

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Plzni

Dizertační práce

Plzeň 2020

Vendula Martínková

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Plzni

Studijní program: Vnitřní lékařství

Náhrada a podpora funkce životně důležitých orgánů v sepsi

Patofyziologie a nové léčebné aspekty

Replacement and support of vital organs in sepsis

Pathophysiology and new aspects of treatments

Dizertační práce

Školitel: prof. MUDr. Martin Matějovič, Ph.D.

Plzeň, 2020

MUDr. Vendula Martínková

ABSTRAKT

Infekční nemoci jsou celosvětově hlavní příčinou morbidit a mortality. Sepse je hlavní příčinou úmrtí na infekční choroby. Jedná se o jeden z nejvážnějších a současně jeden z nejobtížněji léčitelných stavů současné medicíny. Sepse je nejčastější příčinou úmrtí na jednotkách intenzivní péče. Dosud neexistuje kauzální léčba. Díky významnému prohloubení znalostí pato/fyziologických mechanismů sepse je možné modelovat nové preklinické experimenty k ověření účinnosti a bezpečnosti nových terapeutických postupů. Nezastupitelnou roli mají velké animální experimenty progresivní sepse využívající prase domácí. Dlouholeté zkušenosti s tímto modelem a podobnost s člověkem umožňují realizaci složitých experimentů s potenciálem relevantní translace výsledků do následných humánních klinických studií. Cílem této dizertační práce bylo vyhodnotit na klinicky relevantním modelu 1) účinnost a bezpečnost mimotělní membránové oxygenace v případě refrakterního vazoplegického septického šoku; 2) přínos dvou inovativních léčebných přístupů v léčbě sepse: a) intravenózní aplikace mesenchymálních buněk a b) aktivace neuroinflamatorního reflexu stimulací bloudivého nervu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Sepse, ECMO, mesenchymální kmenové buňky, vagová stimulace

ABSTRACT

Infectious diseases are the worldwide leading cause of morbidity and mortality. Sepsis is the major cause of death in infectious diseases. It is one of the most serious and also one of the most difficult treatable conditions of contemporary medicine. Sepsis is the main cause of death in intensive care units. Causal therapy of sepsis does not yet exist. With a far better understanding of patho/physiological mechanism of sepsis, it is possible to model new preclinical experiments to verify the efficiency and security of new therapeutic procedures. Large animal experiments in progressive sepsis, with the use of domestic porcine, play a vital role. Long-standing experience with this model and similarity to human facilitate the realization of more complex experiments with potential for the relevant translation of results into the subsequent clinical studies on human subjects. The objective of this doctoral dissertation was to assess on the clinically relevant model: 1) the efficiency and security of extracorporeal membrane oxygenation in the event of vasoplegic septic shock; and 2) the benefit of two innovative therapeutic approaches to treatment of sepsis: a) the intravenous administration of mesenchymal stem cells; and b) the activation of the neuro-inflammatory reflex through the vagus nerve stimulation.

KEYWORDS

Sepsis, ECMO, mesenchymal stem cells, vagus nerve stimulation

Prohlašuji, že dizertační práci jsem vypracovala samostatně. Veškerou literaturu a ostatní prameny, z nichž jsem při přípravě čerpala, řádně cituji a dále uvádím v seznamu literatury. Současně souhlasím se zapůjčováním této práce.

Jméno.....

Datum.....

Podpis.....

PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

CBF	průtok karotidou
CCI	chronické kritické onemocnění
CO	srdeční výdej
CVP	centrální žilní tlak
DAMPs	damage associated molecular patterns
ECMO	mimotělní membránová oxygenace
hs TnI	high-sensitivity troponin I
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
IL-10	interleukin 10
LPS	lipopolysacharid
MAP	střední arteriální tlak
MDSC	myeloidní supresorové buňky
MPAP	střední tlak v plicnici
MSC	mezenchymální kmenové buňky
NF-κB	nukleární faktor κB
NO	oxid dusný
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PAWP	tlak v zaklínění
PICS	syndrom perzistující inflamace, imunosuprese a katabolizmu
RBF	průtok krve renální arterií

ROS	reactive oxygen species
SCM	septická kardiomyopatie
SOFA	sequential organ failure assesment skóre
SV	tepový objem
TLRs	toll-like receptory

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ	4
2.1.	PŮVODNÍ VĚDECKÉ PRÁCE	4
2.2.	PŮVODNÍ PŘEHLEDOVÉ PRÁCE	5
2.3.	PRÁCE NAVAZUJÍCÍ NA DANOU PROBLEMATIKU	5
3.	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	6
3.1.	PATOFYZIOLOGIE SEPSE.....	6
3.2.	SEPTICKÁ KARDIOMYOPATIE A REFRAKTERNÍ SELHÁNÍ OBĚHU	10
3.3.	EXPERIMENTÁLNÍ LÉČEBNÉ STRATEGIE SEPSE A MECHANISMY IMPLEMENTACE MIMOTĚLNÍ MEMBRÁNOVÉ OXYGENACE V REFRAKTERNÍM OBĚHOVÉM SELHÁNÍ V SEPSI	14
3.3.1.	<i>Mimotělní membránová oxygenace</i>	14
3.3.2.	<i>Mesenchymální kmenové buňky</i>	18
3.3.3.	<i>Cholinergní anti-inflamatorní reflex</i>	20
4.	CÍLE PŮVODNÍCH VĚDECKÝCH PRACÍ	22
5.	METODICKÉ ASPEKTY PRÁCE	23
5.1.	LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY EXPERIMENTŮ SE ZVÍŘECÍM MODELEM	23
5.2.	EXPERIMENTÁLNÍ MODEL PROGRESIVNÍ PERITONEÁLNÍ SEPSE	23
5.2.1.	<i>Specifikace postupu pro experiment s VA-ECMO (I)</i>	25
5.2.2.	<i>Specifikace postupu pro experiment s aplikací mesenchymálních buněk (II)</i> 27	
5.2.3.	<i>Specifikace postupu pro experiment s vagovou stimulací (III)</i>	29
5.2.4.	<i>Statistická analýza</i>	29
6.	SOUHRN VÝSLEDKŮ EXPERIMENTÁLNÍCH PRACÍ A DISKUZE	31
6.1.	MECHANICKÁ OBĚHOVÁ PODPORA V REFRAKTERNÍM VAZODILATAČNÍM SEPTICKÉM ŠOKU (I) .	31
6.1.1.	<i>Systémová a regionální hemodynamika a tekutinová bilance</i>	31
6.1.2.	<i>Orgánové funkce, energetický metabolismus, zánětlivé mediátory, přežití</i> 33	
6.2.	HODNOCENÍ ÚČINNOSTI TERAPIE SEPSE MESENCHYMÁLNÍMI KMENOVÝMI BUŇKAMI (II)	36
6.3.	STIMULACE VAGOVÉHO NERVU JE SCHOPNA OSLABIT PROJEVY MULTIORGÁNOVÉ DYSFUNKCE U PROGRESIVNÍ PERITONEÁLNÍ SEPSE PRASETE (III)	40
7.	PŘIDRUŽENÉ PRÁCE	45
8.	ZÁVĚR	46
9.	PODPORA	48
10.	PODĚKOVÁNÍ	49
11.	LITERATURA	50
12.	PŘÍLOHY	61

1. ÚVOD

Sepse je jedním z nejzávažnějších současných onemocnění, které představuje pro společnost mimořádné zdravotní, finanční a sociální břemeno. Mortalita sepse se pohybuje v rozmezí 25 – 30 % a mortalita septického šoku je až 40 % [Fleischmann et al 2016, projekt EPOSS – Data based Evaluation and Prediction of Outcome in Severe Sepsis, Uvizi et al. 2016]. Pacient s diagnózou sepse má 6 - 10x vyšší riziko úmrtí než pacient s akutním infarktem myokardu a 4 - 5x vyšší riziko úmrtí než pacient s diagnózou cévní mozkové příhody [Liu, 2014]. Celosvětově se ročně objeví 31,5 miliónů případů sepse; z toho 19,4 miliónů případů má závažný průběh a 5,3 miliónů nemocných se sepsí zemře [Fleischmann, 2016]. Prevalence sepse ve světě stoupá, např. ve Spojených státech amerických je to o 3 - 16,5 % za rok, ale počet případů s fatálním průběhem se snižuje [Walkey, 2015]. U populace pacientů nad 65 let jsou infekční příčiny hospitalizace častější než hospitalizace z důvodů srdečního selhání a infarktu myokardu dohromady [Goto, 2016]. Pacienti v této věkové kategorii mají vyšší riziko přechodu do chronického kritického onemocnění [Kumar, 2015]. Finanční náklady, které s sebou léčba sepse nese, jsou enormní. Ve vyspělých zemích činí výdaje na léčbu sepse 5,2 % z rozpočtu na zdravotnictví. V roce 2009 bylo v USA vynaloženo na léčbu chronicky kriticky nemocných pacientů 20 miliard dolarů; 60 % pacientů, kteří spadají do této skupiny, bylo léčeno s diagnózou sepse [Kahn, 2015]. Vysoké procento pacientů, kteří přežijí iniciální fázi sepse, přechází do chronického kritického stavu, který probíhá pod obrazem syndromu přetrvávajícího zánětu imunosuprese a katabolismu s vysokou incidencí nozokomiálních infekcí [Gentile, 2012]. Přibližně 40 % pacientů vyžaduje rehospitalizaci. Mnoho přeživších je poté značně limitováno zdravotně a sociálně.

Definice sepse prodělala od roku 1980 vývoj k současnému konsensu, který byl postulován v roce 2016, tzv. SEPSIS-3 definice

[Singer 2016]. Podkladem pro formulaci definice byla retrospektivní analýza dat 1,2 miliónů pacientů postižených sepsí. Tato nová definice reflektuje pokrok v porozumění patofyziologii sepse. Cílem nové definice bylo zvýšit přesnost a rychlost stanovení diagnózy sepse a rozlišit nekomplikovanou infekci od té komplikované, která vede k multiorgánovému selhání a vysokému riziku úmrtí. Dle SEPSIS-3 musí být pro diagnózu sepse splněna dvě zásadní kritéria: 1) přítomnost infekce a 2) přítomnost nově vzniklé orgánové dysfunkce nebo progresu chronické orgánové dysfunkce jednoho či více orgánů dle SOFA skóre. Skóre hodnotí pomocí čtyřbodové škály (0 - 4 body) celkem šest orgánových systémů (respirační funkce, parametry koagulace, jaterní a renální funkce, hemodynamiku a stav vědomí). Pro dosažení diagnózy sepse je třeba 2 a více bodů [Singer, 2016]. Mortalita pacientů narůstá s vyšší SOFA skóre a počtem postižených orgánových systémů [Vincent, 2006]. Septický šok je dle SEPSIS-3 definován jako stav, při němž je sepse komplikována rozvojem hypotenze, která navzdory dostatečné objemové resuscitaci vyžaduje užití vazopresoru k dosažení středního arteriálního tlaku ≥ 65 mmHg a současně je přítomna hladina laktátu > 2 mmol/l. Závažným a nezřídka letálním průběhem sepse a septického šoku je progresse do refrakterního oběhového selhání [Auchet, 2017]. V rámci septického šoku s refrakterním oběhovým selháním můžeme empiricky pozorovat dva rozdílné fenotypy, které se mohou v různé míře překrývat. V případě tzv. hypodynamického fenotypu v klinickém obraze dominuje myokardiální deprese s poklesem srdečního výdeje (hypodynamický fenotyp); u hyperkinetického septického šoku převažuje vazoplegie s často zachovalou funkcí myokardu a vysokým srdečním výdejem [Huang 2012, Park 2014, Cheng 2013, Brechot 2013]. Mluvíme-li o refrakterním oběhovém selhání v septickém šoku, mluvíme zároveň o vyčerpání konvenční terapie [Rhodes, 2016]. Navzdory pokroku v oblasti preklinického a klinického výzkumu patofyziologie sepse a nových léčebných strategií neexistuje jednoduchá kauzální léčba.

Management nemocných se opírá hlavně o rychlou diagnózu sepse, včasnou a cílenou antimikrobiální terapii, sanaci infekčního fokusu a podporu orgánových funkcí či jejich náhradu. Vývoj kauzální terapie a životaschopných podpůrných mechanismů orgánových systémů vyžaduje důkladnou znalost procesů, které stojí za klinickým obrazem sepse. Nezastupitelným zdrojem zásadních informací jsou velké zvířecí experimentální modely [Osuchowski, 2018]. V rámci níže uvedených experimentálních projektů byl použit etablovaný velký zvířecí model (prase), u něž byla indukována polymikrobiální sterkorální peritonitida, a který posléze umožnil testování léčebných strategií, jejichž potenciál vyplývá ze souboru retrospektivních studií či z předchozích preklinických experimentů s malými septickými zvířecími modely. Dizertační práce předkládá souhrn poznatků, které se týkají patofyziologie refrakterního oběhového selhání v sepsi. Věnuje se metodologii práce s experimentálním zvířetem a popisu a výsledkům konkrétního modelu experimentu. Součástí dizertační práce jsou dva navazující experimenty. Jedná se o použití mezenchymálních kmenových buněk v sepsi a stimulaci vagového nervu v sepsi. Problematika původních prací, které jsou předmětem této dizertace, byla podrobně analyzována v původních přehledových publikacích autorů a uplatněna v časopisech s faktorem impaktu (viz příloha).

2. PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

2.1. Původní vědecké práce

- (I) CHVOJKA, Jiří, MARTÍNKOVÁ, Vendula, BENEŠ, Jan, VALEŠOVÁ, Lenka, DANIHEL, Vojtěch, NALOS, Lukáš, MATĚJOVIČ, Martin. Mechanical Circulatory Support in Refractory Vasodilatory Septic Shock: A Randomized Controlled Porcine Study. *SHOCK*. 2020 JAN;53(1):124-131. (IF 3,083, category rank-Q1)
- Chvojka, J., a Martínková, V. contributed equally to this work.
- (II) HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, MARTÍNKOVÁ, Vendula, TÉGL, Václav, VIŠTEJNOVÁ, Lucie, KUNCOVÁ, Jitka, KOHOUTOVÁ, Michaela, JARKOVSKÁ, Dagmar, BENEŠ, Jan, ŠTENGL, Milan, MATĚJOVIČ, Martin. Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study. *Frontiers Immunology*. 2020; 11:126. (IF 4,716, category rank-Q1)
- (III) KOHOUTOVÁ, Michaela, HORÁK, Jan, JARKOVSKÁ, Dagmar, MARTÍNKOVÁ, Vendula, TÉGL, Václav, NALOS, Lukáš, VIŠTEJNOVÁ, Lucie, BENEŠ, Jan, ŠVÍGLEROVÁ, Jitka, KUNCOVÁ, Jitka, MATĚJOVIČ, Martin, ŠTENGL, Milan. Vagus Nerve Stimulation Attenuates Multiple Organ Dysfunction in Resuscitated Porcine Progressive Sepsis. *Critical Care Medicine*. 2019; 47(6), 461-469. (IF 6,971, category rank-Q1)

2.2. Původní přehledové práce

- (IV) HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, MARTÍNKOVÁ, Vendula, BENEŠ, Jan, ŠTENGL, Milan, MATĚJOVIČ, Martin. Mesenchymal Stem Cells in Sepsis and Associated Organ Dysfunction: A Promising Future or Blind Alley? *Stem Cells International*. 2017; (IF 3,54, category rank-Q2)

- (V) HORÁK Jan, MARTÍNKOVÁ, Vendula, RADĚJ, Jaroslav, MATĚJOVIČ, Martin. Back to Basics: Recognition of Sepsis with New Definition. *J Clin Med*. 2019 Nov 1;8(11):1838. (IF 5,688, category rank-Q1)

2.3. Práce navazující na danou problematiku

- (VI) TKADLEC, Jan, BÉBROVÁ, Eliska, BEROUŠEK, Jan, VYMAZAL, Tomáš, ADÁMKOVÁ, Jaroslava, MARTÍNKOVÁ, Vendula, MOSER, Claus, DRAGON, Florea, DŘEVÍNEK, Pavel. Limited diagnostic possibilities for bloodstream infections with broad-range methods: A promising PCR/electrospray ionization-mass spectrometry platform is no longer available. *Microbiologyopen*.2020; 9(5):e1007. (IF 2,710, category rank-Q2)

3. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

3.1. Patofyziologie sepse

Prvotní reakce na přítomnost infekce je dána vrozenou imunitou. Vrozený imunitní systém reaguje bezprostředně a nespecificky s cílem rychlé eradikace patogenu. Aktivace probíhá cestou motivy rozpoznávajících receptorů, PRRs (pattern-recognition receptors); především jde o toll-like receptory (TLR), které jsou exprimovány na povrchu buněk vrozeného imunitního systému (na monocytech/makrofázích, dendritických buňkách, myeloidních supresorových buňkách, neutrofilech, aj.) a o C-type lectin receptory nebo cytosolové NOD-like receptory a RIG-like receptory. K aktivaci vrozeného imunitního systému a také některých epiteliálních buněk dochází při kontaktu PRRs s tzv. alarminy/PAMPs (pathogen – associated molecular patterns) a DAMPs (danger-associated molecular patterns). PAMPs jsou stavební komponenty Gramm pozitivních a Gramm negativních bakterií, virů (virové genomy, ds DNA, ds RNA, exprimované proteiny); v případě mykotických PAMPs se jedná o mannan, glukany aj. DAMPs jsou výsledkem poškození tkání; při poškození tkání dochází k uvolnění endogenních specifických molekul, např. mitochondriální DNA, adenosin trifosfátu, S100a proteinu, HMGB1, HSPs, fibrinogenu, fibronektinu, hyaluronanu, hemu a jiných [Karvunidis, 2013]. Signalizace zprostředkovaná pomocí PAMPs/DAMPs a PRRs vede ke změně exprese více jak 8000 genů. Následuje masivní produkce cytokinů, chemokinů, adhezivních molekul a vasoaktivních substancí. Některé PRRs, převážně NOD-like receptory, mohou formovat shluky, tzv. inflamazomy. Inflamazomy jsou schopny produkovat a uvolnit velmi potentní cytokiny (IL-1 β a IL-18) a spustit programovou buněčnou smrt; klíčovým mechanismem je kaspázami zprostředkovaná porucha integrity plasmatické membrány (tzv. pyroptóza), následovaná buněčnou smrtí. Dobře popsáním mechanismem imunitního systému je reakce na lipopolysacharid (LPS) stěny

Gramm negativních bakterií [Gotts, 2016]. LPS se naváže na cirkulující lipopolysacharid vázající lipoprotein (LPB). Cestou komplexu LPS-LPB dochází k aktivaci TLR-4 receptoru na povrchu antigen prezentujících buněk (nejčastěji makrofágů). Interakcí těchto složek dochází cestou adaptorové molekuly (MyD88) k upregulaci aktivity nukleárního faktoru κ B (NF- κ B), změnám genové exprese leukocytů a mediaci produkce prozánětlivých cytokinů, např. IL-1, IL-6, TNF α . Obdobným mechanismem dochází k produkci prozánětlivých cytokinů cestou TLR-2 po jejich interakci s Gramm-pozitivními baktériemi. Vytvořené cytokiny aktivují další buňky nativního imunitního systému, zvyšují jejich počet a životnost a podílejí se složitými interakcemi a zpětnými vazbami na regulaci celého procesu inflamatorní reakce. Mimo jiné jsou odpovědné i za aktivaci endoteliálních buněk a produkci dalších chemokinů a zvýšení produkce složek akutní fáze, tj. komplementu a fibrinogenu v játrech. Během tzv. „cytokinové bouře“ dochází k ovlivnění neutrofilů směrem k tvorbě tzv. NETs – „extracelulárních pastí“; ty představují jakousi prokoagulační síť, která je tvořena DNA a antimikrobiálními proteiny a enzymy. Dohromady tvoří základ pro aktivaci trombocytů. Z plazmatické membrány se ve fázi „cytokinové bouře“ uvolňují vezikuly, které obsahují buněčné prooxidační a prokoagulační lipidy a proteiny, včetně tkáňového faktoru. Upregulace exprese tkáňového faktoru na povrchu monocytů spolu s tvorbou NETs a výše zmíněných vezikul vede k „imunotrombóze“, která slouží k zachycení mikrobů a k další aktivaci a migraci leukocytů.

Nativní imunitní odpověď s cytokinovou odezvou vede k rychlé kontrole malé izolované infekce. Pokud tato reakce přesáhne interindividuálně rozdílné prahy tolerance a možnosti kontroly, dochází k rozvoji systémového poškození. Nadměrná produkce ROS a NOS v průběhu imunitních reakcí může zničit buněčné proteiny, lipidy a DNA a oslabit mitochondriální funkce. Aktivace komplementu

(především C5a) dále potencuje produkci ROS, uvolňování enzymů z granulocytů a zvyšuje propustnost endotelu. Imunotrombóza ústí v diseminovanou intravaskulární koagulopatii a spolu s dysfunkcí endotelu vede k rozvoji orgánového poškození s další aktivací inflamatorních drah. Vlivem vzniklých DAMPs při orgánovém poškození dochází k dalšímu prohlubování deregulované zánětlivé odpovědi. Na úrovni mitochondrií dochází vlivem nadprodukce ROS, cytokinů a nerovnováhou mezi genezí a odstraňováním nefunkčních mitochondrií k jejich poškození. Výsledkem je pokles tvorby ATP a útlum buněčných funkcí. Povšechná redukce tkáňového energetického metabolismu potencuje nadále projevy orgánového poškození. V konečném důsledku se rozvíjí nebo prohlubuje akutní renální selhání, myokardiální deprese, ARDS, jaterní selhání, encefalopatie, dysfunkce trávicího traktu.

Anti-inflamatorní mechanismy jsou aktivovány v prvních hodinách rozvoje sepse. Leukocyty produkované IL-10 tlumí tvorbu IL-6 a interferonu γ (INF- γ); IL-10 je schopen stimulovat tvorbu antagonistů TNF receptoru a IL-1 receptoru a neutralizovat tak potentní TNF- α a IL-1 prozánětlivou signalizaci [Schulte 2013]. Na subcelulární úrovni dochází k autofagii PAMPs a DAMPs, a tím k redukci aktivace prozánětlivých procesů. Poškozené buňky a infiltrující leukocyty musí být v rezoluční fázi odklizeny z tkání. Tyto buňky prochází apoptózou a jsou pohlceny a odklizeny převážně makrofágy; jedná se o tzv. eferocytózu. Zároveň se spustí uvolňování protizánětlivých cytokinů a TGF- β (transforming growth factor β). V procesu resoluce a eferocytózy se uplatňují recentně objevené bioaktivní lipidy-lipoxiny (resolviny, protektiny a maresiny). Bioaktivní lipidy jsou navíc schopny redukovat ROS, permeabilitu endotelu, rekrutment leukocytů do tkání a dále potencovat eferocytózu [Levy, 2014]. Tregs (regulační T lymfocyty) a MDSC (myeloid derived suppressor cells) jsou zapojeny v procesu tvorby protizánětlivých cytokinů a eliminace cytotoxických buněk. Do složitého mechanismu „cytokinové bouře“

zasahuje nervová soustava v podobě recentně „objeveného“ neuroinflamatorního reflexu (Tracey 2002).

Přesný mechanismus rozvoje orgánové dysfunkce během sepse ale není stále dostatečně pochopen [Pool 2018]. 1) Orgánová dysfunkce se může vyvinout i v případě dostatečného zásobení tkání kyslíkem. 2) Orgánová dysfunkce se může rozvinout i v případě absence buněčné smrti. Jednou z teorií je, že se rozvine v důsledku hibernace a ztráty běžných buněčných aktivit, spíše než vlivem strukturálních buněčných změn. Nelze vyloučit, že v časných stádiích rozvoje sepse může být orgánová dysfunkce adaptivní strategií na bouřlivou inflamatorní odpověď. 3) V porozumění mechanismů vývoje orgánové dysfunkce může hrát roli nový koncept tzv. tolerance hostitele; tolerance je pravděpodobně nezávislá na mechanismu inflamatorní odpovědi hostitelského organismu na patogen, když probíhá nezávisle. Nicméně pravděpodobně limituje do určité míry důsledky hostitelské odpovědi.

Někteří pacienti jsou schopni obnovit homeostázu a nastoupit trajektorii nekomplikovaného průběhu [Mira, 2016]. Termín „chronické kritické onemocnění“ (CCI-chronic critical illness) se ustálil k popisu pacientů, kteří vyžadují intenzivní péči po dobu více jak 8 dní, přičemž vykazují jednu nebo více z následujících podmínek: 1) prolongovaná ventilace > 96 hodin, 2) tracheostomie, 3) sepse/závažná infekce, 4) závažné poranění, 5) multiorgánová dysfunkce [Mira, 2017]. Recentně je používán termín PICS (Persistent Inflammation catabolism syndrom) pro pacienty, kteří přežijí iniciální fázi sepse, ale stanou se chronicky kriticky nemocnými [Gentile, 2012; Mira, 2017]. PICS je definován jako pokračující zánět, zvládnutelná orgánová dysfunkce, pokračující proteinový katabolismus, nedostatečná nutrice, kachexie, obtížné hojení ran, imunosuprese se zvýšenou náchylností k nozokomiálním infekcím. PICS nevysvětluje fenomén CCI, ale je schopen vysvětlit koexistenci přetrvávajícího zánětu (nižší úrovně, než je úvodní

cytokinová bouře) a adaptivní imunosuprese. V počátku sepse dochází k demarginaci granulocytů z kostní dřeně do místa infekce dle gradientu cytokinů z úvodní cytokinové bouře. V kostní dřeni vzniká prostor pro expanzi hematopoetických kmenových buněk, diferencují se převážně směrem k myeloidní řadě/granulocytům, makrofágům, dendritickým buňkám. Jedná se o tzv. emergentní granulopoézu/myelopoézu a probíhá na úkor erytropoézy a lymfopoézy. Diferenciace nezralých myeloidních buněk do zralých efektorových buněk je za těchto okolností blokována. Dochází k expanzi heterogenní populace inducibilních nezralých myeloidních buněk s imunosupresivními a prozánětlivými vlastnostmi, tj. MDSC (myeloid derived suppressor cells). MDSC přispívají k přetrvávajícím zánětlivým procesům díky své schopnosti produkovat prozánětlivé mediátory, NO a ROS. Populace MDSC dramaticky roste během sepse a přetrvává zvýšena po celé týdny. Z těchto nezralých buněk mají převážně granulocyty silný imunosupresivní účinek. Pacienti s vysokou produkcí MDSC se vyznačují časnou mortalitou nebo protražovanou hospitalizací. Dobrá rezoluce těchto buněk je spojena s dobrou prognózou. DAMPs a endogenní alarminy z poškozených tkání, které se uvolnily v průběhu cytokinové bouře, přispívají k udržování zánětlivého stavu, a to navzdory úspěšné eliminaci mikrobiologického patogenu a jeho PAMPs. Dochází k rozvoji PICS [Timmermans, 2016]. Výše uvedené procesy potlačují adaptivní imunitu. Anergie, redukce absolutního počtu lymfocytů a reaktivace latentních virových infekcí, jsou indikátory potlačené protektivní imunity. Dochází k reinfekcím a reaktivacím virových infekcí.

3.2. Septická kardiomyopatie a refrakterní selhání oběhu

Incidence sepsí indukované kardiomyopatie kolísá v rozmezí 13,8 – 40 %, a to v důsledku nekonzistentních diagnostických kritérií [Lin, 2020]. Septická kardiomyopatie byla poprvé popsána před více jak 40 lety jako akutní reverzibilní srdeční selhání, zapříčiněné sepsí s restitucí původní funkce myokardu v průběhu 7 - 10 dní [Parker,

1984]. Všeobecně přijímanými kritérii pro SCM (septickou kardiomyopatii, septic cardiomyopathy) jsou pokles ejekční frakce levé komory (LVEF) a ventrikulární dilatace během sepse [Beesley, 2018]. Mortalita septických pacientů s průvodní septickou kardiomyopatií je 2-3 x vyšší, dosahuje 70–90 %. Z epidemiologického hlediska je výskyt septické kardiomyopatie spojen s nižším věkem, předchází anamnézou srdečního onemocnění, se vstupní hladinou laktátu nad 4,0 mmol/L [Li 2019]. K septické kardiomyopatii jsou náchylnější muži [Sato, 2016]. Za příčinu septické kardiomyopatie byly již v padesátých letech 20. století považovány tzv. MDFs (The myocardial depressant factors) [Lin, 2020]. V současnosti díky pokroku ve znalostech mechanismů patofyziologie sepse a septické kardiomyopatie víme, že se zde uplatňuje genomická a následná cytokinová bouře, mitochondriální dysfunkce kardiomyocytů, systém komplementu, nerovnováha homeostázy vápníku v kardiomyocytech, cholinergní anti-inflamatorní reflex a další [Lin, 2020; Jarkovská, 2018].

Vazodilatace během septického šoku je výsledkem upregulace vazodilatačních mechanismů a selhání mechanismů vazokonstrikčních. Během sepse dohází k nekontrolované syntéze vazodilatačních substancí – NO (oxid dusný) a následné tvorbě cGMP (cyklický guanosin monofosfát). Hyperpolarizace plasmatické membrány buněk hladké svaloviny je také odpovědná za rozvoj vazodilatace; v tomto procesu hrají klíčovou roli K-ATP kanály (draslíkové kanály regulované adenosin trifosfátem) a K-Ca²⁺ kanály (draslíkové kanály regulované koncentrací vápníků) v membráně hladké cévní svaloviny. V zajištění vazokonstrikce selhávají především noradrenalin, angiotenzin II a vasopresin.

Adekvátní vazokonstrikce je určována vazbou angiotenzinu II a noradrenalinu na povrchové receptory buněk cévní hladké svaloviny. Vazbou dochází k aktivaci příslušných receptorů a konečným výsledkem procesu je uvolnění intracelulárních zásob vápníku a

vstup vápníku z extracelulárního prostředí do buňky cestou napěťově řízených vápníkových kanálů, výsledkem je zvýšení koncentrace vápníku v cytosolu buněk cévní svaloviny. Vysoká koncentrace cytosolového vápníku umožňuje vytvoření komplexu vápník-kalmodulin; tento komplex aktivuje kinázu a následně fosforylaci myosinu, výsledkem procesu je kontrakce hladké cévní svaloviny a vazokonstrikce. Klidový membránový potenciál buněk hladké cévní svaloviny se pohybuje v rozmezí -30 až -60mV. Posun k pozitivním hodnotám napětí (depolarizace) otevírá napěťově řízené vápníkové kanály, zvyšuje cytosolovou koncentraci vápníku a je tak umožněna vazokonstrikce. A naopak, hyperpolarizace zavírá tyto kanály, dojde ke snížení cytosolové koncentrace vápníku a k relaxaci. Dále je membránový potenciál cévních svalových buněk ovlivňován řadou transportních kanálů, převážně draslíkových. Co se týče vazodilatačního šoku, klíčovou roli v patogenezi hrají K-ATP kanály. Aktivace K-ATP kanálů umožňuje vyplavení draslíku z buněk a hyperpolarizaci membrány a dojde takto k zabránění vstupu vápníku do buněk a k vazodilataci. K aktivaci K-ATP kanálů dochází při poklesu koncentrace ATP v buňce, vzestupem vodíkových iontů (H⁺) a vzestupem koncentrace laktátu čili za podmínek zvýšeného tkáňového metabolismu či tkáňové hypoxie. Mezi aktivátory K-ATP kanálu patří další působky, např. atriální natriuretický peptid, CGRP (calcitonin gene-related peptid, adenosin, NO cestou cGMP (cyklický guanosin monofosfát) dependentního mechanismu. Plazmatické hladiny těchto substancí jsou významně zvýšeny během septického šoku [Schneider 1993, Martin 2000]. V důsledku zvýšené exprese iNOS (inducibilní NO syntetázy) v buňkách hladké svaloviny cév a v endoteliálních buňkách během sepse [Thiemermann, 1993] dochází k nadměrné produkci NO (oxidu dusného). Oxid dusný je schopen aktivovat myosin fosfatázu, defosforalizovat myosin a způsobit relaxaci hladké svaloviny cév. NO je také schopen způsobit vazodilataci aktivací draslíkových kanálů (K-Ca²⁺ kanálů) v plazmatické membráně buněk hladké cévní svaloviny. Za

normálních okolností regulují tyto kanály vazokonstrikční účinky noradrenalinu a angiotenzinu II. Při zvýšené cytosolové koncentraci vápníků (vlivem výše popsaného účinku noradrenalinu a angiotenzinu II) se tyto draslíkové kanály otevřou a dojde k hyperpolarizaci plazmatické membrány, snížení vstupu extracelulárního vápníku do buňky a k omezení vazokonstrikce. Oxid dusný (NO) může aktivovat K-Ca²⁺ kanály dvěma způsoby. 1) přímou nitrosylací kanálu a 2) aktivací cGMP dependentní protein kinázy. Rezistence na vazopresory, která je charakteristická pro refrakterní septický šok, je tedy pravděpodobně zprostředkovaná i schopností NO aktivovat K-Ca²⁺ kanály a způsobit hyperpolarizaci plazmatické membrány hladké cévní svaloviny. Oxid dusný, jak bylo zmíněno výše, aktivuje K-ATP kanály a hyperpolarizací je odpovědný za relaxaci svalových cévních buněk a vazodilataci. Vasopresin je za normálních okolností přítomen v koncentracích, jež se pohybují v rozmezí 0,9-6,5 pmol/L; při těchto koncentracích se uplatňuje jeho antidiuretický účinek. Vazokonstrikční efekt se objevuje až při mnohonásobně vyšších koncentracích, 9-187 pmol/L [Landry 2001]. Za normálních okolností má vasopresin minimální vliv na regulaci arteriálního tlaku. Nicméně při hypotenzi nebo sepsi je vasopresin masivně uvolňován z neurohypofýzy a jeho koncentrace v plazmě se značně zvýší a vasopresin spolu s dalšími vazokonstriktory přispívá k udržení arteriálního tlaku. V průběhu šoku však vlivem nepřetržité osmotické a baroreflexní stimulace neurohypofýzy dochází k vyčerpání zásob vasopresinu. Koncentrace vasopresinu postupně klesá (i během jedné hodiny) ke koncentracím, jež nejsou dostatečné k zajištění vazokonstrikčního účinku [Landry, 1997]. Exogenně dodaný vasopresin v případě vazodilatačního šoku je překvapivě účinný při hypotenzi rezistentní na vazokonstriktory, jako jsou noradrenalin a angiotenzin II. Na vysvětlení takto příznivého účinku exogenně podaného vasopresinu se podílí několik hypotéz: 1) koncentrace vasopresinu jsou relativně nízké a cévní receptory jsou k dispozici pro exogenně dodaný vasopresin; jiná situace je

v případě noradrenalinu a angiotenzinu II. Jejich endogenní koncentrace jsou neustále relativně vysoké, receptory mohou být již „obsazeny“ endogenními vazokonstriktory anebo desenzitizované. Proto po exogenním podání, v případě vazodilatačního šoku, nemusí dojít k vazbě na receptory. 2) Vasopresin je schopen potencovat účinek noradrenalinu a hladiny noradrenalinu jsou v septickém šoku vysoké [Bartelston, 1965]. 3) Vasopresin přímo deaktivuje K-ATP kanály ve svalovině cév a tím zabrání hyperpolarizaci a vazodilataci. 4) Vasopresin je schopen omezit vzestup cGMP (cyklický guanosin monofosfát) indukovaný oxidem dusným a atriálním natriuretickým peptidem a snížit produkci indukibilní NO syntetázy (iNOS); tj. omezit hyperpolarizaci a tak vazodilataci [Landry, 2001]. Navzdory pokroku v poznáních patofyziologických mechanismů zůstává stále hlavní terapeutickou strategií refrakterního oběhového selhání kontrola infekčního zdroje, konvenční terapie sepse a farmakologická podpora.

3.3. Experimentální léčebné strategie sepse a mechanismy implementace mimotělní membránové oxygenace v refrakterním oběhovém selhání v sepsi

3.3.1. Mimotělní membránová oxygenace

Zařazení mimotělní oběhové podpory (VA-ECMO) do terapie refrakterního septického šoku je během posledních deseti let diskutovaným a stále kontroverzním tématem [Shekar, 2016]. Problém s přenosem do klinické praxe spočívá v malém počtu čistě retrospektivních studií či kazuistik [Brecht, 2013; Huang, 2013; Park, 2015; Cheng, 2013; Yeo, 2016], v absenci řádných randomizovaných preklinických či klinických studií a v nedostatečném rozlišování mezi oběma fenotypy septického šoku jak ve studiích, tak v klinické praxi. V pediatrii je VA-ECMO etablovanou metodou s přežitím 68–74 % [Davis, 2017]. Novorozenci, kteří mají nejvyšší přežití při napojení na VA-ECMO pro septický šok, vykazují známky dysfunkce levé komory

s redukováným srdečním výdejem. Tento fenotyp septického šoku je častý u novorozenců a menších dětí, se stoupajícím věkem převažuje hyperdynamický septický šok s vysokým srdečním výdejem [MacLaren, 2007]. Vysvětlení je možné částečně hledat i v infekčním agens. V experimentálním modelu Gram pozitivní sepse byla iniciálně pozorována myokardiální deprese, ale u sepse způsobené endotoxinem byla srdeční kontraktilita relativně zachována [Alhamdi, 2015; Opal, 1999]. U pneumokokových infekcí se cirkulující pneumolysin chová jako potentní spouštěč myokardiálního poškození [Alhamdi, 2015]. Tato hypotéza nachází oporu i v retrospektivních studiích na dospělé populaci. Zde je pozorováno vyšší přežití u pacientů s pneumokokovou pneumonií [Cheng, 2013; Brechot, 2013]. V dětské populaci převažují invazivní streptokokové a stafylokokové infekce [MacLaren, 2007]. Mortalita dospělých pacientů napojených na VA-ECMO v případě refrakterního septického šoku kolísá v rozmezí 15 – 70 % [Brechot, 2013; Huang, 2013; Park, 2015; Cheng, 2013; Yeo, 2016]. V současnosti se indikační doporučení u dospělé populace opírají o nevelký počet kazuistik a retrospektivních studií z jednotlivých center [Brechot, 2013; Huang, 2013; Park, 2015; Cheng, 2013; Yeo, 2016, Firstenberg, 2010; Pořízka, 2015]. Tyto studie naznačují, že užití VA-ECMO má své limity u pacientů s refrakterní vazoplegií a s relativně zachovalou srdeční funkcí. Dalším problémem, který neulehčuje orientaci v problematice, je vymezení termínu refrakterní septický šok a rozlišování, resp. nerozlišování mezi dvěma fenotypy septického šoku: hypodynamický septický šok s kardiální depresí (septickou kardiomyopatií) a vazoplegický septický šok s relativně zachovalou srdeční funkcí. Oba fenotypy se pochopitelně mohou v různé míře překrývat. V dostupném souboru retrospektivních studií (tabulka č. 3.3.1.) jsou dvě „fenotypově“ vyhraněné studie. 1) Bréchetova et al, kdy studovali výsledky VA-ECMO u populace mladých pacientů s kritickou septickou kardiální depresí (pacienti s anamnézou srdečního onemocnění byli vyloučeni); přežití v této retrospektivní

nekontrolované analýze dosáhlo překvapivých 70 % [Brecht, 2013].
2) Další podobně vyhraněná studie je od Yeo et al., zde bylo k VVA-ECMO indikováno osm pacientů se septickým šokem a respiračním selháním; u všech byla relativně zachovalá ejekční frakce levé komory, přežití bylo 50 % [Yeo, 2016].

Park et al, definuje refrakterní septický šok jako orgánovou hypoperfuzi, progresivní laktátovou acidózu, neschopnost udržet střední arteriální tlak nad 65mmHg navzdory vysoké vazoaktivní podpoře. Dávky noradrenalinu jsou nad 1µg/kg/min, dobutaminu a dopaminu 20µg/kg/min; Park nerozlišuje fenotyp refrakterního septického šoku ve vztahu k indikaci VA-ECMO [Park, 2015]. Cheng et al. použili VA-ECMO jak u pacientů s refrakterní vazoplegií se zachovalou kardiální funkcí, tak u pacientů s hypodynamickým fenotypem septického šoku s kardiální depresí; mortalita v této skupině byla 70,2 % [Cheng, 2013]. Zdá se, že účinek VA-ECMO podpory je limitovaný v případě septické refrakterní vazoplegie s relativně zachovalou funkcí myokardu [Schmidt, 2016]. Nicméně VA-ECMO bylo úspěšně použito v případě „čistého“ vazodilatačního refrakterního šoku u otravy amlodipinem [Weinberg, 2014; Vignesh, 2018]. Překvapivě vysoké procento přežití (50 %) zaznamenali i Yeo et al. u osmi pacientů se septickým šokem s relativně zachovalou ejekční frakcí levé komory [Yeo, 2016]. Závěrem lze shrnout, že indikace k VA-ECMO u dospělých pacientů s farmakologicky refrakterním septickým šokem je nadále velmi kontroverzní a pouze kazuistická či retrospektivní data ukazují, že přínosem může být převážně u hypodynamických forem septického šoku. Zda-li může VA-ECMO být účinným „rescue“ opatřením k překlenutí kritické fáze dominantně vazoplegického septického šoku, není jasné a nelze najít oporu v žádné prospektivní preklinické ani klinické studii.

Tabulka 3.3.1. Charakteristika souboru retrospektivních studií hodnotící okolnosti a výsledky použití VA- ECMO/VVA-ECMO v refrakterním septického šoku.

Studie	Fenotyp septického šoku	EFLK (%)	CI (L/min/m ²)	SVRI (dyn*s/cm ⁵)	Inotropní skóre/dávka noradrenalinu	Přežití	Mortalita
Brechot et al., France, 2013; <i>Crit Care Med</i>	Hypodynamický fenotyp s kardiální depresí	16% (10%-30%)	1,3	3162	Inotropní skóre 250 (73-629)	71%	
Cheng et al., Taiwan, 2016; <i>The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery</i>	Nerozlišuje		2,1 mv (1,9)	3883	Inotropní skóre 64,4 mv (132,3)	29,8%	70,2 %
Park et al., Korea, 2015; <i>European Journal of Cardio-Thoracic Surgery</i>	Nerozlišuje	25% (20%-41%)					22%
Huang et al., Taiwan, 2013; <i>The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery</i>	Nerozlišuje					15%	
Yeo et al., Korea, 2016; <i>Crit Care</i>	Hyperdynamický fenotyp s relativně zachovalou funkcí myokardu	42,5%			Dávka noradrenalinu 0,7µg/min/kg	50%	50%

Komentář k tabulce 3.3.1. V souboru studií jsou dvě fenotypově vyhraněné: 1) Brechot et al. zahájili VA-ECMO u pacientů s hypodynamickým fenotypem septického šoku s myokardiální dysfunkcí. 2) Yeo et al. použili VVA-ECMO u pacientů s hyperdynamickým fenotypem septického šoku s relativně zachovalou funkcí myokardu. Ostatní autoři mezi fenotypy septického šoku nedělali rozdíl, co se týče indikace k VA-ECMO. CI- cardiac index, SVRI-systemic vascular resistance index, EFLK-ejekční frakce levé komory, mv-mean value.

3.3.2. Mezenchymální kmenové buňky

S ohledem na mimořádnou komplexnost patogeneze sepse a již překonané paradigma „jedna nemoc, jeden lék“ se do popředí výzkumu dostává potřeba ovlivnění několika patofyziologických mechanismů souběžně. Buněčná terapie s využitím mezenchymálních kmenových buněk (MSC), s cílem přeprogramovat imunologické vlastnosti kompetentních buněk a působit protektivně v procesu buněčného poškození, je jednou z perspektivních strategií v léčbě sepse a asociovaných orgánových dysfunkcí. Imunomodulační, anti-inflamatorní, anti-apoptické a anti-mikrobiální účinky MSC jsou racionálním biologickým východiskem pro vědecké ověření jejich přínosu coby adjuvantní léčby nejen sepse, ale i řady jiných kritických stavů (HORÁK, Jan, MATĚJOVIČ, Martin. Experimentální pokroky v léčbě sepse. IN: GURLICH, Robert a kol., Peritonitis. 1. vydání. Praha: Maxdorf. 2019, s. 129-139. ISBN 978-80-7345-584-2).

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) jsou multipotentní kmenové buňky se schopností diferenciací tkáně všech tří zárodečných listů, primárně pak tkáně mezenchymové. MSCs disponují dalšími vlastnostmi, které mají potenciál modulovat inflamatorní odpověď během sepse na několika úrovních, jak bylo prokázáno u in vitro experimentů či u malých zvířecích modelů. Sekrece řady signálních molekul je schopna zasáhnout do procesu tkáňové reparace či modulovat intenzitu pro-inflamatorních drah na zpětnovazebné bázi. Další látky secernované mezenchymálními buňkami jsou schopny zmírnit úroveň oxidativního stresu a inhibovat procesy vedoucí k apoptóze buněk. Se svou schopností transferu vezikul s bioaktivními látkami a transferu některých organel, jako např. mitochondrií cestou tzv. nanotubulů, mohou obnovovat funkce poškozených či utlumených buněk. Jsou schopny produkovat látky, které přímo inhibují bakteriální růst. Příznivé účinky MSCs v sepsi byly prokázány výlučně na malém zvířecím modelu (potkan, myš), a

tudíž je přenos výsledků dále do klinické praxe minimálně relevantní. Rozdíly v imunitní a zánětlivé reakci mezi lidmi a hlodavci jsou dobře zdokumentovány [Seok, 2013].

Problematiku fyziologie MSCs a jejich vliv na průběh sepse shrnuje přehledový článek:

(IV) HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, MARTÍNKOVÁ, Vendula, BENEŠ, Jan, ŠTENGL, Milan, MATĚJOVIČ, Martin. Mesenchymal Stem Cells in Sepsis and Associated Organ Dysfunction: A Promising Future or Blind Alley? *Stem Cells International*. 2017 (IF 3,54)

Recentně byly zveřejněny první humánní klinické studie, jejichž cílem je ověření bezpečnosti aplikace a účinnosti podaných mezenchymálních buněk. První fáze CISS studie [Schlosser, 2019] zkoumala dynamiku vývoje hladin 49 cytokinů a biomarkerů u 30 septických pacientů, z nichž skupina devíti pacientů v septickém šoku byla léčena postupně eskalujícími dávkami MSCs (0,3-1,0-3,0 mil/kg). Během experimentu byl zaznamenán jen přechodný pokles hladiny některých prozánětlivých cytokinů, a to v závislosti na dávce; kromě jednoho pacienta byl pokles zaznamenán při aplikaci středních dávek MSCs. Aplikace MSCs neměla vliv na vývoj hladiny cytokinů a ostatních markerů v jiných směrech. V další studii (15 pacientů v septickém šoku) byla ověřována bezpečnost a účinnost aplikace allogenních mezenchymálních buněk získaných z pupečníku [HE, 2018]. Zároveň byla ověřována účinnost a bezpečnost v závislosti na podané dávce. Jednorázová aplikace neměla vliv na klinické ani laboratorní parametry, neovlivnila dynamiku cytokinů. Nebyly pozorovány známky nežádoucích účinků spojených s podáním mezenchymálních buněk. U přeživších nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky po dobu 18 měsíců [HE, 2018]. Další studie zkoumala bezpečnost a vliv mezenchymálních buněk na časnou fázi inflamatorní odpovědi u modelu humánní endotoxémie navozené podáním purifikovaného LPS. Jednalo se o zaslepenou,

placebem kontrolovanou studii se souborem 32 zdravých mužů, s dávkami MSCs (tukových mesenchymálních buněk) v rozmezí 0,5-4mil/kg. Zkoumáním genové exprese leukocytů během úvodní fáze zánětlivé reakce po podání LPS byla zaznamenána dramatická změna exprese více jak 8000 genů, která byla následována procesy nativní imunitní reakce. Aplikace MSCs vedla k nadměrné expresi IL-8, IL-10, TGF β a IL-12p40, čili výsledkem byla aktivace jak prozánětlivých, tak protizánětlivých reakcí. V souvislosti s podáním vysokých dávek A-MSCs (tukových mesenchymálních buněk) byla patrna mírná prokoagulační aktivita; MSCs asociovaný tkáňový faktor je zřejmě odpovědný za zvýšenou prokoagulační aktivitu v tomto modelu. Podání A-MSCs nevedlo k ovlivnění klinického obrazu, leukocytózy ani koncentraci lipozomálního baktericidního enzymu LL-37 [Peerle, 2018]. Schopnosti mesenchymálních buněk a jejich potenciál ovlivnit inflamatorní děje během sepse jsou jistě velmi atraktivní, a navíc povzbudivě ověřené na četných modelech sepse, bohužel toliko na malém zvířeti, typu myši či jiného hlodavce. Ukvapené použití těchto pozitivních výsledků při modelování humánních klinických studií a jejich zahájení bez relevantních preklinických zvířecích studií však neodpovídá principům translační medicíny. Z tohoto důvodu jsme realizovali experiment na velkém zvířecím modelu sepse, který hodnotil efektivitu a bezpečnost podání mezenchymálních buněk v progresivní sepsi prasete domácího.

3.3.3. Cholinergní anti-inflamatorní reflex

Recentně byla v sérii studií odhalena spojitost mezi nervovým systémem a imunomodulací. Byl postulován koncept cholinergního anti-inflamatorního reflexu [Tracey 2002, 2007; Czura, 2005; Andersson 2012]. Dle konceptu je aferentní signál reflexu indukován pomocí PAMPs a DAMPs (čili cytokiny, eikosanoidy, patogeny a markery tkáňového poškození). Aferentní signál pokračuje cestou vagového nervu do nucleus tractus solitarii; zde dojde k přepojení do jader v mozgovém kmeni a hypothalamu a vyšších center. Eferentní

signál putuje zpět, opět cestou vagového nervu, do gangliom coeliacum. V ganglion coeliacum dochází k aktivaci adrenergních splenických neuronů a vedení signálu do sleziny, přesněji do bílé dřeně, kde se nacházejí zakončení těchto splenických adrenergních neuronů v blízkosti T lymfocytů. T lymfocyty reagují na adrenergní stimulaci produkcí acetylcholinu. Takto uvolněný acetylcholin aktivuje podjednotku $\alpha 7$ nikotinových acetylcholinových receptorů nebo $\beta 2$ adrenergních receptorů převážně na makrofázích; výsledkem je downregulace produkce zánětlivých mediátorů [Andersson, 2012].

Recentně provedené série experimentálních prací na malém zvířecím modelu dokládají příznivý vliv vagové stimulace na přežití. Účinek této metody na průběh sepse u klinicky relevantního modelu nebyl dosud experimentálně ověřen [Borovikova, 2000; Song, 2008].

4. CÍLE PŮVODNÍCH VĚDECKÝCH PRACÍ

- 1) Zhodnotit a definovat roli VA-ECMO v případě refrakterního vazoplegického septického šoku na klinicky relevantním velkém zvířecím modelu progresivní peritoneální sepse.
- 2) Zhodnotit účinnost a bezpečnost aplikace mezenchymálních kmenových buněk na velkém zvířecím modelu progresivní peritoneální sepse.
- 3) Zhodnotit účinnost vagové stimulace u velkého zvířecího modelu progresivní peritoneální sepse.

5. METODICKÉ ASPEKTY PRÁCE

Podrobný popis experimentálních protokolů a použitých metod je uveden v příložených původních pracích, proto níže pouze stručně shrnuji metodické aspekty použité při našem výzkumu.

5.1. Legální a etické aspekty experimentů se zvířecím modelem

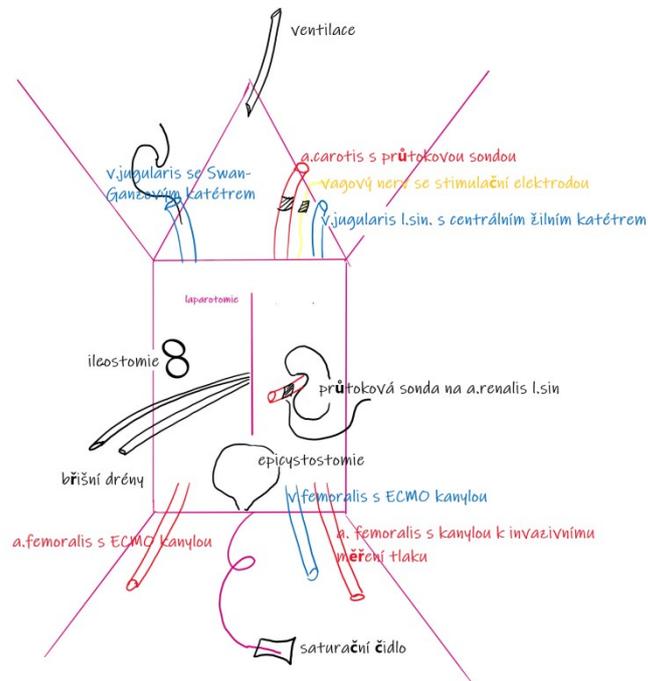
Všechny experimentální práce byly prováděny v souladu se Směrnicí Evropské Unie pro ochranu zvířat požívaných k pokusným nebo jiným vědeckým účelům (86/609/EU). Protokol byl schválen Odbornou komisí pro práci s experimentálními zvířaty Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze, a také Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (číslo protokolu: MSMT24725/2014-4). Experiment byl realizován v prostorách akreditovaného pracoviště Lékařské fakulty v Plzni.

5.2. Experimentální model progresivní peritoneální sepse

K experimentu byla použita selata bez rozdílu pohlaví se střední hmotností 54 kg. V úvodu experimentu byla selata premedikována. Po zajištění periferní žíly jsme zvířata uvedli do anestezie intravenózně podaným propofolem, pipecuroniem a fentanylem za současného zajištění dýchacích cest orotracheální intubací. Následně byla zahájena umělá plicní ventilace s následujícími výchozími parametry: frakce vdechovaného kyslíku 0,4 (FiO₂), PEEP (positive end expiratory pressure) v rozmezí 5 - 10 cmHg, inspirační objem 8mL/kg, dechová frekvence se pohybovala v rozmezí 20 - 40 dechů/min. Ventilace byla vedena tak, abychom dosáhli cílového arteriálního pCO₂ 4,0 - 5,0 kPa a udrželi vrcholový tlak v dýchacích cestách pod hodnotou 40 mmHg. Během chirurgické instrumentace byla zvířata udržována v totální intravenózní anestezii prostřednictvím kontinuální aplikace 2 % propofolu v dávce 20 - 40mg/10kg/hod, analgezie byla zajištěna kontinuálním podáváním fentanylu (5-15μg/kg/h), perioperačně bylo podáváno pipecuronium

v dávce 1mg/kg/h. Po ukončení chirurgické instrumentace byla zvířata vedena v analgosedaci pomocí kontinuální aplikace 2 % propofolu a fentanylu v rozmezí výše uvedeného dávkování. Uvedené schéma bylo pro experimentální zvíře maximálně šetrné a protektivní. Udržovací tekutinou byl zvolen kontinuálně podávaný balancovaný krystaloidní roztok (Ringerfundin, B.Braun, Melsungen AG, Německo), nejprve 10 ml/kg/h během chirurgické instrumentace a poté byla rychlost podání redukována na 7 ml/kg/h. Při poklesu glykémie pod 4,0 mmol/l byla zahájena infúze 10 % glukózy.

Chirurgická instrumentace spočívala v zavedení centrálního žilního katetru do levé jugulární žíly, který sloužil k podávání farmak a infuzí. Cestou opačné jugulární žíly byl zaveden Swan-Ganzův plicnicový katetr sloužící k měření hemodynamických parametrů a výpočtu odvozených parametrů. Do jedné z femorálních tepen byl zaveden arteriální katetr, kterého jsme využili k náběru vzorků a invazivnímu měření arteriálního tlaku. Byla založena epicystostomie k derivaci moči a k monitoraci diurézy. Schéma experimentu je znázorněno na obrázku č. 5.2.



Obrázek č.5.2. - Názorné schéma experimentu

Názorné schéma experimentu. Obrázek znázorňuje prase domácí v supinační poloze po instrumentaci.

Dále se postup u jednotlivých experimentů liší.

5.2.1. Specifikace postupu pro experiment s VA-ECMO (I)

K experimentu s VA-ECMO bylo použito 12 selat obou pohlaví. V úvodu do anestezie byla zvířata premedikována atropinem, ketaminem a 2 % propofolem. Během instrumentace byly druhostranná femorální tepna a žíla vypreparovány a takto připraveny k budoucímu zavedení arteriální ECMO kanyly (17F, Maquet, Rastatt, Německo) a žilní ECMO kanyly (21F Maquet, Rastatt, Německo). Cestou střední laparotomie byla otevřena dutina břišní a na levou renální tepnu byla aplikována ultrazvuková průtoková sonda (Transonic Systems, Ithaca, NY). Další průtoková sonda byla instalována na chirurgicky vypreparovanou levou krční tepnu. Před uzavřením laparotomie byly zavedeny dva břišní drény,

keré sloužily k evakuaci ascitu a k fekální inokulaci, tj. k indukci peritonitidy. Byla provedena punkce močového měchýře a zavedena epicystostomie k monitoraci výdeje. Po instrumentální fázi byla zvířeti ponechána šesti hodinová zotavovací fáze. Poté byla indukována peritonitida inokulací autologní stolice v množství 2 g/kg selete, která byla peroperačně kultivována ve vodní lázni při teplotě 37 °C. Po indukci peritonitidy byla léčba vedena dle aktuálních doporučených postupů, které byly zakotveny v experimentálním protokolu, viz příložená původní práce (I, Chvojka, Martínková, 2019). Oběhová podpora noradrenalinem byla zahájena v případě poklesu středního arteriálního tlaku pod 65 mmHg při již neúčinné odezvě na tekutinovou resuscitaci. Dávka noradrenalinu byla titrována s cílem udržet MAP v rozmezí 65 – 70 mmHg. Refrakterní vazodilatační septický šok byl predefinován hodnotami dávky noradrenalinu: 1 µg/kg/min. Při dosažení kritéria pro vazodilatační refrakterní septický šok byla prasata randomizována buď do skupiny VA-ECMO (VA-ECMO group), nebo do kontrolní skupiny. Priming ECMO okruhu byl proveden roztokem Ringerfundinu a průtok byl progresivně zvyšován k dosažení predefinované cílové hodnoty 100 ml/kg/min. Dávky nefrakcionovaného heparinu v obou skupinách byly srovnatelné, počáteční bolus 50 IE heparinu/kg, následovaný kontinuální infuzí s cílem udržet ACT v hodnotách od 180 – 250 s. Oběma skupinám prasat byl podán bolus širokospektrého antibiotika (piperacillin/tazobactam 2,25 g intravenózně) 12 hodin po indukci sepse. Následoval odběr a zápis dat dle stanoveného protokolu. Experiment končil úmrtím na refrakterní oběhové selhání nebo byl ukončen v případě refrakterní hypotenze, kdy další léčba již byla nadále považována za marnou. Kompletní data byla odebírána ve třech předdefinovaných časových milnících (time points, TP): TP1 – odběr dat s následnou indukci sepse, TP2 - sběr dat 12 hodin po indukci sepse, TP3 - finální odběr dat 24 hodin po indukci sepse. Sbíraná data zahrnovala měření a výpočty systémových a regionálních hemodynamických parametrů a spotřeby vasopresorů.

Ze vzorků arteriální krve byl stanoven laktát. Vzorky arteriální a smíšené žilní krve byly analyzovány na krevní plyny, acidobazickou rovnováhu. Byl stanoven krevní obraz, hladiny IL-1ra, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10. Další biochemické analýzy zahrnovaly zhodnocení orgánových funkcí (serový kreatinin, ALT, AST, pro BNP, hsTnI), zhodnocení parametrů zánětu (CRP). Statistická analýza dat je uvedena v původní příložené práci.

5.2.2. Specifikace postupu pro experiment s aplikací mesenchymálních buněk (II)

V experimentu bylo použito 32 selat, která byla randomizována do 4 skupin (n= 8 selat na jednu skupinu): 1) pouze instrumentovaná skupina bez intervence, 2) instrumentovaná skupina s aplikací MSCs, 3) instrumentovaná skupina s indukovanou sepsí s konvenční terapií, 4) instrumentovaná septická skupina s aplikací mesenchymálních buněk. Úvod do anestezie proběhl pomocí xylazinu (1mg/kg) a tiletaminu-zolazepamu (5mg/kg) a 2% propofolu 2mg/kg intravenózně. Během instrumentace byla na levou renální tepnu aplikována průtoková sonda, dále byla vyvedena dvojhlavňová ileostomie k monitoraci mikrocirkulace střevní sliznice prostřednictvím videomikroskopie (technika SDF, side-stream dark field). Peritoneální sepse byla indukována inokulací autologní stolice v množství 1 g/kg hmotnosti selete. V experimentu byly použity allogenní MSCs, které byly izolovány z kostní dřeně (tibie, femur) zdravých prasat. Tyto buňky byly zpracovány dle aktuálních standardů a po dobu projektu zmrazeny v tekutém dusíku. Čtyři týdny před aplikací byly rozmrazeny a kultivovány na nosném médiu. V den transplantace byly buňky sklizeny a suspendovány ve fyziologickém roztoku. Před vlastní aplikací byl prostřednictvím průtokové cytometrie zhodnocen buněčný fenotyp; s odstupem pak byla hodnocena schopnost diferenciací v jednotlivé podtypy mezenchymálních tkání. Detailní metodika přípravy MSCs v rámci experimentu je popsána v původním publikovaném článku (II, Horák,

2020). Vlastní aplikace MSCs experimentálnímu modelu proběhla s odstupem 6 hodin od indukce peritonitidy. Mezenchymální buňky byly podány pomalou jednorázovou intravenózní infúzí cestou centrálního žilního katetru. Dávka MSCs byla 1 mil MSCs/kg hmotnosti zvířete. Odběr dat probíhal ve stanovených časových milnících. Sledovaná analyzovaná data zahrnovala systémovou a regionální hemodynamiku, spotřebu vazopresorů a resuscitačního roztoku, SOFA skóre, acidobazickou rovnováhu, krevní plyny, koncentraci laktátu. Laboratorní analýza zahrnovala vyšetření krevního obrazu včetně diferenciálního rozpočtu, zhodnocení orgánových funkcí (urea, kreatinin, jaterní enzymy, bilirubin vysoce senzitivní troponin T), parametry zánětu (C-reaktivní protein, prokalcitonin), sérovou bílkovinu, albumin, parametry koagulace. Nadstavbová laboratorní analýza byla provedena po ukončení projektu a zahrnovala vyšetření základních cytokinů (IL-6, IL-8, TNF α , IL-10) a zhodnocení úrovně oxidativního stresu (stanovením koncentrace 8 - isoprostanu). K analýze byly z levé komory myokardu izolovány myocyty (cestou enzymatického oddělení prostřednictvím kolagenázy A). Sarkomerická kontrakce izolovaného kardiomyocytu byla měřena prostřednictvím HyperSwitch Myocyte Calcium and Contractility systému (IonOptix LLC, Weswood, MA, USA). Funkce mitochondrií izolovaných z myokardu byly analyzovány pomocí respirometrie (oxygraf Oroboros O2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Rakousko). Experimentální protokol a analýza dat jsou podrobně popsány v původním publikovaném článku (II, Horák, 2020).

5.2.3. Specifikace postupu pro experiment s vagovou stimulací (III)

25 selat obou pohlaví se srovnatelnou hmotností (44,5 ± 5,7kg) bylo randomizováno do 3 skupin: 1) septická skupina (n=8), 2) skupina se sepsí a vagovou stimulací (n=9), 3) kontrolní skupina, instrumentovaná, bez sepse a bez vagové stimulace (n=8). Úvod do anestezie proběhl pomocí xylazinu (2,2mg/kg) a tiletaminu (2,2 mg/kg), zolazepamu (2,2 mg/kg) a 2% propofolu (2 mg/kg) intravenózně. Peritonitida byla indukována inokulací autologní stolice intraperitoneálně v množství 1g/kg selete po 6 hodinové zotavovací fázi. Během chirurgické instrumentace byla nasazena na krční část levostranného vagového nervu stimulační bipolární elektroda (Harvard Apparatus, Holliston, MA), která umožnila jeho stimulaci. Stimulace byla zahájena s odstupem 6 hodin od indukce fekální peritonitidy. Vagový nerv byl stimulován impulzy o frekvenci 2 Hz a amplitudě 6 mA, s dobou trvání 2 ms prostřednictvím pulzního generátoru (Isostim, A320, PI, Sarasota, Florida, USA). Stimulace byla protokolárně upravována dle současné chronotropní odezvy. Stimulace byla ukončena až s ukončením experimentu. Hemodynamické hodnoty, elektrokardiografie, biochemické laboratorní parametry, krevní plyny, hladiny cytokinů, krevní obraz, byly měřeny a zaznamenávány v základním časovém milníku (těsně před indukci peritonitidy) a na konci experimentu (24 hodin po indukci peritonitidy). Dále následovala in vitro analýza srdeční kontraktility, hospodaření s vápníkem a analýza mitochondriálních funkcí u izolovaného myokardu. Měření a analyzovaná data a statistické zpracování jsou detailně popsány v publikované práci.

5.2.4. Statistická analýza

Statistická analýza je popsána v jednotlivých původních publikovaných pracích. Stručně: data jsou prezentována jako medián

(25 a 75 quartiles – interquartile reange). Výpočty byly provedeny pomocí softwaru SigmaStat, verze 3,5 (Systat Software Inc., Erkrath, Germany) a pomocí softwaru MedCalc, verze 18.10 (MedCalc Software bvba, Belgium). Rozdíly mezi skupinami byly analyzovány pomocí Mann-Whitney U testu, poté co bylo určeno normální rozložení dat dle Kolmogorovova – Smirnovova testu. Friedmanův blokový test pro porovnání vícero souborů a následný Dunnův test, byly použity pro časově dependentní změny v každé skupině. P-hodnota menší než 0,05 byla považována za signifikantní.

6. SOUHRN VÝSLEDKŮ EXPERIMENTÁLNÍCH PRACÍ A DISKUZE

6.1. Mechanická oběhová podpora v refrakterním vazodilatačním septickém šoku (I).

Do finální analýzy výsledků a dat bylo zahrnuto 10 zvířat. V bazálním časovém milníku (TP1) nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly v naměřených hodnotách mezi oběma skupinami. Medián doby trvání experimentu, tj. od indukce peritonitidy, byl 26.4 (22.8 - 29.5) hodin u ECMO skupiny a 27.0 (21.4 - 32.6) hodin v kontrolní skupině ($P = 0.762$). Po indukci peritonitidy vykazovala všechna zvířata známky hyperdynamické cirkulace se zvýšeným srdečním výdejem a sníženou cévní rezistencí. Čas k dosažení vazodilatačního refrakterního septického šoku byl v obou skupinách podobný: 18.8 (12.5 - 21.5) hodin v ECMO skupině a 18.1 (13.9 - 24.3) hodin v kontrolní skupině ($P = 0.762$). U obou skupin bylo po napojení na VA-ECMO dosaženo cílové rychlosti průtoku, tj. 100 mL/kg/min.

6.1.1. Systémová a regionální hemodynamika a tekutinová bilance

U kontrolní skupiny zůstaly MAP (střední arteriální tlak), CO (srdeční výdej), RBF (průtok renální tepnou) a CBF (průtok karotidou) po dosažení refrakterního vazodilatačního septického šoku nezměněny. Stabilní hemodynamické hodnoty však byly udržovány na úkor progresivně rostoucí dávky noradrenalinu a rostoucí srdeční frekvence. Napojení na VA-ECMO vedlo bezprostředně k významnému zvýšení vazopresorické podpory, jež byla signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny. Subjekty napojené na VA-ECMO vyžadovaly vyšší tekutinovou nálož v porovnání s kontrolní skupinou; 21 (20 - 25) ml/kg/h v ECMO skupině versus 10 (10 - 16) mL/kg/h ve skupině kontrolní ($P = 0,0103$). U ECMO skupiny došlo tímto k poklesu hladiny hemoglobinu. Navzdory hemodynamické

resuscitaci bylo po napojení na VA-ECMO obtížné udržet cílovou hodnotu středního arteriálního tlaku. Byla patrna tendence k poklesu srdečního výdeje. Výše zmíněná hemodynamická odezva proběhla v důsledku poklesu srdeční frekvence a poklesu tepového objemu (SV-stroke volume). VA-ECMO nemělo zpočátku vliv na průtok renální a karotickou tepnou; později v průběhu experimentu však ke snížení obou hodnot progresivně dochází.

6.1.2. Orgánové funkce, energetický metabolismus, zánětlivé mediátory, přežití

Ve spojitosti s refrakterním septickým šokem jsou patrné biochemické známky významného orgánového poškození: srdce, ledvin, plic; přítomny jsou hematologické abnormality. U všech zvířat se rozvinul značný metabolický stres, jak je zdokumentováno rozvojem významné metabolické acidózy a progresivně rostoucí hladinou laktátu. Obraz sepsí indukovaného multiorgánového poškození, obraz změn v energetickém metabolismu a systémové zánětlivé odpovědi byly u obou skupin překvapivě velmi podobné, bez signifikantních rozdílů v časové lince.

Doba přežití se u obou skupin nelišila (měřeno od zjištění diagnózy vazodilatačního septického šoku do smrti): 7.1 (5.9 - 9.6) hodin pro ECMO skupinu a 7.9 (7.1 - 8.7) hodin pro kontrolní skupinu ($P = 0,10$).

Grafy a tabulky podporující argumentaci v textu jsou podrobně uvedeny v publikované studii (viz příloha).

Diskuze

Jedná se o první kontrolovanou randomizovanou experimentální studii, která zkoumá pato(fyziologickou) odpověď na VA-ECMO u klinicky relevantního modelu refrakterního septického šoku velkého zvířete s predominantním vazoplegickým fenotypem. Za této situace není myokard navzdory zvýšeného srdečního výdeje schopen saturovat požadavky vazodilatovaného arteriálního kompartmentu a udržet tak dostatečný tkáňový perfúzní tlak. Přispění průtoku z mimotělního oběhu k nativnímu srdečnímu výdeji by mohlo tento nepoměr mezi kapacitou a náplní periferního řečiště snížit a zlepšit tak perfúzi tkání. Odtud vychází rationale pro použití VA-ECMO v případě vazodilatačního fenotypu septického šoku jako oběhové podpory. Jedním z problémů by za této situace však mohlo být omezení srdečního preloadu a snížení nativního srdečního výdeje

odčerpáním 3 - 4 litrů krve při iniciaci VA-ECMO. V našem experimentu tato situace nenastala; po napojení na VA-ECMO nedošlo k bezprostřední změně centrálního žilního tlaku, ani k časné změně nativního srdečního výdeje. Stabilita srdečního preloadu a dostatečná náplň mimotělního okruhu však byly udržovány za cenu agresivní tekutinové resuscitace a významné iatrogenní hemodiluce. Takto agresivní přístup k tekutinové resuscitaci mohl být sám o sobě zhoubný pro již tak oslabenou cévní bariéru a cévní tonus, integritu cévního endotelu [Jaffe, 2018; Byrne, 2018]. Tekutinová nálož a následná iatrogenní hemodiluce jsou navíc kontraproduktivní k primárně zamýšlenému účinku VA-ECMO, tj. přispět ke zlepšení tkáňové oxygenace. Progresivní pokles srdeční frekvence v průběhu experimentu vedl k poklesu srdečního výdeje. Mechanismus, který by vysvětlil progresivní pokles srdeční frekvence v souvislosti s napojením na VA-ECMO, není z této studie jednoznačný. Vysvětlení by mohlo spočívat ve zvýšeném aortálním afterloadu, ke kterému dochází vlivem střetu dvou protichůdných toků; střet retrográdního toku, který generuje ECMO a nativního anterogádního aortálního toku. A/nebo se jedná o paradoxní bradykardii následkem náhlého zvýšení dávky noradrenalinu při zahájení VA-ECMO. Samotné vysoké dávky katecholaminů mají toxický účinek na řadu biologických procesů, včetně samotného myokardu [Hartmann, 2017; Andreis, 2016]. Léčba pomocí VA-ECMO neměla v této studii žádný pozitivní účinek; nebyl prokázán pozitivní účinek na hemodynamické změny během septického šoku, ani sepsí indukované změny regionální hemodynamiky. VA-ECMO nemělo příznivý dopad na systémovou zánětlivou odpověď, ani na energetický metabolismus či na čas do smrti zkoumaných subjektů. ECMO samo o sobě může indukovat progresi systémové proinflatorní odpovědi [Millar, 2016]. Hladiny cytokinů v obou skupinách (VA-ECMO vs control) však byly srovnatelné. Je tedy pravděpodobné, že kontakt krve s mimotělním okruhem nevedl k prohloubení prozánětlivé reakce; nicméně je třeba vzít v úvahu velmi krátký časový rámec studie.

Hlavním poznatkem experimentu je, že VA-ECMO není vhodným „rescue“ léčebným postupem u vazoplegického septického šoku. Ve studii bylo patrné, že zahájení VA-ECMO léčby vedlo ke zhoršení hemodynamické situace, což vedlo k agresivní vasopresorické podpoře a tekutinové resuscitaci a ke snížení orgánové perfuze. V konečném důsledku tedy VA-ECMO neovlivnilo příznivě septickým šokem indukovanou multiorgánovou dysfunkci, alteraci energetického metabolismu, systémovou zánětlivou odpověď a čas do úmrtí. Nasazení VA-ECMO v případě refrakterního septického šoku s převahou vazoplegického fenotypu není z fyziologického hlediska tak dobře obhajitelné jako u hypodynamického fenotypu s myokardiální dysfunkcí.

Limity studie: Potenciálním limitem naší studie je nízký počet experimentálních zvířat v souboru. Jednalo se o velmi finančně, časově a personálně náročný experiment. Nicméně, u všech experimentálních zvířat, která byla napojena na VA-ECMO, nebyl během studie prokázán příznivý účinek této metody, a to zcela konzistentně. Je tedy nepravděpodobné, že by navýšení počtu zvířat v souboru výsledek studie změnilo.

6.2. Hodnocení účinnosti terapie sepse mesenchymálními kmenovými buňkami (II)

Podání mesenchymálních kmenových buněk instrumentovaným zdravým zvířatům neovlivnilo systémovou, regionální ani mikrovaskulární hemodynamiku. Nebyly ovlivněny hladiny markerů inflamatorní odpovědi ani ukazatelé oxidativního stresu, rovněž nebyla ovlivněna funkce orgánů. V obou septických skupinách (sepse s MSCs, sepse bez terapie MSCs) došlo k rozvoji sepse dle SEPSIS-3 kritérií. Po indukci peritonitidy vyvinula všechna zvířata hyperdynamickou sepsi se zvýšeným srdečním výdejem a sníženou systémovou cévní rezistencí; v tomto ohledu nebyly mezi skupinami rozdíly. Celková dávka noradrenalinu a čas zahájení vasopresorické podpory byly v obou septických skupinách srovnatelné: 1,093 (885-1,165) minut v septické skupině vs 748 (594 - 944) minut v MSC-septické skupině. Nebyly signifikantní rozdíly v podané celkové dávce resuscitačního krystaloidu. SOFA skóre progresivně rostlo v obou septických skupinách; léčba mezenchymálními buňkami nebyla schopna zvrátit či oslabit rozvoj sepsí indukované orgánové dysfunkce. Tendence k nárůstu SOFA skóre byla dokonce vyšší ve skupině léčené mesenchymálními buňkami, zejména v důsledku časnější iniciace léčby noradrenalinem. Příznivý dopad terapie mesenchymálními buňkami na orgánové funkce nebyl patrný ani po separátním hodnocení funkcí jednotlivých orgánů. Sepse vedla k vzestupu hladin plazmatických cytokinů (TNF- α , IL-6), poskytující tak důkaz o probíhající progresivní prozánětlivé odpovědi. Aplikace MSC buněk nevedla k žádnému příznivému účinku na tuto dynamiku. Porovnáme-li obě skupiny, MSC-sepsis vs sepsis group, povšechně nebyly shledány signifikantní změny spojené s aplikací MSC, a to v žádném časovém milníku. Mitochondriální funkce byly v septickém myokardu potlačeny, kdy tato redukce byla způsobena hlavně inhibicí komplexu II a IV. Aplikace mesenchymálních buněk neměla efekt na funkci myokardiálních mitochondrií a na sarkomerickou kontrakci izolovaných kardiomyocytů v žádné skupině, tj. jak

v instrumentované skupině bez sepse, tak ve skupině septické. Aplikace mesenchymálních kmenových buněk byla dobře tolerována zdravými zvířaty; nebyl zaznamenán žádný vliv MSCs na makro/mikrocirkulaci, na orgánovou a mitochondriální funkci.

Grafy a tabulky podporující argumentaci v textu jsou podrobně uvedeny v publikované studii (viz příloha).

Diskuze

Podání MSCs septickým zvířatům nepřineslo kýžené terapeutické účinky. Předkládáme argumenty, které mohou vysvětlovat rozdíly mezi slibnými výsledky předchozích studií a nápadnou absencí příznivého působení MSC v našem projektu: 1) Předchozí úspěšné animální experimenty byly prováděny především na hlodavcích. Meziidruhové rozdíly v imunitní výbavě a odezvě na inzult jsou dobře zdokumentovány [Seok, 2013] a jistě jsou odpovědné za výše zmíněnou diskrepanci mezi příznivými výsledky předchozích studií a naším experimentem. 2) V preklinických septických experimentech je časté užití zvířat, která jsou zbavena specifických patogenů (SPF – specific pathogen free animals). Alterovaný mikrobiom SPF zvířat ovlivňuje imunitní odezvu v sepsi [Letson, 2019; Hilbert, 2016]. Z tohoto úhlu pohledu je prase dobrým biomodelem pro svoji genetickou a fyziologickou blízkost s člověkem; srovnatelná je i endotoxinová senzitivita a tkáňová antigeneicita [Goldfarb, 2005]. To stejné platí i pro kardiovaskulární a renální fyziologii, včetně fyziologie hyperdynamické cirkulace v sepsi a dalších podobností v odpovědi na septický insult [Goldfarb, 2005]. Prase jako experimentální model skýtá i jiné výhody, které vyplývají z jeho velikosti a snadnější instrumentace, monitorace, odběru vzorků a dat. Prasata domácí jsou také vystavena podobným environmentálním podmínkám jako lidé, tudíž je pravděpodobné, že jejich mikrobiom se bude podobat lidskému [Dobson, 2019; Bendixen, 2016]. 3) Různé

zdroje mesenchymálních buněk mohou vykazovat různé imunomodulační vlastnosti [Mattar, 2015; Arutyunyan, 2016]. V našem experimentu jsme použili MSCs z kostní dřeně. Příznivý efekt MSCs původem z kostní dřeně byl již prověřen v několika malých preklinických studiích [Nemeth, 2009; Mattar, 2015; Ou, 2016]. Mesenchymální kmenové buňky z kostní dřeně jsou také preferovaným zdrojem v klinických situacích. Na rozdíl od našeho experimentu s MSCs odvozenými z kostní dřeně byl prokázán příznivý účinek na septické hemodynamické změny u prasat léčených MSCs původem z pupečníku [Laroye, 2018]. Avšak v experimentu s endotoxinem indukované sepse u myši byl prokázán příznivý vliv na orgánové postižení indukované sepsí a na mortalitu nezávisle na zdroji podaných mesenchymálních buněk [OU, 2016].

4) Problémem může být kompatibilita MSCs s recipientem. Neexistují studie zkoumající tento problém na velkém zvířecím modelu; nicméně Garcia-Sancho et al. ukázal, že lepší HLA shoda dárcovských MSCs s HLA systémem příjemce nezlepšila účinnost terapie u osteoartritidy a degenerativních onemocnění páteře [Garcia-Sancho, 2017].

Na podkladě výsledků naší studie se v současnosti stavíme proti užití MSCs v tak komplexním onemocnění, jakým je sepse. V této rozsáhlé, klinicky relevantní studii na animálním modelu progresivní peritoneální sepse nebyla léčba mesenchymálními buňkami schopna zvrátit ani jednu ze sepsí indukovaných změn na všech sledovaných a do značné míry nezávislých úrovních. Užití MSCs proto vyžaduje před zahájením dalších klinických studií hlubší prozkoumání.

Limity studie: 1) V naší studii byl zkoumán efekt mesenchymálních buněk pouze z jediného zdroje a v podobě jedné fixní dávky v pevně daném čase. Nestanovili jsme možnost dávku eskalovat v závislosti na odpovědi nebo ji podávat v různých timepointech. V předchozích preklinických studiích bylo testováno časné podání MSCs, a to do 4 hodin po indukci sepse [Lalu, 2016], avšak žádná studie netestovala

podání mimo šestihodinový interval. V humánní studii s podáním alogenních lidských A-MSCs (tukových mesenchymálních buněk) byl patrný prozánětlivý, protizánětlivý efekt a efekt prokoagulační v závislosti na načasování intervence [Peerle, 2018]. MSCs vykazují tedy komplexní biologické vlastnosti a účinnost, která se liší s ohledem na načasování intervence; terapeutický interval pro podání MSCs může tedy být relativně úzký. 2) V naší studii jsme chtěli docílit progresivního hyperdynamického septického šoku, a proto nebyla použita antibiotická terapie, která by mohla plnou manifestaci septické odpovědi oslabit. Antibiotická terapie je schopna potencovat účinek MSCs, což dokazuje studie na modelu sepse u myší. Zde byla kombinovaná terapie mesenchymálních buněk s antibiotiky schopna významně zlepšit příznaky sepse a přežití [Alcayaga, 2015].

6.3. Stimulace vagového nervu je schopna oslabit projevy multiorgánové dysfunkce u progresivní peritoneální sepse prasete (III)

Vagová stimulace v intervenované skupině vedla k oslabení progresu sepse, což bylo patrné z nižšího SOFA skóre v porovnání s kontrolní skupinou. Vagová stimulace příznivě ovlivnila respirační systém (hodnoceno pomocí $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), jaterní dysfunkci (hodnoceno pomocí sérové aktivity transamináz a sérové hodnoty bilirubinu, hodnoty u intervenovaných zvířat byly signifikantně nižší). Incidence AKI byla u obou skupin statisticky bez rozdílu (AKI bylo přítomno u 4 z 8 zvířat v septické skupině, AKI u 3 z 9 zvířat v intervenované skupině). Nicméně nárůst sérového kreatininu byl ve skupině vagové stimulace méně výrazný. Počet trombocytů nebyl během experimentu ovlivněn. Hladiny prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8, TNF α) byly v sepsi vysoké, a tak zůstávaly nezávisle na intervenci. Hladina protizánětlivého cytokinu IL-10 nedosáhla detekčního limitu, a to u všech subjektů. Vagová stimulace zcela potlačila sepsí indukovaný vzestup plazmatické hladiny laktátu. Sepsí indukované hemodynamické změny byly příznivě ovlivněny vagovou stimulací. Intervenovaná skupina měla signifikantně nižší spotřebu noradrenalinu, ale čas do zahájení oběhové podpory se významně nelišil. Celková spotřeba resuscitačního krystaloidu byla u zvířat s vagovou stimulací nižší, zároveň byly hodnoty hemoglobinu a diuréza v obou skupinách obdobné.

Během sepse došlo k rozvoji hyperdynamické cirkulace s vysokým srdečním výdejem, vysokou tepovou frekvencí a nízkým tepovým objemem a periferní vazodilatací. Vagová stimulace byla schopna tyto změny částečně zvrátit; stimulací došlo k prevenci zvýšení srdečního výdeje, a to především snížením srdeční frekvence. Vagová stimulace kompletně zabránila přesunu sympato-vagální rovnováhy směrem k sympatické dominanci. Vagová stimulace zabránila poklesu extrakčního poměru kyslíku. Mitochondriální

analýza (pomocí ultrasenzitivní oxygrafie) prokázala u sepse významnou inhibici komplexu II a IV. Vagová stimulace měla významný protektivní účinek na funkci komplexu II a IV. Intervence vedla k potlačení sepsí vyvolaných změn na úrovni kardiomyocytů. Síla kontrakce izolovaných kardiomyocytů byla potlačena u sepse, vlivem vagové stimulace došlo k normalizaci. U septické skupiny byla patrna inhibice sarkomerického zkrácení, která opět vymizela vlivem vagové stimulace.

Grafy a tabulky podporující argumentaci v textu jsou podrobně uvedeny v publikované studii (viz příloha).

Diskuze

U našeho modelu progresivní sepse byla prokázána řada příznivých terapeutických účinku, převážně s ohledem na kardiovaskulární systém a energetický metabolismus a rozvoj (multi)orgánové dysfunkce.

Příznivý dopad redukce vlivu sympatiku na septický myokard byl již ověřen studii s betablokátory a ivabradinem [Morelli, 2013; Miranda, 2017]. Přímý centrální parasymptický účinek na myokard indukovaný stimulací vagu poskytuje další způsob, jak snížit nároky na kardiovaskulární systém během sepse a zajistit protekci myokardu. Přesný způsob působení vagového nervu pod vlivem stimulace není znám. Nízkofrekvenční stimulace (v rozmezí 1-10Hz) by měla preferenčně aktivovat eferentní část vagového nervu [Bonaz, 2013]; v našich experimentálních podmínkách by tak mělo dojít k přímému účinku na myokard vlivem vagové stimulace; analýza variability srdeční frekvence též prokázala převahu parasymptiku vlivem vagové stimulace. Nicméně centrální autonomní efekt, v důsledku aferentní stimulace, nemůže být vyloučen. Vagový nerv obsahuje jak eferentní tak aferentní vlákna [Prechtl, 1990] a je téměř nemožné rozlišit aferentní a eferentní mechanismus akce při

stimulaci vagového nervu. Obě složky vagového nervu se pravděpodobně navzájem ovlivňují a jednají komplexně [Yamakawa, 2015].

V našem modelu bylo patrné, že sepsí indukovaná myokardiální dysfunkce má patogenetickou vazbu na respirační dysfunkci mitochondrií kardiomyocytů; dysfunkce byla způsobena převážně inhibicí komplexu II a komplexu IV. Vagovou stimulací došlo k normalizaci jejich funkce. Vliv vagové stimulace na respirační funkci mitochondrií kardiomyocytů nebyl dosud zkoumán; nicméně některá data naznačují, že právě kardioprotektivní účinek může být částečně zprostředkován zlepšením funkce mitochondrií [Zhao, 2012]. Příznivý účinek vagové stimulace na myokard může být dále vysvětlen snížením produkce ROS mitochondriemi, jak bylo demonstrováno u modelu srdeční ischemie prasete [Shinlapawittayatorn, 2013]. Další recentně publikovaná studie předkládá názor, že $\alpha 7$ -nikotinový-acetylcholinový receptor se může uplatňovat při ochraně lipopolysacharidem indukované kardiomyopatie a apoptózy u myší [Kong, 2018].

Vlivem sepse došlo u našeho modelu k projevům myokardiální deprese, která se manifestovala snížením síly kontrakce trabekul a sníženým sarkomerickým zkrácením u izolovaných kardiomyocytů a sníženým tepovým objemem během experimentu. Vagová stimulace zcela zvrátila tyto projevy myokardiální dysfunkce. Vlivem vagové stimulace došlo ke zvýšení hladiny intracelulárního kalcia, což mohlo přispět k normalizaci kontrakční síly myokardu. Srdeční sarkoplasmatické retikulum vytváří spolu s mitochondriemi tzv. mitochondriální kalciovou mikrodoménu [Kohlhaas, 2013], uptake kalcia tímto komplexem vede ve finále k produkci ATP (adenosin trifosfátu) [Mammucari, 2018].

Příznivé hemodynamické změny vlivem vagové stimulace nelze přičíst pouze účinku na myokard. U intervenovaných zvířat se srovnatelným srdečním preloadem byla patrna nižší spotřeba noradrenalinu a nižší dávka resuscitačního roztoku k udržení hemodynamického cíle. Tento efekt je možné vysvětlit příznivým vlivem vagové stimulace na cévní motoriku a na bariérovou dysfunkci cévní stěno spojenou se zvýšenou propustností při sepsi. Přesný mechanismus však nebyl dosud popisován a nelze jej ze studie odvodit, nicméně by mohl spočívat v zachování buněčného energetického metabolismu vlivem vagové stimulace.

Pozorovaná snížená extrakce kyslíku spolu s mitochondriální respirační dysfunkcí v našem modelu vede k úvaze, že poškození respirační funkce mitochondrií není omezené pouze na srdeční tkáň; vzhledem k vysoké nabídce kyslíku tkáním a snížené extrakci kyslíku tkáněmi je pravděpodobné, že mitochondriální respirační dysfunkce může být i jednou z hlavních příčin (multi)orgánové dysfunkce [Arulkumaran, 2016].

Příznivý účinek vagové stimulace na modulaci inflamatorních mechanismů byl prokázán v řadě studií na malém zvířecím modelu. Dosud nebyl její vliv testován na klinicky relevantním velkém animálním modelu sepse. Vagová stimulace neměla v naší studii překvapivě žádný vliv na hladiny cirkulujících plasmatických cytokinů, což je v rozporu s výsledky jiných autorů. Možným vysvětlením může být existence významných mezidruhových rozdílů v mechanismu cholinergního-antiinflamatorního reflexu. [Borovikova, 2000].

Přestože jsme popsali řadu příznivých účinků vagové stimulace na projevy sepse, není snadné určit primární mechanismus účinku. Absence vlivu na hladinu cirkulujících cytokinů naznačuje možnost, že se nejedná o přímý protizánětlivý účinek této léčebné metody. Na změnách variability srdeční frekvence během sepse lze pozorovat dominanci sympatiku; vlivem vagové stimulace dochází k příklonu sympato-vagální rovnováhy k parasympatické složce. Příznivý účinek

vagové stimulace v mnoha výše popsaných případech naznačuje, že by jedním z mechanismů mohla být obnovená sympato-vagální rovnováha a oslabení sympatické dominance během sepse.

Výše uvedené slibné výsledky významně zvyšují možnost přenosu této metody do klinické praxe. Stimulace vagového nervu byla již schválena pro léčbu refrakterní epilepsie a deprese a aplikace této léčebné metody je relativně bezpečná, bez zásadních vedlejších účinků [Bonaz, 2013; Yang, 2019]. Transkutánní elektroda ke stimulaci pak představuje elegantní neinvazivní přístup s minimálním rizikem. Klinickému využití by mělo předcházet prohloubení znalostí fyziologických a patofyziologických mechanismů neuroinflamatorního reflexu v rámci sepse.

Limity studie: 1) Vagová stimulace byla zahájena 6 hodin po indukci peritonitidy, kdy ještě nedošlo k plnému rozvoji sepse. Zbývá tedy ověřit účinek vagové stimulace u plně rozvinutého septického šoku. 2) Model naší studie a následná in vitro analýza vyloučily možnost následné analýzy mortality a přežití. Struktura budoucích experimentů by měla s touto možností počítat. 3) Noradrenalin podávaný v různých dávkách druhotně během sepse může ovlivnit sympato-vagální rovnováhu cestou komplexu zpětných vazeb. Nelze tedy vyloučit vliv různých dávek noradrenalinu na výsledky a jejich interpretaci. 4) Efekt vagové stimulace byl zkoumán pouze po dobu 24 hodin od indukce peritonitidy. Zbývá objasnit vliv vagové stimulace za podmínek, které odpovídají klinické situaci; dlouhodobá aplikace vagové stimulace u plně rozvinutého septického šoku. 5) U našeho modelu nebyla aplikována antibiotická terapie s cílem dosáhnout progresivní sepse. Tato skutečnost neodpovídá obvyklé klinické situaci. Vliv interakce vagové stimulace s antibiotickou léčbou na průběh sepse vyžaduje bližší prozkoumání.

7. PŘIDRUŽENÉ PRÁCE

Práce navazující na danou problematiku

Omezení možností pro diagnostiku infekcí krevního řečiště pomocí širokospektrých metod v důsledku nedostupnosti slibné metody kombinující PCR a elektropray ionizační spektrometrii (VI)

Rychlá detekce infekčního agens je klíčovým úkonem v terapii sepsy. Metoda PCR/ESI-MS (polymerase chain reaction/electrospray ionization-mass spectrometry, komerční platforma: IRIDICA, Abbot, Molecular, Des Plaines, IL, USA) spárovala PCR metodiku se spektrometrií s cílem zefektivnit detekci klinicky relevantních agens u infekcí krevního řečiště. 160 krevních vzorků prošlo paralelně diagnostikou konvenčními metodami (16S rRNA PCR a hemokultivací) a metodou PCR/ESI-MS. Metoda PCR/ESI-MS je schopna identifikovat 800 bakteriálních a mykotických (*Candida* sp.) agens. Celkem u 47 (29,4 %) vzorků bylo zachyceno klinicky relevantní agens metodou PCR/ESI-MS, které se nepodařilo detekovat pomocí 16S rRNA PCR a/nebo hemokultivací. Rychlost detekce u PCR/ESI-MS byla v průměru o 34 hodin rychlejší. Z pohledu klinika se jednalo o zásadní informace, které měly vliv na průběh léčby.

Tato technologie byla finančně nerentabilní a byla v roce 2017 stažena z oběhu. V současnosti je jediným zbývajícím molekulárním genetickým testem s panbakteriálním spektrem k detekci infekcí krevního řečiště 16S-PCR.

8. ZÁVĚR

Cílem dizertační práce bylo vyhodnotit terapeutický potenciál tří inovativních intervencí, které nebyly dosud zkoumány na klinicky relevantním, velkém zvířecím modelu progresivní sepse. Dvě z nich byly zaměřeny na časnou, pluripotentní modulaci deregulované imuno-inflamatorní odpovědi hostitele, jedna na vyhodnocení přínosu mimotělního oběhu jako rescue léčby u farmakologicky refrakterního vazoplegického septického šoku. Právě mimotělní membránová oxygenace, VA-ECMO, nemá v současnosti jednoznačná doporučení pro refrakterní vazodilatační oběhové selhání v sepsi. Na našem modelu jsme prokázali, že použití VA-ECMO není schopno stabilizací hemodynamiky a zlepšením tkáňové perfúze poskytnout čas do uplatnění kauzální léčby před smrtelným vazoplegickým zhroucením oběhu. Výsledky naší studie tudíž nepodporují užití VA-ECMO v indikaci refrakterního vazodilatačního šoku.

Pomocí etablovaného modelu progresivní peritoneální sepse jsme byli v rozsáhlém projektu schopni ověřit účinnost a bezpečnost intravenózní aplikace mesenchymálních buněk. Velmi slibné účinky, potvrzené mnoha studiemi na malém zvířecím modelu však nebyly naším experimentem v současnosti podpořeny. Studie je tak významným připomenutím zásadních rizik, plynoucích z ukvapeného zevšeobecnění výsledků z preklinických studií na malých laboratorních zvířatech. Ukazuje na nepodkročitelnou úlohu velkých zvířecích modelů v hierarchii medicínského výzkumu.

Naopak naše výsledky ukazují na velmi slibný přínos vagové stimulace na průběh septického šoku. Za více než dvacet let preklinických experimentů jsme se v naší laboratoři dosud neseťkali s intervencí, která by na mnoha nezávislých úrovních byla schopna prokázat signifikantní protektivní účinek, manifestovaný klinicky

významným zmírněním tíže multiorgánové dysfunkce,
hemodynamickou a metabolicko-energetickou stabilizací.

9. PODPORA

Experimentální projekty jsou nezávislé na komerčních subjektech. Práce byly podpořeny Programem rozvoje vědních oborů UK (Progres Q39), granty AZV (projekty 15-32801A, No. 15-15716S) a projektem CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000787 “Fighting Infectious Diseases”, financovaným z EFRR.

10. PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat.....

...prof. MUDr. M. Matějovičovi, PhD za důvěru, podporu a vedení.

...prof. MUDr.R. Lischkemu, PhD; prof. MUDr. P. Pařkovi; prof. MUDr. J. Schütznerovi a prim. MUDr. J. Tvrdoňovi a všem kolegům ze III. chirurgické kliniky 1. LF UK v Praze, FN v Motole za morální a logistickou podporu, bez které bych se projektu nemohla zúčastnit.

...všem spolupracovníkům na experimentech za velmi dobrou pracovní atmosféru, vstřícnost, spolupráci a motivaci.

...mým nejbližším za vše.

11. LITERATURA

ALCAYAGA-MIRANDA, F, CUENCA, J, MARTIN, A, CONTRERAS, L, FIGUEROA, FE, KHOURY, M. Combination therapy of menstrual derived mesenchymal stem cells and antibiotics ameliorates survival in sepsis. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6:199.

ALHAMDI, Y, et al. Circulating pneumolysin is a potent inducer of cardiac injury during pneumococcal infection. *PloS Pathog.* 2015; 11(5):p. E1004836.

ANDERSSON, U, TRACEY,KJ. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J Exp Med.* 2012; 209:1057-1068.

ANDREIS, DT, SINGER, M. Catecholamines for inflammatory shock: Jekyll-and-Hyde conundrum. *Intensive Care Med.* 2016; 42(9):1387-1397.

ARULKUMARAN, N, DEUTSCHMAN, S, PINSKY, MR, t al. ADQI XIV Workgroup. Mitochondrial function in sepsis. *Shock.* 2016; 45:271-281.

ARUTYUNYAN, I, ELCHANINOV, A, MAKAROV A, FATKHUDDINOV, T. Umbilical cordas prospective source for mesenchymal stem cell-based therapy. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:6901286.

AUCHET, T, REIGNIER, MA, GIRERD, N, LEVY, B. Outcome of patients with septic shock and high-dose vasopressor therapy. *Ann Intensive Care.* 2017; 7(1):43.

BARTLSTONE, HJ, NASMYTH, PA. Vasopressin potentiation of catecholamine actions in dog, rat, cat, and rat aortic strip. *Am J Physiol.* 1965;208:754-62.

BEESELEY, SJ, WEBER, G, SARGE, T, NIKRAVAN, S, GRISSOM, CK, LANSPA, MJ, et al. Septic cardiomyopathy. *Crit Care Med.* 2018; 46, 625-634.

BENDIXEN, E. Animal models for translational proteomics. *Prot Clin Appl*. 2014; 8:637-9.

BONAZ, B, PICQ, C, SINNIGR, V, et al. Vagus nerve stimulation: From epilepsy to the cholinergic anti-inflammatory pathway. *Neurogastroenterol Motil*. 2013; 25:208-221.

BOROVIKOVA, LV, IVANOVA, S, ZHANG, M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*. 2000; 405:458-462.

BRECHOT, N, LUYT, CE, SCHMIDT, M, LEPRINCE, P, TROUILLET, JL, LEGER, P, PAVIE, A, CHASTRE, J, COMBES, A. Venoarterial extracorporeal membrane oxygenation support for refractory cardiovascular dysfunction during severe bacterial septic shock. *Crit Care Med*. 2013; 41(7):1616-1626.

BURGDORFF, AM, BUCHER, M, SCHUMANN, J. Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms. *Journal of International Medical Research*. 2018; 46(4): 1303-1310.

BYRNE, L, OBONYO, ng, DIAB, SD, DUNSTER KR, PASSMORE, MR, BOON, AC, HOE, LS, PEDERSEN, S, FUAZI, MH, PIMENTA, LP, et al.: Unintended consequences: fluid resuscitation worsens shock in an ovine model of endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018; 198(8): 1043-1054.

CZURA CJ, TRACEY KJ. Autonomic neural regulation of immunity. *J Intern Med*. 2005; 257:156-166.

DALEY, GQ, HYUN, I, APPERLEY, NKJ, MACHADO, FR, ANGUS, DC, CALANDRA, T, et al. Setting global standards for stem cell research and clinical translation: The 2016 ISSCR Guidelines. *Stem Cell Rep*. 2016; 6:787-97.

DAVIS, AL, et al. American College of Critical Care Medicine clinical practice parameters for hemodynamic support of pediatric and neonatal septic shock. *Crit Care Med.* 2017; 45(6): 1061-1093.

DOBSON, GP, LETSON, HL, BIROS, E, MORRIS, J. Specific pathogen-free (SPF) animal status as a variable in biomedical research: have we come full circle? *EbioMed.* 2019; 41:42-3.

FIRSTENBERG, MS, ABEL, E, BLAIS, D, LOIS, LB, STEINBERG, S, SAI-SUDHAKAR, C, MARTIN, S, SUN, B. The use of extracorporeal membrane oxygenation in severe necrotizing soft tissue infections complicated by septic shock. *Am Surg.* 2010; 76(11): 1287-9.

FLEISCHMANN, C, SHERAG, A, ADHIKARI, NKJ, HARTOG, CS, TSAGANOS, T, SCHLATTMANN, P, ANGUS, DC, REINHART, K, INTERNATIONAL FORUM OF ACUTE CARE TRIALISTS. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016; 193(3):259-72.

GARCIA-SANCHO, J, SANCHEZ, A, VEGA, A, NORIEGA, DC, NOCITO, M. Influence of HLA matching on the efficacy of allogeneic mesenchymal stromal cell therapies for osteoarthritis and degenerative disc disease. *Transpl Dir.* 2014; 3:e205.

GENTILE, LF, CUENCA, AG, EFRON, PA, ANG, D, BIHORAC, A, MCKINLEY, BA, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012; 72(6), 1491-501.

GOLDFARB, RD, DELLINGER, RP, PARRILLO, JE. Porcine models of severe sepsis: emphasis on porcine peritonitis. *Shock.* 2005; 24(Suppl 1):75-81.

GOTO, T, YOSHIDA, K, TSUGAWA, Y, et al. Infectious Disease-Related Emergency Department Visits of Elderly Adults in the United States.

Stades, 2011-2012. *Journal of American Geriatric Society*. 2016; 64(1), 31-36.

GOTTS, JE, MATTHAY, MA. Sepsis: Pathophysiology and clinical management. *BMJ*. 2016; 353.

HARTMANN, C, RADERMACHER, P, WEPLER, M, NUSSBAUM, B. Non-hemodynamic effects of catecholamines. *Shock*. 2017; 48(4):390-400.

HE, X, AI, S, GUO, W, YANG, Y, WANG, Z, JIANG, D, XU, X. Umbilical cord-derived mesenchymal stem (stromal) cells or treatment of severe sepsis: a phase 1 clinical trial. *Translational Research*. 2018; 199, 52-61.

HILBERT, T, STEINHAGEN, F, SENZIG, S, CRAMER, N, BEKEREDJIAN-DING, I, PARCINA, M, et al. Vendor effects on murine gut microbiota influence experimental abdominal sepsis. *J Surg Res*. 2017; 211:126-36.

HUANG, CT, TSAI, YJ, TSAI, PR, KO, WJ. Extracorporeal membrane oxygenation resuscitation in adult patients with refractory septic shock. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012; 146(5):1041-6.

CHENG, A, SUN, HY, LEE, CW, KO, WJ, TSAI PR, CHUANG YC, HU, FC, CHANG SC, CHEN, YC. Survival of septic adults compared with nonseptic adults receiving extracorporeal membrane oxygenation for cardiopulmonary failure: a propensity-matched analysis. *J Crit Care*. 2013; 28(4):532 e1-10.

JAFFE, W, HODGINS, S, MC GEE, WT: Tissue edema, fluid balance, and patient outcomes in severe sepsis: an organ systems review. *J Intensive Care Med*. 2018; 33(9):502-509.

JARKOVSKA, D, MARKOVA, M, HORAK, J, NALOS, L, BENES, J, AL-OBEIDALLAH, M, TUMA, Z, SVIGLEROVA, J, KUNCOVA, J, MATEJOVIC, M, STENGL, M: Cellular mechanisms of myocardial

depression in porcine septic shock. *Front Physiol.* 2018 Jun 12;9:726. doi: 10.3389/fphys.2018.00726. eCollection 2018.

KAHN, JM, ANGUS, DC, COX, CE, HOUGH, CL, WHITE, DB, YENDE, S, CARSON, SS. The Epidemiology of Chronic Critical Illness in the United States. *Crit Care Med.* 2015; 43(2):282-7.

KARVUNIDIS, T, LYSÁK, D, CHVOJKA, J, LEDVINOVÁ, L, RADĚJ, J, NOVÁK, I, MATĚJOVIČ, M. Imunitní homeostáza (deregulace?) v sepsi a septickém šoku. *Anest. Intenziv. Med.* 2013; 24(4):250-263.

KOHLHAAS, M, MAACK, C. Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovasc Res.* 2013; 98:259-268.

KONG, W, KANG, K, GAO, Y, et al. GTS-21 protected against LPS-induced sepsis myocardial injury in mice through $\alpha 7$ nAChR. *Inflammation.* 2018; 41:1073-1083.

LALU, MM, SULLIVAN, KJ, MEI, SH, MOHER, D, STRAUS, A, FERGUSON, DA, et al. Evaluating mesenchymal stem cell therapy for sepsis with preclinical meta-analyses prior to initiating a first-in-human trial. *Elife.* 2016; 5:e17850.

LANDRY, DW, LEVI, HR, GALLANT, EM, et al. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilatation of septic shock. *Circulation.* 1997; 95:1122-5.

LANDRY, DW, OLIVER, JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med.* 2001; 345:588-95.

LAROYE, C, LEMARIÉ, J, BOUFENZER, A, LABROCA, P, CUNAT, L, ALAUZET, C, et al. Clinical –grade mesenchymal stem cells derived from umbilical cord improve septic shock in pigs. *Intensive Care Med Exp.* 2018; 6:24.

LETSON, HI, MORRIS, J, BIROS, E, DOBSON, GP. Conventional and specific-pathogen free rats responds differently to anesthesia and surgical trauma. *Sci Rep.* 2019; 9:9399.

LEVY, BD, SERHAN, CN. Resolution of acute inflammation in the lung. *Annu Rev Physiol*. 2014; 76:467-92.

LI, Y, LI, H, ZHANG, D. Analysis of incidence and risk factors of septic cardiomyopathy. *Chin. J. Emerg. Med*. 2019; 28, 836-840.

LIN, H, WANG, W, LEE, M, MENG, Q, REN, H. Current status of septic sardiomyopathy: basic science and clinical progress. *Front. Pharmacol*. 2020; 11:210.

LIU, V, ESCOBAR, GJ, GREENE, JD, et al. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *Journal of American Medical Association (JAMA)*. 2014; 312(1), 90-92.

MacLAREN, G, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for refractory septic shock in children: one institution's experience. *Pediatr Crit Car Med*. 2007. 8(5): 447-51.

MAMMUCARI, C, RAFFAELLO, A, VECCELLIO REANE, D, et al. Mitochondrial calcium uptake in organ physiology: From molecular mechanism to animal models. *Pflugers Arch*. 2018; 470:1165-1179.

MARTIN, C, LEONE, M, VIVIAND, X, AYEM, ML, GUIEU, R. High adenosine plasma concentration as prognostic index for outcome in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2000; 28:3198-202.

MATTAR, P, BIEBACK, K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Front Immunol*. 2015; 6:560.

MILLAR, JE, FANNING, JP, Mc DONALD, CI, McAULEY, DF, FRASER, JF: The inflammatory response to extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): a review of the pathophysiology. *Crit Care*. 2016; 20(1):387.

MIRA, JC, GENTILE, LF, MATHIAS, BJ, EFRON, PA, BRAKENRIDGE, SC, MOHR, AM, MOORE, FA, MOLDAWER, LL. Sepsis Pathophysiology, Chronic Critical Illness, and Persistent

Inflammation-Immunosuppression and Catabolism Syndrome. *Critical Care Med.* 2017; 45:253-262.

MIRANDA, ML, BALARINI, MM, BALTHAZAR DS, et al. Ivabradine attenuates the microcirculatory derangements evoked by experimental sepsis. *Anesthesiology.* 2017; 126:140-149.

MORELLI, A, ERTMER, C, WESTPHAL, M, et al. Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: A randomized clinical trial. *JAMA.* 2013; 310:1683-1691.

NEMETH, K, LEELAHAVANICHKUL, A, YUEN, PS, MAYER, B, PARMELEE, A, DOI, K, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E (2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* 2009; 15:42-9.

OPAL, SM and COHEN, J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med.* 1999; 27(8): p. 1608-16.

OU, H, ZHAO, S, PENG, Y, XIAO, X, WANG, Q, LIU, H, et al. Comparison of bone marrow tissue- and adipose tissue- derived mesenchymal stem cells in the treatment of sepsis in a murine model of lipopolysaccharide-induced sepsis. *Mol Med Rep.* 2016; 14:3862-70.

OSUCHOWSKI MF, et al.: Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (Mqtipss): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis. *Shock.* 2018; 50(4):377-380.

PARKER, MM, SHELFHAMER, JH, BACHARACH, SL, GREEN, MV, NATANSON, C, FREDERICK, TM, DAMSKE, BA, PARRILLO, JE. Profound but Reversible Myocardial Depression in Patients with Septic Shock. *Annals of Internal Medicine.* 1984; 100:483-490.

PEERLEE, D, VAN VUGHT, LA, SCICLUNA, BP, MAAG, A, LUTTER, R, KEMPER, EM, VAN DER POLL, T. Intravenous Infusion of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Modifies the Host Response to Lipopolysaccharide in Humans: A Randomized, Single-Blind, Parallel Group, Placebo Controlled Trial. *Stem Cells*. 2018; 36(11), 1778-1788.

POŘÍZKA, M, et al. Successful use of extra-corporeal membrane oxygenation in a patient with streptococcal sepsis: a case report and review in literature. *Prague Med Rep*. 2015; 116(1):57-63.

PRECHTL, JC, POWLEY, TL. The fiber composition of the abdominal vagus of the rat. *Anat Embryol (Berl)*. 1990; 181:101-115.

RHODES, A, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*. 2017; 43(3):304-377.

SATO, R, KURIYAMA, A, TAKADA, T, NASU, M, LUTHE, SK. Prevalence and risk factors of sepsis-induced cardiomyopathy: a retrospective cohort study. *Medicine*. 2016; 95:e5031.

SEOK, J, WARREN, HS, CUENCA, AG, MINDRINOS, MN, BAKER, HV, XU, W, et al.: Genomic response in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110:3507-12.

SHEKAR, K, GREGORY, SD, FRASER, JF. Mechanical circulatory support in the new era: an overview. *Crit Care*. 2016; 20:66.

SHINLAPAWITTAYATORN, K, CHINDA, K, PALEE, S, et al. Low – amplitude, left vagus nerve stimulation significantly attenuates ventricular dysfunction and infarct size through prevention of mitochondrial dysfunction during acute ischemia reperfusion injury. *Heart Rhythm*. 2013; 10:1700-1707.

SCHMIDT, M, BRECHOT, N, COMBES, A: Ten situations in which ECMO is unlikely to be successful. *Intensive Care Med.* 2016; 42(5): 750-752.

SCHNEIDER, F, LUTUN, PH, COUCHOT, A, BILBAUT, P, TEMPE, JD. Plasma cyclic guanosine 3'-5' monophosphate concentrations and low vascular resistance in human septic shock. *Intensive Care Med.* 1993; 19:99-104.

SCHULTE, A, LICHTENSTERN, C, HENRICH, M, WEIGAND, MA, UHLE, F. Loss of vagal tone aggravates systemic inflammation and cardiac impairment in endotoxemic rats. *The Journal of Surgical Research.* 2014; 188(2), 480-488.

SINGER, M, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA.* 2016; 315(8), 801-810.

SCHLOSSER, K, WANG, JP, DOS SANTOS, C, WALLEY, KR, MARSHALL, J, FERGUSON, DA, MEI, SHJ. Effects of Mesenchymal Stem Cell Treatment on Systemic Cytokine Levels in Phase 1 Dose Escalation Safety Trial of Septic Shock Patients. *Critical Care Medicine.* 2019; 47(7), 918-925.

SONG XM, LI, JG, WANG, YL, et al. The protective effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway against septic shock in rats. *Shock.* 2008; 30:468-472.

THIEMERMANN, C, SZABO, C, MITCHELL, JA, VANE, JR. Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:267-71.

TIMMERMANS K, KOX, M, SCHEFFER, GJ, et al. Danger in the intensive care unit: Damps in critically ill patients. *Shock.* 2016; 45:108-116.

TRACEY, KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002; 420, 853-859.

TRACEY, KJ. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest.* 2007; 2007; 117:289-296.

UVÍZL, R, et al. Patient survival, predictive factors and disease course of severe sepsis in Czech intensive care units: A multicentre, retrospective, observational study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2016; 160(2):287-297.

VIGNESH, C, KUMAR, M, VENKATARAMAN, R, RAJAGOPAL, S, RAMAKRISHNAN, N, ABRAHAM, BK. Extracorporeal membrane oxygenation in drug overdose: a clinical case series. *Indian J Crit Care Med.* 2018; 22(2): 111-115.

VINCENT, JL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006; 34, s. 344-353.

WALKEY, AJ, LAGU, T, LINDENAUER, PK. Trends in Sepsis and Infection Sources in the United States. A Population-Based Study. *Ann Am Thorac Soc.* 2015; 12(2):2016-220.

WEINBERG, RL, BOUCHARD, NC, ABRAMS, DC, BACCHETTA, M, DZIERBA, AL, BURKART, KM, BRODIE, D. Venoarterial extracorporeal membrane oxygenation for the management of massive amlopidine overdose. *Perfusion.* 2014; 29(1):53-56.

YAMAKAWA, K, RAJEDRAN, PS, TAKAMIYA, T, et al. Vagal nerve stimulation activates vagal afferent fibers that reduce cardiac efferent parasympathetic effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015; 309: H1579-H1590.

YANG, J, PHI, JH. The Present and Future of Vagus Nerve Stimulation. *Journal of Korean Neurosurgical Society.* 2019; 62(3), 344-352.

YEO, HJ, JEON, D, KIM, YS, CHO, WH, KIM, D. Veno-veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation treatment in patients with

severe acute respiratory distress syndrom and septic shock. *Crit Care*. 2016; 20:28.

ZHAO, M, SUN, L, LIU, JJ, et al. Vagal nerve modulation: A promising new therapeutic approach for cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012; 39:701-705.

12. PŘÍLOHY

- (I) CHVOJKA, Jiří, MARTÍNKOVÁ, Vendula, BENEŠ, Jan, VALEŠOVÁ, Lenka, DANIHEL, Vojtěch, NALOS, Lukáš, MATĚJOVIČ, Martin. Mechanical Circulatory Support in Refractory Vasodilatory Septic Shock: A Randomized Controlled Porcine Study. *SHOCK*. 2020 JAN;53(1):124-131. (IF 3,083, category rank-Q1)
Chvojka, J., a Martínková, V. contributed equally to this work.
- (II) HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, MARTÍNKOVÁ, Vendula, TÉGL, Václav, VIŠTEJNOVÁ, Lucie, KUNCOVÁ, Jitka, KOHOUTOVÁ, Michaela, JARKOVSKÁ, Dagmar, BENEŠ, Jan, ŠTENGL, Milan, MATĚJOVIČ, Martin. Evaluation of mesenchymal stem cell therapy for sepsis: a randomized controlled porcine study. *Frontiers Immunology*. 2020; 11:126. (IF 4,716, category rank-Q1)
- (III) KOHOUTOVÁ, Michaela, HORÁK, Jan, JARKOVSKÁ, Dagmar, MARTÍNKOVÁ, Vendula, TÉGL, Václav, NALOS, Lukáš, VIŠTEJNOVÁ, Lucie, BENEŠ, Jan, ŠVÍGLEROVÁ, Jitka, KUNCOVÁ, Jitka, MATĚJOVIČ, Martin, ŠTENGL, Milan. Vagus Nerve Stimulation Attenuates Multiple Organ Dysfunction in Resuscitated Porcine Progressive Sepsis. *Critical Care Medicine*. 2019; 47(6), 461-469. (IF 6,971, category rank-Q1)

- (IV) HORÁK, Jan, NALOS, Lukáš, MARTÍNKOVÁ, Vendula, BENEŠ, Jan, ŠTENGL, Milan, MATĚJOVIČ, Martin. Mesenchymal Stem Cells in Sepsis and Associated Organ Dysfunction: A Promising Future or Blind Alley? *Stem Cells International*. 2017; (IF 3,54, category rank-Q2)
- (V) HORÁK Jan MARTÍNKOVÁ, Vendula, RADĚJ, Jaroslav, MATĚJOVIČ, Martin. Back to Basics: Recognition of Sepsis with New Definition. *J Clin Med*. 2019 Nov 1;8(11):1838. (IF 5,688, category rank-Q1)
- (VI) TKADLEC, Jan, BÉBROVA, Eliska, BEROUŠEK, Jan, VYMAZAL, Tomáš, ADÁMKOVÁ, Jaroslava, MARTÍNKOVÁ, Vendula, MOSER, Claus, DRAGON, Florea, DŘEVÍNEK, Pavel. Limited diagnostic possibilities for bloodstream infections with broad-range methods: A promising PCR/electrospray ionization-mass spectrometry platform is no longer available. *Microbiologyopen*. 2020; 9(5):e1007. (IF 2,710, category rank-Q2)