

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

MUDr. Roman Sýkora

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

Autoreferát dizertační práce k získání akademického titulu Ph.D.

Vědní obor
Vnitřní nemoci



Plzeň 2008

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

MUDr. Roman Sýkora

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

Autoreferát dizertační práce k získání akademického titulu Ph.D.

Vědní obor
Vnitřní nemoci



Plzeň 2008

Dizertační práce byla vypracována v rámci prezenční formy doktorského studijního programu v oboru vnitřní lékařství na I. interní klinice Fakultní nemocnice Plzeň a v experimentální laboratoři centrálního zvěřince Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni.

Doktorand: MUDr. Roman Sýkora

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

Oponenti:

doc. MUDr. Vladimír Šrámek, Ph.D.

Anesteziologicko resuscitační klinika, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně a
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně

MUDr. Jan Maňák, Ph.D., EDIC

Klinika gerontologická a metabolická, Fakultní nemocnice Hradec Králové a
Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Autoreferát byl rozeslán dne 2008.

Obhajoba dizertace před komisí pro obhajoby doktorských dizertací v oboru vnitřní lékařství se koná dne2008 v hod.

Místo obhajoby:

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu LF UK v Plzni, Husova 3.

prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

předseda komise pro obhajobu dizertačních prací

ve vědním oboru vnitřní lékařství

OBSAH

ÚVOD	5
ORIGINÁLNÍ STUDIE	6
SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....	8
KONTINUÁLNÍ NÁHRADA FUNKCE LEDVIN V LÉČBĚ SEPSE - VYSOKOOBJEMOVÁ HEMOFILTRACE	8
PLAZMAFILTRACE SPOJENÁ S ADSORPCÍ V LÉČBĚ SEPSE.....	9
ANTIKOAGULACE PŘI NÁHRADĚ FUNKCE LEDVIN: REGIONÁLNÍ OCHLAZENÍ MIMOTĚLNÍHO OKRUHU	10
CÍLE PRÁCE	11
ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ.....	12
EXPERIMENTÁLNÍ MODEL.....	12
MĚŘENÍ SYSTÉMOVÉ A REGIONÁLNÍ HEMODYNAMIKY, MIKROCIRKULACE A VÝPOČTY	12
ODBĚR A HODNOCENÍ VZORKŮ	13
SOUHRN STUDIÍ	14
STUDIE: VYSOKOOBJEMOVÁ HEMOFILTRACE V SEPTICKÉM ŠOKU.....	14
STUDIE: PLAZMAFILTRACE SPOJENÁ S ADSORPCÍ V SEPTICKÉM ŠOKU	15
STUDIE: ANTIKOAGULACE PŘI NÁHRADĚ FUNKCE LEDVIN: REGIONÁLNÍ OCHLAZENÍ MIMOTĚLNÍHO OKRUHU	16
ZÁVĚRY.....	17
PODPORA PRÁCE	18
SUMMARY	19
LITERATURA.....	21

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. 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 hemoeliminačních metod jako podpůrné léčby sepsy (2, 3). Na základě těchto úvah byl zkoumán vliv různých modalit hemoeliminačních 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.

ORIGINÁLNÍ STUDIE

Dizertační práce je založena na komentovaném souboru níže uvedených originálních experimentálních studií a souhrnných článků.

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. DOI: 10.1007/s00134-008-1318-y. **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.

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. DOI: 10.1097/SHK.0b013e318188dec5. **IF 3,3.**

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

Kroužecký 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. DOI: 10.1007/s00134-008-1271-9. **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.***

Sýkora R, Chvojka J, Kroužecký A, Raděj J, Karvunidis T, Novák I a Matějovič M **Hemoelimační metody v léčbě sepse: současný stav.** Vnitřní lékařství 2008; 54(10): 1000-1005

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.

SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Kontinuální náhrada funkce ledvin v léčbě sepse - vysokoobjemová hemofiltrace

Nejčastěji používanou hemoelimační 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 hemoelimačních 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 hemofiltrační 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 „Hemoelimační metody v léčbě sepse: současný stav“, který je přílohou dizertační práce se detailně zabýváme biologickými mechanismy hemoelimačních

metod v sepsi. Rozebíráme faktory ovlivňující účinnost hemoelimačních metod jako je diskutovaná dávka hemofiltrace, HVHF, doba zahájení CRRT, použití filtrů s vysokou propustností a adsorpcí a volba vhodné modality CRRT či IHD.

Z rozboru současné literatury jednoznačně vyplývá nutnost dalšího zkoumání konceptu vysokoobjemové hemofiltrace. Protože klinické studie jsou zatížené 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, který umožňuje výzkum základních patofyziologických komponent sepse a zhodnocení léčebných intervencí, včetně hemoelimačních metod.

Plazmafiltrace spojená s adsorpcí v léčbě sepse

Plazmafiltrace spojená s adsorpcí (CPFA, coupled plasma filtration adsorption) je nový druh hemoelimační 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. 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.

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 zlepšila systémovou hemodynamiku a reaktivitu leukocytů více než hemofiltrace (24). Formica et al. v observační klinické studii 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.

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). 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 (28). Tento efekt je dán

především inhibicí enzymatických reakcí koagulačních kaskád a poruchou funkce krevních destiček (29). Čím je zchlazení intenzivnější, tím lze očekávat větší antikoagulační efekt (28) a naopak při ohřívání krve lze sledovat opačný efekt na normalizaci krevní srážlivosti (30). 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. Problematika metod antikoagulace je detailně diskutována v souhrnném článku „Možnosti antikoagulačního zajištění metod mimotělní náhrady funkce ledvin u kriticky nemocných“, který je součástí dizertační práce.

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.

ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

Experimentální model

Zvířecí modely v našich studiích byly vybírány a tvořeny tak, aby byly maximálně klinicky relevantní. Pro výzkum mimotělních eliminačních metod jsme využili model velkého zvířete – selete, jehož anatomické, fyziologické, imunologické a metabolické parametry se velice blíží člověku. 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. Studie byly realizovány na modelu dlouhodobé (22h) peritonitidou indukované sepse s progresí do septického šoku. Tento model úzce napodobuje humánní sepsi a splňuje kritéria pro klinicky relevantní model sepse. Základními rysy zvoleného modelu jsou: (1) hyperdynamická cirkulace charakterizovaná zvýšeným srdečním výdejem a nízkou systémovou cévní rezistencí; (2) agresivní tekutinová resuscitace odpovídající klinické realitě a vylučující hypovolemii jako faktor ovlivňující hemodynamické a metabolické změny; (3) hypermetabolismus a hyperinflamace; (4) vývoj multiorgánové dysfunkce. Léčebné intervence byly provedeny „post-treatment“ způsobem s cílem maximálně napodobit klinickou situaci, tj. stav, kdy léčbu obvykle zahajujeme již v době plně rozvinutého obrazu sepse. Zdravá selata jsme rovněž použili jako objekty pro výzkum metody regionální antikoagulace pro CRRT chlazením mimotělního okruhu v jednodušší instrumentaci.

Měření systémové a regionální hemodynamiky, mikrocirkulace a výpočty

Z parametrů systémové hemodynamiky byly měřeny tyto parametry: srdeční výdej, systémová vaskulární rezistence a plnicí tlaky obou komor. Na úrovni regionální hemodynamiky hepatosplanchniku byly monitorovány průtoky krve portální žilou, 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 jater a ledviny.

Mikrovaskulární perfuze sliznice ilea a kůry ledviny byla hodnocena za použití laser Dopplerometrické metody (LDF) hodnocením perfuzních jednotek. Současně jsme využili techniku intravitální videomikroskopie (SDF, Side-stream Dark imaging) k přímému zobrazení mikrocirkulace sliznice ilea a následně jsme popsali charakter průtoku mikrocirkulace za pomoci indexů (microvascular flow index – MFI a flow heterogeneity index - FHI).

Odběr a hodnocení vzorků

Z arteriální, portální, jaterní a renální žilní krve jsme stanovili koncentrace laktátu a pyruvátu, dále byly stanoveny arteriální sérová hladina alanin aminotransferázy a poměru ketolátek z jaterní žilní krve. Oxidativní a nitrosativní stres jsme stanovovali měřením arteriálních reaktantů s kyselinou thiobarbiturovou a koncentrace arteriálních nitrátů a nitritů. K popisu endoteliální dysfunkce, koagulace a systémové zánětlivé odpovědi jsme stanovovali aktivitu von Willebrandova faktoru, koncentraci asymetrického dimethylargininu, koncentraci komplexů trombinu-antitrombinu, počet krevních destiček, tumor necrosis faktoru alfa (TNF- α) a interleukinu 6 (IL-6). Též jsme hodnotili hladiny neuropeptidu Y a vazoaktivního intestinálního peptidu v arteriální krvi.

SOUHRN STUDIÍ

Studie: Vysokoobjemová hemofiltrace v septickém šoku

Cíle: Úloha hemoeliminačních metod jako pomocné léčby sepse zůstává stále otevřeným tématem. Cílem studie bylo zhodnotit biologický efekt hemofiltrace a úlohu její dávky. Porovnávali jsme standardní dávku hemofiltrace s vysokoobjemovou hemofiltrací (HVHF) v experimentálním modelu septického šoku selete při peritonitidě. **Typ studie:** Kontrolovaná randomizovaná experimentální studie. **Materiál a metody:** Ve studii jsme použili 21 ventilovaných selat v celkové anestezii. Po 12 hodinách hyperdynamické sepse jsme selata randomizovali do tří skupin: kontrolní skupina jen s podpůrnou léčbou (CON, $n = 7$), skupina navíc se standardní dávkou hemofiltrace (HF, 35 ml/kg/h, $n = 7$) nebo s HVHF (100 ml/kg/h, $n = 7$), vždy na 10 hodin. **Sledované parametry a výsledky:** Před indukcí peritonitidy, dále ve 12, 18. a 22. hodině jsme měřili: systémovou a hepatosplanchnickou hemodynamiku, regionální metabolismus kyslíku a energetický metabolismus (laktát/pyruvát, poměr ketolátů), mikrocirkulaci sliznice ilea a kůry ledviny, systémovou zánětlivou odpověď (TNF- α , IL-6), nitrosativní/oxidativní stres (reaktanty s kyselinou thiobarbiturovou, nitráty + nitrity, poměr redukovaného a oxidovaného glutathionu) a dysfunkci endotelu a koagulace (von Willebrandův faktor, asymetrický dimethylarginin a počet destiček). Přestože méně zvířat léčených hemofiltrací potřebovalo podporu oběhu noradrenalinem (86%, 43% a 29% selat ve skupině kontrolní, HF a HVHF, resp.), žádná z dávek hemofiltrace nezvrátila hyperdynamickou cirkulaci, plicní dysfunkci ani nezlepšila poškození mikrovaskulární perfuze střeva a ledviny. Účinek HF i HVHF se neprojevil ani v ostatních sepsí navozených poruchách buněčné energetiky, nitrosativního/oxidativního stresu, endoteliální/koagulační dysfunkce a systémového zánětu. **Závěry:** V našem klinicky relevantním modelu septického šoku selete byla vysokoobjemová hemofiltrace účinnější v prevenci progresu sepse do

septického šoku vyjádřeno potřebou noradrenalinu. Žádná z testovaných dávek hemofiltrace však nedokázala zabránit progresi poruch mikrocirkulace a energetického metabolismu či příznivě ovlivnit ukazatele oxidativního stresu, endoteliální a koagulační dysfunkce.

Studie: Plazmafiltrace spojená s adsorpcí v septickém šoku

Cíl: Plazmafiltrace spojená s adsorpcí (CPFA) je nová hemoeliminační metoda založená na adsorpci a vyvinutá k neselektivnímu odstraňování mediátorů sepse. Cílem naší studie bylo zhodnotit účinnost této hemopurifikační metody v průběhu septického šoku na celkovou a regionální hemodynamiku, mikrocirkulaci, energetický metabolismus, oxidativní/nitrosativní stres, endoteliální a koagulační dysfunkci. **Typ studie:** Kontrolovaná randomizovaná experimentální studie. **Materiál a metody:** U 16 selat jsme v celkové anestezii a na umělé plicní ventilaci indukovali peritonitidu, která postupně progredovala za tekutinové resuscitace do hyperdynamického septického šoku. Noradrenalin jsme použili v případě, že objemová resuscitace nestačila k udržení středního arteriálního tlaku nad 65 mm Hg. Po 12 hodinách peritonitidy jsme zvířata randomizovali do skupiny pouze s podpůrnou léčbou (Control, $n = 8$) nebo byla navíc napojena na CPFA (CPFA, $n = 8$). **Sledované parametry a výsledky:** Před zahájením peritonitidy a dále ve 12., 18. a 22. hodině jsme měřili systémovou hemodynamiku, regionální hemodynamiku hepatosplanchniku a ledvin, systémový a regionální metabolismus kyslíku a energetický metabolismus (laktát/pyruvát, poměr ketolátek v jaterní žilní krvi), mikrocirkulaci sliznice ilea a kůry ledviny, markery zánětu (TNF- α , IL-6), parametry nitrosativního/oxidativního stresu (reaktanty s kyselinou thiobarbiturovou, nitráty+nitrity), endoteliální a koagulační dysfunkci (asymetrický dimethylarginin, von Willebrandův faktor, komplexy trombin-antitrombinu a počet trombocytů). Léčba CPFA nezabránila rozvoji hypotenze ani neovlivnila použitou dávku noradrenalinu. Léčba CPFA neovlivnila poruchy mikrocirkulace a buněčné energetiky, známky endoteliálního poškození a

míru systémového zánětu. Podobně plicní a jaterní dysfunkce nebyly léčbou CPFA ovlivněny. Naopak došlo ke zhoršení poruch koagulace a oxidativního/nitrosativního stresu.

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.

Studie: Antikoagulace při náhradě funkce ledvin: regionální ochlazení mimotělního okruhu

Cíl: Testovat hypotézu, že ochlazení krve v mimotělním okruhu (EC) kontinuální veno-venózní hemofiltrace (CVVH) umožní realizovat proceduru bez potřeby použití anitkoagulancií. **Typ studie:** experimentální studie. **Materiál a metody:** Vyvinuli jsme zařízení umožňující jak selektivní ochlazení krve v mimotělním okruhu CVVH na 20°C tak její znovuohřátí těsně před návratem do těla na 38°C. Dvanáct anestezovaných a ventilovaných selat bylo randomizováno tak, že 6 z nich podstoupilo 6 hodin CVVH s aplikací tohoto chladicího zařízení a 6 podstoupilo CVVH bez jeho aplikace. **Měření:** Před procedurou, dále pak v 15., 60., 180. a 360. minutě po jejím zahájení jsme sledovali proměnné vztahující se k: 1) průchodnosti mimotělního okruhu (čas do vysrážení krve v EC, počet zastavení krevní pumpy způsobených vysokým tlakem v EC, venózní a transmembránový tlak v EC), 2) aktivaci koagulace v EC (komplexy trombinu-antitrombinu, tromboelastografie) a 3) stavu zvířat (teplota, hemodynamika, hemolýza, biochemie). **Výsledky:** Během všech procedur, které byly realizovány s aplikací chladicího zařízení byla zachována výborná průchodnost mimotělního okruhu. Naopak v kontrolní skupině došlo k předčasnému vysrážení u 5 z 6 procedur. Počet zastavení krevní pumpy způsobených vysokým tlakem v EC byl signifikantně vyšší v kontrolní skupině. Progresivní tvorba

krevních sraženin v EC kontrolní skupiny byla provázena signifikantně vyšším nárůstem koncentrace komplexů trombinu-antitrombinu v krvi získané z EC. Tromboelastografická vyšetření krve z okruhu prokázala, že chlazení krve vedlo k opoždění zahájení tvorby trombu a signifikantnímu snížení rychlosti jeho nárůstu. Neproklázali jsme žádné známky hemolýzy způsobené opakovanými cykly ochlazení/ohřátí a stav všech zvířat byl během pokusu stabilní.

Závěr: Námi vyvinutá metoda selektivního ochlazení krve v mimotělním okruhu se ukazuje jako reálně fungující alternativa pro antikoagulační zajištění mimotělní eliminační metody CVVH. 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.

ZÁVĚRY

Hemoelimační 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*) (31) 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. Námi uvedená metoda by se v budoucnu mohla stát atraktivní alternativou nejen pro kriticky nemocné s velkým rizikem krvácení, kterým nelze během CRRT podat antikoagulancia.

PODPORA PRÁCE

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

SUMMARY

The most common cause of death in patients with sepsis/septic shock is deterioration of the function of multiple organs, termed multiple organ dysfunction syndrome. Although our understanding of mechanisms involved in the pathophysiology of sepsis-induced tissue damage has improved substantially, therapy of these syndromes still remains largely supportive. The hallmark of sepsis is an overwhelming systemic production of both pro- and anti-inflammatory mediators leading to generalized endothelial and epithelial damage, microcirculatory-mitochondrial distress, altered endocrine and coagulation homeostasis and cellular immune hyporesponsiveness. Therefore, the hypothesis that modulation of this excessive immunological and biological response to infection might improve patient outcome appears reasonable. Hemoelimination techniques represent biologically plausible way to provide non-specific removal of soluble pro- and anti-inflammatory mediators, although the concept of blood purification in sepsis remains a matter of considerable debate.

The aim of this thesis was to elucidate effects of 1) high volume hemofiltration (HVHF) and 2) coupled plasma filtration adsorption (CPFA) in a long-term, hyperdynamic porcine septic shock model, which fulfils the criteria for human sepsis. We hypothesized that both HVHF and CPFA may exert beneficial effects via a „pleiotropic“ effects including both systemic and regional hemodynamics and microcirculation, oxygen kinetics, tissue energy metabolism, coagulation and endothelial systems. Moreover, the mechanism(s) by which HVHF exerts its potentially beneficial effects were explored. In these mechanistic studies the main outcome variables were selected physiological parameters, providing biological insight for future (clinical) studies. In addition, in a separated study we verified the hypothesis, that the cooling of blood entering the extracorporeal circuit to 20°C and following rewarming of blood before it enters the organism could assure the sufficient anticoagulation and circuit

patency during continuous veno-venous hemofiltration. This method would allow performing of renal replacement therapies without any other anticoagulation.

The main results of this thesis were: a) early HVHF proved superior in preventing the development of septic hypotension. However, neither of tested hemofiltration doses was capable of reversing the progressive disturbances in microvascular, metabolic, endothelial and lung function; b) in a very similar model of septic shock the early CPFA treatment failed to prevent from progression of sepsis to septic shock and was not capable of reversing the sepsis-induced disturbances in various biological pathways and organ systems. Hence, both the efficacy and safety of this method require further rigorous experimental validation in clinically relevant models; c) regional cooling of blood in the CRRT extracorporeal circuit to 20°C for 6 hours makes it possible to perform the procedure without the need to use any anticoagulant with no blood clotting in the extracorporeal circuit. The method of selective in-circuit blood cooling seems to be a feasible alternative strategy for anticoagulation during CRRT.

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. Rohrer MJ, Natale AM. Effect of hypothermia on the coagulation cascade. *Crit Care Med* 1992;20(10):1402-1405.
 29. 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.
 30. 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.
 31. 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.