studovány převážně na malých modelech zvířat, nejčastěji u hlodavců. Náš model sepse nám tak umožnil posunout výzkum na velký zvířecí model sepse.

Role mitochondrií v patogenezi sepse je stále diskutované téma. Na základě studií na malých laboratorních zvířatech se však ukazuje, že dysfunkce mitochondrií přispívá k patogenezi sepse a rozvoji septické kardiomyopatie (Cimolai et al. 2015). Pokles mitochondriální respirace či snížení aktivity respiračních komplexů byl detekován u septických myší, potkanů a králíků. V srdci myší se sepsí vyvolanou aplikací LPS byl pozorován přechodný pokles aktivity komplexu I 12 hodin po injekci LPS, který byl obnoven po 48 hodinách. Stejný trend, ale bez statistické významnosti byl pozorován i u komplexu II (Piquereau et al. 2013). Po injekci LPS byla v srdci potkanů detekována snížená mitochondriální respirace doprovázená poklesem aktivity komplexů ETS, nárůstem

tvorby reaktivních forem kyslíku a rozvojem oxidačního stresu (Vanasco et al. 2012). Také v srdci endotoxemických králíků byl pozorován pokles mitochondriální respirace, který byl doprovázen snížením aktivity komplexů I+III (Gellerich et al. 2002). Paviáni patří mezi jeden z větších experimentálních modelů savců, u kterého byl analyzován vliv bakteriémie na mitochondriální respiraci. U paviánů byla seps vyvolána infuzí *E. Coli* a byl zde prokázán pokles aktivity komplexů I+III a II+III, který byl závislý na dávce bakterií, jež byly zvířatům aplikovány. U paviánů, kteří zemřeli na septický šok, byl pozorován dokonce ještě větší pokles aktivity respiračních enzymů (Gellerich et al. 2002).

Studii provedených na prasečím modelu seps vyvolané peritonitidou a zabývajících se mitochondriální respirací v myokardu není mnoho a jejich výsledky jsou rozporuplné. Zatímco v jedné z publikovaných studií byla detekována snížená aktivita komplexu I (Li et al. 2007), další studie neprokázaly žádné změny mitochondriální respirace v myokardu (Corrêa et al. 2012, Corrêa et al. 2014, Corrêa et al. 2017). Různé výsledky mezi jednotlivými experimenty mohou být způsobeny rozdíly v použitém plemeni experimentálních zvířat a odlišném experimentálním protokolu. Na výsledcích se může odrazet také použitý model seps, délka trvání seps či závažnost seps. V naší současné studii jsme popsali pokles mitochondriální respirace komplexu II a také sníženou aktivitu komplexu IV. Normalizace respirace na aktivitu citrátsyntázy tento charakter změn mitochondriální respirace nijak nezměnila. Pozorovaný pokles respiračního stavu LEAK společně se sníženou mitochondriální respirací by mohl naznačovat, že v septickém srdci došlo k poklesu množství mitochondrií či otoku tkáně vlivem tekutinové resuscitace. S tím je však v rozporu aktivita citrátsyntázy sloužící jako marker množství mitochondrií, která je u kontrolních a septických zvířat obdobná.

- (II) KOHOUTOVÁ M., HORÁK J., JARKOVSKÁ D., MARTÍNKOVÁ V., TÉGL V., NALOS L., VIŠTEJNOVÁ L., BENEŠ J., ŠVÍGLEROVÁ J., KUNCOVÁ J., MATĚJOVIČ M. a ŠTENGL M.** Vagus nerve stimulation attenuates multiple organ dysfunction in resuscitated porcine progressive sepsis. 2019, **47(6)**, 461-469. *Critical Care Medicine*. ISSN 18029973 (IF 7,414)

Souhrn výsledků

V rámci této studie byl zkoumán potenciální terapeutický vliv stimulace bloudivého nervu (VNS z anglického vagus nerve stimulation) na klinicky relevantním prasečím modelu progresivní sepse. Experiment byl proveden na 25 anestetizovaných, mechanicky ventilovaných a instrumentovaných prasatech domácích (plemeno Přestické černostrakaté prase) obou pohlaví (18 samic a 7 samců) a obdobné váhy ($44,5 \pm 5,7$ kg). Zvířata byla rozdělena do 3 skupin. U první skupiny tvořené 8 prasaty byla indukována sepse, u druhé skupiny 9 prasat byla indukována sepse a následně elektricky stimulován bloudivý nerv a třetí skupina o 9 prasatech sloužila jako kontrolní, to znamená, že u nich byl proveden stejný experiment trvající stejnou dobu, ale bez indukce sepse či stimulace bloudivého nervu. Ve skupinách septických zvířat byla sepse indukována aplikací autologních výkalů a následně trvala 24 hodin. Ve skupině zvířat, u kterých proběhla VNS, byla nejprve odhalena krční část levého bloudivého nervu a následně na něj byla připojena stimulační elektroda. Elektrická stimulace byla zahájena 6 hodin po indukci sepse a pokračovala po celou dobu trvání experimentu. U všech zvířat byly v průběhu experimentu měřeny systémové a plicní hemodynamické parametry, biochemické parametry, byly analyzovány krevní plyny, hladiny cytokinů a laktátu v arteriální krvi a bylo registrováno EKG. Na základě naměřených parametrů bylo poté stanoveno modifikované SOFA skóre. Na počátku experimentu (těsně před indukci peritonitidy) a na konci experimentu (24 hodin po indukci peritonitidy) byly odebrány krevní buňky. Na konci experimentu po vyjmutí srdce byla provedena analýza srdečních funkcí *in vitro*, která zahrnovala měření akčních potenciálů a kontrakcí na trabekulách pravých srdečních komor, měření kontrakce sarkomer a měření vápníkových přechodů v izolovaných kardiomyocytech a analýzu mitochondriální respirace v permeabilizovaných vzorcích levé srdeční komory pomocí vysoce účinné respirometrie.

Všech 17 septických zvířat přežilo experimentální sepsi trvající 24 hodin. V této skupině zvířat byly významně zvýšené hodnoty SOFA skóre i přesto, že odpovědi na

vyvolanou infekci nebyly u všech zvířat stejné, 2 zvířata dokonce nesplňovala kritéria definice Sepse 3 pro rozvoj sepse. Na počátku VNS, tedy 6 hodin po indukci peritonitidy, nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinou septických zvířat a septických zvířat s VNS. Avšak na konci experimentu (24 hodin po indukci peritonitidy) bylo u skupiny septických zvířat s VNS pozorováno výrazné oslabení projevů sepse, což dokazuje SOFA skóre dosahující téměř kontrolních hodnot. Dále byly pozorovány příznivé účinky VNS na respirační systém a játra, zatímco na ledviny stimulace bloudivého nervu protektivní vliv neměla. VNS však zcela zabránila zvýšení plazmatické hladiny laktátu vyvolanému sepsí. Rozvoj sepse u zvířat se projevil rozvojem hyperdynamické cirkulace se zvýšeným srdečním výdejem, zvýšenou srdeční frekvencí doprovázenou sníženým systolickým objemem (stroke volume) a periferní vazodilatací. VNS tyto změny částečně zvrátila, zabránila zvýšení srdečního výdeje, a to zejména snížením srdeční frekvence. Pozorovaný pokles srdeční frekvence však není pouhým důsledkem VNS, jak by se mohlo na první pohled zdát, ale vznikl v důsledku pomalejšího rozvoje sepse u stimulovaných zvířat. V rámci experimentu byl totiž bloudivý nerv stimulován frekvencí 2 Hz. Pro vyvolání bradykardie u prasete je však nutné stimulovat bloudivý nerv frekvencí 10 – 20 Hz. VNS však neměla vliv na tělesnou teplotu, která byla u septických zvířat zvýšena, ani na krevní tlaky, krevní plyny či acidobazickou rovnováhu. Doba trvání akčního potenciálu v trabekulách nebyla ovlivněna ani sepsí ani VNS, zatímco síla kontrakce byla vlivem sepse snížena a VNS ji normalizovala. Stejně tak v septických kardiomyocytech došlo k inhibici zkrácení sarkomer, které bylo VNS obnoveno. Naproti tomu amplituda vápníkových přechodů byla sepsí snížena, ale VNS na ni neměla vliv, avšak vedla ke zvýšení hladiny nitrobněčného vápníku. Počty leukocytů a relativní počty monocytů CD14 byly u septických zvířat sníženy, VNS toto snížení nijak neovlivnilo. Zatímco na relativní počty neutrofilů a lymfocytů neměla sepsa ani VNS žádný vliv, relativní počty aktivovaných monocytů CD14 byly sepsí sníženy a normalizovány po VNS. Plazmatické hladiny prozánětlivých cytokinů jako TNF- α , IL-6 a IL-8 významně vzrostly v důsledku sepse a VNS tento nárůst nijak neovlivnila.

Vlivem sepse došlo u zvířat k nárůstu přísunu kyslíku i spotřeby kyslíku, tyto změny vyvolané sepsí byly vlivem aktivace bloudivého nervu částečně potlačeny. Na úrovni srdeční tkáně byl pozorován opačný trend. V permeabilizovaných vláknech levé srdeční komory septických zvířat byl detekován pokles mitochondriální respirace ve stavu OXPHOS II, tedy

po přidání substrátů komplexu I (glutamátu, malátu, pyruvátu), komplexu II (sukcinátu) a inhibitoru komplexu I (rotenonu), a také došlo k poklesu aktivity cytochrom *c* oxidázy (komplexu IV) uměle stimulované TMPD. VNS vedla k potlačení inhibice respirace komplexu II i inhibice aktivity komplexu IV ETS.

Diskuze

V rámci této studie se nám podařilo jako prvním prokázat na klinicky relevantním velkém zvířecím modelu progresivní sepse u prasat, že VNS má řadu příznivých účinků, především na kardiovaskulární systém a energetický metabolismus. Stimulací bloudivého nervu bylo částečně či úplně zabráněno rozvoji hyperlaktémie, hyperdynamické cirkulace, deprese myokardu, byl snížen počet aktivovaných monocytů a také byla odvrácena pokles mitochondriální respirace permeabilizovaných vláken myokardu. Po VNS došlo k výraznému snížení SOFA skóre. Tyto výsledky poukazují na slibný terapeutický potenciál VNS u sepse či septického šoku.

Existuje několik možných terapeutických přístupů, které by mohly zvrátit dysfunkce mitochondrií v sepsi. Lze mezi ně zařadit látky snižující míru oxidativního a nitrosativního stresu, podávání některého z energetických substrátů nebo látky regulující zánětlivé procesy. Mezi látky, které prokazatelně zajišťují pokles oxidativního stresu v sepsi, patří například antioxidanty SS-3, XJB-5-13 (Wendel a Heller 2010) a MitoQ (Apostolova et al. 2011); mezi látky snižující nitrosativní stres aminoguanidin, inhibitor syntázy oxidu dusnatého (King et al. 1999). Také podávání některého z energetických substrátů se zdá být protektivní pro mitochondriální funkce myokardu. Bylo například prokázáno, že podávání sukcinátu prokazatelně zlepšilo funkci myokardu po ischemii a reperfuzi (Cairns et al. 1997). Další možnou cestou vedoucí k obnově mitochondriálních funkcí v sepsi je potlačení aktivace prozánětlivých procesů například inhibicí enzymu PARP (Gero a Szabo 2008) nebo modulací imunitní odpovědi hostitele, kde se jako slibná molekula jeví jeden z mediátorů zánětu HMGB1 a použití jeho antagonistů ethylesteru kyseliny pyrohroznové či tzv. A-boxu (Wang et al. 2008). Mezi terapeutické přístupy regulující zánětlivé procesy lze zařadit také VNS, a to pro její protizánětlivé účinky. VNS je již v současné době využívaná k terapeutickým účelům, konkrétně pro léčbu pacientů s epilepsií nereagující na léky nebo pacientů s depresí. Nedávné studie na modelech *in vivo* poukázaly na další možná léčebná

využití VNS, a to právě díky jejím protizánětlivým účinkům (Bonaz et al. 2013). Přesná informační signalizační kaskáda ani mechanismus, kterým VNS ovlivňuje zánětlivé procesy, nejsou známy, ale výsledky použití tohoto terapeutického přístupu jsou více než slibné při léčbě chronických zánětlivých procesů jako jsou revmatoidní artritida či právě sepse (Johnson a Wilson 2018).

Vliv VNS na mitochondriální spotřebu kyslíku myokardu v sepsi doposud nebyl studován. Některá dostupná data však naznačují, že za kardioprotektivní účinek VNS by mohlo být částečně zodpovědné právě zlepšení mitochondriálních funkcí (Zhao et al. 2012). Protektivní vliv VNS byl opakovaně pozorován například na prasečím modelu ischemického myokardu, kde došlo vlivem VNS k poklesu produkce reaktivních forem kyslíku v srdci, snížení depolarizace a otoku mitochondrií (Nuntaphum et al. 2018, Shinlapawittayatorn et al. 2013), zlepšení mitochondriální dynamiky a také k posunu metabolismu mastných kyselin směrem k beta oxidaci (Nuntaphum et al. 2018). Tato data naznačují, že VNS má protektivní účinek na mitochondriální respiraci myokardu. Tento pozitivní efekt VNS na srdeční mitochondrie se zřejmě uplatňuje také v rámci sepse, což bylo potvrzeno v naší studii, kdy jsme pozorovali zlepšení mitochondriální respirace permeabilizovaných buněk myokardu, konkrétně komplexu II a aktivity komplexu IV po VNS v porovnání se skupinou septických zvířat.

- (III) HORÁK J., NALOS L., MARTÍNKOVÁ V., TÉGL V., VIŠTEJNOVÁ L., KUNCOVÁ J., KOHOUTOVÁ M., JARKOVSKÁ D., DOLEJŠOVÁ M., BENEŠ J., ŠTENGL M. a MATĚJOVIČ M. Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study. 2020, **11**, 1-13. *Frontiers Immunology*. ISSN 16643224 (IF 5,085)

Souhrn výsledků

V této studii byla zkoumána bezpečnost a vliv účinků mezenchymálních kmenových buněk (MSC z anglického mesenchymal stem cells) jako potenciální doplňkové terapie sepse u velkého zvířecího modelu progresivní sepse indukované fekální peritonitidou. Experiment byl proveden na 32 anestetizovaných, mechanicky ventilovaných a instrumentovaných prasatech domácích (plemeno Přestické černostrakaté prase) obou pohlaví a obdobné váhy (40 – 46 kg s mediánem 43,5 kg). Zvířata byla rozdělena po 8 kusech náhodně do 4 skupin. První skupina byla tvořena kontrolními zvířaty, druhá skupina kontrolními zvířaty, jimž byly aplikovány MSC, třetí skupina zvířaty, u nichž byla indukována sepse a čtvrtá skupina zvířaty, u kterých byla indukována sepse a jimž byly aplikovány MSC. Ve skupinách septických zvířat byla sepse indukována aplikací autologních výkalů a následně trvala 24 hodin. U zvířat, jimž byly aplikovány MSC (v množství $1 \times 10^6/\text{kg}$), došlo k jejich aplikaci 6 hodin po indukci sepse případně v odpovídajícím čase od počátku experimentu u kontrolních zvířat. Na počátku experimentu a následně po 12, 18 a 24 hodinách od indukce peritonitidy byly měřeny systémové, regionální a mikrovaskulární hemodynamické parametry, funkce několika orgánů, systémová imunitní zánětlivá odpověď a míra oxidativního stresu. Na konci experimentu po vyjmutí srdce byla analyzována kontrakce sarkomer a mitochondriální respirace v permeabilizovaných vzorcích levé srdeční komory pomocí vysoce účinné respirometrie.

Aplikace MSC kontrolním zvířatům nevedla k žádné významné změně v systémových, regionálních či mikrovaskulárních hemodynamických parametrech. U této skupiny zvířat nebyly ovlivněny ani funkce jednotlivých sledovaných orgánů, zánětlivé parametry či hladina oxidativního stresu. U všech zvířat, u nichž byla indukována sepse, došlo k rozvoji hyperdynamické sepse splňující kritéria definice SEPSE-3. Na počátku aplikace MSC (6 hodin po indukci peritonitidy) nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v měřených parametrech mezi skupinami septických zvířat a septických zvířat s aplikací MSC. Léčba MSC nedokázala zmírnit dysfunkci orgánů vyvolanou sepsí. Postupně

docházelo k nárůstu modifikovaného SOFA skóre v obou septických skupinách, tento nárůst byl výraznější ve skupině septických zvířat, jimž byly aplikovány MSC. U septických zvířat byl pozorován nárůst plazmatických hladin TNF- α a IL-6, což poukazuje na progresi systémové zánětlivé odpovědi. Aplikace MSC však na hladiny těchto prozánětlivých cytokinů neměla žádný vliv. Vlivem sepse došlo k poklesu hladin monocytů (CD14 a CD16), T lymfocytů (Th, Tc, CD8 α a $\gamma\delta$) a regulačních T lymfocytů. Aplikace MSC nijak významně neovlivnila hladiny krevních imunokompetentních buněk, stejně tak neměla žádný vliv na kontrakci sarkomer kontrolních buněk ani sníženou kontrakci sarkomer, která byla pozorována v kardiomyocytech septických buněk.

V permeabilizovaných buňkách levé srdeční komory septických zvířat byl detekován pokles mitochondriální respirace. Konkrétně pokles respirace ve stavu OXPHOS II, tedy po přidání substrátů komplexu I (glutamátu, malátu, pyruvátu), komplexu II (sukcinátu) a inhibitoru komplexu I (rotenonu) a také pokles aktivity cytochrom *c* oxidázy (komplexu IV) uměle stimulovaná TMPD. Aplikace MSC u kontrolních ani u septických zvířat neměla vliv na mitochondriální respiraci.

Diskuze

V rámci této studie se nám podařilo prokázat, že aplikace MSC nemá žádné negativní účinky na hemodynamické parametry, orgánové a mitochondriální funkce u zdravých zvířat velkého zvířecího modelu, kterým je prase domácí. Zároveň se nám u tohoto modelu nepodařilo prokázat žádné příznivé účinky aplikace MSC na depresi myokardu vyvolanou sepsí, deregulovanou imunitní a zánětlivou odpověď ani dysfunkci mitochondrií.

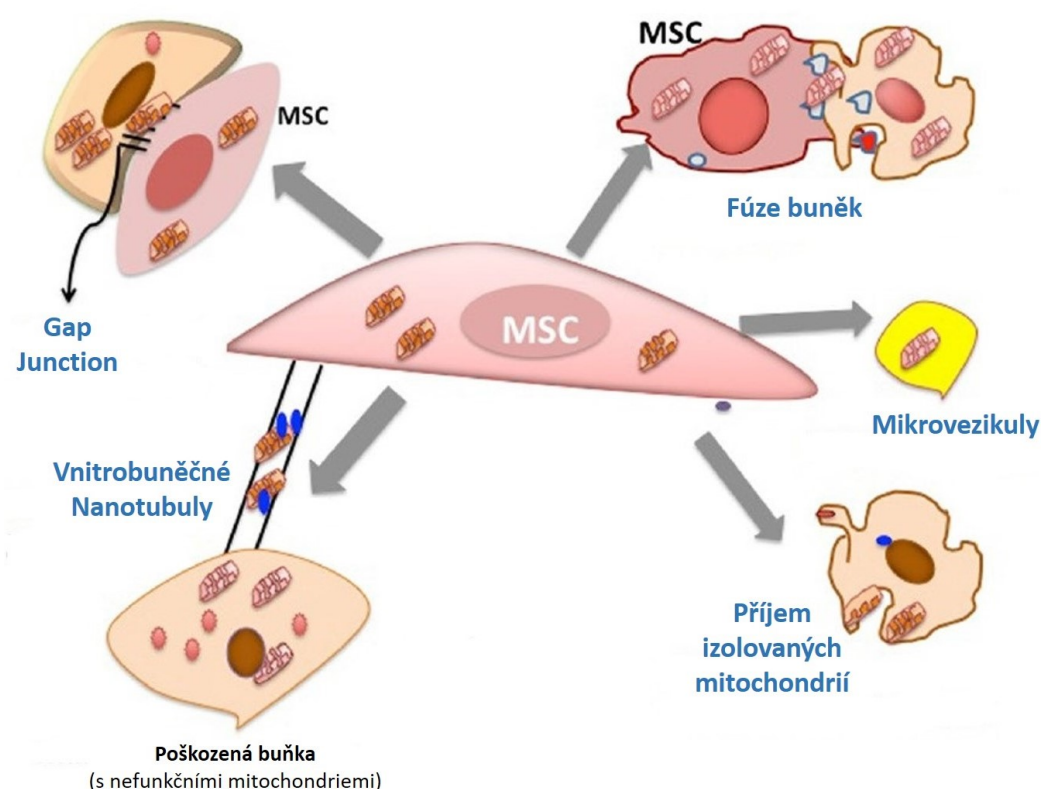
Účinná léčba sepse v současné době bohužel zatím není stále dostupná a to i přesto, že došlo k velkým pokrokům v pochopení patofyziologie sepse. Složitost patofyziologických procesů sepse je však natolik obrovská, že se stále častěji ukazuje, že pouze jeden léčebný přístup těmto procesům nezabrání a je zapotřebí použít kombinaci několika různých léčebných postupů (Thompson et al. 2019). Jedním se slibných terapeutických přístupů se kromě stimulace bloudivého nervu jeví aplikace MSC, a to pro jejich imunomodulační, protizánětlivé, antiapoptotické, metabolické a antimikrobiální účinky (Horák et al. 2017). V rámci mnoha preklinických studií bylo prokázáno, že aplikace MSC má příznivý účinek na patofyziologické procesy způsobené sepsí a septickým šokem

(Walter et al. 2014). Většina těchto studií byla provedena na hlodavcích, a proto jejich translační potenciál pro léčbu pacientů se sepsí není příliš velký. Naším cílem proto bylo zjistit, zda se tyto protektivní účinky aplikace MSC projeví na velkém zvířecím modelu progresivní sepse, což se nám bohužel prokázat nepodařilo. Již mnohokrát se ukázalo, že léčebné postupy, které fungovaly v preklinických studiích sepse na různých zvířecích modelech, nejsou aplikovatelné na člověka. Mezi faktory, které mohou ovlivnit aplikovatelnost terapie na člověka je například různorodost indukované sepse, nevhodné metodické postupy či špatně zvolený zvířecí model (Osuchowski et al. 2018). Naše výsledky jsou navíc v rozporu se studií Laroye et al., kteří prokázali, že aplikace MSC u prasat se sepsí vedla k oslabení defektů vyvolaných sepsí, převážně ke zmírnění kardiovaskulárního selhání (Laroye et al. 2018). Nelze však vyloučit, že aplikace MSC neměla protektivní účinek na některý z parametrů, které v rámci naší studie nebyly sledovány.

Studie zabývající se vlivem aplikace MSC na mitochondriální respiraci u prasat či jiného modelového organismu v současné době neexistují. Byl však studován vliv aplikace MSC v sepsi na mitochondrie, a to převážně u hlodavců. Na myším modelu sepse bylo pozorováno, že aplikace MSC vedla k potlačení funkčních poruch mitochondrií vyvolaných sepsí obnovou transkripčních drah podílejících se na zachování bioenergetických procesů a drah vedoucích ke snížení oxidativního stresu (Dos Santos et al. 2012). Na myším modelu sepse bylo také zjištěno, že aplikace MSC významně potlačila tvorbu ROS a zvýšila mitofagii (Li et al. 2018). Dále bylo prokázáno, že aplikace MSC vedla k obnově dysfunkce mitochondrií v kmenových buňkách kosterního svalstva vyvolané sepsí. U septických buněk byly pozorovány dysfunkce mitochondrií spojené s výrazným snížením množství mitochondrií a zvýšenou aktivitou zbylých organel. U přeživších jedinců byly navíc detekovány i změny mtDNA, které byly aplikací MSC napraveny (Chatre et al. 2017, Rocheteau et al. 2015).

Zajímavým zjištěním je to, že jeden z dalších možných příznivých účinků aplikace MSC v sepsi by mohl být zprostředkován parakrinně uvolňováním několika imunomodulačních faktorů, mikrovezikul, miRNA, exosomů či dokonce přenosem mitochondrií. Právě přenos zdravých mitochondrií se zdá být skvělou terapeutickou možností kvůli tomu, že vede k zajištění obnovy bioenergetických potřeb poškozených buněk (například epiteliálních, endoteliálních či kardiomyocytů), (Paliwal et al. 2018). Proces přenosu mitochondrií objevili Spees et al., kteří poprvé prokázali, že mitochondrie se

mohou pohybovat mezi buňkami, a tím mohou obnovit aerobní respiraci nefunkčních mitochondrií. Bylo pozorováno, že díky aktivnímu přenosu mitochondrií došlo k obnově mitochondriální respirace epiteliálních buněk kokultivací s MSC (Spees et al. 2006). Následné studie poukázaly na způsob, jakým je přenos mitochondrií iniciován a jak nejspíše probíhá. Bylo zjištěno, že okolí poškozené buňky vysílá stresové signály k MSC, které následně spustí přenos mitochondrií. Mezi stresové signály patří uvolnění poškozených mitochondrií, mtDNA, DAMPs společně se zvýšenou hladinou ROS. Samotný přenos mitochondrií probíhá různými způsoby (viz Obrázek 18), jako například tvorbou nanotubulů (tzv. tunnel tube), prostřednictvím gap junctions, fúzí buněk, mikrovezikulů nebo přenosem izolovaných mitochondrií (Paliwal et al. 2018). Přesné mechanismy buněčné signalizace, které zajišťují přenos mitochondrií ze zdravých buněk, a změny, které přispívají k obnově mitochondrií, nejsou zcela objasněny a jsou dále předmětem výzkumu.



Obrázek 18. Různé způsoby přenosu mitochondrií z MSC do poškozených buněk. Mezi tyto způsoby patří přenos prostřednictvím nanotubulů, gap junctions, fúze buněk, přenos mitochondrií v mikrovezikulech či příjem izolovaných mitochondrií (převzato a upraveno podle Paliwal et al. 2018).

- (IV) KOHOUTOVÁ M., DEJMEK J., TŮMA Z. a KUNCOVÁ J.** Variability of mitochondrial respiration in relation to sepsis-induced multiple organ dysfunction. 2018, **67 (Suppl 4)**, 577-592. *Physiological Research*. ISSN 18029973. **(IF 1,655)**

Souhrn

Cílem tohoto přehledového článku bylo shrnout dosavadní poznatky o mitochondriální respiraci v multiorgánovém selhání vyvolaném sepsí a poukázat na značnou variabilitu experimentálních výsledků. Experimentální data získaná na různých experimentálních modelech jsou totiž značně nehomogenní. Některá data poukazují na pokles mitochondriální respirace, zatímco u jiných nebyly pozorovány žádné změny či bylo dokonce pozorováno zlepšení. Proto je potřeba uvědomit si určité limity jednotlivých studií a poukázat na možné zdroje variability.

Prvním ze zdrojů variability je sepse jako taková, jejíž průběh je u každého pacienta jiný. Mezi jednotlivými septickými pacienty je obrovská interindividuální variabilita, která se odráží na průběhu onemocnění, odpovědi každého pacienta na infekci či terapeutické intervence (Christaki a Giamarellos-Bourboulis 2014). Dalším zdrojem variability jsou druhové rozdíly mezi použitými experimentálními modely výzkumu sepse. Většina studií byla provedena na hlodavcích. Použití hlodavců jako experimentálního modelu bylo zpochybněno řadou studií, které poukázaly na výrazné morfologické i funkční rozdíly, které by mohly s těmito nesrovnalostmi v sepsi u hlodavců souviset (shrnuto v Kohoutová et al. 2018). Jedním z dalších zdrojů variability je použitý model sepse. Vzhledem ke složitosti sepse a septických procesů je obtížné toto onemocnění vyvolat v obdobném rozsahu a s obdobným průběhem v experimentálním prostředí (Marshall et al. 2005). Rozdílnost do jednotlivých experimentů vnáší navíc diverzita mitochondriální DNA (Stoneking a Soodyall 1996) či použité analytické metody.

Diskuze

Tento přehledový článek byl publikován 31.12.2018. Od té doby do současnosti (3/2021) přibýlo v PubMedu 25 publikací, které se zabývají mitochondriální respirací v sepsi. Z toho 2 publikace jsou přehledové články, 12 je založeno na výzkumu provedeném na různých modelech hlodavců (10 u myší, 2 u potkanů), 8 na různých typech buněčných

kultur či buněk (krevních destičkách či PBMC – z anglického peripheral blood mononuclear cells, tedy mononukleární buňky periferní krve), 2 publikace (provedené v našich laboratořích) na prasatech a 1 publikace založená na výzkumu provedeném současně na PBMC a potkanech. Je zjevné, že hlodavci jsou nejlépe dostupným a jedním ze snáze chovatelných zvířecích modelů, a proto většina experimentů je provedena právě na nich. Zůstává však otázkou, i v souvislosti s výše zmíněnými rozdíly, do jaké míry se jedná o model vhodně zvolený k případnému přenosu získaných výsledků na člověka.

Kromě velkých zvířecích modelů (jako je prase domácí) se jako vhodnější experimentální model jeví v současné době stále více používané PBMC (byly použity v 6 z 25 výše zmíněných publikací). Hlavní a nespornou výhodou použití těchto buněk je neinvazivnost jejich získávání. Běžně se analýza mitochondriální respirace provádí na izolovaných mitochondriích, tkáňovém homogenátu či permeabilizovaných buňkách nebo tkáních, což je mnohdy pro použití u pacientů (i těch se sepsí) zcela nevhodné. PBMC se izolují z plné krve a odběr krve je v porovnání s ostatními způsoby získávání vzorku metodou výrazně méně invazivní. V současné době jsou již optimalizovány protokoly nejen pro izolaci PBMC z krve, ale také pro měření jejich mitochondriální respirace (Sumbalova et al. 2020). Zřejmě čas však ukáže, zda bude možné díky PBMC a jiným krevním buňkám přesunout analýzu jednotlivých parametrů sepse přímo na člověka a zda tyto analýzy budou dostačující pro pochopení jednotlivých patofyziologických mechanismů sepse či přístupů k její léčbě nebo zda bude potřebné použít kombinaci výzkumu na těchto buňkách a některém z vhodnějších zvířecích modelů.

6 Závěr

Sepse je i přes velké pokroky v dostupné lékařské péči a popis mnoha jejích patofyziologických mechanismů onemocnění, které se těžko léčí a na které umírá mnoho lidí. Právě složitost patofyziologických procesů, které nejsou doposud všechny popsány a variabilní průběh sepse u jednotlivých pacientů znemožňuje na toto onemocnění používat pouze jeden lék, jako je tomu u mnoha jiných chorob. Většinou je zapotřebí použít kombinaci několika různých terapeutických přístupů zároveň. I přes včasný zásah však zůstává sepsa jedním z nejčastějších infekčních onemocnění, na které ročně zemře značné množství pacientů. Proto je cílem současného výzkumu sepse popsat co nejlépe patofyziologické mechanismy tohoto onemocnění, optimalizovat terapeutické přístupy, případně přijít s novými vhodnými postupy léčby pacientů.

Cílem této práce bylo přispět k pochopení etiopatogeneze sepse, a to především popsat případné změny mitochondriální respirace v sepsi. V našich laboratořích se podařilo vytvořit klinicky relevantní velký zvířecí model sepse a septického šoku vyvolaný fekální peritonitidou s typickými hyperdynamickými parametry. To nám umožnilo studovat buněčné mechanismy sepse, septické myokardiální deprese a roli mitochondrií v patogenezi onemocnění. Tyto fenomény byly doposud studovány převážně na malých modelech zvířat, nejčastěji u hlodavců. Samotná role mitochondrií v sepsi je stále diskutované téma a studií provedených na prasečím modelu sepse a zabývajících se mitochondriální respirací v myokardu není mnoho a jejich výsledky jsou navíc rozporuplné. V rámci našeho výzkumu se nám podařilo opakovaně prokázat, že vlivem sepse došlo v levé srdeční komoře septických prasat k poklesu mitochondriální respirace komplexu II (respirační stav OXPHOS II) a k poklesu aktivity komplexu IV uměle stimulované TMPD.

Dalším cílem této práce bylo na našem klinicky relevantním prasečím modelu sepse popsat potenciální terapeutický vliv stimulace bloudivého nervu na mitochondriální respiraci. Vliv stimulace bloudivého nervu na mitochondriální spotřebu kyslíku myokardu v sepsi doposud nebyl studován. Nám se jako prvním podařilo prokázat na tomto velkém zvířecím modelu sepse, že stimulace bloudivého nervu má řadu příznivých účinků, především na kardiovaskulární systém, energetický metabolismus i samotnou mitochondriální respiraci. Pokles mitochondriální respirace komplexu II (ve stavu OXPHOS II) a aktivity komplexu IV pozorovaný v permeabilizovaných buňkách levé srdeční komory

septických zvířat byl stimulací bloudivého nervu normalizován. Výsledky našeho výzkumu proto naznačují slibný terapeutický potenciál stimulace bloudivého nervu při léčbě sepse a poklesu mitochondriální respirace spojeného se sepsí.

Posledním z cílů této práce bylo na našem klinicky relevantním prasečím modelu určit vliv experimentální terapie sepse pomocí mezenchymálních kmenových buněk na mitochondriální respiraci. Vliv aplikace mezenchymálních kmenových buněk na mitochondriální spotřebu kyslíku u prasat či jiného modelového organismu v současné době nebyl studován. Byl však pozorován protektivní účinek aplikace těchto buněk na mitochondrie, především na sepsí vyvolaný nárůst ROS a snížené množství mitochondrií. V rámci našeho výzkumu se nám podařilo prokázat, že aplikace mezenchymálních kmenových buněk nemá žádné negativní účinky na mitochondriální respiraci v permeabilizovaných buňkách levé srdeční komory zdravých zvířat, avšak příznivé účinky aplikace těchto buněk na pokles mitochondriální respiraci komplexu II a aktivity komplexu IV vyvolaný sepsí se nám bohužel prokázat nepodařilo. Nelze však vyloučit příznivý účinek aplikace těchto buněk v některém z jiných orgánů případně na jiné mitochondriálních parametry, které nebyly předmětem našeho výzkumu.

Náš výzkum provedený na klinicky relevantním velkém zvířecím modelu sepse a septického šoku vyvolaném fekální peritonitidou tedy prokázal, že sepse má negativní vliv na mitochondriální respiraci myokardu. Sepse způsobuje v permeabilizovaných buňkách levé srdeční komory pokles mitochondriální respirace komplexu II a pokles aktivity komplexu IV. Tuto inhibici respirace u septických prasat lze zvrátit stimulací bloudivého nervu, ale nelze ji obnovit aplikací mezenchymálních kmenových buněk.

7 Seznam citované literatury

1. AMARAL A., LOURENÇO B., MARQUES M. a RAMALHO-SANTOS J. Mitochondria functionality and sperm quality. 2013, **146** (5), 163-174, *Reproduction*. ISSN 14701626.
2. AMORIM A., FERNANDES T. a TAVEIRA N. Mitochondrial DNA in human identification: A review. 2019, **7**, e7314, *PeerJ*. ISSN 21678359.
3. ANGUS D. C. a VAN DER POLL T. Severe Sepsis and Septic Shock. 2013, **369**(9), 840–851, *N Engl J Med*. ISSN 0028-4793.
4. ANTONUCCI E., FIACCADORI E., DONADELLO K., TACCONE F. S., Federico FRANCHI a SCOLLETTA S. Myocardial depression in sepsis: From pathogenesis to clinical manifestations and treatment. 2014, **29**(4), 500-511. *J Crit Care*. ISSN 15578615.
5. APOSTOLOVA N., GARCIA-BOU R., HERNANDEZ-MIJARES A., HERANCE R., ROCHA M. a VICTOR M. Mitochondrial antioxidants alleviate oxidative and nitrosative stress in a cellular model of sepsis. **28**(11), 2910–2919. *Pharm Res*. ISSN 07248741.
6. ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K a WALTER P. Základy buněčné biologie - Úvod do molekulární biologie buňky - Bruce Alberts. 1998. ISBN 80-902906-2-0
7. AZIZ M., JACOB A., YANG W.-L., MATSUDA A. a WANG P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. 2013, **93**(3), 329–342. *J Leukoc Biol*. ISSN 0741-5400.
8. BAI P., NAGY L., FODOR T., LIAUDET L. a PACHER P. Poly(ADP-ribose) polymerases as modulators of mitochondrial activity. 2015, **26**(2), 75-83. *Trends Endocrinol Metab*. ISSN 18793061.
9. BARADARAN R., BERRISFORD J. M., MINHAS G. S. a SAZANOV L. A. Crystal structure of the entire respiratory complex I. 2013, **494**(7438), 443-448. *Nature*. ISSN 1476-4687.
10. BARTLETT K. a EATON S. Mitochondrial beta-oxidation. 2004, **271**(3), 462–469. *Eur J Biochem*. ISSN 0014-2956.

11. BERNARDI P. a DI LISA F. The mitochondrial permeability transition pore: Molecular nature and role as a target in cardioprotection. 2015, **78**, 100-106. *J Mol Cell Cardiol.* ISSN 10958584.
12. BEZAWORK-GELETA A., ROHLENA J., DONG L., PACAK K. a NEUZIL J. Mitochondrial Complex II: At the Crossroads. 2017, **42**(4), 312-325. *Trends Biochem Sci.* ISSN 13624326.
13. BOEKSTEGERS P., WEIDENHOFER S., KAPSNER T. a WERDAN K. Skeletal muscle partial pressure of oxygen in patients with sepsis. 1994, **22**(4), 640–650. *Crit Care Med.* ISSN 00903493.
14. BOEKSTEGERS P., WEIDENHÖFER S., PILZ G. a WERDAN K. Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: Comparison to limited infection and cardiogenic shock. 1991, **19**(5), 317–323. *Infection.* ISSN 03008126.
15. BONAZ B., PICQ C., SINNIGER V., MAYOL a CLARENÇON D. Vagus nerve stimulation: From epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. 2013, **25**(3), 208-221. *Neurogastroenterol Motil.* ISSN 13501925.
16. BONE R. C., BALK R. A., CERRA F. B., DELLINGER R. P., FEIN A. M., KNAUS W. A., SCHEIN R. M.H. a SIBBALD W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992, **101**(6), 1644-1655. *Chest.* ISSN 00123692.
17. BOYER P. D. A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport. 1975, **58**(1), 1-6. *FEBS Lett.* ISSN 00145793.
18. BRAND M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. 2016, **100**, 14-31. *Free Radic Biol Med.* ISSN 18734596.
19. BRAUNWALD E. a KLONER R. A. The stunned myocardium: Prolonged, postischemic ventricular dysfunction. 1982, **66**(6), 1146-1149. *Circulation.* ISSN 00097322.
20. BRAUNWALD E. a JOHN RUTHERFORD J. D. Reversible ischemic left ventricular dysfunction: Evidence for the “hibernating myocardium”. 1986, **8**(6), 1467-1470. *J Am Coll Cardiol.* ISSN 07351097.

21. BREALEY D., BRAND M., HARGREAVES I., HEALES S., LAND J., SMOLENSKI R., DAVIES N. A., COOPER CH. E. a SINGER M. Association between mitochondrial dysfunction and severity and outcome of septic shock. 2002, **360**(9328), 219–223. *Lancet*. ISSN 0140-6736.
22. BRENNER D. a MAK T. W. Mitochondrial cell death effectors. 2009, **21**(6), 871–877. *Curr Opin Cell Biol*. ISSN 1879-0410.
23. BROOKES P. S., YOON Y., ROBOTHAM J. L., ANDERS M. W. a SHEU S. S. Calcium, ATP, and ROS: A mitochondrial love-hate triangle. 2004, **287**(4), 817-833. *Am J Physiol Cell Physiol*. ISSN 03636143.
24. BROWN G. C. a BORUTAITE V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. 2004, **1658**(1-2), 44-49. *Biochim Biophys Acta*. ISSN 00052728.
25. BRZEZINSKI P. a GENNIS R. B. Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries. 2008, **40**(5), 521–531. *J Bioenerg Biomembr*. ISSN 0145-479X.
26. CAIRNS C. B., FERROGGIARO A. A., WALTHER J. M., HARKEN A. H. a BANERJEE A. Postischemic administration of succinate reverses the impairment of oxidative phosphorylation after cardiac ischemia and reperfusion injury. 1997, **96**(9 Suppl), II–260-265. *Circulation*. ISSN 00097322.
27. CANTO C. a GARCIA-ROVES P. M. High-resolution respirometry for mitochondrial characterization of ex vivo mouse tissues. 2015, **5**(2), 135–153. *Curr Protoc Mouse Biol*. ISSN 2161-2617.
28. CARRE J. E., ORBAN J.-CH, RE L., FELSMANN K., IFFERT W., BAUER M., SULIMAN H. B., PIANTADOSI C. A., MAYHEW T. M., BREEN P., STOTZ M. a SINGER M. Survival in critical illness is associated with early activation of mitochondrial biogenesis. 2010, **182**(6), 745–751. *Am J Respir Crit Care Med*. ISSN 1073-449X.
29. CARRE J. E. a SINGER M. Cellular energetic metabolism in sepsis: The need for a systems approach. 2008, **1777**(7-8), 763-771. *Biochim Biophys Acta*. ISSN 00052728.
30. CATHARINA DUVIGNEAU J. a KOZLOV A. V. Pathological impact of the interaction of NO and CO with mitochondria in critical care diseases. 2017, **4**, 223. *Front Med (Lausanne)*. ISSN 2296858X.
31. CAVAILLON J.-M. a CHRÉTIEN F. From septicemia to sepsis 3.0—from Ignaz Semmelweis to Louis Pasteur. 2019, **20**(5), 371-382. *Genes Immun*. ISSN 14765470.

32. CEDIKOVA M., PITULE P., KRIPNEROVA M., MARKOVA M. a KUNCOVÁ J. Multiple roles of mitochondria in aging processes. 2016, **65**(Suppl 5), 519-531. *Physiol Res*. ISSN 18029973.
33. CHABAN Y., BOEKEMAE. J. a DUDKINA N. V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. 2014, **1837**(4), 418-426. *Biochim Biophys Acta*. ISSN 00052728.
34. CHANCE B., SIES H. a BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. 1979, **59**(3), 527–605. *Physiol Rev*. ISSN 00319333.
35. CHATRE L., VERDONK F., ROCHETEAU P., CROCHEMORE C., CHRÉTIEN F. a RICCHETTI M. A novel paradigm links mitochondrial dysfunction with muscle stem cell impairment in sepsis. 2017, **1863**(10 Pt B), 2546-2553. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. ISSN 1879260X.
36. CHIOLERO R, REVELLY J. P. a TAPPY L. Energy metabolism in sepsis and injury. 1997, **13**(9 Suppl), 45-51. *Nutrition*. ISSN 08999007.
37. CHRISTAKI E. a GIAMARELLOS-BOURBOULIS E. J. The beginning of personalized medicine in sepsis: small steps to a bright future. 2014, **86**(1), 56–61. *Clin Genet*. ISSN 00099163.
38. CHURPEK M. M., ZADRAVECZ F. J., WINSLOW CH., HOWELL M. D. a EDELSON D. P. Incidence and prognostic value of the systemic inflammatory response syndrome and organ dysfunctions in ward patients. 2015, **192**(8), 958–964. *Am J Respir Crit Care Med*. ISSN 15354970.
39. CIMOLAI M. C., ALVAREZ S., BODE CH. a BUGGER H. Mitochondrial mechanisms in septic cardiomyopathy. 2015, **16**(8), 17763-17778. *Int J Mol Sci*. ISSN 14220067.
40. COGLIATI S., ENRIQUEZ J. A. a SCORRANO L. Mitochondrial cristae: where beauty meets functionality. 2016, **41**(3), 261-273. *Trends Biochem Sci*. ISSN 0968-0004.
41. CORRÊA T. D., JEGER V., PEREIRA A. J., TAKALA J., DJAFARZADEH S. a JAKOB S. M. Angiotensin II in septic shock: Effects on tissue perfusion, organ function, and mitochondrial respiration in a porcine model of fecal peritonitis. 2014, **42**(8), e550-559. *Crit Care Med*. ISSN 15300293.

42. CORRÊA T. D., VUDA M., BLASER A. R., TAKALA J., DJAFARZADEH S., DÜNSER M. W., SILVA E., LENSCH M., WILKENS L. a JAKOB S. M. Effect of treatment delay on disease severity and need for resuscitation in porcine fecal peritonitis. 2012, **40**(10), 2841–2849. *Crit Care Med.* ISSN 0090-3493.
43. CORRÊA T. D., PEREIRA A. J., BRANDT S., VUDA M., DJAFARZADEH S., TAKALA J. a JAKOB S. M. Time course of blood lactate levels, inflammation, and mitochondrial function in experimental sepsis. 2017, **21**(1), 105. *Crit Care.* ISSN 1466609X.
44. CROFTS A. R. The cytochrome bc₁ complex: function in the context of structure. 2004, **66**, 689–733. *Annu Rev Physiol.* ISSN 0066-4278.
45. CROUSER E. D., JULIAN M.W., BLAHO D. V. a PFEIFFER D. R. Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity. 2002, **30**(2), 276–284. *Crit Care Med.* ISSN 00903493.
46. CROUSER E. D., JULIAN M. W., HUFF J. E., JOSHI M. S., BAUER J. A., GADD M. E., WEWERS M. D. a PFEIFFER D. R. Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. 2004, **32**(2), 478–488. *Crit Care Med.* ISSN 00903493.
47. CSORDAS G., RENKEN CH., VARNAI P., WALTER L., WEAVER D., BUTTLE K. F., BALLA T., MANNELLA C. A. a HAJNOCZKY G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. 2006, **174**(7), 915–921. *J Cell Biol.* ISSN 00219525.
48. CSORDAS G., WEAVER D. a HAJNOCZKY G. Endoplasmic reticulum–mitochondrial contactology: Structure and signaling functions. 2018, **28**(7), 523-540. *Trends Cell Biol.* ISSN 18793088.
49. DE BACKER D., CRETEUR J., PREISER J. C., DUBOIS M. J. a VINCENT J. L. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. 2002, **166**(1), 98–104. *Am J Respir Crit Care Med.* ISSN 1073449X.
50. DIKALOV S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. 2011, **51**(7), 1289-1301. *Free Radic Biol Med.* ISSN 08915849.

51. DOS SANTOS C. C., GATTAS D. J., TSOPORIS J. N., SMEDING L., KABIR G., MASOOM H., AKRAM A., PLOTZ F., SLUTSKY A. S., HUSAIN M., SIBBALD W. J. a PARKER T. G. Sepsis-induced myocardial depression is associated with transcriptional changes in energy metabolism and contractile related genes: A physiological and gene expression-based approach. 2010, **38**(3), 894–902. *Crit Care Med*. ISSN 15300293.
52. DOS SANTOS C. C., MURTHY S., HU P., SHAN Y., HAITSMAN J. J., MEI S. H. J., STEWART D. J. a LILES W. C. Network analysis of transcriptional responses induced by mesenchymal stem cell treatment of experimental sepsis. 2012, **181**(5), 1681–1692. *Am J Pathol*. ISSN 00029440.
53. DRAXL A., EIGENTLER A. a GNAIGER E. PBI-Shredder HRR-Set: preparation of tissue homogenates for diagnosis of mitochondrial respiratory function. 2015. Dostupné z www.orooboros.at.
54. DYSON A., RUDIGER A. a SINGER M. Temporal changes in tissue cardiorespiratory function during faecal peritonitis. 2011, **37**(7), 1192–1200. *Intensive Care Med*. ISSN 0342-4642.
55. EIGENTLER A., DRAXL A. a GNAIGER E. Laboratory Protocol: Citrate synthase a mitochondrial marker enzyme. 2020. Dostupné www.orooboros.at.
56. FERGUSON S. J. ATP synthase: From sequence to ring size to the P/O ratio. 2010, **107**(39), 16755-16756. *Proc Natl Acad Sci U S A*. ISSN 10916490.
57. FINK M. Cytopathic hypoxia in sepsis. 1997, **110**, 87-95. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. ISSN 05152720.
58. FLEISCHMANN C., SCHERAG A., ADHIKARI N. K. J., HARTOG CH. S., TSAGANOS T., SCHLATTMANN P., ANGUS D. C. a REINHART K. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. 2016, **193**(3), 259–272. *Am J Respir Crit Care Med*. ISSN 1073-449X.
59. FREDRIKSSON K., HAMMARQVIST F., STRIGÅRD K., HULTENBY K., LJUNGQVIST O., WERNERMAN J. a ROOYACKERS O. Derangements in mitochondrial metabolism in intercostal and leg muscle of critically ill patients with sepsis-induced multiple organ failure. 2006, **291**(5), 1044-1050. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. ISSN 01931849.
60. FUNK D. J., PARRILLO J. E. a KUMAR A. Sepsis and Septic Shock: A History. 2009, **25**(1), 83-101. *Crit Care Clin*. ISSN 07490704.

61. GATTINONI L., BRAZZI L., PELOSI P., LATINI R., TOGNONI G., PESENTI A. a FUMAGALLI R. A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. Svo2 collaborative group. 1995, **333**(16), 1025-1032. *N Engl J Med*. ISSN 0028-4793.
62. GELLERICH F. N., TRUMBECKAITE S., HERTEL K., ZIERZ S., MÜLLER-WERDAN U., WERDAN K., REDL H. a SCHLAG G. Impaired energy metabolism in hearts of septic baboons: diminished activities of Complex I and Complex II of the mitochondrial respiratory chain. 1999, **11**(5), 336–41. *Shock*. ISSN 1073-2322.
63. GELLERICH F. N., TRUMBECKAITE S., OPALKA J. R., GELLERICH J. F., CHEN Y., ZIERZ S., WERDAN K., NEUHOF CH. a REDL H. Mitochondrial dysfunction in sepsis: Evidence from bacteraemic baboons and endotoxaemic rabbits. 2002, **22**(1), 99-113. *Biosci Rep*. ISSN 01448463.
64. GERI G., VIGNON P., UBRY A., FEDOU A. L., CHARRON C., SILVA S., REPESSÉ X. a VIEILLARD-BARON A. Cardiovascular clusters in septic shock combining clinical and echocardiographic parameters: a post hoc analysis. 2019, **45**(5), 657-667. *Intensive Care Med*. ISSN 14321238.
65. GERO D. a SZABO C. Poly(ADP-ribose) polymerase: A new therapeutic target? 2008, **21**(2), 111-121. *Curr Opin Anaesthesiol*. ISSN 09527907.
66. GNAIGER E. a FORSTNER H. Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications. 1983, **12**(4), 410-410. *Acta Hydrochim. Hydrobiol*. ISSN 03234320.
67. GONZALEZ A. S., ELGUERO M. E., FINOCCHIETTO P., HOLOD S., ROMORINI L., MIRIUKA S. G., PERALTA J. G., PODEROSO a CARRERAS M. C. Abnormal mitochondrial fusion-fission balance contributes to the progression of experimental sepsis. 2014, **48**(7), 769–783. *Free Radic Res*. ISSN 10292470.
68. GROSS V. S., GREENBERG H. K., BARANOV S. V., CARLSON G. M., STAVROVSKAYA I. G., LAZAREV A. V. a KRISTAL B. S. Isolation of functional mitochondria from rat kidney and skeletal muscle without manual homogenization. 2011, **418**(2), 213–223. *Anal Biochem*. ISSN 10960309.
69. GUARICCI A. I., BULZIS G., PONTONE G., SCICCHITANO P., CARBONARA R., RABBAT M., DE SANTIS D. a CICCONE M. M. Current interpretation of myocardial stunning. 2018, **28**(4), 263-271. *Trends Cardiovasc Med*. ISSN 18732615.

70. GYAWALI B., RAMAKRISHNA K. a DHAMOON A. S. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. 2019, 7, 2050312119835043. *SAGE Open Med.* ISSN 2050-3121.
71. HABIMANA R., CHOI I., CHO H. J., KIM D., LEE K. a JEONG I. Sepsis-induced cardiac dysfunction: a review of pathophysiology. 2020, **35**(2), 57-66. *Acute Crit Care.* ISSN 25866060.
72. HADEN D. W., SULIMAN H. B., CARRAWAY M. S., WELTY-WOLF K. E., ALI A. S., SHITARA H., YONEKAWA H. a PIANTADOSI C. A. Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during *Staphylococcus aureus* sepsis. 2007, **176**(8), 768–777. *Am J Respir Crit Care Med.* ISSN 1073-449X.
73. HAILESELASSIE B., MUKHERJEE R., JOSHI A. U., NAPIER B. A., MASSIS L. M., OSTBERG N. P., QUELICONI B. B., MONACK D., BERNSTEIN D. a MOCHLY-ROSEN D. Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction in septic cardiomyopathy. 2019, **130**, 160–169. *J Moll Cell Cardiol.* ISSN 10958584.
74. HAILESELASSIE B., SU E., POZIOS I., NIÑO D. F., LIU H., LU D.-Y., VENTOU LIS I., FULTON W. B., SODHI CH. P., HACKAM D., O'ROURKE B. a ABRAHAM T. Myocardial oxidative stress correlates with left ventricular dysfunction on strain echocardiography in a rodent model of sepsis. 2017, **5**(1), 21. *Intensive Care Med Exp.* ISSN 2197-425X.
75. HALESTRAP A. P., WOODFIELD K. Y. a CONNERN C. P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. 1997, **272**(6), 3346–3354. *J Biol Chem.* ISSN 00219258.
76. HASSOUN S. M., MARECHAL X., MONTAIGNE D., BOUAZZA Y., DECOSTER B., LANCEL S. a NEVIERE R. Prevention of endotoxin-induced sarcoplasmic reticulum calcium leak improves mitochondrial and myocardial dysfunction. 2008, **36**(9), 2590–2596. *Crit Care Med.* ISSN 15300293.
77. HAYASHI T., RIZZUTO R., HAJNOCZKY G. a SU T. P. MAM: more than just a housekeeper. 2009, **19**(2), 81-88. *Trends Cell Biol.* ISSN 09628924.
78. HAYES M. A., TIMMINS A. C., YAU E. H., PALAZZO M., WATSON D. a HINDS CH. J. Oxygen transport patterns in patients with sepsis syndrome or septic shock: Influence of treatment and relationship to outcome. 1997, **25**(6), 926-936. *Crit Care Med.* ISSN 00903493.

79. HE J., FORD H. C., CARROLL J., DOUGLAS C., GONZALES E., DING S., FEARNLEY I. M. a WALKER J. E. Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. 2018, **115**(12), 2988–2993. *Proc Natl Acad Sci U S A*. ISSN 10916490.
80. HEUSCH G. a SCHULZ R. The biology of myocardial hibernation. 2000, **10**(3), 108-114. *Trends Cardiovasc Med*. ISSN 10501738.
81. HEUSCH G., SCHULZ R. a RAHIMTOOLA S. H. Myocardial hibernation: A delicate balance. 2005, **288**(3), 984-999. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. ISSN 03636135.
82. HEYNDRICKX G. R., MILLARD R. W., MCRITCHIE R. J., MAROKO P. R. a VATNER S. F. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. 1975. **56**(4), 978–985. *J Clin Invest*. ISSN 00219738.
83. HICKSON-BICK D. L.M., JONES CH. a BUJA L. M. Stimulation of mitochondrial biogenesis and autophagy by lipopolysaccharide in the neonatal rat cardiomyocyte protects against programmed cell death. 2008, **44**(2), 411–418. *J Mol Cell Cardiol*. ISSN 00222828.
84. HOBAI I. A., EDGECOMB J., LABARGE K. a COLUCCI W. S. Dysregulation of intracellular calcium transporters in animal models of sepsis-induced cardiomyopathy. 2015, **43**(1), 3-15. *Shock*. ISSN 15400514.
85. HORAK J., HARAZIM M., KARVUNIDIS T., RADEJ J., NOVAK I. a MATEJOVIC M. Sepsis - jak ji poznat, na co se zaměřit aneb zpět k základům ve světle nové definice. 2016, **62**(7-8), 568-574. *Vnitr Lek*. ISSN 0042–773X.
86. HORAK J., NALOS L., MARTINKOVA V., BENES J., STENGL M. a MATEJOVIC M. Mesenchymal stem cells in sepsis and associated organ dysfunction: a promising future or blind alley? 2017, **2017**, 7304121. *Stem Cells Int*. ISSN 16879678.
87. HORAK J., NALOS L., MARTINKOVA V., TEGL V., VISTEJNOVA L., KUNCOVA J., KOHOUTOVA M., JARKOVSKA D., DOLEJSOVA M., BENES J., STENGL M. a MATEJOVIC M. Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study. 2020, **11**, 126. *Front Immunol*. ISSN 16643224.

88. HORSEFIELD R., YANKOVSKAYA V., SEXTON G., WHITTINGHAM W., SHIOMI K., OMURA S., BYRNE B., CECCHINI G. a IWATA S. Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. 2006, **281**(11), 7309–16. *J Biol Chem*. ISSN 0021-9258.
89. HOTCHKISS R. S., SONG S. K., NEIL J. J., CHEN R. D., MANCHESTER J. K., KARL I. E., LOWRY O. H. a ACKERMAN J. J. Sepsis does not impair tricarboxylic acid cycle in the heart. 1991, **260**(1 Pt 1), 50-57. *Am J Physiol*. ISSN 00029513.
90. HUANG Q. a SHEN H. M. To die or to live: The dual role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in autophagy and necrosis under oxidative stress and DNA damage. 2009, **5**(2), 273–276. *Autophagy*. ISSN 15548635.
91. JANG D. H., GREENWOOD J. C., SPYRES M. B. a ECKMANN D. M. Measurement of Mitochondrial Respiration and Motility in Acute Care. 2017, **32**(1), 86–94. *J Intensive Care Med*. ISSN 15251489.
92. JARKOVSKA D., MARKOVA M., HORAK J., NALOS L., BENES J., AL-OBEIDALLAH M., TUMA Z., SVIGLEROVA J., KUNCOVA J., MATEJOVIC M. a STENGL M. Cellular mechanisms of myocardial depression in porcine septic shock. 2018, **9**, 726. *Front Physiol*. ISSN 1664042X.
93. JARKOVSKA D., VALESOVA L., CHVOJKA J., BENES J., SVIGLEROVA J., FLOROVA B., NALOS L., MATEJOVIC M. a STENGL M. Heart rate variability in porcine progressive peritonitis-induced sepsis. 2016, **6**, 412. *Front Physiol*. ISSN 1664042X.
94. JEGER V., DJAFARZADEH S., JAKOB S. M. a TAKALA J. Mitochondrial function in sepsis. 2013, **43**(5), 532-542. *Eur J Clin Invest*. ISSN 00142972.
95. JOHNSON R. L. a WILSON CH. G., 2018. A review of vagus nerve stimulation as a therapeutic intervention. 2018, **11**, 203-213. *J Inflamm Res*. ISSN 11787031.
96. KAKIHANA Y., ITO T., NAKAHARA M., YAMAGUCHI K. a YASUDA T. Sepsis-induced myocardial dysfunction: Pathophysiology and management. 2016, **4**, 22. *J Intensive Care*. ISSN 20520492.
97. KAUKONEN K. M., BAILEY M., PILCHER D., COOPER D. J. a BELLOMO R., 2018. The systemic inflammatory response syndrome criteria and their differential association with mortality. 2018, **46**, 29–36. *J Crit Care*. ISSN 15578615.

98. KING C. J., TYTGAT S., DELUDE R. L. a FINK M. P. Ileal mucosal oxygen consumption is decreased in endotoxemic rats but is restored toward normal by treatment with aminoguanidine. 1999, **27**(11), 2518–2524. *Crit Care Med.* ISSN 00903493.
99. KOHLHAAS M., LIU T., KNOPP A., ZELLER T., ONG M. F., BÖHM M., O'ROURKE B. a MAACK CH. Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. 2010, **121**(14), 1606–1613 *Circulation.* ISSN 00097322.
100. KOHOUTOVA M., DEJMEK J., TUMA Z. a KUNCOVA J. Variability of mitochondrial respiration in relation to sepsis-induced multiple organ dysfunction. 2018, **67**(Suppl 4), 577-592. *Physiol Res.* ISSN 18029973.
101. KOHOUTOVA M., HORAK J., JARKOVSKA D., MARTINKOVA V., TEGL V., NALOS L., VISTEJNOVA L., BENES J., SVIGLEROVA J., KUNCOVA J., MATEJOVIC M. a STENGL M. Vagus nerve stimulation attenuates multiple organ dysfunction in resuscitated porcine progressive sepsis. 2019, **47**(6), e461–e469. *Crit Care Med.* ISSN 15300293.
102. KOZLOV A. V., DUVIGNEAU J. C., MILLER I., NURNBERGER S., GESSLBAUER B., KUNGL A., OHLINGER W., HARTL R. T., GILLE L., STANIEK K., GREGOR W., HAINDL S. a REDL H. Endotoxin causes functional endoplasmic reticulum failure, possibly mediated by mitochondria. 2009, **1792**(6), 521–530. *Biochim Biophys Acta.* ISSN 09254439.
103. KOZLOV A. V., LANCASTER J. R., MESZAROS A. T. a WEIDINGER A. Mitochondria-mediated pathways of organ failure upon inflammation. 2017, **13**, 170-181. *Redox Biol.* ISSN 22132317.
104. KOZLOV A. V., VAN GRIENSVEN M., HAINDL S., KEHRER I., DUVIGNEAU J. C., HARTL R. T., EBEL T., JAFARMADAR M., CALZIA E., GNAIGER E., REDL H., RADERMACHER P. a BAHRAMI S. Peritoneal inflammation in pigs is associated with early mitochondrial dysfunction in liver and kidney. 2010, **33**(5), 295–305. *Inflammation.* ISSN 03603997.
105. KREYMANN G. a WOLF M. Geschichte und definition der sepsis - brauchen wir eine neue terminologie? 1996, **31**(1), 9-14. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* ISSN 09392661.

106. KREYMANN G, GROSSER S., BUGGISCH P., GOTTSCHALL C., MATTHAEI S. a GRETEN H. Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. 1993, **21**(7), 1012–9. *Crit Care Med*. ISSN 0090-3493.
107. KUBLI D. A. a GUSTAFSSON A. B. Mitochondria and mitophagy: The yin and yang of cell death control. 2012, **111**(9), 1208-1221. *Circ Res*. ISSN 00097330.
108. KUZNETSOV A. V., STROBL D., RUTTMANN E., KONIGSRAINER A., MARGREITER R. a GNAIGER E. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. 2002, **305**(2), 186–194. *Anal Biochem*. ISSN 00032697.
109. LANCEL S., HASSOUN S. M., FAVORY R., DECOSTER B., MOTTERLINI R. a NEVIERE R. Carbon monoxide rescues mice from lethal sepsis by supporting mitochondrial energetic metabolism and activating mitochondrial biogenesis. 2009, **329**(2), 641–648. *J Pharmacol Exp Ther*. ISSN 1521-0103.
110. LANGLEY R. J., TSALIK E. L., VAN VELKINBURGH J. C., GLICKMAN S. W., RICE B. J., WANG CH., CHEN B., CARIN L., SUAREZ A., MOHNEY R. P., FREEMAN D. H., WANG M., YOU J., WULFF J., THOMPSON J. W., MOSELEY M. A., REISINGER S., EDMONDS B. T., GRINNELL B., NELSON D. R., DINWIDDIE D. L., MILLER N. A., SAUNDERS C. J., SODEN S. S., ROGERS A. J., GAZOURIAN L., FREDENBURGH L. E., MASSARO A. F., BARON R. M., CHOI A. M. K., COREY G. R., GINSBURG G. S., CAIRNS CH. B., OTERO R. M., FOWLER V. G., RIVERS E. P., WOODS CH. W., KINGSMORE S. F. a KINGSMORE S. F. An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis. 2013, **5**(195), 195ra95. *Sci Transl Med*. ISSN 1946-6242.
111. LAROYE C., LEMARIE J., BOUFENZER A., LABROCA P., CUNAT L., ALAUZET C., GROUBATCH F., CAILAC C., JOLLY L., BENSOUSSAN D., REPPEL L. a GIBOT S. Clinical-grade mesenchymal stem cells derived from umbilical cord improve septic shock in pigs. 2018, **6**(1), 24. *Intensive Care Med Exp*. ISSN 2197-425X.
112. LEHNINGER A. L., NELSON D. L. a COX M. M. Lehninger Principles of Biochemistry (6th Edition). 2013.
113. LELUBRE CH. a VINCENT J. L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. 2018, **14**(7), 417-427. *Nat Rev Nephrol*. ISSN 1759507X.

114. LEVIN B. C., CHENG H. a DENNIS J. REEDER D. J. A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification, medical diagnosis, and mutation detection. 1999, **55**(2), 135–146. *Genomics*. ISSN 08887543.
115. LEVY M. M., FINK M. P., MARSHALL J. C., ABRAHAM E., ANGUS D., COOK D., COHEN J., OPAL S. M., VINCENT J. L. a RAMSAY G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. 2003, **31**(4), 1250–1256. *Crit Care Med*. ISSN 00903493.
116. LI C. M., CHEN J. H., ZHANG P., HE Q., YUAN J., CHEN R. J., CHENG X. J., TAN H. Z. a YANG Y. Continuous veno-venous haemofiltration attenuates myocardial mitochondrial respiratory chain complexes activity in porcine septic shock. 2007, **35**(6), 911–919. *Anaesth Intensive Care*. ISSN 0310057X.
117. LI G., WU J., LI R., YUAN D., FAN Y., YANG J., JI M. a ZHU S. Protective Effects of Antioxidant Peptide SS-31 Against Multiple Organ Dysfunctions During Endotoxemia. 2016, **39**(1), 54–64. *Inflammation*. ISSN 15732576.
118. LI S., WU H., HAN D., MA S., FAN W., WANG Y., ZHANG R., FAN M., HUANG Y., FU X. a CAO F. A novel mechanism of mesenchymal stromal cell-mediated protection against sepsis: Restricting inflammasome activation in macrophages by increasing mitophagy and decreasing mitochondrial ROS. 2018, **2018**, 3537609. *Oxid Med Cell Longev*. ISSN 19420994.
119. LOPEZ-CRISOSTO C., PENNANEN CH., VASQUEZ-TRINCADO C., MORALES P. E., BRAVO-SAGUA R., QUEST A. F. G., CHIONG M. a LAVANDERO S. Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology. 2017, **14**(6), 342-360. *Nat Rev Cardiol*. ISSN 17595010.
120. LUND N., DE ASLA R. J., CLADIS F., PAPADAKOS P. J. a THORBORG P. A. Dopexamine hydrochloride in septic shock: Effects on oxygen delivery and oxygenation of gut, liver, and muscle. 1995, **38**(5), 767–775. *J Trauma*. ISSN 10796061.
121. MANNELLA C. A. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. 2006, **1763**(5-6), 542-548. *Biochim Biophys Acta*. ISSN 01674889.
122. MARSHALL J. C., DEITCH E., MOLDAWER L. L., OPAL S., REDL H. a VAN DER POLL T. Preclinical models of shock and sepsis: What can they tell us? 2005, **24** Suppl 1, 1-6. *Shock*. ISSN 10732322.

123. MATKOVICH S. J., AL KHIAMI B., EFIMOV I. R., EVANS S., VADER J., JAIN A., BROWNSTEIN B. H., HOTCHKISS R. S. a MANN D. L., 2017. Widespread down-regulation of cardiac mitochondrial and sarcomeric genes in patients with sepsis. 2017, **45**(3), 407–414. *Crit Care Med.* ISSN 15300293.
124. MITCHELL P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. 1961, **191**(4784), 144–148. *Nature.* ISSN 00280836.
125. MODIS K., BOS E. M., CALZIA E., VAN GOOR H., COLETTA C., PAPAPETROPOULOS A., HELLMICH M. R., RADERMACHER P., BOUILLAUD F. a SZABO C. Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part II Pathophysiological and therapeutic aspects. 2014, **171**(8), 2123-2146. *Br J Pharmacol.* ISSN 14765381.
126. MONTEIRO J., MORAIS C., OLIVEIRA P. a JURADO A. Mitochondrial membrane lipids in life and death and their molecular modulation by diet: tuning the furnace. 2014, **15**(8), 797–810. *Current Drug Targets.* ISSN 13894501.
127. MURPHY M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. 2009, **417**(1), 1-13. *Biochem J.* ISSN 02646021.
128. NEUPERT W. a HERRMANN J. M. Translocation of proteins into mitochondria. 2007, **76**, 723-749. *Annu Rev Biochem.* ISBN 9780123456786.
129. NUNNARI J. a SUOMALAINEN A. Mitochondria: in sickness and in health. 2012, **148**(6), 1145-1159. *Cell.* ISBN 978-981-13-8367-0.
130. NUNTAPHUM W., PONGKAN W., WONGJAIKAM S., THUMMASORN S., TANAJAK P., KHAMSEEKAEW J., INTACHAI K., CHATTIPAKORN S. C., CHATTIPAKORN N. a SHINLAPAWITTAYATORN K. Vagus nerve stimulation exerts cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury predominantly through its efferent vagal fibers. 2018, **113**(4), 22. *Basic Res Cardiol.* ISSN 14351803.
131. NURNBERGER S., MILLER I., DUVIGNEAU J. C., KAVANAGH E. T., GUPTA S., HARTL R. T., HORI O., GESSLBAUER B., SAMALI A., KUNGL A., REDL H. a KOZLOV A. V. Impairment of endoplasmic reticulum in liver as an early consequence of the systemic inflammatory response in rats. 2012, **303**(12), 1373-1383. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* ISSN 01931857.

132. OSELLAME L. D., BLACKER T. S. a DUCHEN M. R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. 2012, **26**(6), 711-723. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* ISSN 15321908.
133. OSUCHOWSKI M. F., AYALA A., BAHRAMI S., BAUER M., BOROS M., CAVAILLON J.-M., CHAUDRY I. H., COOPERSMITH C. M., DEUTSCHMAN C. S., DRECHSLER S., EFRON P., FROSTELL C., FRITSCH G., GOZDZIK W., HELLMAN J., HUBER-LANG M., INOUE S., KNAPP S., KOZLOV A. V., LIBERT C., MARSHALL J. C., MOLDAWER L. L., RADERMACHER P., REDL H., REMICK D. G., SINGER M., THIEMERMANN CH., WANG P., WIERSINGA W. J., XIAO X. a ZINGARELLI B. Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS): An international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis. 2018, **50**(4), 377–380. *Shock.* ISSN 15400514.
134. PALIWAL S., CHAUDHURI R., AGRAWAL A. a MOHANTY S. Regenerative abilities of mesenchymal stem cells through mitochondrial transfer. 2018, **25**(1), 31. *J Biomed Sci.* ISSN 14230127.
135. PARADIES G., PARADIES V., DE BENEDICTIS V., RUGGIERO F. M. a PETROSILLO G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. 2014, **1837**(4), 408-417. *Biochim Biophys Acta.* ISSN 00052728.
136. PARKER M. M., SHELHAMER J. H., BACHARACH S. L., GREEN M. V., NATANSON C., FREDERICK T. M., DAMSKE B. A. a PARRILLO J. E. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. 1984, **100**(4), 483–490. *Ann Intern Med.* ISSN 00034819.
137. PATIL N. K., PARAJULI N., MACMILLAN-CROW L. A. a MAYEUX P. R. Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis: Mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury. 2014, **306**(7), F734-743. *Am J Physiol Renal Physiol.* ISSN 15221466.
138. PESTA D. a GNAIGER E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. 2012, **810**, 25–58. *Methods Mol Biol.* ISSN 1940-6029.
139. PIERRAKOS CH. a VINCENT J. L. Sepsis biomarkers: a review. 2010, **14**(1), R15. *Crit Care.* ISSN 13648535.

140. PIQUEREAU J., GODIN R., DESCHÊNES S., BESSI V. L., MOFARRAHI M., HUSSAINS. N. a BURELLE Y. Protective role of PARK2/Parkin in sepsis-induced cardiac contractile and mitochondrial dysfunction. 2013, **9**(11), 1837–1851. *Autophagy* ISSN 15548635.
141. PORTA F., TAKALA J., WEIKERT CH., BRACHT H., KOLAROVA A., LAUTERBURG B. H., BOROTTO E. a JAKOB S. M. Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. 2006, **10**(4), R118. *Crit Care*. ISSN 13648535.
142. PREAU S., DELGUSTE F., YU Y., REMY-JOUET I., RICHARD V., SAULNIER F., BOULANGER E. a NEVIERE R. Endotoxemia engages the RhoA kinase pathway to impair cardiac function by altering cytoskeleton, mitochondrial fission, and autophagy. 2016, **24**(10), 529–542. *Antioxid Redox Signal*. ISSN 15577716.
143. RAHIMTOOLA S. H. The hibernating myocardium in ischaemia and congestive heart failure. 1993, **14** Suppl A, 22–26. *Eur Heart J*. ISSN 0195668X.
144. REINHART K., BAUER M., RIEDEMANN N. C. a HARTOG CH. S. New approaches to sepsis: Molecular diagnostics and biomarkers. 2012, **25**(4), 609–634. *Clin Microbil Rev*. ISSN 08938512.
145. REYNOLDS C. M., SULIMAN H. B., HOLLINGSWORTH J. W., WELTY-WOLF K. E., CARRAWAY M. S. a PIANTADOSI C. A. Nitric oxide synthase-2 induction optimizes cardiac mitochondrial biogenesis after endotoxemia. 2009, **46**(5), 564–572. *Free Radic Biol Med*. ISSN 08915849.
146. RITTIRSCH D., FLIERL M. A. a WARD P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. 2008, **8**(10), 776-787. *Nat Rev Immunol*. ISSN 14741733.
147. ROCHETEAU P., CHATRE L., BRIAND D., MEBARKI M., JOUVION G., BARDON J., CROCHEMORE C., SERRANI P., LECCI P. P., LATIL M., MATOT B., CARLIER P. G., LATRONICO N., HUCHET C., LAFOUX A., SHARSHAR T., RICCHETTI M. a CHRÉTIEN F. Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy. 2015, **6**, 10145. *Nat Commun*. ISSN 20411723.

148. SAMAVATI L., LEE I., MATHES I., LOTTSPEICH F. a HUTTEMANN M. Tumor necrosis factor α inhibits oxidative phosphorylation through tyrosine phosphorylation at subunit I of cytochrome c oxidase. 2008, **283**(30), 21134–21144. *J Biol Chem*. ISSN 00219258.
149. SANCHEZ-VILLAMIL J. P., D'ANNUNZIO V., FINOCCHIETTO P., HOLOD S., REBAGLIATI I., PEREZ H., PERALTA J. G., GELPI R. J., PODEROSO J. J. a CARRERAS M. C. Cardiac-specific overexpression of thioredoxin 1 attenuates mitochondrial and myocardial dysfunction in septic mice. 2016, **81**(Pt B), 323–334. *Int J Biochem Cell Biol*. ISSN 18785875.
150. SARASTE M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. 1999, **283**(5407), 1488–1493. *Science*. ISSN 00368075.
151. SAZANOV L. A. a WALKER J. E. Cryo-electron crystallography of two sub-complexes of bovine complex I reveals the relationship between the membrane and peripheral arms. 2000, **302**(2), 455–464. *J Mol Biol*. ISSN 0022-2836.
152. SCARPULLA R. C., VEGA R. B. a KELLY D. P. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. 2012, **23**(9), 459-466. *Trends Endocrinol Metab*. ISSN 10432760.
153. SCHAGGER H. Respiratory chain supercomplexes. 2001, **523**(2-3), 119-128. *IUBMB Life*. ISSN 15216543.
154. SCHEFFLER I. E. 2007. *Mitochondria*. ISBN 978-0-470-04073-7.
155. SCORRANO L., OAKES S. A., OPFERMAN J. T., CHENG E. H., SORCINELLI M. D., POZZAN T. a KORSMEYER S. J. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : A control point for apoptosis. 2003, **300**(5616), 135–139. *Science*. ISSN 00368075.
156. SEPULVEDA M., GONANO L. A., VIOTTI M., MORELL M., BLANCO P., LOPEZ ALARCON M., PEROBA RAMOS I., BASTOS CARVALHO A., MEDEI E. a VILA PETROFF M. Calcium/calmodulin protein kinase II-dependent ryanodine receptor phosphorylation mediates cardiac contractile dysfunction associated with sepsis. 2017, **45**(4), e399–e408. *Crit Care Med*. ISSN 15300293.
157. SHARMA H., SINGH A., SHARMA CH., JAIN S. K. a SINGH N. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer. 2005, **5**, 34. *Cancer Cell Internat*. ISSN 14752867.

158. SHINLAPAWITTAYATORN K., CHINDA K., PALEE S., SURINKAEW S., THUNSIRI K., WEERATEERANGKUL P., CHATTIPAKORN S., KENKNIGHT B. H. a CHATTIPAKORN N. Low-amplitude, left vagus nerve stimulation significantly attenuates ventricular dysfunction and infarct size through prevention of mitochondrial dysfunction during acute ischemia-reperfusion injury. 2013, **10**(11), 1700–1707. *Heart Rhythm* ISSN 15475271.
159. SINGER M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. 2014, **5**(1), 66–72. *Virulence*. ISSN 2150-5594.
160. SINGER M. Critical illness and flat batteries. 2017, **21**(Suppl 3), 309. *Crit Care*. ISSN 1466609X.
161. SINGER M., DEUTSCHMAN C. S., SEYMOUR CH., SHANKAR-HARI M., ANNANE D., BAUER M., BELLOMO R., BERNARD G. R., CHICHE J. D., COOPERSMITH C. M., HOTCHKISS R. S., LEVY M. M., MARSHALL J. C., MARTIN G. S., OPAL S. M., RUBENFELD G. D., Tomvan Der POLL T. D., VINCENT J. L. a ANGUS D. C. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). 2016, **315**(8), 801-810. *JAMA*. ISSN 15383598.
162. SPEES J. L., OLSON S. D., WHITNEY M. J. a PROCKOP D. J. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. 2006, **103**(5), 1283–1288. *Proc Natl Acad Sci U S A*. ISSN 00278424.
163. STANDAGE S. W., BENNION B. G., KNOWLES T. O., LEDEE D. R., PORTMAN M. A., MCGUIRE J. K., LILES W. C. a OLSON A. K. PPAR α augments heart function and cardiac fatty acid oxidation in early experimental polymicrobial sepsis. 2017, **312**(2), H239–H249. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. ISSN 15221539.
164. STANZANI G., DUCHEN M. R. a SINGER M. The role of mitochondria in sepsis-induced cardiomyopathy. 2019, **1865**(4), 759-773. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. ISSN 1879260X.
165. STONEKING M. a SOODYALL H. Human evolution and the mitochondrial genome. 1996, **6**(6), 731–736. *Curr Opin Genet and Dev*. ISSN 0959437X.
166. SULIMAN H. B., WELTY-WOLF K. E., CARRAWAY M., TATRO L. a PIANTADOSI C. A. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. 2004, **64**(2), 279–288. *Cardiovasc Res*. ISSN 00086363.

167. SUMBALOVA Z., DROESCHER S., HILLER E., CHANG S. C., GARCIA-SOUZA L. F., CALABRIA E., VOLANI C., KRUMSCHNABEL G. a GNAIGER E. High-Resolution FluoRespirometry O2k-Protocols: Isolation of peripheral blood mononuclear cells and platelets from human blood for HRFR. 2020. www.orooboros.at
168. SUN F., HUO X., ZHAI Y., WANG A., XU J., SU D., BARTLAM M. a RAO Z. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II. 2005, **121**(7), 1043–1057. *Cell*. ISSN 00928674.
169. SUPINSKI G. S., MURPHY M. P. a CALLAHAN L. A. MitoQ administration prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction. 2009, **297**(4), R1095–R1102. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. ISSN 0363-6119.
170. SZABO A., SALZMAN A. L. a SZABO C. Poly (ADP-ribose) synthetase activation mediates pulmonary microvascular and intestinal mucosal dysfunction in endotoxin shock. 1998, **63**(23), 2133–2139. *Life Sci*. ISSN 00243205.
171. TAKAHASHI W., WATANABE E., FUJIMURA L., WATANABE-TAKANO H., YOSHIDOME H., SWANSON P. E., TOKUHISA T., ODA S., a HATANO M. Kinetics and protective role of autophagy in mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis model. 2013, **17**(4), R160. *Crit Care*. ISSN 1364-8535.
172. THOMPSON K., VENKATESH B. a FINFER S. Sepsis and septic shock: current approaches to management. 2019, **49**(2), 160–170. *Intern Med J*. ISSN 14455994.
173. THON J. N. a ITALIANO J. E. Platelets: Production, morphology and ultrastructure. 2012, **210**, 3-22. *Handb Exp Pharmacol*. ISBN 978-3-642-29423-5.
174. TRAN T. T. H., NGUYEN D. H., TRAN V. K., NGUYEN Q. L., TRINH H. A., LUONG L. H., TRAN V. A., PHAM L. A. T., NGUYEN T. T., NGUYEN V. B., TRAN T. H. a VAN TA T. Variation of Mitochondrial DNA HV1 AND HV2 of the Vietnamese Population. 2020, **1292**, 37-63. *Adv Exp Med Biol*. ISSN 22148019.
175. UMBARAWAN Y., SYAMSUNARNO M. R. A. A., OBINATA H., YAMAGUCHI A., SUNAGA H., MATSUI H., HISHIKI T., MATSUURA T., KOITABASHI N., OBOKATA M., HANAOKA H., HAQUE A., KUNIMOTO F., TSUSHIMA Y., SUEMATSU M., KURABAYASHI M. a ISO T. Robust suppression of cardiac energy catabolism with marked accumulation of energy substrates during lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction in mice. 2017, **77**, 47–57. *Metabolism*. ISSN 15328600.

176. VAKIFAHMETOGLU-NORBERG H., OUCHIDA A. T. a NORBERG E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. 2017, **482**(3), 426-431. *Biochem Biophys Res Commun*. ISSN 10902104.
177. VAN DER BLIEK A. M., SHEN Q. a KAWAJIRI S. Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. 2013, **5**(6), a011072. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. ISSN 1943-0264.
178. VAN EYK J. E. a MURPHY A. M. The role of troponin abnormalities as a cause for stunned myocardium. 2001, **12**(5), 343-347. *Coron Artery Dis*. ISSN 09546928.
179. VANASCO V., MAGNANI N. D., CIMOLAI M. C., VALDEZ L. B., EVELSON P., BOVERIS A. a ALVAREZ S. Endotoxemia impairs heart mitochondrial function by decreasing electron transfer, ATP synthesis and ATP content without affecting membrane potential. 2012, **44**(2), 243–252. *J Bioenerg Biomembr*. ISSN 0145-479X.
180. VANASCO V., SAEZ T., MAGNANI N. D., PEREYRA L., MARCHINI T., CORACH A., INÉS VACCARO M., CORACH D., EVELSON P. a ALVAREZ S. Cardiac mitochondrial biogenesis in endotoxemia is not accompanied by mitochondrial function recovery. 2014, **77**, 1–9. *Free Radic Biol Med*. ISSN 18734596.
181. VANHOREBEEK I., De VOS R., MESOTTEN D., WOUTERS P. J., WOLF-PEETERS CH. D. a VAN DEN BERGHE G. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. 2005, **365**(9453), 53–59. *Lancet*. ISSN 01406736.
182. VARY T. C. Sepsis-induced alterations in pyruvate dehydrogenase complex activity in rat skeletal muscle: Effects on plasma lactate. 1996, **6**(2), 89–94. *Shock*. ISSN 10732322.
183. VENTURA-CLAPIER R., GARNIER A. a VEKSLER V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: The central role of PGC-1 α . 2008, **79**(2), 208-217. *Cardiovasc Res*. ISSN 17553245.
184. VINCENT J. L., MORENO R., TAKALA J., WILLATTS S., DE MENDONÇA A., BRUINING H., REINHART C. K., SUTER P. M. a THIJS L. G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. 1996, **22**(7), 707–710. *Intensive Care Med*. ISSN 03424642.

185. VINCENT J. L., DE MENDONÇA A., CANTRAINED F., MORENO R., TAKALA J., SUTER P. M., SPRUNG C. L., COLARDYN F. a BLECHER S. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on „sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. 1998, **26**(11), 1793–800. *Crit Care Medicine*. ISSN 0090-3493.
186. WALTER J., WARE L. B. a MATTHAY M. A. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of potential therapeutic benefit in ARDS and sepsis. 2014, **2**(12), 1016-1026. *Lancet Respir Med*. ISSN 22132619.
187. WANG H., ZHU S., ZHOU R., LI W. a SAMA A. E. Therapeutic potential of HMGB1-targeting agents in sepsis. 2008, **10**(32), 1–20. *Expert Rev Mol Med*. ISSN 14623994.
188. WATANABE E., MUENZER J. T., HAWKINS W. G., DAVIS CH. G., DIXON D. J., MCDUNN J. E., BRACKETT D. J., LERNER M. R., SWANSON P. E. a HOTCHKISS R. S. Sepsis induces extensive autophagic vacuolization in hepatocytes: A clinical and laboratory-based study. 2009, **89**(5), 549–561. *Lab Invest*. ISSN 00236837.
189. WENDEL M. a HELLER A. R. Mitochondrial function and dysfunction in sepsis. 2010, **160**(5-6), 118-123. *Wien Med Wochenschr*. ISSN 00435341.
190. WIEWEL M. A., VAN VUGHT L. A., SCICLUNA B. P., HOOGENDIJK A. J., FRENCKEN J. F., ZWINDERMAN A. H., HORN J., CREMER O. L., BONTEN M. J., SCHULTZ M. J. a VAN DER POLL T. Prior use of calcium channel blockers is associated with decreased mortality in critically ill patients with sepsis: a prospective observational study. 2017, **45**(3), 454–463. *Crit Care Med*. ISSN 15300293.
191. WU J., ZHANG M., HAO S., JIA M., JI M., QIU L., SUN X., YANG J. a LI K. Mitochondria-targeted peptide reverses mitochondrial dysfunction and cognitive deficits in sepsis-associated encephalopathy. 2015, **52**(1), 783–791. *Mol Neurobiol*. ISSN 15591182.
192. XIE L.-L., SHI F., TAN Z., LI Y., BODE A. M. a CAO Y. Mitochondrial network structure homeostasis and cell death. 2018, **109**(12), 3686–3694. *Cancer Sci*. ISSN 1347-9032.

193. YAO X., CARLSON D., SUN Y., MA L., WOLF S. E., MINEI J. P. a ZANG Q. S. Mitochondrial ROS induces cardiac inflammation via a pathway through mtDNA damage in a pneumonia-related sepsis model. 2015, **10**(10), e0139416. *PLoS ONE*. ISSN 19326203.
194. ZHAO M., SUN L., LIU J.-J., WANG H., MIAO Y. a ZANG W. J. Vagal nerve modulation: A promising new therapeutic approach for cardiovascular diseases. 2012, **39**(8), 701–705. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. ISSN 03051870.
195. ZHU J., VINOTHKUMAR K. R. a HIRST J. Structure of mammalian respiratory complex I. 2016, **536**(7616), 354–358 *Nature*. ISSN 14764687.
196. ZIMORSKI V., KU CH., MARTIN W. F. a GOULD S. B. Endosymbiotic theory for organelle origins. 2014, **22**, 38-48. *Curr Opin Microbiol*. ISSN 18790364.
197. ZINOVKINA L. A DNA Replication in Human Mitochondria. 2019, **84**(8), 884-895. ISSN 16083040.
198. ZUO X., DONG D., SUN M., XIE H. a KANG Y. J. Homocysteine restricts copper availability leading to suppression of cytochrome C oxidase activity in phenylephrine-treated cardiomyocytes. 2013, **8**(6), e67549. *PloS One*. ISSN 1932-6203.

8 Přehled publikační činnosti

8.1 Odborné publikace vztahující se k tématu dizertační práce

JARKOVSKÁ D., MARKOVÁ M., HORÁK J., NALOS L., BENEŠ J., AL-OBEIDALLAH M., TŮMA Z., ŠVÍGLEROVÁ J., KUNCOVÁ J., MATĚJOVIČ M. a ŠTENGL M. Cellular mechanisms of myocardial depression in porcine septic shock. 2018, **726(9)**. *Frontiers in Physiology*. ISSN 1664-042X. (IF 3,201)

KOHOUTOVÁ M., DEJMEK J., TŮMA Z. a KUNCOVÁ J. Variability of mitochondrial respiration in relation to sepsis-induced multiple organ dysfunction. 2018, **67(Suppl 4)**, 577-592. *Physiological Research*, ISSN 0862-8408. (IF 1,655)

KOHOUTOVÁ M., HORÁK J., JARKOVSKÁ D., MARTÍNKOVÁ V., TÉGL V., NALOS L., VIŠTEJNOVÁ L., BENEŠ J., ŠVÍGLEROVÁ J., KUNCOVÁ J., MATĚJOVIČ M. a ŠTENGL M. Vagus nerve stimulation attenuates multiple organ dysfunction in resuscitated porcine progressive sepsis. 2019, **47(6)**, 461-469. *Critical Care Medicine*. ISSN 0090-3493. (IF 7,414)

HORÁK J., NALOS L., MARTÍNKOVÁ V., TÉGL V., VIŠTEJNOVÁ L., KUNCOVÁ J., KOHOUTOVÁ M., JARKOVSKÁ D., DOLEJŠOVÁ M., BENEŠ J., ŠTENGL M. a MATĚJOVIČ M. Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study. 2020, **11**, 1-13. *Frontiers in Immunology*. ISSN 1664-3224. (IF 5,085)

8.2 Ostatní odborné publikace

GRUNDMANOVÁ M., JARKOVSKÁ D., SÜß A., TŮMA Z., MARKOVÁ M., GRUNDMAN Z., EL-KADI A., ČEDÍKOVÁ M., ŠTENGL M. a KUNCOVÁ J. Propofol-induced mitochondrial and contractile dysfunction of the rat ventricular myocardium. 2016, **65**, 601-609. *Physiological Research*. ISSN 0862-8408 (IF 1,655)

ČEDÍKOVÁ M., KRIPNEROVÁ M., PITULE P., MARKOVÁ M. a KUNCOVÁ J. Is aging reversible? - Beneficial effects of exercise. 2016, **2016**, 9-15. *Plzeňský lékařský sborník*. ISSN 0551-1038. (recenzovaný časopis)

ČEDÍKOVÁ M., PITULE P., KRIPNEROVÁ M., **MARKOVÁ M.** a KUNCOVÁ J. Multiple roles of mitochondria in aging processes., 2016, **65**. *Physiological Research*. ISSN 0862-8408 (**IF 1,655**)

KUNCOVÁ J., JIRKOVSKÁ A., ŠVÍGLEROVÁ J., **MARKOVÁ M.**, MEIRELES D. a ČEDÍKOVÁ M. Neonatal capsaicin administration impairs postnatal development of the cardiac chronotropy and inotropy in rats. 2016, **65**. *Physiological Research*. ISSN 0862-8408 (**IF 1,655**)

DEJMEK J., ČEDÍKOVÁ M., BOLEK L., **MARKOVÁ M.**, BABUŠKA V. a KUNCOVÁ J. Mikrohyperbarie - možnost studia buněčného metabolismu v odlišných fyzikálních podmínkách. 2018, **2018**, 37-42. *Plzeňský lékařský sborník*. ISSN 0551-1038 (**recenzovaný časopis**)

DEJMEK J., **KOHOUTOVÁ M.**, KRIPNEROVÁ M., ČEDÍKOVÁ M., TŮMA Z., BABUŠKA V., BOLEK L. a KUNCOVÁ J. Repeated exposure to hyperbaric hyperoxia affects mitochondrial functions of the lung fibroblasts. 2018, **67**. *Physiological Research*. ISSN 0862-8408. (**IF 1,655**)

KRIPNEROVÁ M., PARMAR H., PEŠTA M., **KOHOUTOVÁ M.**, KUNCOVÁ J., DRBAL K., RAJTMAJEROVÁ M. a HATINA J. Urothelial cancer stem cell heterogeneity. 2019, **1139**, 127-151. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ISBN 978-3-030-14365-7. (**IF 2,450**)

KLADNICKÁ I., ČEDÍKOVÁ M., KRIPNEROVÁ M., DVOŘÁKOVÁ J., **KOHOUTOVÁ M.**, TŮMA Z., MÜLLEROVÁ D. a KUNCOVÁ J. Mitochondrial respiration of adipocytes differentiating from human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. 2019, **68**. *Physiological Research*. ISSN 0862-8408. (**IF 1,655**)

DEJMEK J., **MARKOVÁ M.**, KRIPNEROVÁ M., ČEDÍKOVÁ M., TŮMA Z., BABUŠKA V., BOLEK L. a KUNCOVÁ J. Změny respirace plicních fibroblastů in vitro po opakované krátkodobé hyperoxické expozici. 2018, **70**, 130-135. *Pracovní lékařství*. ISSN 0032-6291 (**recenzovaný časopis**)

GNAIGER E, AASANDER FROSTNER E, ABDUL KARIM N, ABDEL-RAHMAN EA, ABUMRAD NA, ACUNA-CASTROVIEJO D, ADIELE RC, **MARKOVA M** et al. Mitochondrial respiratory states and rates. *MitoFit Preprint Arch. Bioenergetics communications*, 1:44 pp, 2020. 5th edition. Mitochondrial physiology. Bioenerg Commun. ISBN 978-3-9504814-2-6. (**kniha**)

8.3 Prezentace výsledků na odborných setkáních a konferencích

MARKOVÁ M, ČEDÍKOVÁ M, GRUNDMANOVÁ M, KUNCOVÁ J. Porcine hearts samples preparation: PBI-Shredder or saponin? *MitoFit Science Camp 2016*, July 7 – 13, 2016, Kuehtai, Rakousko

Ocenění za vynikající poster

MARKOVÁ M, KANCIROVÁ I, FERKO M, KUNCOVÁ J. Mitochondrial respiration in the rat left heart ventricle after inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase. *10th MiPschool Obergurgl 2017*, July 23 – 30, 2017, Obergurgel, Rakousko

MARKOVÁ M, JARKOVSKÁ D, HORÁK J, NALOS L, BENEŠ J, AL-OBEIDALLAH M, SVÍGLEROVÁ J, KUNCOVÁ J, MATĚJOVIČ M, ŠTENGL M. Porcine sepsis and associated myocardial depression. *MiP2017*, November 15 – 18, 2017, Hradec Králové, Česká republika

KRIPNEROVÁ M, **MARKOVÁ M**, HATINA J, KUNCOVÁ J. A new cell culture models of urothelial carcinoma links mitochondrial physiology to multidrug resistance. *MiP2017*, November 15 – 18, 2017, Hradec Králové, Česká republika

MARKOVÁ M, KANCIROVÁ I, TŮMA Z, FERKO M, KUNCOVÁ J. Zvýšení mitochondriální respirace v myokardu levé komory potkana vlivem inhibice kinázy pyruvátdehydrogenázy. *57. SVK LF v Plzni*, 2017, Plzeň, Česká republika

MARKOVÁ M, DEJMEK J, KRIPNEROVÁ M, ČEDÍKOVÁ M, TŮMA Z, KOŽÍŠKOVÁ M, BACHRATÝ T, BABUŠKA V, BOLEK L, KUNCOVÁ J. Vliv opakované expozice hyperbarické hyperoxie na mitochondriální respiraci plicních fibroblastů. *58. SVK LF v Plzni*, 2018, Plzeň, Česká republika

1. místo v soutěži o nejlepší práci v postgraduální sekci

JAROVSKÁ D, **MARKOVÁ M**, HORÁK J, NALOS L, BENEŠ J, AL-OBEIDALLAH M, ŠVÍGLEROVÁ J, KUNCOVÁ J, MATĚJOVIČ M, ŠTENGL M. Buněčné mechanismy myokardiální deprese v sepsi. 45. pracovní konference Komise experimentální kardiologie (KEK), 18. – 20. října, 2017, Kutná Hora, Česká republika

KUNCOVÁ J, **MARKOVÁ M**, TŮMA Z. Mezidruhové rozdíly v mitochondriální respiraci ledvin a srdce. 45. pracovní konference Komise experimentální kardiologie (KEK), 18. – 20. října, 2017, Kutná Hora, Česká republika

MARKOVÁ M, KANCÍROVÁ I, TŮMA Z, FERKO M, KUNCOVÁ J. Regulace pyruvátdehydrogenázy-kinázy v myokardu potkana. 45. pracovní konference Komise experimentální kardiologie (KEK), 18. – 20. října, 2017, Kutná Hora, Česká republika

FERKO M, KANCÍROVÁ I, JAŠOVÁ M, ANDELOVÁ N, BUDINSKÁ P, SZEIFFOVÁ BAČOVÁ B, FARKAŠOVÁ V, KUNCOVÁ J, **MARKOVÁ M**, RAVINGEROVÁ T, WACZULÍKOVÁ I. Bioenergetická a proteomická analýza srdečních mitochondrií v procesech funkční adaptace myokardu. 94. Fyziologické dny (FD), 6. – 8. února, 2018, Plzeň, Česká republika

KUNCOVA J, **MARKOVÁ M**, TŮMA Z. Mitochondriální dysfunkce v sepsi. 94. Fyziologické dny (FD), 6. – 8. února, 2018, Plzeň, Česká republika

MARKOVÁ M, DEJMEK J, KRIPNEROVÁ M, ČEDÍKOVÁ M, BABUŠKA V, BOLEK L, KUNCOVÁ J. Opakovaná krátkodobá expozice hyperoxii snižuje respiraci plicních fibroblastů in vitro. 94. Fyziologické dny (FD), 6. – 8. února, 2018, Plzeň, Česká republika

1. místo v Soutěži o nejlepší přednášku mladých vědeckých pracovníků do 35 let (ČFS)

9 Přílohy

- (I)** JARKOVSKÁ D., MARKOVÁ M., HORÁK J., NALOS L., BENEŠ J., AL-OBEIDALLAH M., TŮMA Z., ŠVÍGLEROVÁ J., KUNCOVÁ J., MATĚJOVIČ M. a ŠTENGL M. Cellular mechanisms of myocardial depression in porcine septic shock. 2018, **726(9)**. *Frontiers in Physiology*. ISSN 1664042X (**IF 3,201**)
- (II)** KOHOUTOVÁ M., HORÁK J., JARKOVSKÁ D., MARTÍNKOVÁ V., TÉGL V., NALOS L., VIŠTEJNOVÁ L., BENEŠ J., ŠVÍGLEROVÁ J., KUNCOVÁ J., MATĚJOVIČ M. a ŠTENGL M. Vagus nerve stimulation attenuates multiple organ dysfunction in resuscitated porcine progressive sepsis. 2019, **47(6)**, 461-469. *Critical Care Medicine*. ISSN 18029973 (**IF 7,414**)
- (III)** HORÁK J., NALOS L., MARTÍNKOVÁ V., TÉGL V., VIŠTEJNOVÁ L., KUNCOVÁ J., KOHOUTOVÁ M., JARKOVSKÁ D., DOLEJŠOVÁ M., BENEŠ J., ŠTENGL M. a MATĚJOVIČ M. Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study. 2020, **11**, 1-13. *Frontiers in Immunology*. ISSN 16643224 (**IF 5,085**)
- (IV)** KOHOUTOVÁ M., DEJMEK J., TŮMA Z. a KUNCOVÁ J. Variability of mitochondrial respiration in relation to sepsis-induced multiple organ dysfunction. 2018, **67 (Suppl 4)**, 577-592. *Physiological Research*. ISSN 18029973 (**IF 1,655**)

Příloha I

JARKOVSKÁ D., **MARKOVÁ M.**, HORÁK J., NALOS L., BENEŠ J.,
AI-OBEIDALLAH M., TŮMA Z., ŠVÍGLEROVÁ J., KUNCOVÁ J., MATĚJOVIČ M.
a ŠTENGL M. Cellular mechanisms of myocardial depression in porcine septic shock.
2018, **726(9)**. *Frontiers in Physiology*. ISSN 1664042X (**IF 3,201**)

Příloha II

KOHOUTOVÁ M., HORÁK J., JARKOVSKÁ D., MARTÍNKOVÁ V., TÉGL V.,
NALOS L., VIŠTEJNOVÁ L., BENEŠ J., ŠVÍGLEROVÁ J., KUNCOVÁ J.,
MATĚJOVIČ M. a ŠTENGL M. Vagus nerve stimulation attenuates multiple organ
dysfunction in resuscitated porcine progressive sepsis. 2019, **47(6)**, 461-469. *Critical
Care Medicine*. ISSN 18029973 (**IF 7,414**)

Příloha III

HORÁK J., NALOS L., MARTÍNKOVÁ V., TÉGL V., VIŠTEJNOVÁ L., KUNCOVÁ J., **KOHOUTOVÁ M.**, JARKOVSKÁ D., DOLEJŠOVÁ M., BENEŠ J., ŠTENGL M. a MATĚJOVIČ M. Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study. 2020, **11**, 1-13. *Frontiers in Immunology*. ISSN 16643224 (IF 5,085)

Příloha IV

KOHOUTOVÁ M., DEJMEK J., TŮMA Z. a KUNCOVÁ J. Variability of mitochondrial respiration in relation to sepsis-induced multiple organ dysfunction. 2018, **67 (Suppl 4)**, 577-592. *Physiological Research*. ISSN 18029973 (**IF 1,655**)