

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Lékařská fakulta v Plzni

**HEMOELIMINAČNÍ METODY V LÉČBĚ SEPSE A ČASNÉ
MULTIORGÁNOVÉ DYSFUNKCE**

MUDr. Roman Sýkora

Dizertační práce

Plzeň 2008

Souhlasím se zapůjčováním této práce

MUDr. Roman Sýkora

OBSAH

1	ÚVOD	5
2	ORIGINÁLNÍ STUDIE	7
3	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	9
3.1	KONTINUÁLNÍ NÁHRADY FUNKCE LEDVIN V LÉČBĚ SEPSE - VYSOKOOBJEMOVÁ HEMOFILTRACE	9
3.2	PLASMAFILTRACE SPOJENÁ S ADSORPCÍ V LÉČBĚ SEPSE	10
3.3	ANTIKOAGULACE PŘI NÁHRADĚ FUNKCE LEDVIN: REGIONÁLNÍ OCHLAZENÍ MIMOTĚLNÍHO OKRUHU	12
4	CÍLE PRÁCE	13
5	LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY STUDIÍ	14
6	METODOLOGICKÁ ČÁST	15
6.1	ZVÍŘECÍ MODEL - ÚVOD	15
6.2	EXPERIMENTÁLNÍ MODEL SEPTICKÉHO ŠOKU PŘI PERITONITIDĚ	16
6.2.1	<i>Anestézie a instrumentace experimentálního modelu septického šoku</i>	16
6.2.2	<i>Měření systémové a regionální hemodynamiky, mikrocirkulace a výpočty</i>	17
6.2.3	<i>Odběr a hodnocení vzorků krve, plazmy a tkání</i>	19
6.3	PROTOKOL STUDIÍ A NASTAVENÍ HEMOELIMINAČNÍCH METOD	21
6.3.1	<i>Protokol studie</i>	21
6.3.2	<i>Experimentální skupiny</i>	21
6.3.3	<i>Resuscitace experimentální sepse a septického šoku</i>	21
6.3.4	<i>Nastavení kontinuální veno-venózní hemofiltrace</i>	22
6.3.5	<i>Nastavení plazmafiltrace spojené s adsorpcí</i>	22
6.3.6	<i>Antikoagulace</i>	23
6.4	MATERIÁL A METODY STUDIE: ANTIKOAGULACE PŘI NÁHRADĚ FUNKCE LEDVIN: REGIONÁLNÍ OCHLAZENÍ MIMOTĚLNÍHO OKRUHU	25
6.4.1	<i>Experimentální model a popis technických parametrů</i>	25
6.4.2	<i>Experimentální skupiny a protokol studie</i>	26
6.5	POUŽITÉ STATISTICKÉ METODY	26
6.6	POZNÁMKA	27
7	SOUHRN VÝSLEDKŮ STUDIÍ	28
7.1	VYSOKOOBJEMOVÁ HEMOFILTRACE V SEPTICKÉM ŠOKU (I)	28
7.2	PLAZMAFILTRACE SPOJENÁ S ADSORPCÍ V SEPTICKÉM ŠOKU (II)	29

7.3	ANTIKOAGULACE PŘI NÁHRADĚ FUNKCE LEDVIN: REGIONÁLNÍ OCHLAZENÍ MIMOTĚLNÍHO OKRUHU (III)	31
8	ZÁVĚR	33
9	SEZNAM ORIGINÁLNÍCH PUBLIKACÍ NAVAZUJÍCÍCH NA ŘEŠENOU PROBLEMATIKU	35
10	PODĚKOVÁNÍ	37
11	PODPORA PRÁCE	38
12	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	39
13	LITERATURA	41
14	PŘÍLOHY: PUBLIKOVANÉ PRÁCE	47
	<ul style="list-style-type: none"> • HIGH VERSUS STANDARD-VOLUME HAEMOFILTRATION IN HYPERDYNAMIC PORCINE PERITONITIS: EFFECTS BEYOND HAEMODYNAMICS? • COUPLED PLASMA FILTRATION ADSORPTION IN EXPERIMENTAL PERITONITIS-INDUCED SEPTIC SHOCK. • REGIONAL COOLING OF THE EXTRACORPOREAL BLOOD CIRCUIT: A NOVEL ANTICOAGULATION APPROACH FOR RENAL REPLACEMENT THERAPY? • HEMOELIMINAČNÍ METODY V LÉČBĚ SEPSE: SOUČASNÝ STAV. • MOŽNOSTI ANTIKOAGULAČNÍHO ZAJIŠTĚNÍ METOD MIMOTĚLNÍ NÁHRADY FUNKCE LEDVIN U KRITICKY NEMOCNÝCH. 	

1 ÚVOD

Sepse je v současnosti desátou nejčastější příčinou úmrtí v USA a velmi podobná situace je i ve většině zemí Evropské unie (1). Podle velkých statistik se sepsa stává medicínským problémem nového tisíciletí (1), což souvisí nejen se stárnutím populace, ale i se zvyšujícím se počtem imunokompromitovaných osob. Problém sepsy se promítá do většiny medicínských disciplín, negativním způsobem ovlivňuje výsledky léčby a nejčastěji se manifestuje u nemocných různých diagnostických skupin přijatých na jednotky intenzivní péče (JIP). Vlastní patogenetický mechanismus vzniku sepsy a multiorgánové dysfunkce (MODS, multiple organ dysfunction syndrome) je přes mimořádně intenzivní klinický a experimentální výzkum nejasný. Základním rysem je nekontrolovaná a deregulovaná systémová zánětlivá odpověď na infekci, která je zprostředkována širokým spektrem endogenních působků. Předpokládaný komplex vzájemně propojených mechanismů zahrnuje interakci bakteriálních faktorů, inflamatorních mediátorů, endoteliálního poškození, selhání mikrocirkulace, narušené buněčné energetiky a apoptózy. Jejich vlivem vzniká dysfunkce řady orgánů vzdálených původnímu ložisku infekce.

Mimořádný medicínský a socio-ekonomický dopad sepsy a navazujícího MODS je důvodem velmi intenzivního celosvětového experimentálního i klinického výzkumu. Informace o možnostech prevence a léčby tkáňového poškození a orgánové dysfunkce v sepsi jsou však stále nedostatečné a proto se staly východiskem předkládané dizertační práce. Selhání klinických studií zaměřených proti jednotlivým vybraným mediátorům sepsy stimulovalo výzkum cílený na neselektivní odstranění nadbytku mediátorů sepsy. Tato „detoxifikace“ organismu tvoří základní biologické východisko a teoretický podklad pro využití hemoelminačních metod jako podpůrné léčby sepsy (2, 3). Na pozadí těchto úvah byl zkoumán vliv různých modalit hemoelminačních metod na klinicky relevantním modelu

septického šoku prasete. Studie konkrétně hodnotily přínos vysokoobjemové hemofiltrace a plazmafiltrace spojené s adsorpcí v podpůrné léčbě sepse. Hlavním cílem projektu bylo blíže popsat vhodné biologické cíle pro uplatnění „pleiotropního“ účinku eliminačních metod a účinnost jejich ovlivnění zvolenou metodou. Proto byl vliv léčebných intervencí zkoumán na řadě vzájemně nezávislých patofyziologických úrovních uplatňujících se v procesu sepse a orgánové dysfunkce. Protože žádnou z hemoelimačních metod nelze rutinně klinicky používat bez zajištění nesrážlivosti krve pacienta nebo mimotělního okruhu, zaměřili jsme se na vývoj nové metody antikoagulace při náhradě funkce ledvin regionálním ochlazením mimotělního okruhu.

2 ORIGINALNÍ STUDIE

Tato dizertační práce je založena na komentovaném souboru níže uvedených originálních experimentálních studií a souhrnných článků, které jsou v textu označeny římskými číslicemi.

- I. **Sykora R**, Chvojka J, Krouzecky A, Radej J, Karvunidis T, Varnerova V, Novak I and Matejovic M. **High versus standard-volume haemofiltration in hyperdynamic porcine peritonitis: effects beyond haemodynamics?** Intensive Care Med 2008; Oct 14. [Epub ahead of print] **IF 4,6**.

Práce byla oceněna: Vítězná práce I. česko-slovenského kongresu intenzivní medicíny dětí a dospělých a XIV. Národního kongresu České společnosti anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny. Přednáška z oblasti intenzivní medicíny.

- II. **Sykora R**, Chvojka J, Krouzecky A, Radej J, Kuncova J, Varnerova V, Karvunidis T, Novak I and Matejovic M. **Coupled plasma filtration adsorption in experimental peritonitis-induced septic shock.** Shock 2008; Sep 29 [Epub ahead of print] **IF 3,3**.

Práce byla oceněna: Poster award, 28th International Symposium in Intensive Care and Emergency Medicine Brussels, March 18 – 21, 2008.

- III. Krouzecky A, Chvojka J, **Sykora R**, Radej J, Karvunidis T, Novak I, Ruzicka J, Petrankova Z, Benes J, Bolek L and Matejovic M. **Regional cooling of the extracorporeal blood circuit: a novel anticoagulation approach for renal replacement therapy?** Intensive Care Med 2008; Sep 18 [Epub ahead of print] **IF 4,6**.

Práce byla oceněna: Ocenění za nejlepší přednášku na II. kongresu České společnosti pro intenzivní medicínu, 5.června 2008.

*Přihlášený patent, leden/2008, u Patentového úřadu ČR. Vlastník: Univerzita Karlova Praha, Lékařská fakulta v Plzni. Původci: MUDr. Jiří Růžička, PhD., Ing. Zdena Petránková, MUDr. Jiří Beneš, PhD., MUDr. Lukáš Bolek, PhD., MUDr. Aleš Kroužecký, PhD., MUDr. Roman Sýkora, Doc. MUDr. Martin Matějovič, PhD. **Způsob snížení srážlivosti krve v okruhu přístroje pro náhradu funkce ledvin a zařízení k provádění tohoto způsobu.***

IV. Sýkora R, Chvojka J, Kroužecký A, Raděj J, Karvunidis T, Novák I a Matějovič M
Hemoeliminační metody v léčbě sepse: současný stav. Vnitřní lékařství 2008; v tisku.

V. Kroužecký A, Novák I, Raděj J, Sýkora R, Chvojka J, Karvunidis T, Matějovič M.
Možnosti antikoagulačního zajištění metod mimotělní náhrady funkce ledvin u kriticky nemocných. Anesteziologie a intenzivní medicína 2008, 19: 154-158.

3 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

3.1 Kontinuální náhrady funkce ledvin v léčbě sepse - vysokoobjemová hemofiltrace

Nejčastěji používanou hemoeliminační metodou na jednotkách intenzivní péče u nemocných v sepsi či septickém šoku se současným akutním poškozením ledvin (AKI, acute kidney injury) je kontinuální náhrada funkce ledvin (CRRT, continuous renal replacement therapy) hemofiltrací (CVVH, continuous veno-venous hemofiltration) nebo hemodiafiltrací (CVVHDF, continuous veno-venous hemodiafiltration) (4). Předností těchto metod je 24 hodinová efektivní a flexibilní kontrola metabolické homeostázy a nelimitované zajištění výživy. Použití mimotělních hemoeliminačních metod jako podpůrné terapie v léčbě sepse je v poslední době velmi diskutovaným a dosud neuzavřeným tématem (5, 6).

Podle multicentrické studie, která hodnotila efekt dávek 20, 35 a 45 ml/kg/h, intenzivnější hemofiltrací léčba pravděpodobně zlepšuje prognózu kriticky nemocných s akutním selháním ledvin. Podskupinová analýza této randomizované klinické studie naznačila, že právě pacienti se sepsí a současným selháním ledvin by mohli mít prospěch z dalšího zvyšování dávky filtrace (7). Koncept tzv. vysokoobjemové hemofiltrace (HVHF, high-volume hemofiltration) v léčbě sepse je podporován klinickými (8-14) a experimentálními (15-19) studiemi, které poukazují na schopnost časně hemofiltrace příznivě ovlivnit především hemodynamickou nestabilitu a dávku vazopresorů. Kritické zhodnocení metodologické kvality těchto studií však neumožňuje formulování závazných klinických doporučení. Klinické studie jsou limitovány nekontrolovaným nebo retrospektivním designem a velmi malou velikostí sledovaného souboru nemocných. Podobně kvalita provedených experimentálních studií je nedostatečná jak z pohledu zvoleného modelu sepse, tak z hlediska načasování a délky intervence (8-19).

V souhrnném článku „Hemoeliminační metody v léčbě sepse: současný stav“ (IV.), který je přílohou této dizertační práce se detailně zabýváme biologickými mechanismy hemoeliminačních metod v sepsi. Rozebíráme faktory ovlivňující účinnost hemoeliminačních metod jako je diskutovaná dávka hemofiltrace, HVHF, doba zahájení CRRT, použití filtrů s vysokou propustností a adsorpcí a volba vhodné modalit CRRT či IHD.

Z rozboru současné literatury jednoznačně vyplývá nutnost dalšího zkoumání konceptu vysokoobjemové hemofiltrace. Protože klinické studie jsou zatíženy řadou rušivých faktorů, je perspektivním řešením experimentální výzkum, který v maximální možné míře napodobuje patofyziologickou situaci kriticky nemocných. Výsledky studií uvedené v této dizertaci vycházejí z klinicky relevantního modelu sepse (Obrázek 1), který umožňuje výzkum základních patofyziologických komponent sepse a zhodnocení léčebných intervencí, včetně hemoeliminačních metod.

3.2 Plazmafiltrace spojená s adsorpcí v léčbě sepse

Plazmafiltrace spojená s adsorpcí (CPFA, coupled plasma filtration adsorption) je nový druh hemoeliminační metody, která je zaměřena především na neselektivní odstraňování cirkulujících mediátorů, které se spolupodílejí na patogenezi sepse (20). Tato metoda se skládá z plazmafiltru, adsorpční kapsle obsahující syntetickou makroporózní pryskyřici s vysokou adsorpční kapacitou a ze standardního hemofiltru (Obrázek 4). Krev prochází rychlostí 150 ml/min plazmafiltrem, dochází k separaci plazmy, nejčastěji se jedná o 20% objemu protékající krve. Separace plazmy významně zpomalí její průtok (30 ml/min) a umožní po delší dobu kontakt plazmy s extrémně porózním adsorpčním povrchem (50000m² v naší studii) hydrofobní styrenové pryskyřice obsažené v kapsli, která má

vysokou schopnost adsorpce solubilních cirkulujících mediátorů a cytokínů (21, 22), což podporují in vitro a ex vivo studie (23, 24). Takto očištěná krev dále postupuje do hemofiltru a podstoupí buď hemofiltraci či hemodialýzu (Obrázek 4).

Dosud byla na toto téma publikována jen jedna experimentální práce. Účinek CPFA byl zkoumán na králičím modelu endotoxinového šoku navozeného letálním bolusem endotoxinu *E. coli* (25). V této studii byla léčba CPFA spojena s prodloužením doby přežití (72 hodin) (25). Studie je však omezena řadou limitací: a) výsledkem bolusového podání endotoxinu a absence tekutinové resuscitace byl hypodynamický endotoxinový šok, který je zcela v protikladu k obvyklé klinické situaci, b) léčba CPFA byla zahájena před indukcí šoku, tzn. ve schématu, které nelze klinicky uplatnit.

U obou dosud publikovaných klinických studií (24, 26) je výpovědní hodnota slibných a pozitivních výsledků limitována především velikostí souborů sledovaných pacientů a absencí randomizace. V klinické studii u deseti pacientů v septickém šoku Ronco et al. ukázali, že desetihodinová léčba CPFA zlepší systémovou hemodynamiku a reaktivitu leukocytů více než hemofiltrace (24). Formica et al. v observační klinické studii, bez kontrolní skupiny, zkoumal efekt opakované léčby CPFA na hemodynamiku u dvanácti pacientů v septickém šoku (26). V této studii pozoroval zvýšení středního arteriálního tlaku a vyšší než predikované přežívání nemocných (26). Dříve než bude možné CPFA metodu doporučit pro klinickou praxi, je jednoznačně nezbytné ověřit její účinnost a bezpečnost na klinicky relevantních modelech septického šoku.

3.3 Antikoagulace při náhradě funkce ledvin: regionální ochlazení mimotělního okruhu

Nejčastějším způsobem prevence srážení krve v průběhu náhrady funkce ledvin je systémová antikoagulace, která však není vhodná pro některé rizikové pacienty. V těchto případech se používají alternativní způsoby antikoagulace: regionální antikoagulace, minimální heparinizace, prostaglandiny nebo proplachy mimotělního okruhu (27, 28). Jedná se ovšem o metody, které jsou buď nedostatečně efektivní, spojeny s nežádoucími účinky nebo jsou příliš drahé. Snížení teploty krve vede ke snížení srážlivosti (29). Tento efekt je dán především inhibicí enzymatických reakcí koagulačních kaskád a poruchou funkce krevních destiček (30, 31). Čím je zchlazení intenzivnější, tím lze očekávat větší antikoagulační efekt (29) a naopak při ohřívání krve lze sledovat opačný efekt na normalizaci krevní srážlivosti (32). Na základě těchto údajů jsme postulovali hypotézu, že ochlazení krve v mimotělním okruhu a následné ohřátí krve před návratem do organismu může vést k dostatečnému protisrážlivému efektu. Tím by bylo možné vyhnout se jakékoliv farmakologické antikoagulaci v průběhu mimotělních hemoeliminačních metod.

4 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo v experimentálních studiích na zvířecím modelu septického šoku:

- 1) a) Zhodnotit vliv hemofiltrace na úrovni systémové hemodynamiky, regionální hemodynamiky, mikrocirkulace, energetického metabolismu, oxidativního stresu, endotelu a koagulace.

b) Porovnat vliv vysokoobjemové hemofiltrace s dávkou 100 ml/kg/h s „konvenční - septickou“ dávkou hemofiltrace 35 ml/kg/h.
- 2) Zkoumat vliv plazmafiltrace spojené s adsorpcí na úrovni systémové hemodynamiky, regionální hemodynamiky, mikrocirkulace, energetického metabolismu, oxidativního stresu, endotelu a koagulace.
- 3) Ověřit hypotézu, že ochlazení krve v mimotělním okruhu a následné ohřátí krve před návratem do organismu může vést k dostatečnému protisrážlivému efektu.

5 LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY STUDIÍ

Experimentální práce byly provedeny v souladu se závaznými doporučeními pro práci s laboratorními zvířaty a schváleny etickou komisí Lékařské Fakulty UK v Plzni.

6 METODOLOGICKÁ ČÁST

6.1 Zvířecí model - úvod

Zvířecí modely v našich studiích jsou vybírány a tvořeny tak, aby byly maximálně klinicky relevantní (tzn. se svými vlastnostmi co nejvíce podobaly klinické situaci v humánní medicíně) (33, 34). Pro výzkum mimotělních eliminačních metod používáme model velkého zvířete – selete, jehož anatomické, fyziologické a metabolické parametry se velice blíží člověku. Při tekutinové resuscitaci sepse a septického šoku bylo použito velkých objemů tekutin ke korekci intravaskulární náplně s cílem vyloučit hypovolémii, která by mohla negativně ovlivnit hemodynamické a metabolické parametry. Tímto způsobem bylo dosaženo hyperdynamické cirkulace, typické pro sepsi, charakterizované zvýšením minutového srdečního výdeje a snížením systémové vaskulární rezistence s poruchami mikrocirkulace a energetického metabolismu. Selata jsou vhodná k zavedení stejných invazivních vstupů a kanyl, které se používají u pacientů na jednotkách intenzivní péče. Navíc nabízejí nekomplikovaný operační přístup ke zkoumaným orgánům hepatosplanchniku a ledvině umožňující sledovat přímo regionální hemodynamiku a selektivně odebírat krevní vzorky z cév jednotlivých sledovaných orgánů.

Použití antibiotik by náš model ještě více přiblížilo klinické situaci. Náš model však napodobuje hyperdynamickou sepsi s narůstající tíží onemocnění a progresí do septického šoku v dostatečných časových intervalech (Obrázek 2 a 3). Použití antibiotik by významně zasáhlo do průběhu onemocnění a rozvoje septické odpovědi v průběhu našeho modelu. Náš instrumentovaný model je konstruovaný pro přímá měření a hodnocení patofyziologických odpovědí a není svou povahou určen pro hodnocení přežití.

Na základě zkušeností s prasečím modelem jsme zdravá selata použili jako objekty pro výzkum metody regionální antikoagulace pro CRRT chlazením mimotělního okruhu v mnohem jednodušší instrumentaci.

6.2 Experimentální model septického šoku při peritonitidě

6.2.1 Anestézie a instrumentace experimentálního modelu septického šoku

V experimentech jsme použili selata obou pohlaví, vážící 27-44kg. Jako premedikaci jsme intramuskulárně podávali atropin (1mg), ketamin (50mg) a azaperon titrovaný podle klinického efektu. Na úvod do anestézie byl podán intravenózně atropin (0,5 mg), propofol 2% (1-2 mg/kg), ketamin (2 mg/kg) a pancuronium (4mg). Po intubaci byla selata napojena na umělou plicní ventilaci (FiO₂ 0,4; PEEP 5-10 cm H₂O; dechový objem 10 ml/kg; dechová frekvence byla nastavena tak, aby se cílový arteriální pCO₂ pohyboval mezi 4,0 a 5,0 kPa). Během chirurgické instrumentace byla celková anestézie vedena kontinuálním intravenózním podáváním thiopentalu (10 mg/kg/h) a fentanylu (10-15 µg/kg/h). Po dokončení operace byly sníženy dávky thiopentalu (5 mg/kg/h) i fentanylu (5 µg/kg/h) a touto rychlostí byly podávány do konce experimentu. Svalová relaxace byla zajištěna kontinuálním intravenózním podáváním pancuronia (0,2 mg/kg/h) po celou dobu experimentu. Infúzní roztok Plasma Lyte byl podáván jako udržovací tekutina v průběhu chirurgické instrumentace rychlostí 15 ml/kg/h, poté byla dávka snížena na 7 ml/kg/h. Hladina glykémie v arteriální krvi byla udržována mezi 4,5-7 mmol/l infúzí 20% glukózy v průběhu celého experimentu.

Do levé jugulární žíly byl zaveden trojcestný centrální žilní katétr k podávání farmak a infuzí. Cestou pravé jugulární žíly byl zaveden plicnicový katétr. Do levé femorální tepny jsme zavedli katétr, který sloužil k invazivní monitoraci krevního tlaku, sběru vzorků a zavádění

fiberoptického katétru k měření nitrohručního objemu krve (ITBV, intrathoracic blood volume). Do pravé femorální žíly byla zavedena dialyzační kanyla, přes kterou byla selata napojována na hemoeliminační metody. Po provedení horní střední laparotomie jsme na portální žílu, společnou jaterní tepnu a renální tepnu vlevo upevnili ultrazvukové průtokové sondy (Transonic Systems, Ithaca, New York). Poté jsme do portální a renální žíly vlevo zavedli katétry ke sběru vzorků. Do jaterní žíly jsme zavedli katétra až po ukončení pokusu pod ultrazvukovou kontrolou. Přímo na povrch ledviny, skrze incizi v renální kapsuli, jsme umístili laser Doppler sondu (PF 404, Suturable angled probe, Perimed, Jarfalla, Švédsko) sloužící k monitoraci mikrocirkulace. Následovalo vyšíť dvouhlavňové ileostomie, kterou jsme použili k monitoraci střevní mikrocirkulace a to laser Doppler sondou (PF 409, Straight endoscopic probe, Perimed, Jarfalla, Švédsko) a intravitalní videomikroskopií (Microscan, MicroVision Medical, Amsterdam, Holandsko). Ileostomie byla mezi měřeními přikryta sterilní gázou navlhčenou fyziologickým roztokem a zakryta stomickým sáčkem. Na konci operace jsme umístili skrze břišní stěnu dva trubicové drény k derivaci ascitu a k indukci peritonitidy. Perkutánně jsme zavedli cystostomický katétra pod ultrazvukovou kontrolou a měřili výdej moči. Po uzavření laparotomie následovalo 6 hodin pooperační stabilizace. Současně s úvodem do anestézie bylo 0,5g/kg autologní stolice selete rozpuštěno ve 200 ml fyziologického roztoku a kultivováno ve vodní lázni při 37°C. Tento roztok byl použit následně k indukci peritonitidy.

6.2.2 Měření systémové a regionální hemodynamiky, mikrocirkulace a výpočty

Z parametrů systémové hemodynamiky byly měřeny tyto parametry: srdeční výdej, systémová vaskulární rezistence, ITBV a plicní tlaky obou komor. Na úrovni regionální hemodynamiky hepatosplanchniku byly monitorovány průtoky krve portální žílou, společnou jaterní tepnou a levou renální tepnou. Odebírali jsme vzorky arteriální, portální, jaterní a

renální žilní krve k analýze pH, pO₂, pCO₂ a saturaci hemoglobinu kyslíkem. Následně jsme podle obvyklých vzorců vypočítávali systémovou a především regionální dodávku kyslíku, spotřebu kyslíku játry a ledvinou:

Systémová dodávka kyslíku $DO_2 = (CO \times CaO_2)$

Systémová konzumpce kyslíku $VO_2 = CO \times (CaO_2 - CvO_2)$

CO Srdeční výdej (cardiac output) [ml/kg/min]

CaO₂ Obsah kyslíku v arteriální krvi = $(Hb \times 1,34 \times SaO_2) + (0,003 \times PaO_2)$

CvO₂ Obsah kyslíku venózní krve = $(Hb \times 1,34 \times SvO_2) + (0,003 \times PvO_2)$

Hb Hemoglobin [mg/ml]

SaO₂ Saturace arteriální krve kyslíkem

SvO₂ Saturace smíšené žilní krve (a.pulmonalis)

PaO₂ Parciální tlak kyslíku v arteriální krvi [kPa]

PvO₂ Parciální tlak kyslíku ve smíšené žilní krvi [kPa]

Dodávka kyslíku do ledviny $DO_2 \text{ renal} = RABF \times CaO_2$

Spotřeba kyslíku ledvinou $VO_2 \text{ renal} = RABF \times (CaO_2 - CrvO_2)$

CrvO₂ Obsah kyslíku: renální žíle = $(Hb \times 1,34 \times SrvO_2) + (PrvO_2 \times 0,003)$

RABF Průtok ledvinnou tepnou, renal arterial blood flow [ml/kg/min]

SrvO₂ Saturace renální žíly kyslíkem

PrvO₂ Parciální tlak kyslíku v renální žíle

Dodávka kyslíku do jater $DO_2 \text{ liver} = (HABF \times CaO_2) + (PVBF \times CpvO_2)$

Spotřeba kyslíku játry $VO_2 \text{ liver} = DO_2 \text{ liver} - ((HABF + PVBF) \times ChvO_2)$

HABF Průtok krve společnou jaterní artérií, hepatic arterial blood flow

PVBF Průtok krve portální žilou, portal venous blood flow

CpvO₂ Obsah kyslíku: portální žíla = $(Hb \times 1,34 \times SpvO_2) + (PpvO_2 \times 0,003)$

SpvO ₂	Saturace krve portální žíly kyslíkem
PpvO ₂	Parciální tlak kyslíku v portální žíle
ChvO ₂	Obsah kyslíku v jaterní žíle = (Hb x 1,34 x ShvO ₂) + (PhvO ₂ x 0,003)
ShvO ₂	Saturace jaterní žíly kyslíkem
PhvO ₂	Parciální tlak kyslíku v jaterní žíle

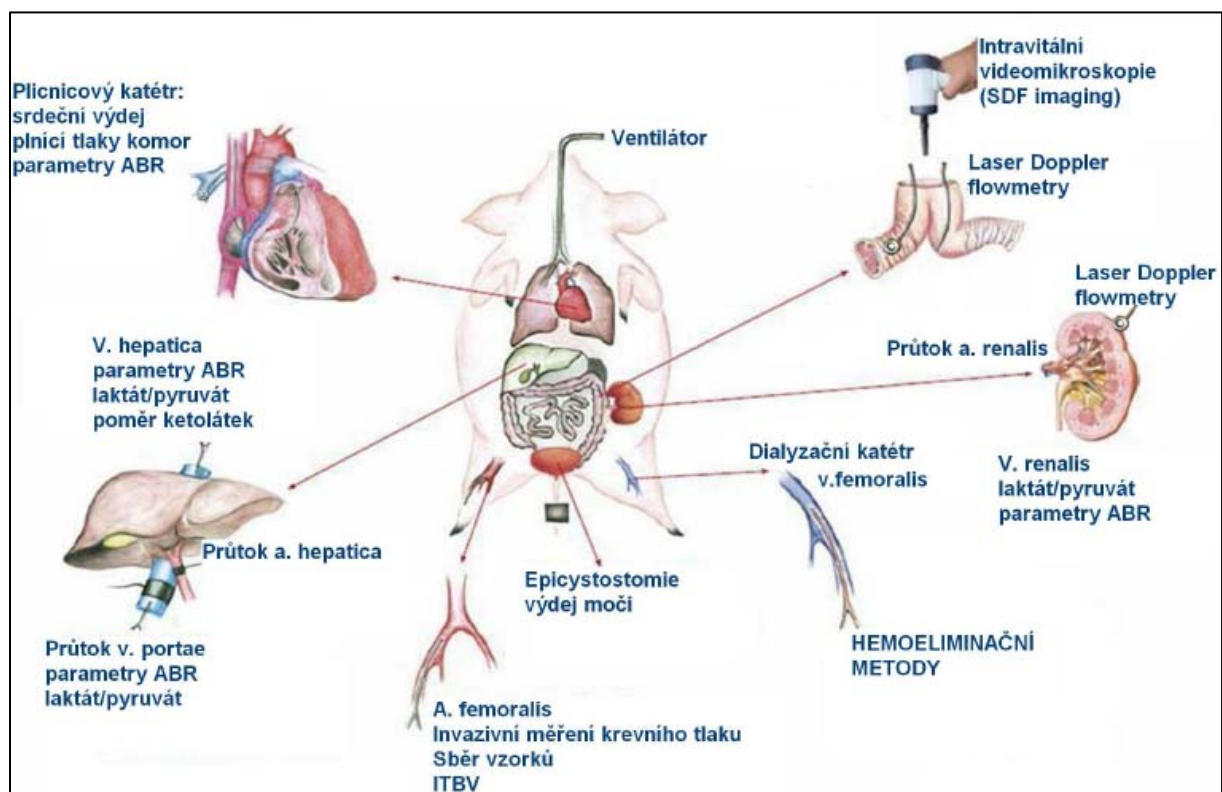
Mikrovaskulární perfuze sliznice ilea a kůry ledviny byla hodnocena za použití laser Dopplerometrické metody hodnocením perfuzních jednotek při adekvátním zpětně odráženém signálu (back scattered light). Současně jsme využili techniku intravitální videomikroskopie (SDF, Side-stream Dark imaging) k přímému zobrazení mikrocirkulace sliznice ilea. Během každého měření jsme natočili ze tří různých míst sliznice ilea dvacetivteřinovou videosekvenci. Za pomoci softwaru vyvinutého k hodnocení těchto sekvencí: Microscan Analyzing Software (MicroVision Medical, Amsterdam, The Netherlands) jsme určovali microvascular flow index (MFI) a flow heterogeneity index (FHI). 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 naší studii jako výsledek uvádíme průměrný MFI ze tří náhodně vybraných lokalit sliznice ilea. FHI ukazuje spíše než na charakter průtoku na prostorovou heterogenitu perfuze. Výpočet FHI provádíme jako rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou MFI dělenou průměrným MFI (35).

6.2.3 Odběr a hodnocení vzorků krve, plazmy a tkání

Z arteriální, portální, jaterní a renální žilní krve jsme stanovili koncentrace laktátu (L) a pyruvátu (P), dále byly stanoveny arteriální sérová hladina alanin aminotransferázy (ALT) a poměru ketolátek z jaterní žilní krve (KBR, acetoacetát/β-hydroxybutyrát). K popisu

oxidativního a nitrosativního stresu jsme použili měření arteriálních reaktantů s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS, thiobarbituric acid reactive species) a koncentraci arteriálních nitrátů a nitritů. Z arteriální krve jsme stanovili také aktivitu von Willebrandova faktoru (vWF), koncentraci komplexů trombinu-antitrombinu (TAT), počet krevních destiček, koncentraci asymetrického dimethylargininu (ADMA), tumor necrosis faktoru alfa (TNF- α) interleukinu 6 (IL-6) a v případě studie plazmafiltrace spojené s adsorcí také arteriální hladiny neuropeptidu Y (NPY) a vazoaktivního intestinálního peptidu (VIP). Všechny vzorky jsme hodnotili dvojmo a abychom odstranili efekt hemodiluce při objemové resuscitaci, korigovali jsme následující hodnoty na celkovou bílkovinu: NO_x, TBARS, ADMA, ALT, vWF, TAT, TNF- α , IL-6, NPY a VIP.

Obrázek 1. Instrumentace experimentálního modelu septického šoku při peritonitidě



6.3 Protokol studií a nastavení hemoelimačních metod

6.3.1 Protokol studie

První měření a sběry vzorků byly provedeny po 6 hodinovém zotavení z chirurgické instrumentace. Následovala indukce peritonitidy inokulací 0,5 g/kg autologní stolice rozpuštěné v 200 ml fyziologického roztoku do břišní dutiny jedním z drénů. Druhý set měření a sběru vzorků byl proveden po 12 hodinách od indukce peritonitidy. V této době byla již plně rozvinutá hyperdynamická sepse, tekutinově resuscitovaná krystaloidem i koloidem podle protokolu. Poté byla zvířata randomizována buď do kontrolních skupin, kde spontánně progredovala sepse nebo byla napojena na 10 hodin na některou z hemoelimačních metod (HVHF, CVVH, CPFA). Další měření byla provedena v 18. a 22. hodině, v průběhu hemoelimační metody (Obrázek 2 a 3).

6.3.2 Experimentální skupiny

Ve studii „vysokoobjemová hemofiltrace v septickém šoku“ jsme randomizovali do tří skupin: kontrolní (Control, n = 7), standardní hemofiltrace 35 ml/kg/h (HF, n = 7) a vysokoobjemová hemofiltrace 100 ml/kg/h (HVHF, n = 7).

Ve studii „plazmafiltrace spojená s adsorpcí v septickém šoku“ jsme randomizovali do dvou skupin: kontrolní (Control, n = 8) a plazmafiltrace spojená s adsorpcí (CPFA, n = 8).

6.3.3 Resuscitace experimentální sepse a septického šoku

K základní, udržovací, infúzi roztoku PlasmaLyte jsme od šesté hodiny od indukce peritonitidy přidali infúzi 6% hydroxyetylskrubu 130 kD/0,4 rychlostí 10 ml/kg/h (7 ml/kg/h v případě že byl CVP nebo PAOP vyšší než 18 mm Hg) tak, abychom udrželi plnicí tlaky

komor vyšší než 12 mm Hg. Kontinuální infúze noradrenalinu byla zahájena, pokud se tekutinovou resuscitací nedařilo udržet střední arteriální tlak nad 70 mm Hg. Poté, co jsme získali poslední set měření a odebrali poslední vzorky, byla zvířata utrácena za hluboké celkové anestézie injekcí KCl.

6.3.4 Nastavení kontinuální veno-venózní hemofiltrace

K hemofiltraci byl použitý přístroj MultiFiltrate (Fresenius Medical Care AG & Co. KGaA, Bad Homburg, SRN) se syntetickou membránou (Ultraflux AV600S; high-flux polysulphon filter, povrch 1,4 m², cut off do 30000 Daltonů, Fresenius Medical Care). Kontinuální veno-venózní hemofiltrace a vysokoobjemová hemofiltrace s nulovou cílovou ultrafiltrací byly nastaveny na dávku hemofiltrace 35 a 100 ml/kg/h. Průtok krve byl nastaven na 200 ml/min. K substituci byl použit bikarbonátový roztok (35 mmol/l), který byl napojen rovnoměrně pre- i postdilučním způsobem (50% + 50%). K prevenci poklesu tělesné teploty v mimotělním okruhu byl substituční roztok ohříván na 39°C v hemoeliminačním přístroji a současně byl zapojen na venózní linku i ohříváč HOTLINE[®].

6.3.5 Nastavení plazmafiltrace spojené s adsorpcí

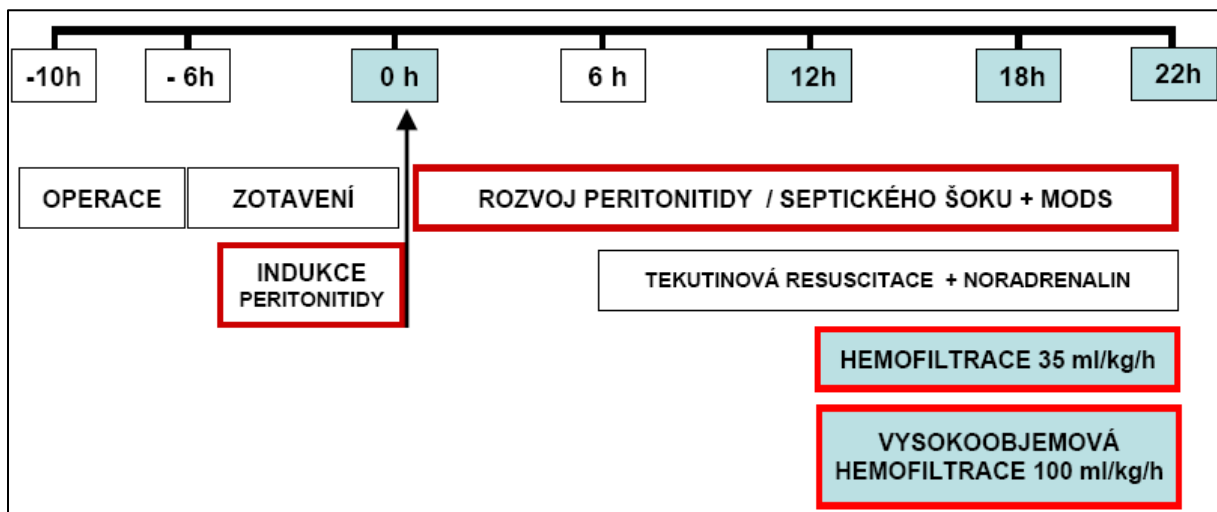
Léčba CPFA byla prováděna na komerčně dostupném přístroji určeném k různým modalitám extrakorporální hemoeliminace (LYNDA, Bellco[®], Mirandola, Itálie), za použití kitu CPFA kit (ABL 814, Bellco SpA), který obsahuje polyétersulfonový plazmafiltr (MPS 05, 0.5 m²) v sérii s vysoce propustným polyétersulfonovým hemofiltrem (HFT 14, 1.4 m², Bellco SpA) a adsorbční kapslí obsahující styrenovou pryskyřici makroporózní strukturou (Mediasorb, 50000m²/cartridge). Průtok krve byl nastaven na 150 ml/min, objem separované plazmy na 20% v plazmafiltru (průtok plazmy 30ml/min). Poté, co plazma byla očištěna v adsorpční kapsli, společně se zbytkem krve ještě prošla hemofiltrem, na kterém byla nastavena

hemofiltrace 35ml/kg/h s nulovou ultrafiltrací. K substituci byl použit bikarbonátový (35 mmol/l) roztok, který byl napojen postdilučním způsobem. K prevenci poklesu tělesné teploty v mimotělním okruhu byl substituční roztok ohříván na 39°C v hemoeliminačním přístroji a současně byl zapojen na venózní linku i ohřívač HOTLINE®.

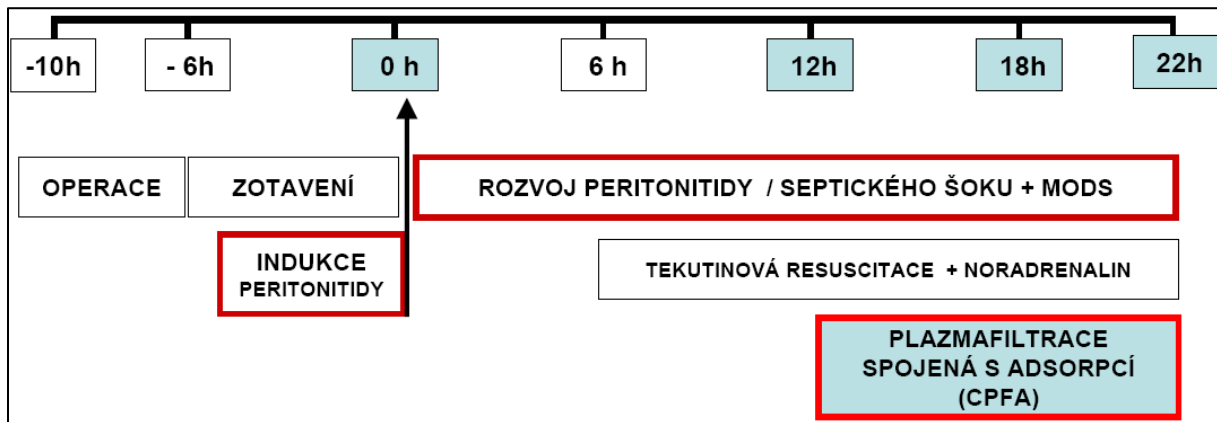
6.3.6 Antikoagulace

K antikoagulaci všech zvířat z obou studií jsme použili intravenózní bolus 0,2 ml/10 kg nadroparinu těsně po druhém měření a sběru vzorků (Obrázek 2 a 3). V žádné ze studovaných skupin v obou studiích jsme neměnili ani filtry ani adsorpční kapsle.

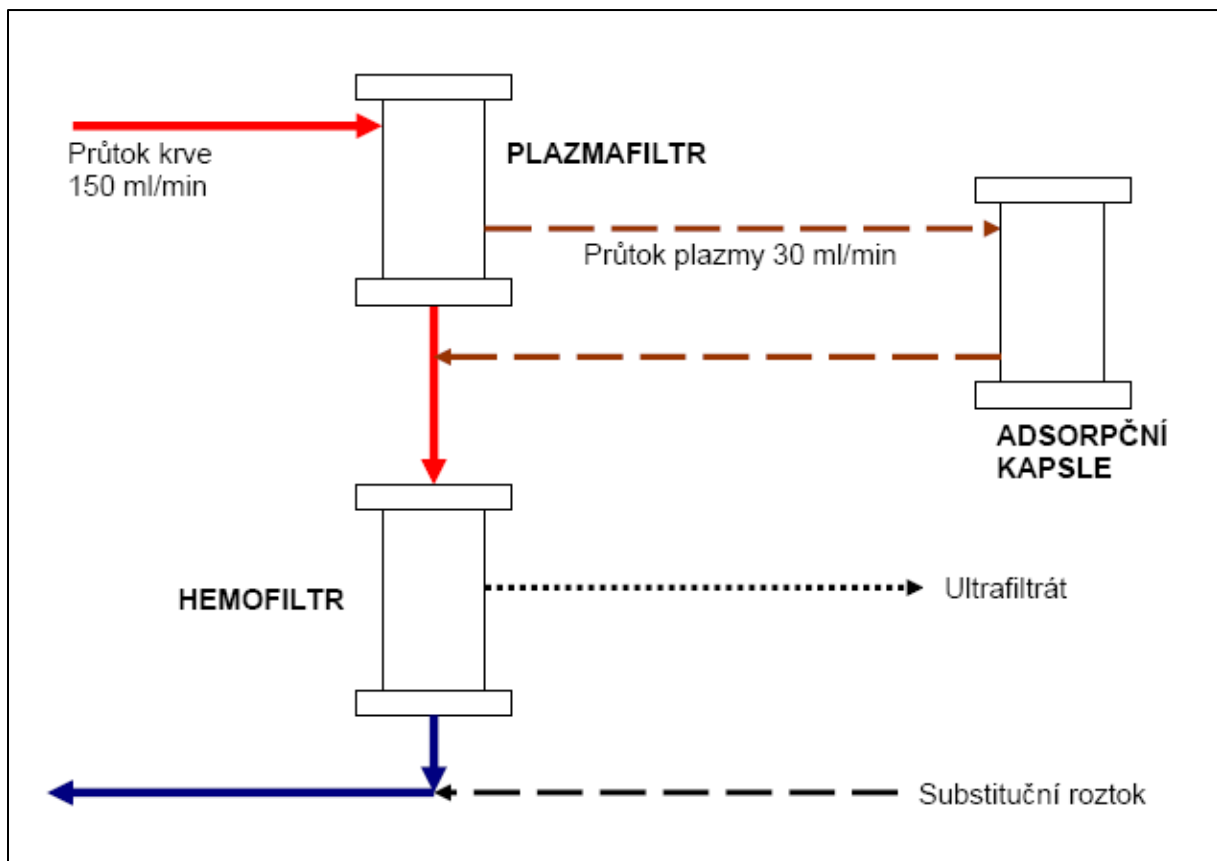
Obrázek 2. Schéma protokolu studie: Vysokoobjemová hemofiltrace v septickém šoku



Obrázek 3. Schéma protokolu studie: Plazmafiltrace spojená s adsorpcí v septickém šoku



Obrázek 4. Schéma CPFA



6.4 Materiál a metody studie: Antikoagulace při náhradě funkce ledvin: regionální ochlazení mimotělního okruhu

6.4.1 Experimentální model a popis technických parametrů

Pro účely této studie byl použit zvířecí model, celkem 12 selat o hmotnosti 37 (33; 43) kg. Intravenózní anestézie a ventilace byla vedena stejně jako je popsáno u předešlých studií s tím rozdílem, že zde jako analgetikum byl použit buprenorfin podávaný intravenózně v bolusech 0,3 mg a byla podávána infuze roztoku PlasmaLyte 10 ml/kg/h během instrumentace a následně byla po operaci redukována na 5 ml/kg/h. U selat jsme zaváděli dialyzační kanylu do femorální žíly, do levé femorální tepny byl zaveden arteriální sheath, který sloužil k odběru vzorků a zavádění katétru k měření teploty tělesného jádra. Také byla zavedena cystostomie k derivaci moči.

K CVVH byl použitý přístroj MultiFiltrate se syntetickou polysulfonovou membránou (Ultraflux AV600S). CVVH s nulovou cílovou ultrafiltrací byla nastavena na dávku hemofiltrace 20 ml/kg/h. Průtok krve byl nastaven na 150 ml/min. K substituci byl použit laktátový roztok, který byl napojen postdilučním způsobem.

K antikoagulaci bylo použito ochlazení krve před vstupem do CVVH námi vyvinutým přístrojem. Krev vycházející ze selete byla ochlazená na 20°C chladicí jednotkou a po průchodu mimotělním okruhem CVVH byla před návratem do selete v ohřívací jednotce zahřátá na 38°C. Detailní popis přístroje je dostupný v příložené práci „Regional cooling of the extracorporeal blood circuit: a novel anticoagulation approach for renal replacement therapy?" (III.).

6.4.2 Experimentální skupiny a protokol studie

Zvířata byla randomizována do dvou skupin. U kontrolní skupiny (CONTR, n = 6) byla šestihodinová CVVH prováděna zcela bez antikoagulace. Ve druhé skupině (COOL, n = 6) bylo použito zařízení na zchlazení krve jako metoda antikoagulace pro šestihodinovou CVVH. Vzorky byly odebírány a měření byla prováděna před zahájením a dále pak 15, 60, 180 a 360 minut od zahájení CVVH. Měřili jsme a) *parametry okruhu*: čas do vysrážení okruhu, počet alarmem navozených zastavení CVVH, transmembránové a venózní tlaky; b) *parametry koagulace okruhu*: komplexy trombinu a antitrombinu (TAT), tromboelastografii (TEG, ve 180 minutě, prováděné buď při teplotě extrakorporálního okruhu 20°C nebo 37°C podle místa odběru vzorku) a c) *parametry bezpečnosti metody*: hemodynamika, teplota tělesného jádra, krevní obraz, hladinu volného plazmatického hemoglobinu, bilirubin a jaterní enzymy a krevní plyny.

6.5 Použité statistické metody

Hodnoty výsledků prezentujeme jako medián a 25. a 75. percentil (interkvartilové rozpětí). Absenci normálního rozložení hodnot jsme testovali testem normality Kolmogorov-Smirnov.

Ve studiích „vysokoobjemová hemofiltrace v septickém šoku a plazmafiltrace spojená s adsorpcí v septickém šoku“ byly rozdíly v čase před indukci a po indukci peritonitidy v rámci jedné skupiny otestovány statistickým testem ANOVA při opakovaných měřeních (Friedman ANOVA on ranks) za následného použití post hoc Dunnova testu pro identifikaci statisticky významných rozdílů při mnohočetném porovnávání. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami v daných timepointech v případě studie „vysokoobjemová hemofiltrace v septickém šoku“ byly testovány za pomoci Kruskal-Wallisova testu (Kruskal-Wallis

ANOVA) opět s následným použitím post hoc Dunnova testu. Rozdíly mezi skupinami v daných timepointech v případě studie „plazmafiltrace spojená s adsorpcí v septickém šoku“ byly testovány za pomoci Mann-Whitneyova U testu (rank sum test).

Ve studii „Antikoagulace při náhradě funkce ledvin: regionální ochlazení mimotělního okruhu“ byly rozdíly v čase v rámci každé skupiny testovány statistickým testem ANOVA při opakovaných měřeních (Friedman ANOVA on ranks) za následného použití post hoc Dunnova testu pro identifikaci statisticky významných rozdílů při mnohočetném porovnávání. Rozdíly mezi skupinami v daných timepointech byly testovány za pomoci Mann-Whitneyova U testu (rank sum test).

Grafy použité v příložených pracích jsou buď jednoduché bodové grafy nebo standardní krabicové grafy zobrazující medián, interkvartilové rozpětí a rozpětí rozsahu neodlehých hodnot (koeficient 1,5).

6.6 Poznámka

V této části práce nejsou zmiňováni výrobci běžně používaných farmak, spotřebního materiálu, přístrojů ani preanalytické a analytické metody stanovování jednotlivých markerů. Tyto informace jsou dostupné v metodologických částech příložených prací, kde jsou detailně popsány.

7 SOUHRN VÝSLEDKŮ STUDIÍ

7.1 Vysokoobjemová hemofiltrace v septickém šoku (I)

Cíl: V experimentální randomizované kontrolované studii zhodnotit efekt hemofiltrace na klinicky relevantním modelu septického šoku na úrovni systémové a regionální hemodynamiky, mikrocirkulace, energetického metabolismu, oxidativního stresu, endotelu a koagulace. Porovnat vysokoobjemovou hemofiltraci s dávkou 100 ml/kg/h s „konvenční - septickou“ dávkou hemofiltrace 35 ml/kg/h.

Metody: Celá metodika experimentu je detailně popsána v části 6 (Metodologická část).

Výsledky: Ve skupinách léčených hemofiltrací byl nižší celkový počet zvířat, která potřebovala podporu oběhu noradrenalinem (86%, 43% a 29% zvířat ve skupinách Control, HF a HVHF). Dávka hemofiltrace 100 ml/kg/h stejně jako dávka 35 ml/kg/h nezvrátila hyperdynamickou cirkulaci, plicní dysfunkci, ani nezlepšila sepsí způsobené poruchy mikrocirkulace střeva a ledviny. Žádná z dávek hemofiltrace neovlivnila poruchy energetického metabolismu (L/P, kinetika kyslíku, KBR), úroveň nitrosativního a oxidativního stresu (nitráty a nitrity, TBARS, GSH/GSSG), dysfunkci endotelu a koagulace (vWF, ADMA, počet trombocytů) či aktivaci systémové inflamace (TNF- α , IL-6).

Diskuze: Stejně jako v předcházejících experimentálních (15, 16, 18, 36) i klinických (9, 11, 12, 14) studiích jsme pozorovali nižší potřebu noradrenalinu při použití hemofiltrace v septickém šoku. Pozitivní vliv na systémovou hemodynamiku se však neprojevil v jiných úrovních námi zkoumaných biologických systémů (regionální hemodynamika, mikrocirkulace, energetický metabolismus, oxidativní/nitrosativní stres, koagulace, endoteliální dysfunkce, systémová inflamace). Oproti studiím na toto téma, kde byla srovnávána s HVHF především dávkou 20 ml/kg/h (low volume haemofiltration) nebo

neléčené objekty, jsme v naší studii hodnotili „standardní“ dávku hemofiltrace 35 ml/kg/h a srovnávali ji s dávkou 100 ml/kg/h. Přínos našich výsledků je následující: 1) studie nepodporuje koncept vysokobjemové hemofiltrace v sepsi; 2) výsledky naopak podporují současná doporučení pro léčbu sepse, tj. nepoužívat hemoelimační metody pro tzv. non-renální indikace, 3) studie poukazuje na nutnost obezřetné interpretace tzv. pozitivních výsledků, které vyplynuly z experimentálních studií na klinicky irelevantních modelech (tzn. krátkodobé, hypodynamické modely v pre-treatment režimech); 3) jednoznačná disociace mezi příznivým vlivem na systémovou hemodynamiku (resp. potřebou noradrenalinu) a absencí pozitivního ovlivnění řady jiných na sobě nezávislých patofyziologických mechanismů zpochybňuje systémovou hemodynamiku jako spolehlivý marker účinnosti hemoelimačních metod.

Závěr: V našem klinicky relevantním modelu septického šoku selete byla vysokoobjemová hemofiltrace účinnější v prevenci progresu sepse do septického šoku vyjádřeno potřebou noradrenalinu. Nicméně žádná z testovaných dávek hemofiltrace nedokázala zabránit progresi sepsi indukovaných poruch mikrocirkulace a energetického metabolismu či příznivě ovlivnit ukazatele oxidativního stresu, endoteliální a koagulační dysfunkce.

7.2 Plazmafiltrace spojená s adsorpcí v septickém šoku (II)

Cíl: V experimentální randomizované kontrolované studii zhodnotit efekt CPFA na klinicky relevantním modelu septického šoku na úrovni systémové hemodynamiky, regionální hemodynamiky, mikrocirkulace, energetického metabolismu, oxidativního stresu, endotelu a koagulace.

Metody: Celá metodika experimentu je detailně popsána v části 6 (Metodologická část).

Výsledky: Napojení septických selat na CPFA neovlivnilo progresi hyperdynamické cirkulace do hyperdynamického septického šoku (vyjádřeno časem do zahájení podpory oběhu noradrenalinem a jeho dávkou) a výslednou multiorgánovou dysfunkci. Léčba CPFA nezlepšila poruchy mikrocirkulace střeva a ledviny, skupina léčená CPFA měla dokonce horší charakter mikrovaskulární perfuze sliznice ilea (FHI). CPFA rovněž příznivě neovlivnila změny jednotlivých ukazatelů poškození buněčné energetiky (L/P, kinetika kyslíku, KBR), endotelu (vWF, ADMA) či dynamiku markerů systémové zánětlivé odpovědi (TNF- α , IL-6) a neuropeptidů (NPY, VIP). Při léčbě došlo naopak k významnému zhoršení v parametrech oxidativního/nitrosativního stresu (TBARS, NOx) a aktivace koagulace (TAT, pokles počtu trombocytů).

Diskuze: V našem pokusu jsme jako první použili léčbu CPFA v plně rozvinuté sepsi s MODS a to na velkém zvířecím modelu. Navzdory časnému zahájení jsme neprokázali, že by metoda CPFA zabránila rozvoji septické hypotenze, příznivě ovlivnila rozvoj multiorgánové dysfunkce či systémovou zánětlivou odpověď na peritonitidu. Podobně CPFA nezlepšila poruchy mikrovaskulární perfuze a energetického metabolismu. Naopak jsme pozorovali další zhoršení parametrů koagulace a oxidativního a nitrosativního stresu.

Cílem studie bylo maximálně se přiblížit klinickým podmínkám objemově resuscitované sepse při peritonitidě. V plně rozvinuté hyperdynamické sepsi jsme zahájili 10 hodinovou léčbu CPFA. Tímto protokolem a schématem našeho modelu se významně odlišujeme od dosud jediné publikované studie, kde byla CPFA u králičího modelu endotoxémie zahájena již 30 minut před inzultem. Pozitivní výsledky této experimentální studie (lepší 72 hodinové přežití) kontrastují významně s negativním výsledkem naší práce. Náš projekt opět odhaluje zásadní rozdíly výsledků experimentálních prací prováděných na modelech různé klinické relevance. Řada léčebných intervencí, které byly shledány efektivní právě v těchto modelech, se ukázaly jako neúčinné v klinických randomizovaných kontrolovaných studiích. Selhání

účinnosti CPFA metody a naopak riziko nežádoucích účinků, plynoucích pravděpodobně z procesů bioinkompatibility, dokládá nutnost dalších studií, které musí dostatečně zhodnotit jak účinnost tak bezpečnost této jinak koncepčně perspektivní metody. Do té doby nelze CPFA metodu přes slibné výsledky pilotních klinických studií či kazuistik doporučit pro klinické účely.

Závěr: V tomto modelu septického šoku nevedlo časně zahájení léčby CPFA k zabránění rozvoje septického šoku a multiorgánové dysfunkce. CPFA neovlivnila příznivě poruchy mikrocirkulace a buněčné energetiky a naopak zhoršovala prokoagulační stav a parametry oxidačního stresu.

7.3 Antikoagulace při náhradě funkce ledvin: regionální ochlazení mimotělního okruhu (III)

Cíl: Optimální antikoagulační režim při CRRT nebyl stále nalezen. Je dobře známo, že ochlazení krve vede ke snížení její srážlivosti. Proto bylo cílem naší práce vyvinout a v experimentálních podmínkách testovat zařízení k selektivnímu ochlazení krve v mimotělním okruhu kontinuální hemofiltrace (CVVH) umožňující protisrážlivé ošetření krve bez nutnosti použití antikoagulancia.

Metody: Celá metodika experimentu je detailně popsána v části 6 (Metodologická část) a v příložené publikaci III.

Výsledky: 1) *Vlastnosti mimotělního okruhu v průběhu CVVH* (čas do vysrážení okruhu, počet alarmem vynucených zastavení pump mimotělního okruhu, venózní a transmembránové tlaky) byly významně alterovány u kontrolní skupiny, u které nebyla použita žádná antikoagulace (5 ze 6 plánovaných šestihodinových CVVH vůbec nebylo dokončeno). Všechny CVVH ve skupině s chlazením mimotělního okruhu byly plánovaně ukončeny po

šesti hodinách s významně lepšími parametry mimotělního okruhu. 2) *Koagulační parametry* krve z mimotělního okruhu ukazovaly významně vyšší aktivaci koagulace (hladiny TAT) u kontrolní skupiny a rovněž tendenci k delšímu „initial clotting time“ a významné snížení „clotting rate“ při TEG v 180 minutě. 3) *Stav zvířat* (systémová hemodynamika, hemolýza, biochemická vyšetření, volný hemoglobin) nebyl opakovaným chlazením a ohříváním v mimotělním oběhu nijak alterován.

Diskuze: Hlavním výsledkem naší experimentální studie je, že regionální ochlazení krve v mimotělním okruhu CRRT na 20°C na dobu 6 hodin umožní proceduru realizovat bez potřeby použití jakéhokoliv antikoagulantia, aniž by došlo k vysrážení krve v mimotělním okruhu. Vysvětlení, proč chlazení mimotělního okruhu vede k udržení jeho patence, aniž by došlo k vysrážení krve, lze nalézt v datech týkajících se tvorby trombinu a dynamiky tvorby trombu z okruhu. Ta ukazují, že ochlazení krve vedlo primárně k inhibici iniciační fáze tvorby trombinu a tak kompromitovalo srážecí proces. To se projevilo jednak oddálením zahájení tvorby trombu a jednak snížením rychlosti jeho nárůstu. Pevnost takto vzniklého trombu se ale od normálního trombu nelišila. Naše výsledky jsou v plném souladu s daty popsányými Martinim (37), který studoval vliv tělesné hypotermie na koagulaci u prasat (37, 38). V rámci procesu krevní srážlivosti jistě hrají důležitou roli počet trombocytů a jejich funkce. My jsme během metody pozorovali pokles v počtu trombocytů v obou skupinách. V obou se však intenzita poklesu nelišila a je třeba říci, že počet trombocytů byl stále v dostatečných fyziologických mezích, takže by nemělo tímto mechanismem dojít k ovlivnění procesu tvorby trombu a alteraci jeho pevnosti. Netestovali jsme též funkci trombocytů. Nicméně, dle dostupných údajů se zdá, že hypotermie funkci destiček může významně ovlivnit (31, 39), takže lze připustit, že se může na antikoagulačním efektu chlazení podílet. Naše studie byla zatím zaměřena především na funkčnost systému a nikoliv jeho vedlejší účinky. Tyto účinky je třeba komplexně testovat jak na úrovni buněčných tak nebuněčných krevních složek, což je

předmětem navazujícího projektu.

Závěr: Námi vyvinutá metoda selektivního ochlazení krve v mimotělním okruhu se ukazuje jako reálně fungující alternativa pro antikoagulační zajištění metody. K tomu, aby se však mohla stát klinicky využitelnou, je především nutné prokázat, že její aplikace je bezpečná. V tom případě by pak mohla doznat širokého klinického uplatnění.

8 ZÁVĚR

Hemoeliminační metody mají kromě účinné kontroly metabolické homeostázy schopnost „detoxifikovat“ organismus eliminací mediátorů sepse, což tvoří základní biologické východisko a teoretický podklad pro využití CRRT jako podpůrné léčby sepse. Zůstává však mnoho nejasností, týkajících se především exaktního stanovení dávky RRT, jejího načasování, volby modalit, indikačního spektra a definování konkrétních biologických cílů.

Podobně chybí přesvědčivé důkazy pro efektivní odstranění mediátorů v klinických studiích a stále jsou hledány nové hypotézy, které by teoreticky příznivý vliv vysvětlily. Na pozadí těchto skutečností jsme provedli sérii experimentů, jejichž závěry v souhrnu formulujeme.

V klinicky relevantním modelu septického šoku vyvolaného peritonitidou:

1. Vysokobjemová hemofiltrace může oddálit rozvoj septické hypotenze. Konveční ani vysokoobjemová hemofiltrace však neovlivňuje příznivě poruchy mikrocirkulace, energetického metabolismu a vybrané parametry koagulace, endoteliální dysfunkce a oxidačního stresu. V souladu s výsledky recentní a dosud jediné multicentrické studie (*Acute Renal Failure Trial Network*) (40) usměrňují naše závěry v literatuře často akcentovaný přínos vyšších dávek používaných metod náhrady funkce ledvin.
2. Metoda CPFA přes svůj teoreticky větší „detoxifikační“ potenciál nezabránila progresi sepse do septického šoku a neovlivnila průběh multiorgánové dysfunkce. V rozporu

s dosud dostupnými studiemi naše práce zřetelně dokumentuje nutnost obezřetné interpretace tzv. pozitivních výsledků, které vyplývají z experimentálních studií na klinicky irelevantních modelech.

3. Antikoagulace pro hemoelimační metody ochlazením krve vstupující do mimotělního okruhu a její ohřátí před vstupem do organismu je slibnou technologií. V našem projektu jsme vyvinuli zařízení pro selektivní ochlazení krve v mimotělním okruhu a následně jsme demonstrovali technickou proveditelnost CVVH s touto metodou antikoagulace. Návazným krokem je ověřit bezpečnost a biokompatibilitu dlouhodobé CVVH v experimentálním modelu. Nami uvedená metoda by se v budoucnu mohla stát atraktivní alternativou nejen pro kriticky nemocné s velkým rizikem krvácení, kterým nelze během CRRT podat antikoagulancia.

9 SEZNAM ORIGINÁLNÍCH PUBLIKACÍ NAVAZUJÍCÍCH NA ŘEŠENOU PROBLEMATIKU

Stengl M, **Sykora R**, Krouzecky A, Novak I, Kuncova J, Nalos L, Svirglerova J, Matejovic M. **Continuous hemofiltration in pigs with hyperdynamic septic shock affects cardiac repolarization.** Crit Care Med, in press, **IF 6,6.**

Stengl M, **Sykora R**, Chvojka J, Krouzecky A, Novak I, Varnerova V, Kuncova J, Nalos L, Svirglerova J, Matejovic M. **Differential effects of hemofiltration and of coupled plasma filtration adsorption on cardiac repolarization in pigs with hyperdynamic septic shock.** Intensive Care Med, odesláno k recenznímu řízení.

Stengl M, Bartak F, **Sykora R**, Chvojka J, Krouzecky A, Novak I, Varnerova V, Svirglerova J, Kuncova J, Matejovic M. **Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from pigs with hyperdynamic septic shock.** Crit Care Med, odesláno k recenznímu řízení.

Chvojka J, **Sykora R**, Krouzecky A, Radej J, Varnerova V, Karvunidis T, Hes O, Novak I, Radermacher P, Matejovic M. **Renal hemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathologic responses to peritonitis-induced septic shock in pigs.** Crit Care, odesláno k recenznímu řízení.

Eret V, Hora M, **Sykora R**, Hes O, Urge T, Klecka J, Matejovic M: **GreenLight (532 nm) Laser Partial Nephrectomy Followed by Suturing of Collecting System Without Renal Hilar Clamping in Porcine Model.** Urology 2008; May 23 [Epub ahead of print] **IF 2,1.**

Radej J, Matejovic M, Krouzecky A, **Sykora R**, Chvojka J and Novak I. **How severe acidosis can a human survive? Successful hemofiltration use.** Dialysis & Transplantation 2007, 36(11), s. 608-610. **IF 0,2.**

Sýkora R, Raděj J, Novák I, Kroužecký A, Mareš J, Irová I, Hadravská Š, Chvojka J, Karvunidis T, Maňáková T a Matějovič M. **Perzistentní průjmy, hypotenze a polyneuropatie: kasuistika.** Vnitřní lékařství, v tisku.

Raděj J, Kroužecký A, **Sýkora R**, Chvojka J, Karvunidis T, Novák I, Matějovič M.

Mají kortikosteroidy místo v léčbě ALI /ARDS? Anesteziologie a intenzivní medicína, v tisku.

Chvojka J, **Sykora R**, Karvunidis T, Radej J, Krouzecky A, Novak I, Matejovic M. **Acute kidney injury in sepsis – new pathophysiological concepts.** Wien Klin Wochenschr, in press, **IF 0,9.**

Radej J, Krouzecky A, Chvojka J, **Sykora R**, Karvunidis T, Bergerova T, Matejovic M, Novak I. **Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus CA MRSA infections in Czech Republic.** Wien Klin Wochenschr, in press, **IF 0,9.**

10 PODĚKOVÁNÍ

Experimentální studie byly provedeny v laboratoři centrálního zvěřince LF UK Plzeň.

Rád bych vyjádřil své díky všem, kteří se podíleli na vzniku této dizertační práce a jednotlivých studií:

doc. MUDr. Martinu Matějovičovi, Ph.D., svému školiteli a učiteli za vše, navíc k poděkování bych zde chtěl vyjádřit i hlubokou úctu k jeho práci,

příteli MUDr. Jiřímu Chvojkovi za obrovskou pomoc a podporu při výzkumu,

kolegům lékařům a výzkumníkům MUDr. Ivanu Novákovi, as. MUDr. Aleši Kroužeckému, Ph.D., MUDr. Jaroslavu Radějovi, MUDr. Thomasi Karvunidisovi, MUDr. Janu Benešovi, MUC. Veronice Varnerové, MUC. Lence Ledvinové za velkou pomoc, laskavost a skvěle odváděnou práci

a Kačence za trpělivost a lásku.

11 PODPORA PRÁCE

Tato práce byla vypracována s podporou v rámci hlavního výzkumného záměru č. MSM 0021620819 Náhrada a podpora funkce některých životně důležitých orgánů.

12 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABR	Acidobazická rovnováha
ADMA	Asymetrický dimethylarginin
ALT	Alanin aminotransferáza
AKI	Akutní poškození ledvin (acute kidney injury)
CPFA	Plazmafiltrace spojená s adsorpcí (coupled plasma filtration adsorption)
CRRT	Kontinuální náhrada funkce ledvin (continuous renal replacement therapy)
CVP	Centrální žilní tlak
CVVH	Kontinuální veno-venózní hemofiltrace (Continuous veno-venous hemofiltration)
FHI	Flow heterogeneity index
HF	Hemofiltrace
HVHF	Vysokoobjemová hemofiltrace (high-volume hemofiltration)
IHD	Intermitentní hemodialýza
IL-6	Interleukin 6
ITBV	Nitrohruční objem krve (intrathoracic blood volume)
KBR	Poměr ketolátek (acetoacetát / betahydroxybutyrát)
L	Laktát
LDF	Laser Doppler flowmetry
MFI	Microvascular flow index
NOx	Plazmatické koncentrace nitrátů + nitritů
NPY	Neuropeptid Y
P	Pyruvát
PAOP	Tlak v zaklínění
RRT	Náhrada funkce ledvin
SDF	Side-stream Dark Field imaging

TAT	Komplexy trombinu a antitrombinu
TBARS	Reaktanty s kyselinou thiobarbiturovou
TEG	Tromboelastografie
TNF- α	Tumor necrosis factor alfa
VIP	Vazoaktivní intestinální peptid
vWF	Von Willebrandův faktor

13 LITERATURA

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29(7):1303-1310.
2. Cariou A, Vinsonneau C, Dhainaut JF. Adjunctive therapies in sepsis: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004;32(11 Suppl):S562-S570.
3. Bellomo R, Honore PM, Matson J, Ronco C, Winchester J. Extracorporeal blood treatment (EBT) methods in SIRS/Sepsis. *Int J Artif Organs* 2005;28(5):450-458.
4. Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Oudemans-van SH, Ronco C, Kellum JA. Continuous renal replacement therapy: a worldwide practice survey. The beginning and ending supportive therapy for the kidney (B.E.S.T. kidney) investigators. *Intensive Care Med* 2007;33(9):1563-1570.
5. Honore PM, Joannes-Boyau O, Gressens B. Blood and plasma treatments: the rationale of high-volume hemofiltration. *Contrib Nephrol* 2007;156:387-395.
6. Bouman CS, Oudemans-van Straaten HM, Schultz MJ, Vroom MB. Hemofiltration in sepsis and systemic inflammatory response syndrome: the role of dosing and timing. *J Crit Care* 2007;22(1):1-12.
7. Ronco C, Bellomo R, Homel P, Brendolan A, Dan M, Piccinni P, La GG. Effects of different doses in continuous veno-venous haemofiltration on outcomes of acute renal failure: a prospective randomised trial. *Lancet* 2000;356(9223):26-30.

8. Honore PM, Jamez J, Wauthier M, Lee PA, Dugernier T, Pirenne B, Hanique G, Matson JR. Prospective evaluation of short-term, high-volume isovolemic hemofiltration on the hemodynamic course and outcome in patients with intractable circulatory failure resulting from septic shock. *Crit Care Med* 2000;28(11):3581-3587.
9. Cole L, Bellomo R, Journois D, Davenport P, Baldwin I, Tipping P. High-volume haemofiltration in human septic shock. *Intensive Care Med* 2001;27(6):978-986.
10. Cornejo R, Downey P, Castro R, Romero C, Regueira T, Vega J, Castillo L, Andresen M, Dougnac A, Bugedo G, Hernandez G. High-volume hemofiltration as salvage therapy in severe hyperdynamic septic shock. *Intensive Care Med* 2006;32(5):713-722.
11. Piccinni P, Dan M, Barbacini S, Carraro R, Lieta E, Marafon S, Zamperetti N, Brendolan A, D'Intini V, Tetta C, Bellomo R, Ronco C. Early isovolaemic haemofiltration in oliguric patients with septic shock. *Intensive Care Med* 2006;32(1):80-86.
12. Ratanarat R, Brendolan A, Piccinni P, Dan M, Salvatori G, Ricci Z, Ronco C. Pulse high-volume haemofiltration for treatment of severe sepsis: effects on hemodynamics and survival. *Crit Care* 2005;9(4):R294-R302.
13. Oudemans-van Straaten HM, Bosman RJ, van der Spoel JI, Zandstra DF. Outcome of critically ill patients treated with intermittent high-volume haemofiltration: a prospective cohort analysis. *Intensive Care Med* 1999;25(8):814-821.
14. Joannes-Boyau O, Rapaport S, Bazin R, Fleureau C, Janvier G. Impact of high volume hemofiltration on hemodynamic disturbance and outcome during septic shock. *ASAIO J* 2004;50(1):102-109.

15. Rogiers P, Zhang H, Smail N, Pauwels D, Vincent JL. Continuous venovenous hemofiltration improves cardiac performance by mechanisms other than tumor necrosis factor-alpha attenuation during endotoxic shock. *Crit Care Med* 1999;27(9):1848-1855.
16. Bellomo R, Kellum JA, Gandhi CR, Pinsky MR, Ondulik B. The effect of intensive plasma water exchange by hemofiltration on hemodynamics and soluble mediators in canine endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(5):1429-1436.
17. Yekebas EF, Eisenberger CF, Ohnesorge H, Saalmuller A, Elsner HA, Engelhardt M, Gillesen A, Meins J, The M, Strate T, Busch C, Knoefel WT, Bloechle C, Izbicki JR. Attenuation of sepsis-related immunoparalysis by continuous veno-venous hemofiltration in experimental porcine pancreatitis. *Crit Care Med* 2001;29(7):1423-1430.
18. Grootendorst AF, van Bommel EF, van der HB, van Leengoed LA, van Osta AL. High volume hemofiltration improves right ventricular function in endotoxin-induced shock in the pig. *Intensive Care Med* 1992;18(4):235-240.
19. Ullrich R, Roeder G, Lorber C, Quezado ZM, Kneifel W, Gasser H, Schlag G, Redl H, Germann P. Continuous venovenous hemofiltration improves arterial oxygenation in endotoxin-induced lung injury in pigs. *Anesthesiology* 2001;95(2):428-436.
20. Formica M, Inguaggiato P, Bainotti S, Wratten ML. Coupled plasma filtration adsorption. *Contrib Nephrol* 2007;156:405-410.
21. Winchester JF, Kellum JA, Ronco C, Brady JA, Quartararo PJ, Salsberg JA, Levin NW. Sorbents in acute renal failure and the systemic inflammatory response syndrome. *Blood Purif* 2003;21(1):79-84.

22. Cole L, Bellomo R, Davenport P, Tipping P, Uchino S, Tetta C, Ronco C. The effect of coupled haemofiltration and adsorption on inflammatory cytokines in an ex vivo model. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(11):1950-1956.
23. Tetta C, Cavaillon JM, Schulze M, Ronco C, Ghezzi PM, Camussi G, Serra AM, Curti F, Lonnemann G. Removal of cytokines and activated complement components in an experimental model of continuous plasma filtration coupled with sorbent adsorption. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13(6):1458-1464.
24. Ronco C, Brendolan A, Lonnemann G, Bellomo R, Piccinni P, Digito A, Dan M, Irone M, La GG, Inguaggiato P, Maggiore U, De NC, Wratten ML, Ricci Z, Tetta C. A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock. *Crit Care Med* 2002;30(6):1250-1255.
25. Tetta C, Gianotti L, Cavaillon JM, Wratten ML, Fini M, Braga M, Bisagni P, Giavaresi G, Bolzani R, Giardino R. Coupled plasma filtration-adsorption in a rabbit model of endotoxic shock. *Crit Care Med* 2000;28(5):1526-1533.
26. Formica M, Olivieri C, Livigni S, Cesano G, Vallero A, Maio M, Tetta C. Hemodynamic response to coupled plasmafiltration-adsorption in human septic shock. *Intensive Care Med* 2003;29(5):703-708.
27. Oudemans-van Straaten HM, Wester JP, de Pont AC, Schetz MR. Anticoagulation strategies in continuous renal replacement therapy: can the choice be evidence based? *Intensive Care Med* 2006;32(2):188-202.
28. Tan HK, Baldwin I, Bellomo R. Continuous veno-venous hemofiltration without anticoagulation in high-risk patients. *Intensive Care Med* 2000;26(11):1652-1657.

29. Rohrer MJ, Natale AM. Effect of hypothermia on the coagulation cascade. *Crit Care Med* 1992;20(10):1402-1405.
30. Wolberg AS, Meng ZH, Monroe DM, III, Hoffman M. A systematic evaluation of the effect of temperature on coagulation enzyme activity and platelet function. *J Trauma* 2004;56(6):1221-1228.
31. Watts DD, Trask A, Soeken K, Perdue P, Dols S, Kaufmann C. Hypothermic coagulopathy in trauma: effect of varying levels of hypothermia on enzyme speed, platelet function, and fibrinolytic activity. *J Trauma* 1998;44(5):846-854.
32. Staab DB, Sorensen VJ, Fath JJ, Raman SB, Horst HM, Obeid FN. Coagulation defects resulting from ambient temperature-induced hypothermia. *J Trauma* 1994;36(5):634-638.
33. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31(4):1250-1256.
34. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990;49(2):186-196.
35. De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, Goedhart P, Buchele G, Ospina-Tascon G, Dobbe I, Ince C. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care* 2007;11(5):R101.
36. Yekebas EF, Strate T, Zolmajd S, Eisenberger CF, Erbersdobler A, Saalmuller A, Steffani K, Busch C, Elsner HA, Engelhardt M, Gillesen A, Meins J, The M, Knoefel WT, Izbicki JR. Impact of different modalities of continuous venovenous

- hemofiltration on sepsis-induced alterations in experimental pancreatitis. *Kidney Int* 2002;62(5):1806-1818.
37. Martini WZ. The effects of hypothermia on fibrinogen metabolism and coagulation function in swine. *Metabolism* 2007;56(2):214-221.
 38. Martini WZ, Pusateri AE, Uscilowicz JM, Delgado AV, Holcomb JB. Independent contributions of hypothermia and acidosis to coagulopathy in swine. *J Trauma* 2005;58(5):1002-1009.
 39. Kermode JC, Zheng Q, Milner EP. Marked temperature dependence of the platelet calcium signal induced by human von Willebrand factor. *Blood* 1999;94(1):199-207.
 40. Palevsky PM, Zhang JH, O'Connor TZ, Chertow GM, Crowley ST, Choudhury D, Finkel K, Kellum JA, Paganini E, Schein RM, Smith MW, Swanson KM, Thompson BT, Vijayan A, Watnick S, Star RA, Peduzzi P. Intensity of renal support in critically ill patients with acute kidney injury. *N Engl J Med* 2008;359(1):7-20.

14 PŘÍLOHY: PUBLIKOVANÉ PRÁCE

I.

High versus standard-volume haemofiltration in hyperdynamic porcine peritonitis: effects beyond haemodynamics?

Sykora R, Chvojka J, Krouzecky A, Radej J, Karvunidis T, Varnerova V, Novak I and Matejovic M

Intensive Care Med 2008; Oct 14. [Epub ahead of print]

II.

Coupled plasma filtration adsorption in experimental peritonitis-induced septic shock.

Sykora R, Chvojka J, Krouzecky A, Radej J, Kuncova J, Varnerova V, Karvunidis T, Novak I
and Matejovic M

Shock 2008; Sep 29. [Epub ahead of print]

III.

Regional cooling of the extracorporeal blood circuit: a novel anticoagulation approach for renal replacement therapy?

Krouzecky A, Chvojka J, Sykora R, Radej J, Karvunidis T, Novak I, Ruzicka J, Petrankova Z, Benes J, Bolek L and Matejovic M

Intensive Care Med 2008; Sep 18. [Epub ahead of print]

IV.

Hemoeliminační metody v léčbě sepse: současný stav.

Sýkora R, Chvojka J, Kroužecký A, Raděj J, Karvunidis T, Novák I a Matějovič M

Vnitřní lékařství 2008; v tisku.

V.

Možnosti antikoagulačního zajištění metod mimotělní náhrady funkce ledvin u kriticky nemocných.

Kroužecký A, Novák I, Raděj J, Sýkora R, Chvojka J, Karvunidis T a Matějovič M

Anesteziologie a intenzivní medicína 2008, 19: 154-158.