

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni

**AKUTNÍ POŠKOZENÍ LEDVIN V SEPSI:
PATOFYZIOLOGIE A LÉČEBNÉ ASPEKTY**

Jiří Chvojka
Dizertační práce



Plzeň 2010

ABSTRAKT

Sepse a septický šok zůstávají dominantní příčinou mortality na nekoronárních jednotkách intenzivní péče. Prognóza septických pacientů je významně zhoršena za přítomnosti akutního poškození ledvin. I přes intenzivní experimentální a klinický výzkum zůstává mnoho patofyziologických mechanismů vedoucích k ledvinné dysfunkci v sepsi nadále nejasnými. Obdobně kontroverzní je otázka využití mimotělních očišťovacích metod v léčbě sepse. Cílem naší práce bylo objasnit chování systémové a regionální hemodynamiky, mikrocirkulace a energetického metabolismu ledvin na klinicky relevantním modelu septického šoku. Na stejném modelu jsme se snažili prokázat pozitivní přínos dvou různých hemoelminačních metod na různých úrovních biologické odpovědi organismu na infekční inzult.

Klíčová slova

Sepse – akutní poškození ledvin – akutní tubulární nekróza – mikrocirkulace – hemofiltrace – párová plazmafiltrace-adsorpce

Abstract

Sepsis and septic shock remain major cause of mortality in non-coronary intensive care units. Prognosis of septic patients worsens further in case of concomitant acute kidney injury. Pathophysiological pathways leading to renal dysfunction in sepsis remain unclear despite of enormous experimental and clinical research. Similarly, the role of extracorporeal blood purification techniques as an adjunctive treatment in sepsis is highly controversial. The aim of our study was to dynamically assess renal haemodynamic, microvascular and metabolic responses in a porcine clinically relevant model of septic shock. The same experimental model was used in experiments elucidating potential benefit effects of two distinct haemopurification methods on different biological responses to infectious insult.

Key words

Sepsis – acute kidney injury – acute tubular necrosis – microcirculation – haemofiltration – coupled plasmafiltration-adsorption

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

Jiří Chvojka

Datum:

Podpis: Jiří Chvojka

Přehled použitých zkratk

ACEi angiotensin-converting enzyme inhibitor; inhibitor angiotensin-konvertujícího enzymu

ADMA asymmetric dimethyl arginine; asymetrický dimetylarginin

AKI acute kidney injury; akutní poškození ledvin

ARB angiotensin II receptor blocker; blokátor receptoru pro angiotenzin II

ATN acute tubular necrosis; akutní tubulární nekróza

CLP cecal ligation puncture; cekální ligace a punkce

CO cardiac output; srdeční výdej

CPFA coupled plasmafiltration-adsorption; párová plazmafiltrace-adsorpce

CVP central venous pressure; centrální žilní tlak

CVVH continuous veno-venous haemofiltration; kontinuální veno-venózní hemofiltrace

CVVHD veno-venous haemodialysis; kontinuální veno-venózní hemodialýza

CVVHDF continuous veno-venous haemodiafiltration; kontinuální veno-venózní hemodiafiltrace

FHI flow heterogeneity index

HABF hepatic artery blood flow; průtok krve jaterní tepnou

HVHF high-volume haemofiltration; vysokoobjemová hemofiltrace

ICaL L type calcium current; vápníkový kanál typu L

IL-6 interleukin 6

ITBV intrathoracic blood volume; nitrohruční objem krve

JIP jednotka intenzivní péče

KBR ketone bodies ratio; poměr ketolátek

MAP mean arterial pressure; střední arteriální tlak

MFI mean flow index

MPAP mean arterial pulmonary pressure; střední tlak v plicnici

MODS multiple organ dysfunction syndrome; syndrom multiorgánové dysfunkce

NO nitric oxide; oxid dusnatý

Nox nitrates/nitrites ratio; poměr nitrátů/nitritů

NPY neuropeptide Y; neuropeptid Y

PAOP pulmonary artery occlusion pressure; tlak v zaklínění v plicnici

PVBF portal vein blood flow; průtok krve portální žilou

PVR pulmonary vascular resistance; plicní vaskulární rezistence

RBF renal blood flow; průtok krve renální tepnou

RVP renal venous pressure; renální žilní tlak

RVR renal vascular resistance; renální vaskulární rezistence
ROS reactive oxygen species; volné kyslíkové radikály
RNOS reactive nitrogen species; volné dusíkaté radikály
RRT renal replacement therapy; náhrada funkce ledvin
SDF side stream dark field;
SVR systemic vascular resistance; systémová vaskulární rezistence
TAT thrombin-antithrombin komplex
TBARS thiobarbituric acid reactant species
TNF- α tumor nekrotizující faktor alfa
VIP vasoactive intestinal peptide; vazoaktivní intestinální peptid
vWF von Willebrand factor; von Willebrandův faktor

OBSAH

1	Úvod	2
2	Původní práce	6
2.1	Patofyziologie AKI v sepsi	6
2.2	AKI V SEPSI: LÉČEBNÉ aspekty	6
2.3	Práce přímo navazující na danou problematiku	7
3	Současný stav problematiky	9
3.1	PATOFYZIOLOGIE AKI	9
3.1.1	Ledviny u kriticky nemocných	9
3.1.2	Mechanismy AKI v sepsi	11
3.2	Mimotělní očišťovací metody v léčbě AKI v sepsi	13
3.2.1	Vysokoobjemová hemofiltrace	14
3.2.2	Párová plazmafiltrace - adsorpce	14
4	LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY STUDIÍ	15
5	CÍLE STUDIÍ	15
6	METODICKÉASPEKTY	16
6.1	EXPERIMENTÁLNÍ model	16
6.1.1	Experimentální model fekální peritonitidy	16
6.1.2	Protokol studie	18
6.1.3	Měření systémové a regionální hemodynamiky, mikrocirkulace, odvozené výpočty 19	
6.1.4	Analyzované parametry, krevní a histologické vzorky	20
6.2	Experimentální skupiny – randomizace	20
6.3	Nastavení očišťovacích metod	21
6.3.1	Nastavení kontinuální veno-venózní hemofiltrace	21
6.3.2	Nastavení párové plazmafiltrace-adsorpce	21
7	SOUHRN VÝSLEDKŮ STUDIÍ A OBECNÁ DISKUZE	21
7.1	Renální hemodynamika, mikrocirkulace a metabolismus ve zvířecím modelu peritonitidou indukovaného septického šoku	21
7.2	Vysokoobjemová hemofiltrace v septickém šoku	23
7.3	Párová plazmafiltrace-adsorpce v modelu septického šoku	25
8	SOUHRN VÝSLEDKŮ	27
9	Práce bezprostředně navazující na náš výzkum	28
10	PODPORA	29
11	LITERATURA	30
12	PODĚKOVÁNÍ	34
13	PŘÍLOHY	35

1 ÚVOD

Sepse a septický šok představují jednu z nejčastějších příjmových diagnóz na jednotkách intenzivní péče (JIP). Společně s epidemií kardiovaskulárních chorob a nádorů, tak současná medicína čelí epidemii sepse, která se stává významným medicínským a socioekonomickým problémem. Incidence sepse každým rokem setrvale narůstá a představuje 10. nejčastější příčinu úmrtí. Jen v USA je ročně hospitalizováno pro sepsi více jak 750 000 pacientů, jejichž mortalita je enormní [Angus et al. 2001]. Základním patofyziologickým mechanismem je nekontrolovaná systémová odpověď na infekční inzult s aktivací pro- a proti- zánětlivých mechanismů, nadprodukcí širokého spektra cytokinů, endogenních působků a mediátorů, kyslíkových a dusíkatých radikálů. Jejich komplexní interakce na úrovni systémové a regionální cirkulace, mikrocirkulace, koagulačního systému, na úrovni cévního endotelu a na úrovni molekulární vedou k dysfunkci celé řady orgánů vzdálených od primárního infekčního ložiska. Klinicky se tento stav manifestuje multiorgánovým selháváním (MODS, multiple organ dysfunction syndrome). Incidence orgánové dysfunkce 1, 2, 3 a 4 orgánů u septických pacientů se pohybuje okolo 74 %, 21 %, 5 % a 1 % s odpovídající narůstající mortalitou 21 %, 44 %, 65 % a 76 % [Vincent et al. 2006]. Mezi tyto orgánové dysfunkce patří akutní poškození ledvin (AKI, acute kidney injury), jehož je sepse nejčastější příčinou. Navíc incidence AKI proporcionálně roste s tíží sepse a postihuje až 51% pacientů se septickým šokem [Rangel-Frausto et al. 1995]. Mortalita pacientů se septickým šokem a AKI je vysoká, renální dysfunkce vyžadující náhradu funkce ledvin je nezávislým rizikovým faktorem úmrtí [Hoste et al. 2003] a AKI tak představuje obávanou komplikaci sepse/septického šoku. Již malé zhoršení ledvinných funkcí ovlivňuje nepříznivě mortalitu [Chertow et al. 2006] a jak ukazují recentní klinické studie, AKI u kriticky nemocných významně ovlivňuje nejen krátkodobou, ale i dlouhodobou prognózu těchto pacientů [Triverio et al. 2009]. Ohrožení jsou zejména pacienti s již preexistující ledvinnou dysfunkcí, u nichž po epizodě akutního selhání ledvin vyžadujícího mimotělní kontinuální náhradu funkce dochází k rychlejší progresi do terminálního selhání. Rozlišení sepse od jiných příčin akutního poškození ledvin může být pro lékaře významným zjištěním, protože patofyziologie AKI v sepsi se pravděpodobně značně liší od jiných forem AKI a může tak být spojeno s odlišnou mortalitou a odpovědí na léčebné intervence [Uchino et al. 2005].

Jedním z důvodů, proč zůstává mortalita septického šoku, zejména je-li přítomno akutní renální selhání, vysoká, je absence kauzální terapie. Je pochopitelné, že k vývoji takové

terapeutické intervence či cílené léčby je nejprve nezbytné důkladné pochopení patofyziologických mechanismů. Avšak i přes tato závažná fakta a intenzivní experimentální i klinický výzkum zůstává v oblasti patofyziologie akutního poškození ledvin v sepsi celá řada nejasností. Vzhledem k etickým aspektům nelze detailně změny vedoucí k AKI v sepsi sledovat u pacientů. Základní výzkum se tedy opírá především o zvířecí modely. I přes mnohaletý výzkum patofyziologických mechanismů akutního poškození ledvin v sepsi a septickém šoku na různých zvířecích modelech není, jak již bylo zmíněno výše, dosud žádná kauzální léčba známa. Tento fakt je důkazem, jak obtížná je translace výsledků z experimentálních studií do běžné humánní praxe. Možným vysvětlením je vysoká heterogenita experimentálních modelů. Ideální zvířecí model by měl věrně napodobit nejen hemodynamickou odpověď organismu na sepsi/septický šok, ale zároveň i odpověď imunitního systému s prozánětlivou i protizánětlivou fází, molekulární i hemodynamickou odpověď mikrocirkulace, napodobit rozvoj jednotlivých orgánových dysfunkcí a stejně tak přinést možnost sledovat obdobné histopatologické změny v postižených orgánech jako v případě lidské sepse. V experimentu lze k indukci sepse využít obecně dvou způsobů. Prvním je kontinuální či bolusové podání živých bakterií či komponent mikrobiální stěny, např. endotoxinu, intravenózně. Druhou možností je infikování a indukce vzniku septického fokusu v peritoneální dutině či plicích; model fekální peritonitidy, cekální ligace a punkce (cecal ligation puncture – CLP) či instilace živých bakterií do plic. Heterogenní volba pokusného zvířete (hlodavci, ovce, vepř, psi, primáti), způsobu indukce sepse (bolus či infúze endotoxinu, CLP), délky trvání (hodiny vs. dny), volba terapeutických intervencí i vlastní mezidruhově odlišná odpověď na septický inzult však vede k vysoké rozmanitosti získaných dat s obtížnou interpretovatelností výsledků a jejich konečnou aplikací v humánní medicíně. Tak lze vysvětlit, proč celá řada v experimentu slibných terapeutických přístupů, jako např. blokace receptoru pro tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α), selhala v klinických studiích [Doi et al. 2009]. Potřeba kvalitních experimentálních studií věrně napodobujících humánní sepsi je tedy evidentní. Bez těchto modelů bude i nadále velmi obtížné hledat nové terapeutické směry v septickém šoku a ledvinném poškození. Naší snahou bylo tedy vytvořit maximálně klinicky relevantní zvířecí model, který by dobře kopíroval humánní odpověď organismu na sepsi. Zároveň ale umožnil relativně snadné a široké pozorování patofyziologických dějů na různých úrovních, které se při rozvoji orgánových dysfunkcí, zejména ledvinné, uplatňují.

Přibližně 4% pacientů s akutním poškozením ledvin dospěje do stádia vyžadujícího mimotělní metodu očišťování krve (RRT, renal replacement therapy) [Uchino 2006] a RRT se tak stávají nedílnou součástí jejich terapie. Navzdory rutinnímu používání RRT stále existuje řada kontroverzních otázek, na jejichž zodpovězení není dostatek vědeckých důkazů. Týkají se především načasování zahájení/ukončení RRT, její intenzity či volby modalit. V poslední době byla značně diskutovaná otázka přínosu těchto metod u septických pacientů jako podpůrné terapie z tzv. „non-renální“ indikace. Základním východiskem pro tento koncept je schopnost kontinuálních očišťovacích metod eliminovat z organismu různé mediátory sepse. Sepse je charakterizována nadprodukcí širokého spektra pro- i protizánětlivých působků (cytokinů, eikosanoidů, vazogenních aminů apod.) Dosavadní experimentální a některé klinické práce prokázaly schopnost hemoelimačních metod tyto působky odstraňovat. Ať již procesem hemofiltrace či difúze či adsorpce na povrch dialyzační membrány. Některé práce prokázaly větší hemodynamickou stabilitu při použití vysokoobjemové hemofiltrace (HVHF, high-volume haemofiltration). Tento imunomodulační vliv na tkáňovou a intravaskulární inflamaci by teoreticky mohl ovlivnit stonání a přežívání septických pacientů [Ronco 2007]. Zejména experimentální práce však měly řadu metodologických nedostatků. Nevhodně zvolená indukce sepse s krátkým trváním terapeutické intervence, zahájení kontinuálních metod v době či velmi krátce po indukci sepse. V době absence velkých randomizovaných studií se většina experimentálních prací zabývala pouze vlivem očišťovacích metod na hemodynamickou stabilitu, potřebu katecholaminů v septickém šoku a minimálně zkoumala vliv těchto metod na ostatní biologické systémy. Podobně byla-li sledována v klinických studiích mortalita, byla porovnávána pouze s historickými kontrolami. Stanovili jsme si tedy za cíl sledovat vliv mimotělní očišťovací metody nejen na systémovou a regionální hemodynamiku, ale i na další na sobě nezávislé úrovně biologické odpovědi organismu na infekční inzult v maximálně relevantním experimentálním modelu.

Druhá část dizertační práce je tak věnována léčbě akutního poškození ledvin u kriticky nemocných obecně, a zároveň jsou zde prezentovány výsledky našich prací týkajících se vysokoobjemové hemofiltrace (HVHF, high-volume haemofiltration) a párové plazmafiltrace-adsorpce (CPFA, coupled plasmafiltration adsorption), v klinicky relevantním modelu septického šoku u zvířete. Zajímá nás vliv těchto metod na různých patofyziologických úrovních, vliv na regionální hemodynamiku a mikrocirkulaci, oxidační stres, endoteliální dysfunkci a inflamatorní systémovou odpověď organismu.

Třetí část dizertace shrnuje práce, které bezprostředně navazují na náš základní výzkum. Jednou z dobře klinicky rozpoznatelných orgánových dysfunkcí v sepsi a septickém šoku je sepsí indukovaná kardiální dysfunkce, tzv. septická kardiomyopatie. Jedním z patofyziologických mechanismů vedoucích k septické kardiomyopatii je i narušený transport kalcia [Rudiger 2007]. Z dosavadních experimentálních prací vyplývá, že možným důvodem je redukce počtu kalciových kanálů typu L (ICaL, L-type calcium current) s následným zkrácením trvání akčního potenciálu [Lew et al. 1996]. V našich experimentálních studiích na zvířecím modelu septického šoku u prasete jsme se zaměřili na vliv sepse na kalciové kanály typu L, trvání akčního potenciálu a dále na vliv mimotělních očišťovacích metod na tyto parametry.

Realizace kontinuální mimotělní očišťovací metody vyžaduje obvykle použití antikoagulace k prevenci možného srážení krve uvnitř mimotělního okruhu. Možnostmi jsou buď celkové, systémové, podání antikoagulace, např. nefrakcionovaného heparinu, či regionální antikoagulace realizovaná nejčastěji podáním citrátu. Oba způsoby mohou vést k celé řadě nežádoucích účinků a nezanedbatelné jsou i finanční náklady [Oudemans-van Straaten 2006]. Je známou skutečností, že krev se při nízkých teplotách stává nesrážlivou [Rohrer 1992]. V naší experimentální práci jsme vyvinuli způsob selektivního ochlazení krve v mimotělním okruhu s následným opětovným ohřevem na tělesnou teplotu. Následně jsme testovali hypotézy, že toto selektivní ochlazení krve v okruhu kontinuální veno-venózní hemofiltrace nebude vyžadovat podání jiných antikoagulancií, sledovali jsme bezpečnost tohoto nového způsobu antikoagulace a vliv na biologickou odpověď organismu.

Sepse je typická svoji nadprodukcí rozličných pro- i protizánětlivých mediátorů a modulátorů imunitní odpovědi. Mezi takové mediátory patří i vazoaktivní intestinální peptid (VIP, vasoactive intestinal peptide), který by dle některých experimentálních prací mohl být případným terapeutickým cílem v sepsi [Hamidi et al. 2006]. Nervový systém je pravděpodobně schopen modulovat imunitní odpověď organismu prostřednictvím autonomního nervového systému [Bellinger et al. 2008]. Možným mediátorem této odpovědi může být i neuropeptid Y (NPY, neuropeptide Y).

Snažili jsme se proto zjistit, zda použití hemofiltrace signifikantně ovlivní tkáňové či plazmatické hladiny VIP a NPY v modelu fekální peritonitidy u prasete.

2 PŮVODNÍ PRÁCE

Tato dizertační práce vychází z komentovaného souboru původních experimentálních prací a přehledových článků, jejichž seznam je uveden níže.

2.1 PATOFYZIOLOGIE AKI V SEPSI

CHVOJKA, Jiří; SÝKORA, Roman; KROUŽECKÝ, Aleš; RADĚJ, Jaroslav; VARNEROVÁ, Veronika; Karvunidis, Thomas; HES, Ondřej; NOVÁK, Ivan; RADERMACHER, Peter; MATĚJOVIČ, Martin. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs.. *Crit Care*. 2008, 6, s. R164. **IF 4,55**

CHVOJKA, Jiří; SÝKORA, Roman; KARVUNIDIS, Thomas; RADĚJ, Jaroslav; KROUŽECKÝ, Aleš; NOVÁK, Ivan; MATĚJOVIČ, Martin. New developments in septic acute kidney injury. *Physiol Res*. 2010. Jun 9. [Epub ahead of print] **IF 1,430**

CHVOJKA, Jiří; MATĚJOVIČ, Martin. Syndrom multiorgánové dysfunkce: update 2010. *Cor Vasa*. 2010, 52, s. 116-120.

2.2 AKI V SEPSI: LÉČEBNÉ ASPEKTY

SÝKORA, Roman; CHVOJKA, Jiří; KROUŽECKÝ, Aleš; RADĚJ, Jaroslav, KARVUNIDIS Thomas; VARNEROVÁ, Veronika; NOVÁK, Ivan; MATĚJOVIČ, Martin. High versus standard-volume haemofiltration in hyperdynamic porcine peritonitis: effects beyond haemodynamics? *Intensive Care Med*. 2009, 2, s. 371-80. **IF 5,168**

RS and JC contributed equally to this study

SÝKORA, Roman; CHVOJKA, Jiří; KROUŽECKÝ, Aleš; RADĚJ, Jaroslav; KUNCOVÁ, Jitka; Jaroslav, KARVUNIDIS Thomas; VARNEROVÁ, Veronika; NOVÁK, Ivan; MATĚJOVIČ, Martin. Coupled plasma filtration adsorption in experimental peritonitis-induced septic shock. *Shock*. 2009, 5, s. 473-80. **IF 2,871**

RS and JC contributed equally to this study

CHVOJKA, Jiří; RADĚJ, Jaroslav; KROUŽECKÝ, Aleš; KARVUNIDIS, Thomas; NOVÁK, Ivan; MATĚJOVIČ, Martin. Náhrada a podpora funkce ledvin u kriticky nemocných – update 2009. *Anest. intenziv. Med.*, 21, 2010, 3, s. 153-157.

SÝKORA, Roman; CHVOJKA, Jiří; KROUŽECKÝ, Aleš; RADĚJ, KUNCOVÁ, Jitka; Jaroslav, KARVUNIDIS Thomas; VARNEROVÁ, Veronika; NOVÁK, Ivan; MATĚJOVIČ, Martin. Hemoeliminační metody v léčbě sepse: současný stav. *Vnitr Lek.* 2008, 10, s. 1000-5.

2.3 PRÁCE PŘÍMO NAVAZUJÍCÍ NA DANOU PROBLEMATIKU

ŠTENGL, Milan; BARTÁK, František; SÝKORA, Roman; CHVOJKA, Jiří; BENEŠ, Jan; KROUŽECKÝ, Aleš; NOVÁK, Ivan; ŠVÍGLEROVÁ, Jitka; KUNCOVÁ, Jitka; MATĚJOVIČ, Martin. Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from pigs with hyperdynamic septic shock. *Crit Care Med.* 2010, 2, s. 579-87. **IF 6,373**

ŠTENGL, Milan; SÝKORA, Roman; CHVOJKA, Jiří; KROUŽECKÝ, Aleš; NOVÁK, Ivan; VARNEROVÁ, Veronika; KUNCOVÁ, Jitka; NALOS, Lukáš; ŠVÍGLEROVÁ, Jitka; MATĚJOVIČ, Martin. Differential effects of hemofiltration and of coupled plasma filtration adsorption on cardiac repolarization in pigs with hyperdynamic septic shock. *Shock.* 2010, 1, s.101-5. **IF 2,871**

KROUŽECKÝ, Aleš; CHVOJKA, Jiří; SÝKORA, Roman; RADĚJ, Jaroslav; KARVUNIDIS, Thomas; NOVÁK, Ivan; RŮŽIČKA, Jiří; PETRÁNKOÁ, Zuzana; BENEŠ, JIŘÍ; BOLEK, Lukáš; MATĚJOVIČ, Martin. Regional cooling of the extracorporeal blood circuit: a novel anticoagulation approach for renal replacement therapy? *Intensive Care Med.* 2009, 2, s. 364-70. **IF 5,168**

KROUŽECKÝ, Aleš; CHVOJKA, Jiří; SÝKORA, Roman; RADĚJ, Jaroslav; KARVUNIDIS, Thomas; NOVÁK, Ivan; HANZLÍKOVÁ, Jana; BULTASOVÁ, Lenka; RŮŽIČKA, Jiří; PETRÁNKOÁ, Zuzana; MATĚJOVIČ, Martin. The safety and efficacy of a new anticoagulation strategy using selective in-circuit blood cooling during haemofiltration – an experimental study. *Nephrol Dial Transplant.* 2010, doi: 10.1093/ndt/gfq622 **IF 3,306**

KUNCOVÁ, Jitka; CHVOJKA, Jiří; SÝKORA, Roman; ŠVÍGLEROVÁ, Jitka; ŠTENGL, Milan; NALOS, Lukáš; KROUŽECKÝ, Aleš; MATĚJOVIČ, Martin. Tissue concentrations of vasoactive intestinal peptide are affected by peritonitis-induced sepsis and hemofiltration in pigs. *Physiol Res.* 2010. in press **IF 1,430**

KUNCOVÁ, Jitka; SÝKORA, Roman; CHVOJKA, Jiří; ŠVÍGLEROVÁ, Jitka; ŠTENGL, Milan; KROUŽECKÝ, Aleš; NALOS, Lukáš; MATĚJOVIČ, Martin. Plasma and Tissue Levels of Neuropeptide Y in Experimental Septic Shock: Relation to Hemodynamics, Inflammation, Oxidative Stress, and Hemofiltration. *J Artif Organs.* 2010. in press **IF 1,532**

3 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

3.1 PATOFYZIOLOGIE AKI

3.1.1 Ledviny u kriticky nemocných

Ledviny se podílejí na mnoha důležitých funkcích v lidském organizmu. Tvoří moč a vylučují odpadní produkty organismu, udržují homeostázu vnitřního prostředí, elektrolytů, acidobazickou rovnováhu, mají funkci endokrinní, spolupodílejí se na řízení krevního tlaku. Teprve recentně byla do klinické praxe zavedena konsenzuální diagnostická kritéria AKI, která odráží fakt, že i mírný vzestup plazmatické hladiny kreatininu významně ovlivňuje mortalitu a prognózu pacientů [Mehta et al. 2007]. Sjednocení diagnostických kritérií také umožnilo cílené epidemiologické studie v populaci kriticky nemocných.

Izolované akutní selhání ledvin vyžadující náhradu funkce ledvin je velmi vzácné. Akutní poškození ledvin u kriticky nemocných je obvykle součástí širšího syndromu, syndromu multiorganové dysfunkce (MODS, multiple organ dysfunction syndrome), který se rozvíjí u kriticky nemocných a to nejen v důsledku sepse. Příčina vzniku AKI je obvykle multifaktoriální a je často velmi obtížné jednoznačně definovat jediného původce. Sepse však zůstává příčinou nejčastější. Kromě sepse se na rozvoji AKI spolupodílejí hemodynamická kompromitace, hypovolémie, nefrotoxická medikace či rabdomyolýza, ať již primárně, či jako následek traumatického šoku. Je-li AKI součástí MODS, je obvykle první manifestací tohoto syndromu [Tran et al. 1993].

V průběhu kritického stonání jsou ledviny ohroženy typicky prerenálními faktory, zejména hemodynamickou nestabilitou, hypoperfúzí, hypovolemií či kombinací obou. Razantní a včasná léčba hypovolémie a hypotenze je proto klíčovým preventivním opatřením rozvoje AKI. Navíc většina kriticky nemocných pacientů se rekrutuje ze stárnoucí populace nemocných s vysokou četností chronické renální insuficience, hypertenze, aterosklerotického postižené tepen, včetně renálních, což může významně přispívat ke snížení renálního perfúzního tlaku. Rizikovým faktorem je i užívání léků, které interferují s intrarenálními autoregulačními mechanizmy, např. ACE inhibitory, blokátory receptoru pro angiotensin (ARB), nesteroidní antiflogistika. I za podmínek přijatelného středního arteriálního tlaku, tak může v ledvinách docházet ke skryté hypoperfúzi a ischemii. Znalost těchto rizikových faktorů a možnosti tzv. normotenzního renálního selhání, umožňuje klinikovi stanovení individuálních léčebných cílů, např. výše středního, a tím renálního perfúzního tlaku [Abuelo 2007]. Jak bude uvedeno dále tento perfúzní tlak může být ovlivněn i renální žilní kongescí, zvýšeným renálním žilním tlakem, který může ke zhoršení ledvinných funkcí přispívat.

Obdobným mechanismem může k ledvinné dysfunkci vést i zvýšený intraabdominální tlak a syndrom nitrobřišní hypertenze je nutné urychleně terapeuticky řešit [Maerz 2008]. Zatímco v časně fázi inzultu je agresivní tekutinová resuscitace opodstatněná, v pozdních fázích není pozitivní tekutinová bilance bez následků. Tekutinové přetížení může přispívat ke zhoršení ledvinných funkcí a může být asociováno s vyšší mortalitou těchto pacientů [Payen et al. 2008]. Ledviny jsou navíc v době kritického stonání vystaveny celé řadě iatrogenních inzultů, jejichž minimalizace je více než žádoucí. Mezi nejvýznamnější patří léky s nefrotoxickými účinky (aminoglykosidy, amfotericin B apod.) a radiokontrastní látky. Je-li u kriticky nemocného pacienta přítomna sepse/septický šok, je, kromě agresivní a časně tekutinové resuscitace, zásadním preventivně-léčebným opatřením včasná a adekvátní antibiotická léčba. Opožděné podání antibiotik u pacienta se septickým šokem přispívá k významnému zvýšení incidence AKI [Bagshaw 2009].

Význam AKI v populaci kriticky nemocných nabývá na důležitosti i tím, že AKI může výrazně ovlivňovat výskyt a tíži jiných orgánových dysfunkcí. Kardio-renální, pulmo-renální interakce, vliv uremických toxinů na funkce nervového a imunitního systému, vliv ledvin na rovnováhu cirkulujících mediátorů a potenciace zánětlivé odpovědi, vliv ledvin na tekutinovou bilanci, to vše může potencovat rozvoj MODS a tím nepříznivě ovlivňovat mortalitu. Pacienti s MODS a AKI mají až třikrát větší mortalitu než pacienti se stejnou tíží stonání bez AKI [Li et al. 2009]. Patogenetické mechanismy vedoucí k AKI kriticky nemocných nejsou dosud jednoznačně objasněny a to i přes intenzivní výzkum. Bezpochyby se uplatňuje vliv protrahované hypoxie s následnou aktivací systémové prozánětlivé odpovědi, nadprodukcí cytokinů, které vedou k poškození orgánů přímým i nepřímým účinkem. Komplexní kaskáda dějů s uvolněním volných radikálů, aktivace endotelu a aktivace koagulace s výsledným prokoagulačním stavem a potlačenou fibrinolýzou vedou v konečném důsledku k dysfunkci mikrocirkulace, tkáňové hypoxii a mikrovaskulární trombóze [Amaral et al. 2004]. Novou teorií v patogenezi MODS je koncept buněčné hibernace. Bioenergetické selhání buněk je dle tohoto názoru adaptivním procesem sloužícím k ochraně postižených buněk před energetickým kolapsem. Centrálním buněčným orgánem této teorie jsou mitochondrie a proces oxidativní fosforylace. Přestože zatím pro toto tvrzení neexistují data z humánních studií, je nutno této problematice věnovat patřičnou pozornost. Vysoká mortalita MODS pramení z faktu, že dosud neexistuje kauzální léčba tohoto syndromu.

Naše současná léčba AKI a MODS je léčbou pouze podpůrnou opírající se o včasné rozpoznání a odstranění vyvolávající příčiny, adekvátní hemodynamickou resuscitaci a

maximální vyvarování se iatrogenních inzultů, které mohou případně orgánové dysfunkce dále prohlubovat. Mechanizmy, terapií a náhledem do budoucnosti léčby MODS jsme se zabývali v našem přehledovém článku Syndrom multiorgánové dysfunkce: update 2010.

3.1.2 Mechanizmy AKI v sepsi

Detailní rozbor soudobých poznatků týkajících se patofyziologických mechanismů vedoucích k akutnímu poškození ledvin v sepsi jsme shrnuli v recentním přehledovém článku New developments in septic acute kidney injury. Níže proto uvádíme pouze krátké shrnutí.

Akutní tubulární nekróza, ischemie ledvin

Až donedávna byla akutní tubulární nekróza (ATN, acute tubular necrosis) považována za dominantní příčinu ledvinného selhání v sepsi. Předpokládalo se, že základním mechanismem tohoto strukturálního poškození je renální vazokonstrikce s následnou ledvinnou ischemií. Tak je tomu obvykle v případě stavů s nízkým srdečním výdejem. Příkladem jsou hemoragický či kardiogenní šok. Nicméně chování ledvinné cirkulace za podmínek tekutinově resuscitované sepse zůstává nadále kontroverzním tématem. Vážným nedostatkem výše zmiňovaného tvrzení je také absence jednoznačného histopatologického průkazu tubulární nekrózy u septických pacientů [Langenberg et al. 2008].

Perfúze ledvin v sepsi

Vzhledem k nemožnosti měřit přímo renální průtok v humánní medicíně, jsou dostupná data, stran renální vazokonstrikce, značně nejednotná a koncept ischemie ledvin se tak opírá především o experimentální modely. Jak ukázal souhrnný přehled dosud publikovaných studií zkoumajících průtok renální arterií v sepsi/septickém šoku, důležitým prediktorem renálního průtoku je srdeční výdej. Některé experimentální a humánní studie ukazují, že za podmínek typické hyperdynamické sepse (tzn. za podmínek normálního nebo zvýšeného srdečního výdeje) dochází k poklesu glomerulární filtrace a diurézy i přes konstantní či dokonce zvýšený krevní průtok ledvinami [Langenberg et al. 2005]. Byly to zejména práce Wana a Langenberga na septických ovcích, které poukázaly na fakt, že podmínkou renální dysfunkce v sepsi nemusí být snížený průtok renální tepnou [Wan et al. 2008] Teorie ledvinné ischemie tak vychází zejména z modelů s hypodynamickou cirkulací, ze stavů s nízkým srdečním výdejem. Sepsí navozená hypovolémie a vazoplegie vede k hypotenzi, která, je-li neléčená, vede k poklesu perfúzního tlaku ledvin, ztrátě autoregulace a může vyústit v ireverzibilní

strukturální změny, tubulární nekrózu. Je-li včas léčena vyvolávající příčina septického šoku a je obnovena dostatečná perfúze ledvin, může se jednat stále o funkční a reverzibilní dysfunkci bez porušené integrity tubulárních buněk. I přes adekvátní úpravu hypovolémie tekutinovou resuscitací a hypotenze katecholaminovou podporou však u řady septických pacientů dochází k progresivnímu snížení funkce ledvin. V našem experimentálním modelu septického šoku jsme se proto snažili nalézt odpověď na otázku, jak se chová ledvinná makrocirkulace za podmínek adekvátně resuscitovaného hyperdynamického septického šoku.

Glomerulární a peritubulární mikrocirkulace v sepsi

Rozvoj nových zobrazovacích metod, jako např. intravitální videomikroskopie, prokázal, že místem klíčových změn v sepsi je mikrocirkulace. V důsledku otevření funkčních arteriovenózních zkratů, nepoměru mezi vazokonstrikcí a vazodilatací, otoku endotelových buněk, tvorby mikrotrombů, zvýšené adhezi a snížené deformability neutrofilů a erytrocytů dochází k porušení mikrovaskulární perfúze se snížením funkční kapilární denzity a zvýšením podílu neperfundovaných či intermitentně perfundovaných kapilár [Trzeciak et al. 2007]. V poslední době přibylo důkazů, že mikrocirkulace a její dysfunkce hraje důležitou úlohu i v rozvoji akutního poškození ledvin v sepsi [Matějovič 2008]. Pozornost se soustředí zejména na peritubulární mikrocirkulaci, která se zdá být významnou „obětí“ sepse a její dysfunkce předchází rozvoji akutního poškození ledvin [Wu et al. a,b 2007]. Patogeneze těchto změn je vysoce komplexní děj, v němž se kromě širokého spektra pro- a protizánětlivých cytokinů, uplatňují další mediátory, nadprodukce oxidu dusnatého (NO, nitric oxide), kyslíkových a dusíkatých radikálů (ROS, reactive oxygen species; RNOS reactive nitrogen species), metabolitů kyseliny arachidonové. Svoji roli sehrává také narušená rovnováha mezi pro- a anti-koagulačními mechanismy s posunutím rovnováhy směrem k prokoagulačnímu stavu [Le Dorze 2009]. Přestože studií zabývajících se vztahem mezi renální hemodynamikou a kinetikou kyslíku v ledvině není mnoho, z dostupných prací vyplývá, že výsledkem mikrovaskulárních změn v sepsi může být tkáňová hypoxie [Johannes et al. 2009]. Tyto hypoxické oblasti navíc mohou v budoucnu predisponovat pacienta k rozvoji chronické renální insuficience [Horbelt et al. 2007]. V naší experimentální studii jsme proto sledovali chování ledvinné mikrocirkulace a spojitost mezi těmito změnami a kinetikou kyslíku.

Inflamace a ledviny

Nepříznivý vliv na ledvinné funkce v sepsi má vysoce pravděpodobně také vlastní zánětlivá odpověď organismu. Ačkoliv dosud není znám přesný molekulární mechanismus takového poškození, některé práce poukazují na souvislost mezi infiltrací ledvinného intersticia neutrofilů, intrarenální inflamací a ledvinnou dysfunkcí [Cunningham et al. 2002]. Svoji roli jistě sehrávají prozánětlivé cytokiny, např. tumor nekrotizující faktor (TNF- α), který svým přímým či nepřímým vlivem může nepříznivě ovlivňovat ledvinné funkce [Baud et al. 1989]. Kromě vlastního poškození ledvin, má velikost systémové zánětlivé odpovědi i význam prognostický [Chawla et al. 2007].

Tubulární dysfunkce a poškození

Jak již bylo řečeno výše, nemáme dostatek validních důkazů pro tvrzení, že akutní tubulární nekróza je dominantní strukturální změnou ledvinných tubulů v septickém AKI. Časně post-mortem histologické studie ledvin u pacientů zemřelých v sepsi nenalezly ve více než 90% žádné známky morfologického poškození ledvin [Hotchkiss et Karl 2003]. Častěji byly pozorovány pouze nespecifické histologické změny [Langenberg et al. 2008]. Rozsah strukturálních změn v ledvinách se tak pravděpodobně mění v závislosti na tíži a délce trvání od mírného subletálního poškození po těžké strukturální změny. Analýza histologických vzorků po epizodě septického šoku byla také předmětem našeho experimentálního výzkumu.

3.2 MIMOTĚLNÍ OČIŠŤOVACÍ METODY V LÉČBĚ AKI V SEPSI

Přibližně 4% pacientů na jednotkách intenzivní péče si v důsledku svého kritického stonání vyžádají některou z forem mimotělní náhrady funkce ledvin [Uchino 2006]. Možností jsou metody jak intermitentní, tak kontinuální (CRRT, continuous renal replacement therapy). Výhodou kontinuálních metod je větší hemodynamická tolerance, trvalá kontrola metabolické homeostázy. Kontinuální metody lze zvolit ve formě kontinuální veno-venózní hemofiltrace (CVVH, continuous veno-venous haemofiltration), hemodiafiltrace (CVVHDF, continuous veno-venous haemodiafiltration) a hemodialýzy (CVVHD, continuous veno-venous haemodialysis). Stále neexistují jasná pravidla kdy a jakou modalitu zvolit a kolem dialyzační dávky existovala dosud intenzivní debata. Další hojně diskutovanou otázkou je využití těchto či jiných mimotělních očišťovacích metod v podpůrné terapii sepse/septického šoku a jejich dopad na přežití pacientů. Problematiku mimotělních očišťovacích metod v sepsi

jsme detailněji diskutovali v našich dvou nedávných článcích: Hemoeliminační metody v léčbě sepse: současný stav a Náhrada a podpora funkce ledvin u kriticky nemocných – update 2009. Z těchto důvodů se v následujících odstavcích zaměřujeme pouze na problematiku konceptu vysokoobjemové hemofiltrace (HVHF, high-volume haemofiltration) a párové plazmafiltrace-adsorpce (CPFA, coupled plasmafiltration adsorption).

3.2.1 Vysokoobjemová hemofiltrace

Převládal názor, že časnější indikace a vyšší dávky dialýzy mohou příznivě ovlivnit průběh kritického stonání, mortalitu a časnější zotavení z AKI. Tento názor vycházel především z multicentrické studie zkoumající dopad rozdílných dialyzačních dávek, 20, 35 a 45 ml/kg/h, která prokázala výhodu vysokých dialyzačních dávek v podskupině septických pacientů [Ronco et al. 2000] a koncept této „vysokoobjemové“ hemofiltrace se stal atraktivním konceptem jako podpůrné terapie sepse. Základním mechanismem této teorie je schopnost hemofiltrace neselektivně odstraňovat různé mediátory sepse a očištění organismu od těchto působků by mělo vést k lepšímu přežívání těchto pacientů. Přestože se jedná o atraktivní myšlenku, na základě dostupných dat nebylo možno formulovat jednoznačná doporučení, mj. z důvodů absence kvalitních experimentálních prací zkoumajících vliv této metody na různé patofyziologické úrovně v klinicky relevantním modelu septického šoku. Pochopitelným krokem byla pak naše experimentální práce na modelu septického prasete, kdy jsme sledovali vliv HVHF na systémovou a regionální hemodynamiku, mikrocirkulaci, energetický metabolismus, oxidativní stres, endoteliální dysfunkci a koagulační systém. Srovnávali jsme dávku 35 ml/kg/h s dávkou 100 ml/kg/h.

3.2.2 Párová plazmafiltrace - adsorpce

S myšlenkou neselektivního odstranění širokého spektra mediátorů uplatňujících se v patogenezi sepse pracuje i mimotělní metoda označovaná jako párová plazmafiltrace-adsorpce (CPFA, coupled plasmafiltration adsorption) [Formica et al 2007]. Principem metody je separace plazmy na plazmafiltru s následným průchodem této plazmy přes vysoce porozní syntetickou pryskyřici s vysokou adsorpční schopností. Tato styrenová pryskyřice má velkou kapacitu na svém povrchu vázat cirkulující mediátory sepse, cytokiny [Cole et al. 2002]. Očištěná krev posléze prochází standardní hemofiltrační kapslí. Dostupná data sledující vliv CPFA v sepsi/septickém šoku jsou velmi chudá a opírají se pouze o jednu experimentální a dvě klinické studie [Tetta et al. 2000; Formica et al. 2003; Ronco et al.

2002]. Všechny tyto práce byly však zatíženy řadou metodologických chyb, malým počtem zkoumaných probandů a absencí randomizace, díky čemuž nelze na jejich závěrech stavět jakákoliv klinická doporučení. V našem experimentu jsme se proto obdobně jako u práce s vysokoobjemovou hemofiltrací snažili prozkoumat vliv CPFA na několika patofyziologických úrovních relevantního septického šoku u zvířete.

4 LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY STUDIÍ

Všechny naše experimentální práce byly řádně schváleny etickou komisí při Lékařské fakultě UK v Plzni a proběhly v souladu s doporučeními pro práci s laboratorními zvířaty. Výzkum proběhl na experimentálním pracovišti I. interní kliniky při LF UK v Plzni.

5 CÍLE STUDIÍ

Cílem našich prací bylo v klinicky relevantním experimentálním modelu septického šoku:

1. objasnit chování renální hemodynamiky, mikrocirkulace a energetického metabolismu v průběhu progresu sepse a septického šoku na klinicky relevantním zvířecím modelu.
2. porovnat časnou konvenční veno-venózní hemofiltraci (CVVH, filtrace 35 ml/kg/h) s vysokoobjemovou hemofiltrací (HVHF, filtrace 100 ml/kg/h), posoudit jejich vliv na systémovou a regionální hemodynamiku, mikrocirkulaci, energetický metabolismus, oxidativní stres, aktivaci endotelu a koagulace a orgánové funkce
3. zkoumat biologický efekt párové plazmafiltrace-adsorpce (CPFA) v hyperdynamickém modelu septického šoku u zvířete. Zhodnotit vliv této metody na úrovni systémové hemodynamiky, regionální hemodynamiky, mikrocirkulace, energetického metabolismu, oxidativního stresu, endotelu a koagulace a orgánové funkce

6 METODICKÉ ASPEKTY

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

6.1 EXPERIMENTÁLNÍ MODEL

Zvířecí modely jsou nedílnou součástí základního výzkumu. Na I. interní klinice má výzkum na etablovaném modelu selete domácího několikaletou tradici. Výhodou selete je nejen jeho velikost, která umožňuje dobrý nekomplikovaný chirurgický přístup, možnost široké instrumentace na orgánech hepatosplanchniku, ledvinách a cévních vstupech, ale také obdobnost anatomických a morfologických poměrů ledvin a dalších orgánů s anatomii lidskou. Hlavním cílem v našich experimentech je dosáhnout, pokud možno, maximální klinické relevance, zajistit podobnost s danou klinickou situací v humánní medicíně. Model umožňuje komplexní monitoraci a péči jako na jednotce intenzivní péče. Snahou bylo dosáhnout v modelu fekální peritonitidy sepse s následnou progresí do septického šoku. Prevencí hypodynamického oběhu bylo podání adekvátního množství tekutin k dosažení hyperdynamické cirkulace se zvýšeným srdečním výdejem a sníženou systémovou vaskulární rezistencí. Včas zahájenou katecholaminovou podporou následně bráníme rozvoji septické hypotenze. Vzhledem k tomu, že naším cílem bylo sledovat odpověď organismu, resp. ledvin, na vyvolávající infekční inzult na různých stupních, nebyl průběh pokusu ovlivněn podáním antibiotik. Stejně tak není tento model určen pro sledování mortality. Stejný zvířecí model jsme použili i v experimentech týkajících se podpůrné terapie sepse vysokoobjemovou hemofiltrací (HVHF) a párovou plazmafiltrací-adsorpcí (CPFA). Následující popis zvířecího modelu je tedy společný pro všechny naše uváděné studie.

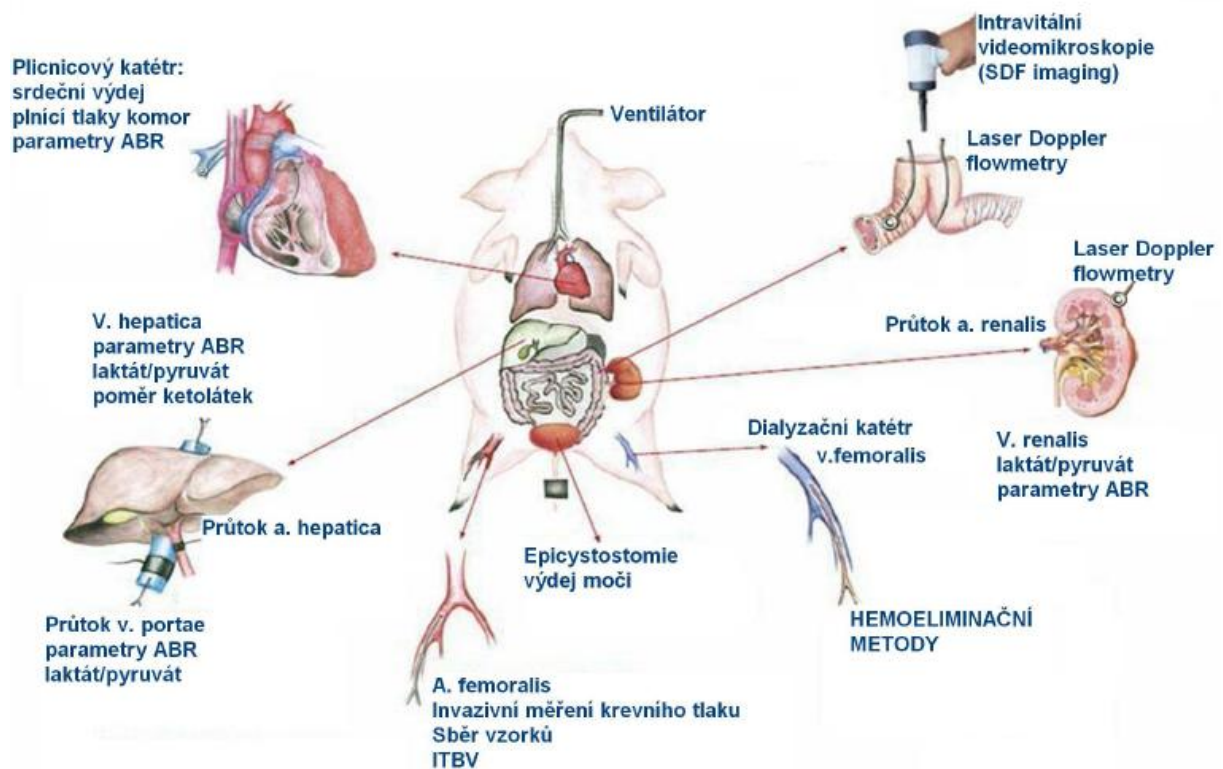
6.1.1 Experimentální model fekální peritonitidy

Selata domácí obou pohlaví byla v úvodu experimentu intramuskulárně premedikována atropinem, ketaminem a azaperonem. Po zajištění periferní žíly jsme uvedli zvířata do anestézie intravenózně podávaným propofolem, ketaminem a pancuroniem. Současně byly zajištěny dýchací cesty orotracheální intubací. Následně byla zahájena umělá plicní ventilace vedená tak, abychom dosáhli cílového arteriálního pCO_2 4,0 a 5,0 kPa. Během chirurgické instrumentaci jsme pokračovali v anestézii vedené thiopentalem, fentanylem a kontinuálním

pancuroniem. Jako udržovací tekutina byl zvolen kontinuuálně podávaný krystaloidní roztok, nejprve v dávce 15 ml/kg a po dokončení chirurgické části experimentu byla jeho dávka redukována na 7 ml/kg. Při poklesu glykémie pod 4,5 mmol/l byla zahájena infúze 20% glukózy. Pro bližší seznámení s dávkami jednotlivých medikamentů a výrobci jednotlivých preparátů a přístrojů odkazujeme čtenáře na plnou verzi našich experimentálních prací, které jsou uvedené v příloze této dizertace.

Chirurgická instrumentace spočívala v zavedení centrálního žilního katétru do levé jugulární žíly, který sloužil k podávání farmak a infúzí. Cestou opačné jugulární žíly jsme zavedli Swan-Ganzův plicnicový katétr sloužící k měření hemodynamických parametrů a výpočtu odvozených parametrů. Do jedné z femorálních tepen byl zaveden arteriální katétr, kterého jsme využili k náběrům vzorků, invazivnímu měření arteriálního tlaku, zavedení fibrooptického katétru k měření nitrohruďního objemu krve (ITBV, intrathoracic blood volume). V experimentálních pracích zkoumajících vliv hemoelimačních metod jsme do druhostranné femorální žíly zavedli dialyzační kanylu, přes kterou byla daná procedura realizována. Cestou střední laparotomie byla otevřena břišní dutina a po preparaci portální žíly, jaterní tepny, renální žíly byly na příslušné cévy umístěny ultrazvukové průtokové sondy. Současně byly do portální žíly a renální žíly umístěny dvoucestné katetry sloužící k odběru vzorků a v případě renální žíly i k přímému měření renálního žilního tlaku. Do jaterních žil jsme zaváděli katétr až po ukončení operace pod ultrazvukovou kontrolou. Dále jsme otevřeli renální pouzdro a na ledvinový povrch fixovali laser-dopplerometrickou sondu k monitoraci kortikální mikrocirkulace. Na pravém boku zvířete byla vyšita dvouhlavňová ileostomie, která byla určena k monitoraci mikrocirkulace střevní mukózy a k získávání obrazové dokumentace intravitální videomikroskopií. Před uzavřením laparotomie po vrstvách jsme pomocí dvou silných drenů drenovali břišní dutinu k evakuaci ascitu a k indukci peritonitidy. Pod ultrazvukovou kontrolou byla provedena punkce močového měchýře a zavedena epicystotomie k měření močového výdeje. Po instrumentaci následovala 6 hodinová perioda pooperační stabilizace. V průběhu úvodu do anestezie byla současně získána autologní stolice, která byla v dávce 0,5 g/kg selete rozpuštěna ve 200 ml fyziologického roztoku a kultivována ve vodní lázni při 37°C. Takto získaný roztok byl použit následně k indukci peritonitidy. Názorné zobrazení chirurgické instrumentace v našem experimentálním modelu fekální peritonitis je uvedené na obrázku 1. Instrumentace ve studii s hemoelimačními metodami byla shodná, pouze rozšířená o kanylaci femorální žíly dialyzační kanylou.

Obrázek 1 – model fekální peritonitidy



6.1.2 Protokol studie

Po 6 hodinové periodě pooperační stabilizace byl proveden první sběr vzorků a provedena první série měření. Zvířata byla randomizována do skupiny kontrolní bez septického šoku a do skupiny se septickým šokem. Ihned poté jsme indukovali fekální peritonitidu inokulací autologního střevního obsahu do dutiny břišní. Další sada náběrů a měření proběhla s odstupem 12 hodin od indukce peritonitidy. V době rozvinuté sepsy byla v prevenci septické hypotenze zahájena tekutinová resuscitace koloidem v dávce 10 ml/kg k udržení plicních tlaků nad 12 mmHg a v případě poklesu středního arteriálního tlaku (MAP, mean arterial pressure) pod 70 mmHg jsme podávali noradrenalin v kontinuální infúzi. V případě experimentálních prací týkajících se mimotělní očišťovacích metod probíhala randomizace do skupin léčených příslušnými eliminačními technikami až v tomto okamžiku. Další dvě sady měření a náběrů proběhla v odstupu 18 a 22 hodin od indukce peritonitidy. Ihned po ukončení pokusu byly odebrány vzorky ledvinné tkáně k histologické analýze.

6.1.3 Měření systémové a regionální hemodynamiky, mikrocirkulace, odvozené výpočty

Měřené parametry systémové hemodynamiky zahrnovaly srdeční výdej (CO, cardiac output), střední arteriální tlak (MAP, mean arterial pressure), střední arteriální tlak v plicnici (MPAP, mean arterial pulmonary pressure), systémovou vaskulární rezistenci (SVR, systemic vascular resistance), plicní vaskulární rezistenci (PVR, pulmonary vascular resistance), plnicí tlaky obou komor (CVP, central venous pressure; PAOP, pulmonary artery occlusion pressure), nitrohrudní objem krve (ITBV, intrathoracic blood volume).

Na úrovni regionální hemodynamiky nás zajímaly průtoky jednotlivými sledovanými cévy: zejména průtok renální tepnou (RBF, renal blood flow), dále renální žilní tlak (RVP, renal venous pressure) a renální vaskulární rezistence (RVR, renal vascular resistance), která byla odvozena od vzorce: $RVR = \frac{MAP \text{ (mmHg)} - RVP \text{ (mmHg)}}{RBF \text{ (l.min}^{-1}\text{)}}$.

Ve studiích s HVHF a CPFA jsme dále měřili průtok portální žilou (PVBF, portal vein blood flow), dále společnou jaterní tepnou (HABF, hepatic artery blood flow).

S použitím laser-dopplerometrických sond jsme za současné analýzy zpětně odraženého světla (back scattered light) hodnotili mikrovaskulární perfúzi renálního kortexu a střevní mukózy. Další metodou využitou ke sledování mikrocirkulačních změn ve sliznici střeva byla intravitální videomikroskopie (SDF, side-stream dark field imaging). Pomocí softwaru dodaného výrobcem jsme hodnotili tři sekvence natočené během každého sběru dat ze tří různých míst střevní sliznice ilea. Každá ze sekvencí trvá 20 sekund. Sledovanými parametry byly MFI (microvascular flow index), FHI (flow heterogeneity index). MFI je založen na hodnocení jednotlivých charakterů průtoku v kapilárách a cévách do průměru 20 mikrometrů v každém ze 4 kvadrantů videosekvence (žádný průtok = 0, intermitentní = 1, zpomalený = 2, kontinuální = 3). Průměr hodnot z jednotlivých kvadrantů je MFI. V našich studiích jako výsledek uvádíme průměrný MFI ze tří náhodně vybraných lokalit sliznice ilea. FHI ukazuje spíše než na charakter průtoku na prostorovou heterogenitu perfúze. Výpočet FHI provádíme jako rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou MFI dělenou průměrným MFI. Metodika hodnocení mikrocirkulace je v souladu s recentním doporučením [De Backer et al. 2007].

Z analýzy krevních plynů v arteriální, smíšené žilní, portální, jaterní a renální žilní krvi a srdečního výdeje/regionálního průtoku byla vypočtena systémová dodávka a konzumpce kyslíku, respektive regionální dodávka a konzumpce kyslíku v příslušných orgánech. Detailně jsou měřené parametry a metodika uvedeny v jednotlivých studiích v příloze této dizertační práce.

6.1.4 Analyzované parametry, krevní a histologické vzorky

V arteriální, portální, jaterní a renální žilní krvi byla analyzována koncentrace laktátu a pyruvátu, poměr ketolátek z jaterní žilní krve (KBR, acetoacetát/ β -hydroxybutyrát). Jako ukazatelů oxidativního a nitrosativního stresu bylo využito měření reaktantů s kyselinou thiobarbiturovou v arteriální krvi (TBARS, thiobarbituric acid reactant species) a poměru nitrátů/nitritů (NOx). Z ukazatelů zánětu nás zajímaly koncentrace prozánětlivých cytokinů, tumor necrosis faktoru alfa (TNF- α) a interleukinu 6 (IL-6). Kromě rutinních biochemických parametrů byla arteriální krev v případě studií s hemoelimačními metodami dále vyšetřena na koncentraci komplexů trombin-antitrombin (TAT), aktivitu von Willebrandova faktoru (vWF), koncentraci asymetrického dimetylargininu (ADMA) a v případě studie párové plazmafiltrace-adsorpce také arteriální hladiny neuropeptidu Y (NPY) a vazoaktivního intestinálního peptidu (VIP). Vzhledem k možnému efektu hemodiluce na sledované koncentrace jsme zmíněné parametry korigovali na celkovou bílkovinu. Při pitvě odebrané ledviny byly poskytnuty k barvení hematoxylin-eosinového barvení a k hodnocení zkušeným nefropatologem.

6.2 EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINY – RANDOMIZACE

Ve studii týkající se patofyziologie akutního poškození ledvin v septickém šoku jsme studovaná zvířata randomizovali do dvou skupin. První skupina (control, n = 6) podstoupila kompletní chirurgickou instrumentaci bez indukce fekální peritonitis. Druhou skupinu (AKI, n = 8) představovala zvířata se septickým šokem při fekální peritonitidě.

V práci zabývající se vlivem vysokoobjemové hemofiltrace v septickém šoku jsme randomizovali selata do tří skupin: skupina bez metody (control, n = 7), skupina se standardní dávkou hemofiltrace 35 ml/kg/h (HF, n = 7) a do skupiny s vysokoobjemovou hemofiltrací léčené dávkou 100 ml/kg/h (HVHF, n = 7).

Ve studii s párovou plazmafiltrací-adsorpcí byla zvířata randomizována do ramene bez metody (control, n = 8) a do ramene léčené zmiňovanou metodou (CPFA, n = 8).

6.3 NASTAVENÍ OČIŠŤOVACÍCH METOD

6.3.1 Nastavení kontinuální veno-venózní hemofiltrace

V experimentálním modelu bylo využito hemofiltrace na komerčně dostupném přístroji Multifiltrate (Fresenius Medical Care AG & Co. KGaA) se syntetickým polysulfonovým hemofiltrem (Ultrarflux AV600S). Průtok krve byl 200ml/min a substituce byla realizována bikarbonátovými roztoky v pre- i post-dilučním módu v poměru 1:1 a to v dávce odpovídající standardní dialyzační dávce 35 ml/kg/h a ve skupině léčené vysokoobjemovou hemofiltrací 100 ml/kg/h. Do okruhu byl vřazen ohřívač nastavený na 39° C k prevenci poklesu teploty.

6.3.2 Nastavení párové plazmafiltrace-adsorpce

Metoda byla realizována na přístroji LYNDA (Bellco®). Mimotělní okruh obsahoval polyétersulfonový plazmafiltr (MPS 05), který byl zařazen v sérii s hemofiltrem (HFT 14) a kapslí obsahující styrenovou pryskyřici s makroporózním povrchem (Mediasorb). Separace plazmy v plazmafiltru byla nastavena na 20% protékající krve při rychlosti průtoku 150 ml/min. Hemofiltrace byla nastavena v dávce 35 ml/kg/h a jako substituční roztok jsme opět využili bikarbonátový roztok, tentokrát zařazený pouze v postdilučním módu. K zabránění hypotermie jsme vřadili ohřívač krve.

Pro detailní seznámení s nastavením kontinuálních očišťovacích metod a užitou antikoagulací odkazujeme na stať týkající se metodiky v plných verzích příložených studií.

7 SOUHRN VÝSLEDKŮ STUDIÍ A OBECNÁ DISKUZE

7.1 RENÁLNÍ HEMODYNAMIKA, MIKROCIRKULACE A METABOLISMUS VE ZVÍŘECÍM MODELU PERITONITIDOU INDUKOVANÉHO SEPTICKÉHO ŠOKU

U všech selat došlo k progresi hyperdynamické sepse do septického šoku a současně k rozvoji akutního poškození ledvin definovaného elevací plazmatického kreatininu a/nebo oligurií. Průtok renální tepnou byl po dobu experimentu nezměněn ve srovnání s kontrolní skupinou. Podobně nedošlo k signifikantním změnám renální cévní rezistence. Prokázali jsme však signifikantní zvýšení renálního žilního tlaku. I přes nezměněnou renální cévní rezistenci a

zachovaný průtok renální tepnou již v časně fázi sepse došlo ke zhoršení mikrovaskulární perfúze kůry. I přes zvýšenou renální extrakci kyslíku se renální konzumpce kyslíku neměnila. Současně došlo k rozvoji významné regionální metabolické acidozy s nárůstem poměru laktát/pyruvát. Histologické vzorky odhalily pouze mírné morfologické změny na úrovni ledvinných tubulů, bez známek akutní tubulární nekrózy.

Renální vazokonstrikce a pokles průtoku renální arterií tedy nebyla příčinou akutní dysfunkce ledvin v tomto klinicky relevantním modelu sepse. Klíčovým a časným patofyziologickým faktorem je pravděpodobně mikrovaskulární dysfunkce a porucha energetického metabolismu. Akutní tubulární nekróza není v tomto modelu morfologickým substrátem poškození ledvin v sepsi. Zajímavým zjištěním byl rozvoj ledvinné žilní hypertenze, která může být klinicky skrytým faktorem přispívajícím k rozvoji akutní ledvinné dysfunkce v sepsi.

Diskuze

Vzhledem k tomu, že dosavadní experimentální výzkum přináší značně nekonzistentní data týkající se patogeneze AKI v sepsi, je nezbytné používat ve výzkumu takové experimentální modely, které budou maximálně věrně napodobovat určitou klinickou situaci [Dyson et Singer 2009]. Naším cílem bylo tedy vytvořit dostatečně relevantní model septického šoku s progredující orgánovou dysfunkcí, na němž bychom mohli ověřit recentní teorie o chování renální hemodynamiky v případě hyperdynamické sepse a současně sledovat odpovídající změny na úrovni mikrocirkulační, metabolické a sledovat výsledné histologické změny.

V souladu se závěry recentních studií [Langenberg et al 2005] jsme i my v našem modelu prokázali, že nedochází k snížení průtoku ledvinnou tepnou za podmínek adekvátně tekutinově resuscitované hyperdynamické sepse. Zajímavým zjištěním pak byla progresivní elevace renálního žilního tlaku. Perfúzní tlak ledviny a filtrační gradient je determinován středním arteriálním tlakem a renálním žilním tlakem. Tekutinová resuscitace za podmínek sepsí navozenou kapilární propustností s únikem tekutin extravaskulárně vede k velkému tkáňovému otoku. Rozvoj tohoto edému současně s nárůstem nitrobřišní hypertenze může být zodpovědný za pozorované zvýšení renálního žilního tlaku. Přinejmenším v našem modelu nelze vyloučit, že renální žilní kongesce přispěla k rozvoji renální dysfunkce. Je zajímavé, že naše studie byla první, která sledovala přímo renální žilní tlak v sepsi. Ve světle dříve uvedených studií poukazujících na narůstající význam renální žilní kongesce v patogenezi různých stavů, je namístě věnovat této problematice náležitou pozornost i v klinice, v případech agresivní tekutinové resuscitace v sepsi.

Deteriorace kortikální mikrovaskulární perfúze i za podmínek adekvátního renálního průtoku potvrzuje významnou úlohu, kterou mikrocirkulace hraje v patogenezi orgánové dysfunkce. Vzhledem k limitacím laser-dopplerometrického snímání však nemůžeme zodpovědně říci, k jakým změnám dochází hlouběji v ledvině, nemůžeme se vyjádřit k případné kortiko-medulární redistribuci krevního průtoku ledvinou.

Z přítomnosti metabolického stresu, který byl charakterizován rozvojem renální žilní metabolické acidózy a zhoršením poměru laktát/pyruvát, mikrovaskulární dysfunkce a zvýšené extrakci kyslíku lze vyvodit domněnku o existenci hypoxických oblastí v ledvině, přestože celková renální konzumpce kyslíku zůstala nezměněna. Je na místě podotknout, že některé práce ukazují, že totální renální konzumpce kyslíku je orientačním parametrem, jehož normální hodnoty nevylučují přítomnost ledvinné hypoxie [Johannes et al. 2009].

Stejně jako v dalších studiích, ani v našem experimentu nebyla akutní tubulární nekróza morfologickým korelátem akutního poškození ledvin a přítomny byly pouze mírné histologické změny [Langenberg et al. 2008]. Byť náš experiment patří mezi obdobnými studii mezi jeden z nejdelších, nelze zcela vyloučit, že septický šok trvající déle než 22 hodin by přinesl jiné histologické změny.

Mezi další limitace naší práce patří absence metod k přímému měření tkáňového parciálního tlaku kyslíku v kortexu a medule. Další pochyby může vzbudit využití koloidu při objemové resuscitaci. Otázka role koloidu v patogenezi AKI je však nadále nezodpovězená a koloidy i nadále zůstávají v tekutinové resuscitaci septických pacientů relativně běžnou klinickou praxí.

7.2 VYSOKOOBJEMOVÁ HEMOFILTRACE V SEPTICKÉM ŠOKU

U všech selat došlo po 12h k rozvoji hyperdynamické sepse. Progrese do septického šoku u kontrolní skupiny vedla ke zhoršení mikrocirkulace sliznice ilea a kůry ledviny i přes zachovanou regionální perfúzi. Současně se zhoršením mikrocirkulace došlo k významnému nárůstu L/P a KBR, tj. k poruše cytosolického a mitochondriálního redox stavu. Oběhovou podporu noradrenalinem vyžadovalo 6 selat v kontrolní skupině, 3 ve skupině sepse+HF a pouze u 2 ve skupině sepse+HVHF. Přesto HF ani HVHF nezabránilo rozvoji poruch mikrocirkulace ledvin, sliznice střeva, buněčného energetického metabolismu a příznivě neovlivnily ani parametry systémové inflamace, oxidativního/nitrosativního stresu, aktivace endotelu či koagulace.

Vysokoobjemová hemofiltrace se jevila výhodnější při ovlivnění potřeby vazopresorické potřeby. Žádná z dodaných dávek hemofiltrace ale nedokázala zabránit rozvoji poruch mikrocirkulace a příznivě protektivně ovlivnit kterýkoli ze sledovaných parametrů a vysokoobjemová hemofiltrace tak nenabídla žádné výhody oproti konvenční dávce hemofiltrace.

Diskuze

Kontinuální očišťovací metody umožňují těsnou a účinnou kontrolu homeostázy organismu. Kromě toho však mají hemoeliminační metody teoretickou schopnost odfiltrovat a tím pádem ovlivnit rovnováhu různých mediátorů sepse (cytokiny, vazogenní aminy, eikosanoidy atd.) [Venkataraman et al. 2003], k jejichž nadprodukcii v sepsi dochází. Základní myšlenkou testování intenzivních hemoeliminačních metod se tak stala teorie příznivého ovlivnění plazmatických či tkáňových hladin cytokinů s následným zmírněním zánětlivé systémové odpovědi organismu a nastolení příznivější imunohomeostázy organismu [Ronco 2007]. Logicky očekávatelným důsledkem by tedy bylo zlepšení řady biologických mechanismů, které se v patogenezi orgánové dysfunkce v kritických stavech uplatňují. Rozhodli jsme se proto testovat hypotézu, zda hemofiltrace v dávce 35 ml/kg/h příznivě ovlivní průběh septického šoku indukovaného fekální peritonitidou a zda tento prospěch bude zvýrazněn při navýšení dávky hemofiltrace na 100 ml/kg/h.

Oproti standardní dialyzační dávce 35 ml/kg/h nebylo ve skupině léčené HVHF pozorované zlepšení na úrovni systémové či regionální hemodynamiky, mikrocirkulace, v intenzitě metabolické odpovědi na infekční inzult. Stejně tak nedošlo k příznivému ovlivnění molekulárních markerů systémové zánětlivé odpovědi organismu na úrovni aktivace endotelu, koagulace, oxidativního/nitrosativního stresu. Naše studie tudíž přispívá k názoru, že HVHF není v non-renální indikaci doporučeným postupem a dialyzační dávky vyšší než v níže uváděných klinických studiích nemají své opodstatnění v léčbě septických pacientů. Přestože jsme ve shodě s jinými experimentálními [Rogiers et al. 1999; Bellomo et al. 2000] či klinickými studiemi [Piccinni et al. 2006; Ratanarat et al. 2005] pozorovali efekt vysokoobjemové hemofiltrace na vazopresorickou podporu, lze vzhledem k absenci jakéhokoli pozitivního ovlivnění na ostatních patofyziologických úrovních pochybovat o skutečném klinickém přínosu této metody pro septické pacienty. Jinými slovy soudobé metody a membrány zatím nemají schopnost příznivě zasáhnout do komplexních patofyziologických dějů v kritickém stavu a je nutné na ně pohlížet pouze jako efektivní nástroj udržování a kontroly metabolické a objemové homeostázy u pacienta se současným akutním poškozením ledvin.

Náš názor z přísného hlediska medicíny založené na důkazech podporují recentní velké multicentrické klinické randomizované studie, které nepřinesly očekávaný efekt dávek hemo(dia)filtrace vyšších než 20-25 ml/kg/h v nejdůležitějším parametru a sice mortalitě těchto pacientů [Palevsky et al. 2008; Bellomo et al. 2009]. Na druhou stranu z uvedených studií vyplývá, že i tito pacienti měli velmi dobrou kontrolu vnitřního prostředí (průměrná denní urea 16,7 mmol/l ve studii ATN, 15,9 mmol/l ve studii RENAL). Za podmínek dobré kontroly vnitřního prostředí další navyšování dávek hemofiltrace nepřináší těmto nemocným žádným přínos. Zásadní roli tak sehrává dávka skutečně dodaná, nikoli pouze předepsaná. Časté přerušování metody, transport kriticky nemocných, může významně ovlivnit množství skutečně dodané dávky. Klinik tedy musí přizpůsobit režim očišťovací procedury individuálnímu stavu pacienta, aby zajistil maximálně efektivní kontrolu urémie, acidobazické rovnováhy, kalémie a tekutinové bilance.

7.3 PÁROVÁ PLAZMAFILTRACE-ADSORPCE V MODELU SEPTICKÉHO ŠOKU

Metoda CPFA nijak neovlivnila průběh septického šoku, neovlivnila příznivě potřebu katecholaminové podpory. Neovlivnila parametry systémové či regionální hemodynamiky. Naopak došlo ke zhoršení mikrocirkulace sliznice střeva hodnocené flow heterogenity indexem (FHI). Oproti kontrolní skupině nebyl rozdíl v parametrech kinetiky kyslíku, na úrovni buněčné energetiky (L/P, KBR). Nepozorovali jsme zlepšení či zmírnění systémové zánětlivé odpovědi (TNF- α , IL-6), v aktivaci endotelu (vWF, ADMA). K signifikantnímu zhoršení v míře oxidativního/nitrosativního stresu (TBARS, NOx) a v aktivaci koagulace (TAT, trombocyty).

V našem klinicky relevantním modelu jsme tedy nepozorovali přínos metody CPFA v septickém šoku. CPFA nevedla k zabránění progresi sepse do septického šoku, neovlivnila tíži orgánových dysfunkcí, navíc vedla ke zhoršení oxidativního stresu a prohloubení prokoagulačního stavu.

Diskuze

CPFA byla uvedena na trh jako slibná metoda v léčbě septického šoku. Doporučení výrobce se však zakládalo na zcela minimálním, byť ve prospěch metody slibném, experimentálním či klinickém pozadí. První z klinických nekontrolovaných studií prokázala lepší systémovou hemodynamiku a reaktivitu leukocytů u septických pacientů oproti skupině léčené hemofiltrací [Ronco et al. 2002]. V druhé, rovněž nekontrolované, klinické studii spočíval přínos CPFA v zvýšení středního arteriálního tlaku u malé skupiny septických pacientů a nižší

mortalitě, než jaká byla predikována [Formica et al. 2003]. Experimentální výzkum byl dosud založen na jediné studii endotoxinového modelu králičího šoku se zahájením CPFA před vlastním bolusovým podáním endotoxinu, tj. profylaktické léčbě. Pomineme-li fakt, že bolusové podání obvykle vede k hypodynamickému šoku, nelze pominout fakt, že terapeutická intervence byla zahájena ještě před vlastní indukcí septického stavu. Tato situace zcela postrádá klinickou relevanci [Tetta et al. 2000]. V našem experimentálním zvířecím modelu jsme se snažili vysledovat příznivý efekt metody opět na celé řadě patofyziologických úrovních.

CPFA však nejenže nezmírnila rozvoj MODS či neovlivnila katecholaminovou potřebu, naopak vedla k prohloubení oxidativní/nitrosativní odpovědi na infekční inzult a dále zhoršila koagulační parametry. Z charakteru experimentu lze pouze spekulovat, které mechanismy jsou zodpovědné za toto pozorování. Nelze vyloučit aktivaci koagulace interakcí povrchu adsorpční pryskyřice s krví a krevními destičkami s jejich adsorpcí. Zhoršení oxidativního/nitrosativního stresu svědčí proti schopnosti CPFA příznivě ovlivnit endoteliální dysfunkci, která je v patofyziologii sepse jedním z klíčových mechanismů [Schouten et al. 2008].

Jak již bylo uvedeno výše v kapitole o HVHF, odstranění různých mediátorů sepse je koncepčně velmi zajímavým přístupem, který však nadále zůstává značně kontroverzní. Přetrvávají totiž otázky, které mediátory, kdy a do jaké míry, by měly být metodou odstraněny. A zda je jejich eliminace vůbec přínosná. Tato otázka vedla k vývoji různých hemoeliminačních metod založených na více, či méně, selektivním odstranění molekul a látek uplatňujících se v rozvoji SIRS a MODS. CPFA umožňuje adsorpci širokého spektra působků, zejména molekul o střední a vyšší molekulové hmotnosti, na styrenové pryskyřici a principem hemofiltrace. Přestože se tento koncept jeví terapeuticky atraktivní, výše zmíněné experimentální a nekontrolované klinické studie, vzhledem ke svým vážným metodologickým nedostatkům, nedovolují formulovat konkrétní klinická doporučení.

Stejně tak naše studie ponechává otázku alternativních očišťovacích metod v léčbě sepse dále otevřenou a varuje před přílišným optimismem v užívání těchto metod při absenci kvalitních klinicky relevantních experimentů a velkých randomizovaných studií.

8 SOUHRN VÝSLEDKŮ

Prokázali jsme, že je možné vytvořit dobře fungující experimentální model, který věrně napodobuje klinickou praxi, umožňuje rozsáhlou chirurgickou instrumentaci, extenzivní sledování a monitoraci na různých patofyziologických úrovních a dovoluje tak nejen lépe pochopit jednotlivé patofyziologické děje, ale zároveň detailní analýzu jednotlivých terapeutických intervencí. Věříme, že takto etablovaný model, může i v budoucnu napomáhat k poznání patogeneze kritických stavů a dovolí např. testování nových diagnostických či léčebných přístupů.

Na tomto modelu jsme dále přispěli do mozaiky patofyziologie akutního poškození ledvin v sepsi. Za podmínek adekvátně tekutinově resuscitované sepse a septického šoku se nejvíce snižování průtoku renální tepnou s následnou globální ischemií ledviny hlavním patogenetickým mechanismem AKI. Zajímavým zjištěním bylo navýšení renálního žilního tlaku. Tato renální žilní kongesce zasluhuje bezpochyby nadále pozornost v klinice i experimentu. Jednou ze známých interakcí v MODS je kardio-renální syndrom, který se může rozvinout nejen u septických pacientů, ale i např. u pacientů s chronickým srdečním selháváním a jak napovídají některé poslední studie, právě u takových pacientů renální žilní kongesce může významně ovlivňovat nejen vlastní renální funkce [Mullens et al. 2009], ale i v konečném důsledku nepřímo ovlivňovat mortalitu [Damman et al. 2009]. Lze tedy spekulovat, zda by posun v terapeutickém přístupu s příklonem k razantnější a včasnější selektivní redukci žilního městnání nepřinesl této skupině pacientů prospěch.

Z naší práce je zřejmé, že je-li zachována adekvátní perfúze ledviny, spočívá deteriorace ledvinných funkcí spíše v komplexní interakci mikrovaskulárních, tubulárních a zánětlivých faktorů. Z klinického pohledu nadále trvá v úvodní fázi septického šoku zásadní potřeba agresivní tekutinové resuscitace k udržení adekvátní volémie a perfúzního tlaku. Další kauzální léčebné možnosti však v tuto chvíli neexistují a snahou tedy musí být minimalizovat iatrogenní inzulty a včas odstranit vyvolávající příčinu, infekci. Vzhledem ke skutečnosti, že tubulární mikrocirkulace a navazující tubulární epiteliální dysfunkce se jeví časnou „obětí“ sepse, intenzivní výzkum se nyní obrací k farmakologickým možnostem ovlivnění renální mikrovaskulární, resp. tubulární epiteliální dysfunkce [Baiwa et al. 2009].

Absence histologických známek akutní tubulární nekrózy a přítomnost pouze mírných změn za stavu manifestního ledvinného selhávání by mohla podporovat nově formulovanou teorii orgánové dysfunkce, teorii buněčné hibernace. V této teorii hrají zásadní roli mitochondrie. Působením oxidativního/nitrosativního stresu dochází k porušení procesu oxidativní

fosforylace se snížením produkce vysokoenergetických fosfátů s navozením hypometabolického stavu, který připomíná zvířecí hibernaci. Orgánová dysfunkce by v takovém případě byla pouze odrazem snahy zabránit kompletnímu energetickému zhroucení v kritickém stavu a představovala by pouze adaptivní stav na těžký prozánětlivý stav. Pokud by tato teorie byla pravdivá, mohla by v budoucnu opět naprosto změnit terapeutický přístup. Kromě výše zmíněných současných možností terapie septických pacientů s AKI se v souladu se stávajícími doporučeními a závěry velkých klinických studií, a s přihlédnutím k výsledkům našich experimentů, nepřikláníme k využití mimotělních očišťovacích metod v „non-renální“ indikaci k léčbě sepse. Vyšší dávky kontinuálních metod či hybridní metody jako je CPFA nepřinášejí pacientům žádný prospěch a z patofyziologického hlediska nevedou k příznivému ovlivnění jakéhokoli biologického systému. Léčebně by tak měly být využívány pouze ke kontrole vnitřního prostředí u pacientů v septickém šoku se současně přítomnou ledvinnou dysfunkcí.

9 PRÁCE BEZPROSTŘEDNĚ NAVAZUJÍCÍ NA NÁŠ VÝZKUM

Další patofyziologické děje, které provázejí sepsi a septický šok, jsme se snažili částečně postihnout i ve studiích, které na náš základní výzkum bezprostředně navazují. Ať již se jedná o problematiku septické kardiomyopatie a případné ovlivnění vápníkových proudů v srdci či úlohu VIP a NPY. Společně s výše uvedenými komentovanými výsledky poskytují v současné literatuře velmi ojedinělý soubor prací, který odhaluje komplexnost a vzájemnou interakci patofyziologických mechanismů a mimotělních očišťovacích metod v sepsi a septickém šoku.

Práce týkající se selektivního ochlazení krve v mimotělním okruhu je unikátní svým naprosto novým přístupem k možnostem regionální antikoagulace v průběhu hemoelimačních metod. Tato technologie bude zasluhovat i do budoucna velkou pozornost, protože by mohla být základem pro alternativní způsob antikoagulace v průběhu kontinuálních či intermitentních metod náhrady funkce ledvin.

10 PODPORA

Náš výzkum byl podpořen VZ MSM 0021620819.

11 LITERATURA

- ABUELO, JG. Normotensive ischemic acute renal failure. *N Engl J Med.* 2007, 357, s. 797-805.
- AMARAL, A; OPAL, SM; VINCENT, JL. Coagulation in sepsis. *Intensive Care Med.* 2004, 30, s. 1032–1040.
- ANGUS, DC, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001, 29, s. 1303–1310.
- BAIWA, A; KINSEY, GR; OKUSA, MD. Immune mechanisms and novel pharmacological therapies of acute kidney injury. *Curr Drug Targets.* 2009, 12, s. 1196 - 1204.
- BAGSHAW, SM, et al. Acute kidney injury in septic shock: clinical outcomes and impact of duration of hypotension prior to initiation of antimicrobial therapy. *Intensive Care Med.* 2009, 35, s. 871–881.
- BAUD, L, et al. Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. *Kidney Int.* 1989, 35, s. 1111-1118.
- BELLOMO, R, et al. The effect of intensit plasma water exchange by hemofiltration on hemodynamics and soluble mediators in canine endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000, 161, s.1429-1436.
- BELLOMO, R. et al. Intensity of continuous renal-replacement therapy in critically ill patients. *N Engl J Med.* 2009, 361, s. 1627–1638.
- BELLINGER, DL,et al. Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease. *Cellular Immunology.* 2008, 1-2, s. 27-56.
- COLE, L, et al. The effect of coupled haemofiltration and adsorption on inflammatory cytokines in an ex vivo model. *Nephrol Dial Transplant.* 2002, 17, s. 1950-1956.
- CUNNINGHAM, PN,et al. Acute renal failure in endotoxemia is caused by TNF acting directly on TNF receptor-1 in kidney. *J Immunol.* 2002, 168, s. 5817-5823.
- DAMMAN, K. et al. Increased central venous pressure is associated with impaired renal function and mortality in a broad spectrum of patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009, 53, s. 582–588.
- DE BACKER, D,et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care.* 2007, 11, R101.
- DOI, K, et al. Animal model sof sepsis and sepsis/induced kidney Indry. *J Clin Invest.* 2009, 10, s. 2868-78.
- DYSON, A;, SINGER, M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit. Care Med.* 2009, 37, s. 30–37.

FORMICA, M, et al. Coupled plasma filtration adsorption. *Contrib Nephrol.* 2007, 156, s. 405-410.

FORMICA, M, et al. Hemodynamic response to coupled plasmafiltration-adsorption in human septic shock. *Intensive Care Med.* 2003, 29, s. 703-708.

HAMIDI, SA, et al. Clues to VIP function from knockout mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2006, 1070, s. 5-9.

HORBELT, M, et al. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007,293, s. 688-695.

HOSTE, EA, et al. Acute renal failure in patients with sepsis in a surgical ICU: Predictive factors, incidence, comorbidity, and outcome. *J Am Soc Nephrol.* 2003, 14, s. 1022–1030.

HOTCHKISS, RS; KARL, IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003, 348, s. 138-150

CHAWLA, LS, et al. Elevated plasma concentrations of IL-6 and elevated APACHE II score predict acute kidney injury in patients with severe sepsis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007,2, s. 22-30.

CHERTOW, GM, et al. Mortality after acute renal failure: models for prognostic stratification and risk adjustment. *Kidney Int.* 2006, 70, s. 1120-1126.

JOHANNES, T; MIK, EG; INCE C. Nonresuscitated endotoxemia induces microcirculatory hypoxic areas in the renal cortex in the rat. *Shock.* 2009, 31, s. 97-103.

LANGENBERG, C, et al. Renal blood flow in sepsis. *Crit Care Med.* 2005, 9, s. 363-37.

LANGENBERG, C, et al. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic Review. *Critical Care.* 2008, 12, s. R38.

LE DORZE, M, et al. The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care.* 2009,15, s. 503-508.

LI, X, et al. Organ crosstalk: the role of the kidney. *Curr Opin Crit Care.* 2009, 6, s. 481-487.

LEW, WY, et al. Endotoxininduced cardiac depression is associated with decreased cardiac dihydropyridine receptors in rabbits. *J Mol Cell Cardiol.* 1996, 28, s. 1367–1371.

MAERZ, L; KAPLAN, LJ. Abdominal compartment syndrome. *Crit Care Med.* 2008, 4, s. 212-215.

MATĚJOVIČ, M; RADERMACHER, P ; THONGBOONKERD, V. From hemodynamics to proteomics: unrevealing the complexity of acute kidney injury in sepsis. In *Yearbook of intensive care and Emergency medicine.* Edited by JL Vincent. Berlin Heidelberg : Springer Verlag, 2008. s. 568-578.

MEHTA, R, et al. Acute Kidney Injury Network: Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* .2007, 11, s. R31

MULLENS, W, et al. Importance of venous congestion for worsening of renal function in advanced decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2009, 53, s. 589–596.

OUDEMANS VAN-STRAATEN, HM, et al. Anticoagulation strategies in continuous renal replacement therapy: can the choice be evidence based? *Intensive Care Med*. 2006, 32, s. 188–202.

PALEVSKY, PM, et al. Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury. *N Engl J Med*. 2008, 359, s. 7–20.

PAYEN, D, et al. A positive fluid balance is associated with a worse outcome in patients with acute renal failure. *Crit. Care*. 2008, 12, s. 74.

PICCINNI, P, et al. Early isovolaemic haemofiltration in oliguric patients with septic shock. *Intensive Care Med*. 2006, 32, s. 80-86.

RANGEL-FRAUSTO, MS, et al. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*. 1995, 273, s. 117-123.

RATANARAT, R, et al. Pulse high-volume haemofiltration for treatment of severe sepsis: effects on hemodynamics and survival. *Crit Care*. 2005, 9, s. 294-302.

ROGIERS, P, et al. Continuous venovenous hemofiltration improves cardiac performance by mechanisms other than tumor necrosis factor-alpha attenuation during endotoxic shock. *Crit Care Med*. 1999, 27, s.1848-1855.

ROHRER, MJ; NATALE, AM. Effect of hypothermia on the coagulation cascade. *Crit Care Med*. 1992, 20, s. 1402–1405.

RONCO, C. The immunomodulatory effect of extracorporeal therapies in sepsis: a reconciliation of three theories. *Int J Artif Organs*. 2007, 30, s. 855– 857.

RONCO, C, et al. Effects of different doses in continuous veno-venous haemofiltration on outcomes of acute renal failure: a prospective randomised trial. *Lancet* 2000, 356, s. 26-30.

RONCO, C, et al. A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. *Crit Care Med*. 2002, 30, s. 1250-1255.

RUDIGER, A; SINGER, M. Mechanisms of sepsis induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med*. 2007, 35, s. 1599–1608.

SCHOUTEN, M, et al. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*. 2008, 83, s. 536-545.

TETTA, C, et al. Coupled plasma filtration-adsorption in a rabbit model of endotoxic shock. *Crit Care Med*. 2000, 28, s. 1526-1533.

- TRAN, D, et al. Acute renal failure in patients with acute pancreatitis: prevalence, risk factors, and outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 1993, 8, s. 1079–84.
- TRIVERIO, PA, et al. Long-term prognosis after acute kidney injury requiring renal replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2009, 24, s. 2186–2189.
- TRZECIAK, S, et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med*. 2007, 49, s. 88-98.
- UCHINO, S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: A multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005, 294, s. 813–818.
- UCHINO, S. Epidemiology of acute renal failure in the world. *Curr Opin Crit Care*. 2006, 12, s. 538-543.
- VENKATARAMAN, R; SUBRAMANIAN, S; KELLUM, JA. Clinical review: extracorporeal blood purification in severe sepsis. *Crit Care* .2003, 7, s. 139– 145.
- VINCENT, JL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med*. 2006, 34, s. 344–353.
- WAN, L, et al. Pathophysiology of septic acute kidney injury: what do we really know? *Crit Care Med*. 2008, 36, s. 198-203.
- WU, L, et al. **a** Peritubular capillary dysfunction and renal tubular epithelial cell stress following lipopolysaccharide administrativ in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007, 292, s. 261-268.
- WU, L, et al. **b** Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2007, 18, s. 1807-1815.

12 PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat těmto lidem za jejich pomoc a podporu po celou dobu naší experimentální práce a při tvorbě této dizertační práce:

Prof. MUDr. Martinu Matějovičovi, PhD., mému školiteli, za jeho příkladný lidský, profesní i vědecký přístup, trpělivost, neúnavnost, shovívavost a motivaci po celou dobu mého postgraduálního studia.

Mým rodičům za jejich bezmeznou rodičovskou lásku, trpělivost, rady, ochotu vyslechnout mě kdykoliv to bylo nutné a schopnost dodat energii v pravou chvíli.

MUDr. Romanovi Sýkorovi za jeho přátelství, obrovskou zásobu humoru a odhodlání, bez čehož bychom některé okamžiky těžko zvládli.

MUDr. Ivanovi Novákovi, MUDr. Janu Benešovi, MUDr. Lence Ledvinové a ostatním mým přátelům a kolegům nejen z JIP I.IK, kteří nám setrvale pomáhali svými názory, radami, podporou či vlastní prací v průběhu našich experimentálních studií.

13 PŘÍLOHY