

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu Fyziologie a patologická fyziologie na Ústavu fyziologie LF UK v Plzni.

Uchazeč: **Ing. Dagmar Jarkovská**

Školitel: **doc. MUDr. Milan Štengl, Ph.D.**

Oponenti: **doc. MUDr. Markéta Bébarová, Ph.D.**

Fyziologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita
Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česká republika

doc. MUDr. Tatiana Stankovičová, CSc.

Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Univerzita
Komenského v Bratislavě
Ulica odbojárov 10, 832 32 Bratislava 3, Slovenská republika

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací studijního programu Fyziologie a patologická fyziologie se koná dne:

Místo obhajoby: knihovna Ústavu fyziologie LF UK v Plzni, alej Svobody 1655/76,
323 00 Plzeň

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Plzni
Univerzity Karlovy, Husova 3, 301 00 Plzeň

doc. MUDr. František Vožeh, CSc.

Předseda komise pro obhajobu dizertačních prací studijního programu
Fyziologie a patologická fyziologie

Ústav patologické fyziologie LF UK v Plzni

Abstrakt

Tato dizertační práce sestává ze tří částí, které popisují elektrofyziologické a kontraktilní změny myokardu při sepsi, acidóze a anestezii vyvolané propofolem.

První část se zaměřuje na analýzu variability srdeční frekvence v klinicky relevantním modelu prasečí sepse/septického šoku. Během několika málo hodin vykazovala variabilita srdeční frekvence rychlý pokles, který předcházel změnám klinických parametrů běžně používaných v diagnostice sepse. Stejně rychlá kinetika variability srdeční frekvence se projevila jak u septického šoku, tak u sepse bez závažného multiorgánového selhání. Na základě těchto výsledků se zdá, že by variabilita srdeční frekvence mohla sloužit jako nástroj pro včasnou diagnostiku u pacientů ohrožených sepsí.

Ve druhé části této práce je analyzován vliv acidózy na kardiovaskulární systém. Na prasatech domácích byla studována metabolická a hyperkapnická acidóza za použití hemodynamických měření *in vivo* i experimentů *in vitro*, které charakterizovaly elektrofyziologii a kontraktilitu srdečního svalu. Oba typy acidózy ovlivnily cirkulaci krve a snížily kontraktilitu myokardu, což by mohlo omezovat terapeutické využití hyperkapnické acidózy.

Práci uzavírá studie tkáňových účinků propofolu, anestetika použitého ve dvou výše zmíněných studiích. Na komorové tkáni potkana *in vitro* nebyla zaregistrována žádná změna tvaru akčního napětí, ale nastal výrazný pokles síly kontrakce, který vzrůstal se zvyšující se koncentrací propofolu. Nicméně pokles síly kontrakce byl pozorován až při koncentracích, jež překračovaly pravděpodobnou hladinu propofolu v krvi septických a acidotických prasat.

Abstract

This dissertation consists of three parts describing electrophysiological and contractile changes of the myocardium in sepsis, acidosis, and propofol-induced anaesthesia.

The first part is focused on heart rate variability analysis in a clinically relevant porcine model of sepsis/septic shock. Heart rate variability showed fast decrease few hours after sepsis induction which preceded changes in clinical parameters commonly used for sepsis diagnosis. The same fast kinetics of heart rate variability were demonstrated in progressive septic shock and in sepsis without serious multiorgan failure. Based on these results, it seems that heart rate variability could represent an early diagnostic tool in patients threatened with sepsis.

In the second part of this thesis acidosis and its effects on the cardiovascular system are analysed. Metabolic and hypercapnic acidoses were examined in domestic pigs using hemodynamic *in vivo* measurements and *in vitro* experiments focused on electrophysiology and contractility of the heart. Both types of acidosis affected circulation and reduced myocardial contractility; hence it could limit therapeutic use of hypercapnic acidosis.

The thesis is completed by a study of the effect of propofol, an anaesthetic used in two above mentioned studies. In rat ventricular tissue *in vitro*, no changes in action potential shape were detected but there was a marked reduction in contraction force, which was concentration-dependent. However, this contraction force decrease was observed only at propofol concentrations higher than the probable propofol blood levels in septic and acidotic pigs.

Obsah

1	Úvod	6
1.1	Variabilita srdeční frekvence	6
2	Cíle dizertace	7
3	Experimentální metody	7
3.1	Experimentální model sepse	8
3.2	Experimentální model acidózy	8
3.3	Experiment na myokardu potkana	9
3.4	Analýza variability srdeční frekvence	10
3.5	Měření akčního napětí a síly kontrakce	12
3.6	Statistické zhodnocení výsledků	13
4	Výsledky a diskuze	13
4.1	Vliv sepse na kardiovaskulární systém	13
4.2	Vliv acidózy na kardiovaskulární systém	18
4.3	Účinky propofolu na srdeční tkáň <i>in vitro</i>	22
5	Závěr	24
5.1	Shrnutí výsledků dizertační práce	24
5.2	Cíle do budoucna	25
6	Literatura	26
	Seznam publikací autorky	31

1 Úvod

1.1 Variabilita srdeční frekvence

Variabilita srdeční frekvence (HRV, z anglického Heart Rate Variability) je přirozená oscilace délky srdečního cyklu. Její analýzou lze získat především informaci o ovlivnění srdeční činnosti autonomním nervovým systémem.

Existují **lineární metody** analýzy HRV, které lze rozdělit na metody v časové oblasti, sem spadají statistické a geometrické parametry, a ve frekvenční oblasti. Spektrální výkon v pásmu vysoké frekvence (HF; 0,15-0,4 Hz) je spojován s aktivitou parasympatiku, zatímco v pásmu nízké frekvence (LF; 0,04-0,15 Hz) s aktivitou jak sympatiku, tak parasympatiku. V poslední době dochází k rozvoji **nelineárních metod**, které jsou sice složitější, ovšem často jsou schopné podchytit jevy, které lineární metody nezaznamenají.

Variabilita srdeční frekvence je ovlivňována celou řadou faktorů. První skupinu tvoří **fyzilogické faktory**, jako pohlaví, věk nebo poloha těla a denní doba, v níž je záznam EKG pořizován. Jejich význam je třeba brát v úvahu především při přípravě experimentů, které by měly být prováděny vždy ve stejnou denní dobu, a rovněž poloha pacientů při nahrávání EKG by měla být stejná (pokud se ovšem nejedná o dlouhodobé monitorování dle Holtera). Pečlivě je nutné posuzovat i složení skupin zkoumaných pacientů z hlediska pohlaví a věku.

Na HRV působí také celá řada **patologických faktorů**, mezi něž patří samozřejmě kardiovaskulární onemocnění (např. infarkt myokardu), dále diabetes mellitus, septické stavy, nádorová nebo duševní onemocnění. Vliv má ale také životní styl a v poslední době se spekuluje i o životním prostředí a jeho znečištění. Při analýze HRV by se rovněž mělo brát v úvahu případné farmakologické ovlivnění, které bylo prokázáno například u betablokátorů, tricyklických antidepresiv a celé řady anestetik.

2 Cíle dizertace

Záměrem této dizertační práce byla analýza elektrofyziologie myokardu za různých patofyziologických podmínek, a to na úrovni jednotlivých buněk, multicelulárního preparátu i celého srdce. Případné změny v elektrofyziologických vlastnostech myokardu byly sledovány v souvislosti s dalšími parametry vypovídajícími o stavu kardiovaskulárního systému (hemodynamická měření) i celého organismu (acidobazická rovnováha).

První cíl představovala charakteristika účinků sepse na variabilitu srdeční frekvence. Otázkou nebyl pouze její případný pokles, ale i jeho kinetika ve vztahu k systémové hemodynamice. Byla rovněž prověřována citlivost analýzy HRV v závislosti na stupni závažnosti experimentálně navozeného septického stavu.

Další část práce se věnuje studiu acidózy na prasečím modelu s úmyslem popsat co nejkompexněji její vliv na kardiovaskulární systém. Uvedené experimenty zahrnovaly sledování systémové, plicní i regionální hemodynamiky, ale i měření na izolované srdeční tkáni, aby bylo možné odlišit přímý efekt acidózy na myokard od sekundárních účinků způsobených změnami v cévní soustavě.

V experimentálním prasečím modelu sepse i acidózy byl k anestezii a sedaci použit (mimo jiné) propofol. Cílem pokusů popisovaných v posledním úseku této práce bylo popsat jeho účinek na kontrakci a elektrofyziologii myokardu. Získané informace měly určit, nakolik mohlo podávání propofolu ovlivnit výsledky předchozích experimentů.

3 Experimentální metody

Všechny experimenty na zvířatech zmiňované v této dizertační práci byly prováděny v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely a byly schváleny Odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy.

3.1 Experimentální model sepse

Pro experimentální modelování sepse v pokusech popisovaných v této práci byla použita prasata domácí. Zvířata byla 18 hodin před začátkem experimentu držena na lačno s neomezeným přístupem k pitné vodě. Anestezie byla zahájena podáním ketaminu i.m. (2 mg/kg), azaperonu i.m. (2-4 mg/kg) a 2% propofolu i.v. (1-2 mg/kg). Po navození anestezie byla provedena orotracheální intubace a zahájena mechanická ventilace (FiO_2 0,3; PEEP 6 cm H_2O , dechový objem 8 ml/kg), přičemž koncentrace vdechovaného kyslíku byla upravována tak, aby se $PaCO_2$ pohyboval v rozmezí 4-5 kPa.

Následovala instrumentace, jejímž cílem bylo umožnit monitorování srdečního výdeje (CO), systolického objemu (SV), systémové (SVR) i plicní cévní rezistence (PVR), středního arteriálního tlaku (MAP) a hladiny cytokinů, interleukinu 6 (IL-6) a faktoru nádorové nekrózy (TNF- α), v průběžně odebírané krvi.

Po provedení instrumentace následovala šestihodinová zotavovací fáze. Po jejím skončení byla realizována všechna měření, jimiž bylo možné charakterizovat stav prasete ještě před vyvoláním septického stavu. Bylo také zahájeno kontinuální měření EKG, které pokračovalo až do úplného závěru experimentu.

Samotná sepse byla způsobena aplikací autologních exkrementů (0,5-1 g/kg) do peritonea prostřednictvím drénu, připraveného během instrumentace. Se zvířetem bylo poté zacházeno jako s pacientem na jednotce intenzivní péče. Standardní terapeutické postupy zahrnovaly (kromě udržování normovolémie a normoglykémie) i podávání noradrenalinu i.v., pokud MAP poklesl pod 65 mmHg. Všechny experimenty byly ukončeny buď eutanázií 48 hodin po vyvolání sepse, nebo úhynem zvířete následkem septického šoku.

3.2 Experimentální model acidózy

Pro experimentální model acidózy byla použita prasata domácí, jimž byla navozována buď metabolická (MAC), nebo hyperkapnická acidóza (HCA). Vždy

18 hodin před začátkem pokusu byla zvířata držena o hladu s neomezeným přístupem k vodě. Experiment byl pak zahájen podáním úvodní anestezie, která sestávala z ketaminu i.m. (2 mg/kg), azaperonu i.m. (2 mg/kg) a 2% propofolu i.v. (1-2 mg/kg). Zvířata byla během pokusu mechanicky ventilována (FiO_2 0,4; PEEP 5 cm H_2O , dechový objem 10 ml/kg). Následovala instrumentace, která zahrnovala umístění centrální žilního katetru, termodilučního katetru, katetru do femorální arterie a ultrazvukových sond na portální žílu, jaterní tepnu, levou renální tepnu a levou karotickou tepnu.

Po provedení instrumentace následovala šestihodinová pauza pro zotavení zvířete. Po získání výchozích hodnot, což zahrnovalo hemodynamická i biochemická měření a nahrání prvního 5minutového záznamu EKG, byla vyvolána acidóza. Hyperkapnické acidózy bylo dosaženo ve dvou krocích. Nejprve byla snížena frakce vdechovaného CO_2 tak, aby pH arteriální krve pokleslo na hodnotu 7,25. To odpovídalo zvýšení $PaCO_2$ z výchozích 4-5 kPa na přibližně 10 kPa. Tento stav byl udržován dalších 60 minut, než bylo přikročeno k druhé fázi snížení pH. Opět byl zvýšen poměr vdechovaného CO_2 , tentokrát cca na 15 kPa. Cílem bylo dosáhnout hodnoty pH 7,1. Stejně jako po prvním poklesu pH i nyní následovala 60minutová stabilizační fáze. Až po jejím uplynutí byla provedena závěrečná hemodynamická a biochemická měření a nahráno EKG.

Metabolická acidóza byla zprostředkována kontinuální infuzí HCl (2 mol/l) rychlostí 10 ml/h. Na rozdíl od hyperkapnické acidózy, frakce vdechovaného CO_2 zůstala po celou dobu experimentu nezměněna (4-5 kPa). Pokus byl opět realizován ve dvou fázích, pH bylo sníženo nejprve na 7,25 a za hodinu na výsledných 7,1. Po další hodině byla uskutečněna měření podobně jako v případě hyperkapnické acidózy.

3.3 Experiment na myokardu potkana

Pro zkoumání účinků propofolu na srdeční tkáň bylo použito celkem 37 šestiměsíčních samců laboratorního potkana kmene Wistar (VELAZ, Praha, ČR). Zvířata byla vždy v den experimentu omráčena a dekapitována bez použití

farmakologické anestezie, jež by mohla způsobit případné zkreslení výsledků pokusu. Z těla zvířete bylo rychle vyjmuto srdce a byl odebrán preparát z levé a pravé srdeční komory. Vzhledem k stejnosměrnému uspořádání svalových vláken byl volen papilární sval nebo trabekula. Preparát byl následně umístěn do lázně, kde bylo změřeno membránové napětí a síla kontrakce, nejprve v kontrolním roztoku, následně i v roztoku s propofolem, jehož koncentrace byla zvyšována tak, aby postupně dosahovala hodnot: 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 mmol/l. Ve všech uvedených koncentracích bylo provedeno měření vždy při čtyřech různých stimulačních frekvencích (1, 2, 3 a 5 Hz).

3.4 Analýza variability srdeční frekvence

Všechny nahrávky EKG (svod II), jejichž analýza byla zahrnuta do této práce, byly pořízeny pomocí měřicí jednotky Biopac (Biopac Systems Inc., Santa Barbara, CA, USA). Ve všech případech byla použita vzorkovací frekvence 1000 Hz. Analýza byla prováděna buď na 5minutových nahrávkách, nebo na hodinových úsecích, na něž byl rozdělen kontinuální záznam. Pro off-line analýzu byl zvolen software MATLAB 2014b (MathWorks Inc., Natick, MA, USA, 2014). Nejprve byly detekovány R kmity (algoritmus Pan-Tompkins, Pan a Tompkins, 1985), z nichž byly vypočítány RR intervaly. Ještě před samotnou analýzou byly ze série automaticky vyloučeny ektopické RR intervaly. Byly za ně považovány ty intervaly, jež se od aritmetického průměru z okolních 50 intervalů (25 předcházejících a 25 následujících) lišily o více než 20 %. Tento algoritmus byl opakován, dokud série obsahovala alespoň jeden ektopický interval. Celá nahrávka byla vyřazena z další analýzy, pokud obsahovala více než 5 % ektopických RR intervalů. V sériích RR intervalů zahrnutých do analýzy variability srdeční frekvence byly ektopické RR intervaly nahrazeny odpovídajícím počtem normálních RR intervalů s využitím metody lineární interpolace.

Takto připravená série RR intervalů byla podrobena analýze variability srdeční frekvence, jejímž výsledkem byly hodnoty parametrů v časové a frekvenční oblasti (Tab. 3.1).

Parametry v časové oblasti	
Statistické parametry	
SDNN (ms)	Směrodatná odchylka normálních RR intervalů.
SDSD (ms)	Směrodatná odchylka rozdílů mezi sousedními normálními RR intervaly.
pNN50 (%)	Podíl sousedících normálních RR intervalů, které se od sebe liší o více než 50 ms.
Geometrické parametry	
HRV TI (-)	Celkový počet normálních RR intervalů dělený výškou frekvenčního histogramu normálních RR intervalů.
TINN (ms)	Základna trojúhelníku získaného interpolací frekvenčního histogramu normálních RR intervalů.
Parametry Poincarého grafu	
SD1 (ms)	Směrodatná odchylka bodů Poincarého grafu kolmo vůči ose 1. kvadrantu.
SD2 (ms)	Směrodatná odchylka bodů Poincarého grafu podél osy 1. kvadrantu.
SD1/SD2 (-)	Poměr SD1 vůči SD2.
S (ms ²)	Plocha elipsy aproximující Poincarého graf.
Parametry ve frekvenční oblasti	
TP (ms ²)	Celková výkonová spektrální hustota.
LF (ms ²)	Výkonová spektrální hustota v pásmu nízké frekvence (0,04-0,15 Hz) v absolutních jednotkách.
HF (ms ²)	Výkonová spektrální hustota v pásmu vysoké frekvence (0,15-0,4 Hz) v absolutních jednotkách.
LF norm (n. u.)	Výkonová spektrální hustota v pásmu nízké frekvence (0,04-0,15 Hz) normalizovaná podle vzorce LF norm = LF / (LF + HF).
HF norm (n. u.)	Výkonová spektrální hustota v pásmu vysoké frekvence (0,15-0,4 Hz) normalizovaná podle vzorce HF norm = HF / (LF + HF).
LF/HF (-)	Poměr výkonové spektrální hustoty v pásmu nízké frekvence vůči výkonové spektrální hustotě v pásmu vysoké frekvence.

Tab. 3.1. Parametry variability srdeční frekvence.

3.5 Měření akčního napětí a síly kontrakce

Měření akčního napětí a síly kontrakce byla prováděna na multiceulárních preparátech z prasete nebo potkana. Ihned po usmrcení daného zvířete bylo rychle vyjmuto srdce, z něhož byla vypreparována trabekula, resp. papilární sval. Preparát byl okamžitě přemístěn do lázně promývané okysličeným Tyrodovým roztokem ohřátým na teplotu 37°C, kde byl napnut mezi dva háčky, z nichž jeden byl statický a druhý pohyblivý. Ten byl připojen k mechano-elektrickému převodníku (model F30; Hugo Sachs Electronik – Harvard Apparatus, GmbH, March-Hugstetten, Německo), který umožnil převod měřené síly kontrakce na elektrický, počítačem registrovaný signál. Po umístění preparátu do lázně následovala třicetiminutová fáze stabilizace, kdy byl preparát stimulován frekvencí 1 Hz. Stimulace byla zajišťována komerčním stimulatorem (Pulsmaster A300; World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA), jehož obdélníkové pulsy (o délce 20 ms a amplitudě o 50 % vyšší než nalezený stimulační práh) byly přiváděny prostřednictvím izolační jednotky.

Při vlastním měření byl preparát stimulován po řadě několika frekvencemi. V případě preparátů z prasečího srdce se jednalo o frekvence 0,5; 1 a 2 Hz, u laboratorního potkana 1; 2; 3 a 5 Hz. Zároveň se silou kontrakce bylo pomocí vysokoodporových elektrod zaznamenáváno membránové napětí buněk komorového myokardu. Elektrody byly vyrobeny ze skleněných kapilár pomocí tahače elektrod (Microelectrode Puller P-1000, Sutter Instrument, Novato, CA, USA) a následně naplněny roztokem 3M KCl.

Při měření akčního napětí a síly kontrakce byl preparát umístěn v lázni promývané Tyrodovým roztokem o následujícím složení (v mmol/l): NaCl 137; KCl 4,5; MgCl₂ 1; CaCl₂ 2; glukóza 10; HEPES 5. Pomocí NaOH bylo následně upraveno pH na hodnotu 7,4, respektive 7,1 v případě experimentů zabývajících se vlivem acidózy na kardiovaskulární systém.

Při studiu vlivu propofolu na průběh akčního napětí a síly kontrakce *in vitro* byl do Tyrodova roztoku přidáván propofol předem rozpuštěný v 96% etanolu. Výsledná

koncentrace propofolu v Tyrodově roztoku činila 0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; resp. 0,5 mmol/l.

Záznamy membránového napětí a síly kontrakce byly exportovány ve formátu ASCII a analyzovány v softwaru, který byl v rámci této práce pro daný účel speciálně vyvinut v prostředí programu MATLAB 2014b (MathWorks Inc., Natick, MA, USA, 2014). Jeho součástí bylo i uživatelské rozhraní, jež umožňovalo zobrazit oba signály a ručně vybrat úseky zahrnující alespoň 10 srdečních cyklů, na nichž pak byly měřeny požadované parametry. V případě síly kontrakce bylo stanovováno její maximum (CF), doba od začátku do vrcholu kontrakce (TTP), doba od vrcholu kontrakce do 50% relaxace (R50) a doba od vrcholu kontrakce do 90% relaxace (R90). Pro akční napětí byla určována jeho amplituda (APA) a na jejím základu doba od začátku depolarizace do 50% repolarizace (APD50) a doba od začátku depolarizace do 90% repolarizace (APD90).

3.6 Statistické zhodnocení výsledků

Všechny výsledky jsou v této práci prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka. Rozdíly na hladině významnosti $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné a označeny hvězdičkou (*). Statistická analýza byla prováděna v komerčních softwarech STATISTICA Cz 8 (StatSoft ČR, s r. o., Praha, CZ, 2008) a Origin 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA, 2011), v němž byly vytvořeny i všechny grafy.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Vliv sepse na kardiovaskulární systém

Sepse je definována jako život ohrožující orgánová dysfunkce způsobená porušenou regulací hostitelské reakce na infekci (Singer et al., 2016). Septický šok je pak podmnožinou sepse, v které jsou zásadní oběhové a buněčné/metabolické změny dostatečně závažné na to, aby podstatně zvýšily úmrtnost (Singer et al.,

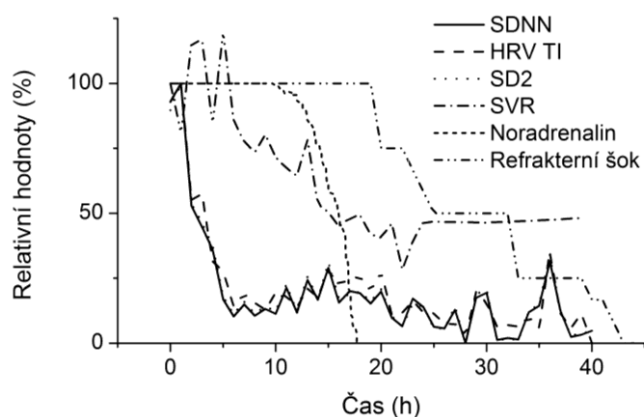
2016). Pro úspěšný výsledek terapie septických pacientů, zahrnující hemodynamickou optimalizaci a léčbu antibiotiky, je zásadní včasná diagnóza (Kumar et al., 2006; Rivers et al., 2001). Zatím ovšem nebyl nalezen spolehlivý nástroj, který by ji umožňoval. Jeden z potenciálních indikátorů sepse, na nějž je zaměřena i tato práce, představuje variabilita srdeční frekvence (Seely a Christou, 2000).

Cílem pokusů představených v následující podkapitole bylo nejen popsat změny HRV během sepse, ale i jejich kinetiku. Tyto výsledky pak byly interpretovány v souvislosti s dalšími sledovanými parametry (hemodynamika, hladina zánětlivých cytokinů) a rychlostí jejich změny při rozvoji sepse. Dalším záměrem bylo určit, zda se pokles HRV týká i septických stavů, kdy nedochází k multiorgánovému selhání. Proto byly pokusy navrženy tak, aby bylo dosaženo různého stupně závažnosti sepse.

Do septických experimentů (viz podkapitola 3.1) bylo zařazeno celkem 27 prasat domácích (40 ± 6 kg). První skupině zvířat, jež sestávala z 11 prasat (z toho 6 samců a 5 samic), byl podán 1 g/kg exkrementů do dutiny břišní. Druhé skupině (celkem 11 prasat, z toho 9 samců a 2 samice) bylo aplikováno jen poloviční množství, tedy 0,5 g/kg, navíc zde byla 6 hodin po vyvolání sepse zahájena antibiotická léčba (piperacilin/tazobactam 2,5 g každých 8 hodin). Cílem bylo dosáhnout u první skupiny těžké sepse s multiorgánovým selháním, potažmo septického šoku a u druhé skupiny sepse s mírnějším průběhem bez multiorgánového selhání. Zbýlých pět experimentů bylo prováděno bez vyvolání sepse, aby bylo možné vyloučit nescifické účinky zvolených metod (chirurgický zákrok, anestezie, odběr vzorků) na sledované parametry.

V klinicky relevantním prasečím modelu sepse došlo k výraznému propadu variability srdeční frekvence v obou modifikacích experimentálního protokolu. Jeho příčinou byl zřejmě pokles aktivity parasympatiku, který způsobil přesun sympatovagální rovnováhy směrem k sympatické modulaci srdeční činnosti. Propad HRV byl zaznamenán několik hodin před zpozorováním hemodynamických změn (Obr. 4.1 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**), což by

v praxi mohlo poskytnout širší prostor pro včasné zahájení terapie a tím i vyšší šanci na přežití pacientů.



Obr. 4.1. Časové vztahy mezi HRV, hemodynamikou a rozvojem refrakterního šoku.

Všechny zobrazené veličiny jsou vyjádřeny relativně, přičemž 100 % představuje hodnotu před indukcí sepse. Parametry HRV jsou zastoupeny SDNN (plná křivka), HRV TI (dlouze čárkovaná křivka) a SD2 (tečkovaná křivka). Hemodynamická nestabilita je doložena SVR (čerchovaná křivka), terapeutickou dávkou noradrenalinu (krátce čárkovaná křivka), respektive hodnotou získanou jako rozdíl příslušné terapeutické dávky a počáteční hodnoty (100%), a refrakterním šokem (čerchovaná křivka se dvěma tečkami).

Frekvenční analýza HRV odhalila v obou septických skupinách statisticky významný pokles v oblasti vysoké frekvence, zatímco v případě nízké frekvence byla změna statisticky signifikantní pouze u zvířat se septickým šokem, a to jen v rámci jedné hodiny. Když byly hodnoty LF a HF normalizovány, byl vzestup v HF komponentě doprovázen snížením LF, což bylo dáno faktem, že ve vzorci pro výpočet normalizované LF je zahrnuta i HF (Tab. 3.1). Poměr LF/HF se zvýšil během experimentů pouze přechodně, v případě septického šoku mezi 9. a 13. hodinou, u sepse s mírnějším průběhem ve 14. - 16. hodině. Výsledky analýzy HRV ve frekvenční oblasti lze shrnout do konstatování, že sympatovagální rovnováha se vlivem sepse přesunula směrem k sympatické modulaci činnosti srdce. V tomto ohledu však v literatuře nepanuje shoda, která může být dána jednak metodikou (stupeň závažnosti sepse, objekt experimentu a jeho věk, způsob indukování sepse aj.), ale také časovým rozvrhem pokusů.

Změna sympatovagální rovnováhy pozorovaná při našich pokusech je velice zajímavá v souvislosti s pracemi skupiny prof. Traceyho (Tracey, 2007, 2009). Tato skupina představila koncept cholinergní protizánětlivé dráhy, který propojuje nervovou a humorální odpověď na infekci. Na základě této teorie byla testována stimulace n. vagus (Borovikova et al., 2000) a bylo prokázáno, že potlačuje produkci mediátorů zánětu (např. TNF- α). Z toho lze vyvozovat, že pokles HF komponenty, který nastal u septických prasat a který odrážel inhibici aktivity n. vagus, mohl vést k nedostatečné aktivaci nebo inhibici cholinergní protizánětlivé dráhy a přispět tak k rozvoji sepse.

Statistické, geometrické i nelineární (Poincarého) parametry HRV vykazovaly během pokusu velmi rychlý pokles, který byl kompletní během přibližně 5 hodin od navození sepse. Obdobná kinetika byla pozorována u vysokofrekvenční komponenty spektrální výkonové hustoty. Ovšem hodnota její nízkofrekvenční složky se v případě sepse bez multiorgánového selhání statisticky významně nezměnila a při těžké sepsi/septickém šoku signifikantně stoupla až po 14 hodinách. Můžeme tedy předpokládat, že inhibice parasympatiku byla převažujícím mechanismem způsobujícím snížení variability srdeční frekvence u prasat postižených sepsí. Ke zvýšení aktivity sympatiku zřejmě došlo až sekundárně vlivem hemodynamických změn a terapeutického podávání noradrenalinu kvůli udržení MAP nad 65 mmHg.

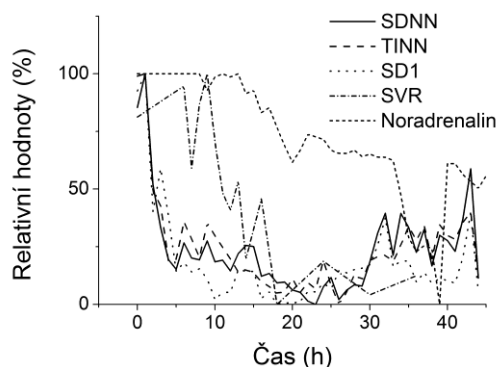
Inhibice parasympatiku však nemusí být jedinou příčinou snížení parametrů HRV během rozvoje sepse. Vedle autonomní nervové regulace srdce zde může hrát roli například i změna pacemakerové aktivity způsobená inhibicí hyperpolarizací aktivovaného proudu I_f (Barbuti a DiFrancesco, 2014; Papaioannou et al., 2013). Na izolovaných buňkách bylo totiž zdokumentováno, že aplikace endotoxinu vyvolala snížení proudu I_f (Klöckner et al., 2014; Zorn-Pauly et al., 2007).

Otázkou však nebylo pouze samotné snížení variability srdeční frekvence, ale i její citlivost vzhledem k míře závažnosti septického stavu. Proto byl experimentální model sepse použit ve dvou modifikacích. V první bylo cílem dosáhnout těžké sepse, resp. septického šoku, což se zdařilo. Všechna zvířata v této skupině uhynula následkem refrakterního šoku a nedožila se plánovaného ukončení

pokusu. U druhé skupiny prasat jsme se snažili o vyvolání sepse s mírnějším průběhem tak, aby nedošlo k multiorgánovému selhání. K popisu stavu zvířat bylo použito SOFA skóre (Vincent et al., 1996), které umožňuje číselně ohodnotit vliv sepse na jednotlivé orgánové soustavy. Hodnotí respiraci, koagulaci, stav jater, kardiovaskulární a centrální nervové soustavy a funkci ledvin.

Podle tohoto systému sepse během experimentu nevyvolala selhání ledvin ani jater, jak ukazují nezměněné hodnoty kreatininu a bilirubinu. Diuréza se dokonce zvýšila, což bylo zřejmě dáno objemovou resuscitací. Posouzení stavu centrálního nervového systému pomocí Glasgowské stupnice bezvědomí nebylo vzhledem k celkové anestezii zvířat možné. K mírnému zhoršení došlo v rámci dýchání a koagulace, ovšem až 24 hodin po vyvolání sepse. Kardiovaskulární systém se tak stal jedinou orgánovou soustavou, která významně přispěla ke zvýšení SOFA skóre během rozvoje sepse. U zvířat se objevila hyperdynamická cirkulace s periferní vazodilatací. U 9 z 11 zvířat byla nutná aplikace noradrenalinu k udržení MAP nad 65 mmHg, ovšem většinou pouze nízká dávka a u 6 prasat jen po přechodnou dobu. V současnosti je septický šok klinicky definován dlouhodobě přetrvávající hypotenzí (MAP <65 mmHg) vyžadující léčbu vazopresory a zároveň hyperlaktémií (>2 mmol/l) odolávající objemové resuscitaci (Singer et al., 2016). Hodnota laktátu však v našem případě nepřesáhla 1,2 mmol/l, což naznačuje dostatečné okysličení tkání.

Lze tedy říci, že minimálně prvních 24 hodin nedošlo k multiorgánovému selhání ani septickému šoku, přesto i zde vykazovala variabilita srdeční frekvence výrazný pokles podobně jako u experimentů, kde nastal septický šok (Obr. 4.2). Mohlo by se tedy jednat o citlivý nástroj v diagnostice sepse, který projevuje významnou změnu již při méně závažných stavech.



Obr. 4.2. Časové vztahy mezi HRV a hemodynamikou.

Všechny zobrazené veličiny jsou vyjádřeny relativně, přičemž 100 % představuje hodnotu před indukcí sepse. Parametry HRV jsou zastoupeny SDNN (plná křivka), TINN (dlouze čárkovaná křivka) a SD1 (tečkovaná křivka). Hemodynamická nestabilita je doložena SVR (čerchovaná křivka) a terapeutickou dávkou noradrenalinu (krátce čárkovaná křivka), respektive hodnotou získanou jako rozdíl příslušné terapeutické dávky a počáteční hodnoty (100 %).

4.2 Vliv acidózy na kardiovaskulární systém

Naším cílem bylo sledovat systémové i regionální hemodynamické změny vyvolané acidózou na velkém zvířecím modelu. Na rozdíl od většiny studií byl zkoumán čistě efekt acidózy samotné nikoliv acidózy jako stavu, který doprovází jinou patologii. Na zdravých prasatech byl zkoumán vliv metabolické (MAC) a hyperkapnické acidózy na různé orgánové soustavy. HCA byla porovnávána s MAC, protože zatím není zcela jasné, zda její účinek spočívá převážně v hyperkapnii, nebo ve vlastní acidóze, přičemž některé práce naznačují, že hlavní roli hraje právě acidóza (Laffey et al., 2000). Experimenty uskutečněné *in vivo* byly doplněny měřeními *in vitro*, aby bylo možné odlišit přímý vliv acidózy na srdce od sekundárního efektu v důsledku ovlivnění cévního systému.

Naše studie byla provedena na 24 prasatech domácích obou pohlaví (37 ± 1 kg), jež byla rozdělena do tří skupin, kontrolní, metabolická acidóza a hyperkapnická acidóza. Acidóza byla zvířatům způsobena podle popisu v podkapitole 3.2. Část pokusu prováděná *in vivo* byla ukončena vyjmutím srdce, jež bylo použito k následnému *in vitro* experimentu. Z pravé srdeční komory byla vždy

vypreparována trabekula, která byla umístěna do lázně promývané Tyrodovým roztokem. Zde byla nahrávána síla kontrakce a membránové napětí za stimulační frekvencemi 0,5; 1 a 2 Hz (viz podkapitola 3.5). Poté byl vyměněn kontrolní Tyrodův roztok (pH 7,4) za svou kyselou variantu (pH 7,1) a měření byla zopakována při stejných stimulačních frekvencích. Získaná data byla analyzována off-line spolu s nahrávkami EKG.

Prezentovaná studie prokázala, že jak hyperkapnická (HCA), tak metabolická acidóza (MAC) mají vliv na kardiovaskulární systém. V plicním oběhu byl jejich účinek podobný, zvýšená plicní vaskulární rezistence i střední tlak v plicní tepně. Systémová cirkulace však byla ovlivněna rozdílně. Po vyvolání MAC se její parametry nezměnily, zatímco působením HCA došlo ke zvýšení MAP i přes snížení systémové cévní rezistence. Oba typy acidózy vykazovaly pokles systolického objemu a vzestup srdeční frekvence.

Aby bylo možné odlišit přímý efekt acidózy na funkci srdce od účinků primárně zapříčiněných změnami v oběhovém systému, byla prováděna měření *in vitro*. Ukázalo se, že kontraktilita preparátu z pravé srdeční komory byla v kyselém prostředí snížena (Obr. 4.3), což odpovídá poklesu systolického objemu v *in vivo* situaci. Podobný efekt na sílu kontrakce byl pozorován u izolovaného potkaního srdce s hyperkapnickou acidózou (Tang et al., 1991). Na rozdíl od naší studie však byl připisován spíše hyperkapnii než acidóze.

Fakt, že ke snížení síly kontrakce myokardu *in vitro* v kyselém roztoku došlo při všech použitých stimulačních frekvencích (0,5; 1 a 2 Hz), naznačuje, že nárůst srdeční frekvence nemusel hrát hlavní roli v poklesu systolického objemu *in vivo*. Nicméně hodnoty srdeční frekvence byly výrazně vyšší (200 bpm by odpovídalo stimulační frekvenci 3,3 Hz), což významně zkrátilo plnicí fázi a mohlo přispět i k nižšímu SV. Na druhou stranu globální end-diastolický objem se při acidóze nezměnil, takže plnění srdce nebylo ovlivněno.

Vzhledem k tomu, že v obou acidotických skupinách bylo pozorováno statisticky významné zkrácení korigovaného QT intervalu, dalo by se předpokládat, že při *in vitro* pokusech v kyselém prostředí se objeví zkrácení akčního napětí spojené se sníženým přítokem vápenatých iontů kanály typu L, což by mohlo představovat

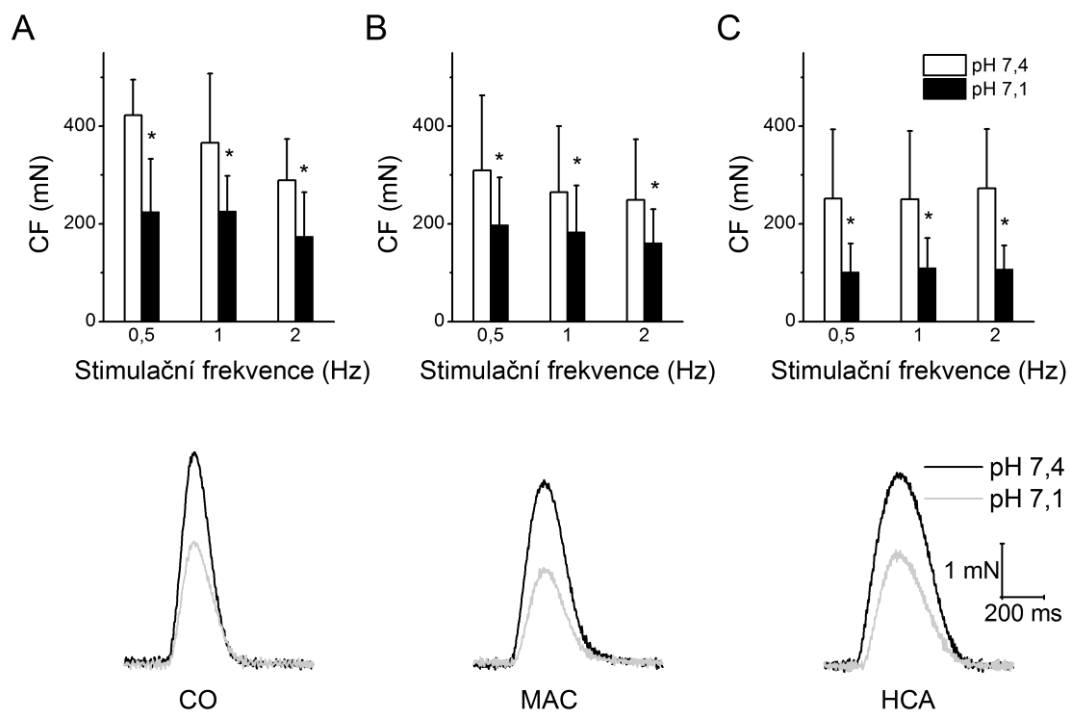
jednu z příčin snížené kontraktility. Ovšem trvání akčního napětí se nezměnilo, takže se membránová elektrogenese nejeví jako hlavní příčina změny síly kontrakce *in vitro*. Výše zmíněný rozpor v ovlivnění repolarizace acidózou *in vivo* (kratší QTc) a *in vitro* (nezměněné trvání AP) mohl být způsoben přítomností humorální a nervové regulace srdeční činnosti, k níž dochází pouze *in vivo*, ale i samotnou metodou korekce QT intervalu, která vždy vykazuje určitou chybu bez ohledu na použitý vzorec (Funck-Brentano a Jaillon, 1993).

V obou acidotických skupinách, MAC i HCA, se objevilo zvýšení srdeční frekvence, jehož příčinou mohla být autonomní nervová regulace, ale i přímý efekt acidózy na sinoatriální uzel. Analýza variability srdeční frekvence v naší práci neodhalila změnu sympatovagální rovnováhy, což hovoří ve prospěch komplexního zpětnovazebního mechanismu jako je například presynaptická inhibice uvolňování noradrenalinu a/nebo zvýšení hladiny katecholaminů v krvi. Podobná teorie byla navržena i ve studii, v níž bylo popsáno paradoxní snížení hodnoty nízkofrekvenční komponenty (spojované s aktivitou sympatiku) při zvýšené hladině noradrenalinu v krevním oběhu (Tulppo et al., 2005). Kromě periferního působení acidózy musíme brát v úvahu také její vliv na centrální chemoreceptory, které jsou velice citlivé na parciální tlak CO₂ v krvi a které mohly přispět ke zvýšení CO při HCA, ale nikoliv při MAC.

Inotropní efekt acidózy popsáný *in vitro* na izolované tkáni naznačuje, že autonomní regulace srdeční činnosti nebyla jeho hlavní příčinou. Nebylo odhaleno ani ovlivnění membránové elektrogenese (při pH 7,1), takže ke snížení kontraktility srdečního svalu nepřispělo zřejmě ani snížení I_{CaL}. Nejspíše se vyvinula intracelulární acidóza, která narušila např. vazbu vápníku na troponin C, interakci troponinu a tropomyozinu nebo aktinu a myozinu (Li et al., 2001; Kohmoto et al., 1990; Orchard a Kentish, 1990). Ovšem nutno podotknout, že výše popsané změny byly pozorovány při acidóze s hodnotou pH kolem 6,5, což je mnohem méně než klinicky relevantní acidóza vyvolaná v naší studii (pH 7,1).

Tepová práce pravé srdeční komory za jednu minutu byla zvýšená u obou typů acidózy, ovšem u levé komory měla tento efekt pouze HCA. Toto zjištění by mělo být vzato do úvahy při případném terapeutickém využití HCA. Byly sice popsány

pozitivní účinky HCA (včetně protizánětlivých, Curley et al., 2010), ovšem v případě srdečního selhání nebo plicní hypertenze by se vzhledem k jejímu inotropnímu efektu mělo dbát zvýšené opatrnosti.



Obr. 4.3. Vliv acidózy na sílu kontrakce komorového myokardu.

Prázdné sloupce zobrazují sílu kontrakce (CF) změřenou v kontrolním roztoku (pH 7,4), plné sloupce v kyselém roztoku (pH 7,1). * $P < 0,05$, statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku (pH 7,4). A. Velikost síly kontrakce změřené na preparátech ze zvířat z kontrolní skupiny (CO). B. Velikost síly kontrakce změřené na preparátech ze zvířat s metabolickou acidózou (MAC). C. Velikost síly kontrakce změřené na preparátech ze zvířat s hyperkapnickou acidózou (HCA). Spodní panel, ukázky průběhu síly kontrakce v kontrolním (pH 7,4, černá křivka) a v kyselém roztoku (pH 7,1, šedá křivka) změřené na preparátu ze zvířete z příslušné skupiny (CO, MAC, resp. HCA).

Zatímco v rámci plicního oběhu vykazovaly oba typy acidózy podobné změny hemodynamických parametrů, v dalších regionech již byly výsledky heterogenní. V průtoku renální tepnou nebyl zaznamenán žádný statisticky významný efekt, což je v kontrastu s literaturou, kde byl pozorován jak zvýšený (Cardenas et al., 1996), tak snížený (Fujii et al., 1985) průtok krve ledvinami. V průtoku krve játry

a karotickou tepnou byly zjištěny rozdíly mezi MAC a HCA, kde byly naměřeny signifikantně vyšší hodnoty pro HCA. Zde tedy pravděpodobně dominoval vazodilatační efekt oxidu uhličitého nad eventuálním vazokonstrikčním účinkem acidózy.

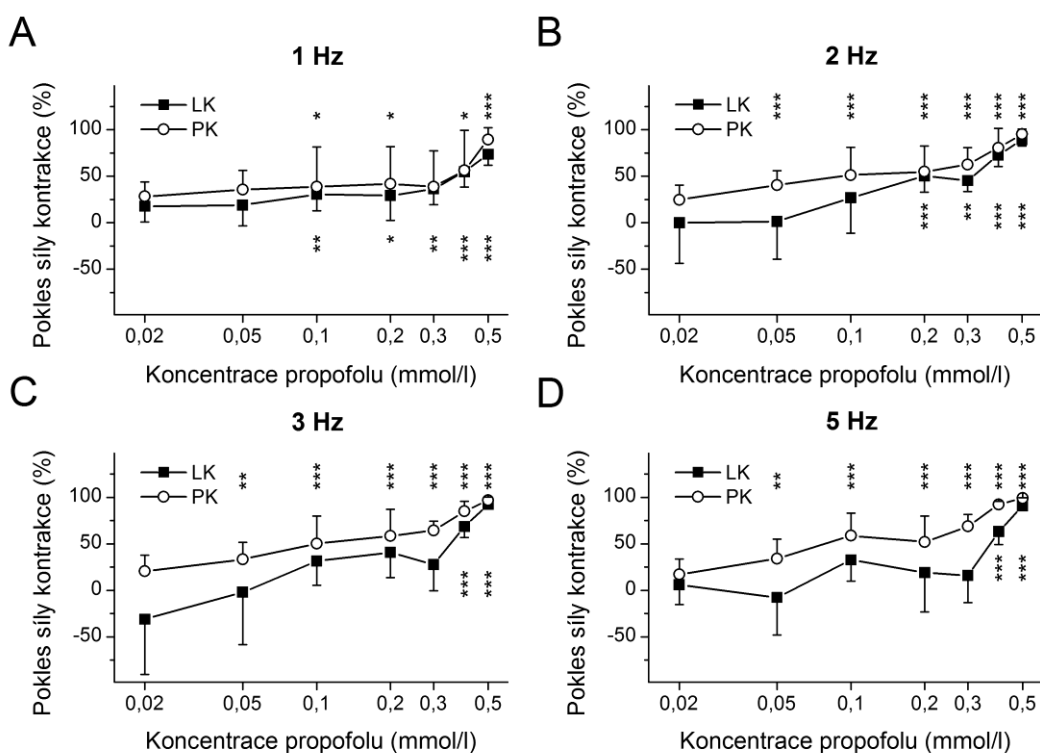
4.3 Účinky propofolu na srdeční tkáň *in vitro*

Propofol (2,6-diisopropylfenol) je rychlé a krátce účinkující hypnotikum, které je používáno na úvod i udržení anestezie nebo sedaci u ventilovaných pacientů během resuscitační péče (Bryson et al., 1995). Jeho podávání může být spojeno se závažnými vedlejšími účinky na kardiovaskulární systém, včetně poklesu krevního tlaku a srdečního výdeje (Yang et al., 2015). Propofol však není používán pouze v humánní medicíně, je rutinně aplikován i pokusným zvířatům. Byl podáván všem prasatům ve studiích popisovaných na předchozích stránkách této práce. Cílem bylo stanovit, jaký má propofol vliv na membránové napětí a sílu kontrakce v srdci potkana, které byly měřeny stejnou metodou jako v případě experimentů prováděných na prasatech. Výsledky měly pomoci určit, do jaké míry mohla být měření ovlivněna použitou anestezií.

Propofol v žádné z koncentrací použitých v této práci neovlivňoval průběh akčního napětí v preparátech z obou srdečních komor laboratorního potkana. Byl ale prokázán významný inotropní efekt propofolu na komorový myokard potkana při koncentraci propofolu 50 $\mu\text{mol/l}$ (Obr. 4.4). Účinná koncentrace pro 50% pokles síly kontrakce (EC_{50}) při 3Hz stimulaci, jež se nejvíce blíží situaci *in vivo*, byla 210 a 230 $\mu\text{mol/l}$ v levé, resp. pravé komoře. Publikací popisujících vliv propofolu na kontrakci myokardu lze najít poměrně velké množství, ovšem jejich výsledky se často značně liší. Je to dáno jak rozdílnými metodami (např. stimulační frekvence, teplota), tak použitým preparátem (izolované kardiomyocyty nebo multicelulární preparát) a v neposlední řadě i druhem a věkem zvířete, na němž byl experiment prováděn. Například (Azuma et al., 1993) popisoval statisticky významný účinek na kontrakci papilárního svalu z levé komory až při koncentraci propofolu 600 $\mu\text{mol/l}$. Jeho výsledky byly však získány za jiných podmínek, než jaké byly aplikovány v naší práci. Teplota během experimentů byla pouze 30°C a stimulační

frekvence 0,5 Hz, což je pro potkana velmi nízká hodnota, i když se bere v úvahu případná bradykardie, kterou může propofol v klinických podmínkách způsobovat. Studie prováděné na izolovaných buňkách různých druhů včetně potkana většinou uvádí EC50 kolem 50 $\mu\text{mol/l}$ (Hamilton et al., 2000; Puttick a Terrar, 1992).

Zatím nepanuje obecná shoda na příčině poklesu síly kontrakce v důsledku působení propofolu. Bylo prokázáno, že ho nelze plně vysvětlit inhibicí vápníkového proudu I_{CaL} (Hamilton et al., 2000). Pravděpodobně zde hraje roli více faktorů ovlivňujících vápníkový metabolismus srdeční buňky. Přispívajícími mechanismy mohou být změněná aktivita sodíko-vápníkového výměníku, pokles čerpání vápenatých iontů do sarkoplazmatického retikula nebo snížená citlivost kontraktálních bílkovin vůči vápníku (Hamilton et al., 2000; Sprung et al., 2001; Wickley et al., 2006, 2007).



Obr. 4.4. Vliv propofolu na sílu kontrakce komorového myokardu.

Pokles síly kontrakce v levé (LK; plné čtverce) a pravé srdeční komoře (PK; prázdné kroužky) při stimulačních frekvencích 1 (A), 2 (B), 3 (C) a 5 Hz (D) vyjádřený jako procentuální hodnota síly kontrakce naměřené v kontrolním roztoku bez propofolu odečtená od 100 %. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, statisticky významný rozdíl ve srovnání s hodnotami naměřenými v kontrolním roztoku bez propofolu.

Koncentrace propofolu, používaná k anestezii pacientů, se pohybuje v rozmezí 5-50 $\mu\text{mol/l}$. V lidské plazmě se propofol ve velké míře váže na albumin a erytrocyty, jeho volná frakce činí jen 1-5 % z celkové koncentrace, tedy 0,05-2,5 $\mu\text{mol/l}$ (Dawidowicz et al., 2008; Mazoit a Samii, 1999). Koncentrace propofolu použité v této práci byly vybrány s ohledem na hodnoty, při nichž jsou udávány významné změny ve funkci srdce (Grounds et al., 1985). Nicméně je lze stále považovat za klinicky relevantní, a to ze dvou důvodů. Za prvé, při úvodu anestezie může koncentrace volného propofolu až několikanásobně překročit hodnoty, jakých je dosaženo v ustáleném stavu při udržování anestezie (Bienert et al., 2012). Za druhé, volná frakce propofolu je navyšována přítomností dalších farmak, která se rovněž váží na albumin, konformační změnou molekuly albuminu nebo změnou koncentrace plazmatických proteinů, jež omezuje vazbu propofolu na albumin (Dawidowicz et al., 2008).

5 Závěr

5.1 Shrnutí výsledků dizertační práce

Předkládaná dizertační práce se zabývá analýzou elektrofyzologie myokardu při sepsi, acidóze a anestezii indukované propofolem. Její hlavní část je zaměřená na popis variability srdeční frekvence během rozvoje sepse, případně septického šoku u prasete domácího. Bylo zjištěno, že dochází k markantnímu snížení HRV, a to bez ohledu na stupeň závažnosti sepse. Stejně rychlý pokles byl pozorován jak u těžké sepse následované refrakterním šokem, tak u sepse bez těžkého multiorgánového selhání. Významné změny hemodynamických parametrů se navíc objevily až o několik hodin později. Analýza HRV by tak mohla představovat nástroj pro včasnou diagnostiku septických pacientů. Užití frekvenční analýzy HRV zároveň umožnilo popsat autonomní nervovou regulaci srdeční činnosti během sepse. Byl zjištěn výrazný pokles ve vysokofrekvenční komponentě spektrální výkonové hustoty, který ukazoval na snížení parasympatické aktivity a přesun sympatovagální rovnováhy ve prospěch sympatické regulace, což může souviset s konceptem cholinergní protizánětlivé dráhy (Tracey, 2007).

Druhá část této práce se věnuje sledování účinků hyperkapnické a metabolické acidózy na kardiovaskulární systém prasete, přičemž *in vivo* experimenty, zahrnující komplexní měření systémové i regionální hemodynamiky, byly doplněny o *in vitro* měření kontraktility a membránového napětí komorového myokardu. Zatímco MAC ovlivňovala především plicní oběh, HCA se projevila i změnou systémových a regionálních hemodynamických parametrů. Oba typy acidózy snižovaly kontraktilitu srdečního svalu a kladly tak zvýšené nároky na jeho práci, což by mohlo představovat potencionální omezení v terapeutickém využití HCA.

V obou předchozích částech předkládané práce byl v rámci anestezie zvířat použit propofol. Studium jeho účinku na komorový myokard potkana se zabýval poslední díl práce. Nebyl shledán žádný vliv na tvar a trvání akčního napětí, ovšem byl zaznamenán statisticky významný pokles síly kontrakce. Koncentrace, při nichž se tento efekt projevil, ale řádově přesahovaly hodnoty, jakých bylo pravděpodobně dosahováno během experimentů na septických a acidotických prasatech, a to i při úvodu do anestezie.

5.2 Cíle do budoucna

Téma sepse zůstává i nadále v centru pozornosti našeho vědeckého týmu v Laboratoři experimentální kardiologie Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni. V současnosti probíhají dokonce dvě studie zaměřené na léčebné postupy v boji proti tomuto onemocnění. První z nich, podpořená Agenturou pro zdravotnický výzkum České republiky (grant č. 15-32801A), se zabývá terapeutickým potenciálem mezenchymálních kmenových buněk v klinicky relevantním prasečím modelu sepse. Aplikace těchto buněk by mohla představovat naději pro septické pacienty. Nicméně studie, které popisovaly jejich příznivý účinek na vývoj sepse, byly prováděny pouze na hlodavcích. Je tedy třeba ověřit jejich působení na velkém zvířecím modelu. Analýza HRV bude v této studii použita jako nástroj k detailnímu sledování rozvoje sepse a případné optimalizaci velikosti dávky kmenových buněk a jejího načasování.

Další projekt financovaný Grantovou agenturou České republiky (grant č. 15-157) má za cíl testovat roli autonomního nervového systému v rozvoji sepse. Podle hypotézy představené profesorem Traceym (Tracey, 2007) je nervový systém schopen inhibovat uvolňování cytokinů díky zánětlivému reflexu bloudivého nervu a tím zabránit rozvoji sepse. Dosud publikované práce zaměřené na terapeutický potenciál cholinergní protizánětlivé dráhy, byly realizovány na myších a potkaních modelech. Testování stimulace vagu jako nové možnosti v léčbě sepse bude tedy nově provedeno na prasatech. Vzhledem k tomu, že HRV analýza poskytuje informaci o chování autonomního nervového systému, jeví se jako ideální prostředek ke sledování průběhu daných experimentů.

V rámci případného využití HRV analýzy jako nástroje k včasné diagnostice sepse představuje další logický krok translace experimentálních poznatků na klinickou úroveň. Zkoumání reálných patientských dat bude dalším krokem k implementaci analýzy HRV do klinické praxe. Na základě našich výsledků předpokládáme, že nasazení analýzy HRV bude cenné zejména v časných fázích onemocnění, kdy sledování HRV může významně rozšířit okno pro časnou terapeutickou intervenci. Velmi zajímavou a dosud nezkoumanou otázkou představuje chování HRV ve fázích zotavování a rekonvalescence ze septického onemocnění včetně pacientů s chronickým průběhem nemocí se zánětlivou a infekční etiologií.

6 Literatura

AZUMA, M., C. MATSUMURA a O. KEMMOTSU. Inotropic and electrophysiologic effects of propofol and thiamylal in isolated papillary muscles of the guinea pig and the rat. *Anesthesia and Analgesia*. 1993, **77**(3), 557–563. ISSN 0003-2999.

BARBUTI, Andrea a Dario DIFRANCESCO. The ‘funny’ side of sepsis. *The Journal of Physiology* [online]. 2014, **592**(Pt 6), 1171. ISSN 0022-3751. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2014.271171.

BIENERT, Agnieszka, Paweł WICZLING, Edmund GRZEŚKOWIAK, Jacek CYWIŃSKI a Krzysztof KUSZA. Potential pitfalls of propofol target controlled

infusion delivery related to its pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacological reports: PR*. 2012, **64**(4), 782–795. ISSN 1734-1140.

BOROVIKOVA, L. V., S. IVANOVA, M. ZHANG, H. YANG, G. I. BOTCHKINA, L. R. WATKINS, H. WANG, N. ABUMRAD, J. W. EATON a K. J. TRACEY. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* [online]. 2000, **405**(6785), 458–462. Dostupné z: doi:10.1038/35013070.

BRYSON, H. M., B. R. FULTON a D. FAULDS. Propofol. An update of its use in anaesthesia and conscious sedation. *Drugs*. 1995, **50**(3), 513–559. ISSN 0012-6667.

CARDENAS, V. J., J. B. ZWISCHENBERGER, W. TAO, P. D. NGUYEN, T. SCHROEDER, L. D. TRABER, D. L. TRABER a A. BIDANI. Correction of blood pH attenuates changes in hemodynamics and organ blood flow during permissive hypercapnia. *Critical Care Medicine*. 1996, **24**(5), 827–834. ISSN 0090-3493.

CURLEY, Gerard, Maya M. B. CONTRERAS, Alistair D. NICHOL, Brendan D. HIGGINS a John G. LAFFEY. Hypercapnia and acidosis in sepsis: a double-edged sword? *Anesthesiology* [online]. 2010, **112**(2), 462–472. ISSN 1528-1175. Dostupné z: doi:10.1097/ALN.0b013e3181ca361f.

DAWIDOWICZ, Andrzej L., Mateusz KOBIELSKI a Jaroslaw PIENIADZ. Anomalous relationship between free drug fraction and its total concentration in drug-protein systems I. Investigation of propofol binding in model HSA solution. *Eur J Pharm Sci* [online]. 2008, **34**(1), 30–36. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2008.02.004.

FUJII, H., J. E. ZEHR, T. MITSUYAMA, H. TAKAGI, Y. NAKASHIMA, K. SUNADA a R. KUSUKAWA. The influence of renal sympathetic nerves on renal hemodynamic and renin responses during hypercapnia in dogs. *Japanese Circulation Journal*. 1985, **49**(11), 1185–1189. ISSN 0047-1828.

FUNCK-BRENTANO, C. a P. JAILLON. Rate-corrected QT interval: techniques and limitations. *The American Journal of Cardiology*. 1993, **72**(6), 17B–22B. ISSN 0002-9149.

GROUNDS, R. M., A. J. TWIGLEY, F. CARLI, J. G. WHITWAM a M. MORGAN. The haemodynamic effects of intravenous induction. Comparison of the effects of thiopentone and propofol. *Anaesthesia*. 1985, **40**(8), 735–740. ISSN 0003-2409.

HAMILTON, D. L., M. R. BOYETT, S. M. HARRISON, L. A. DAVIES a P. M. HOPKINS. The concentration-dependent effects of propofol on rat ventricular myocytes. *Anesth Analg*. 2000, **91**(2), 276–282.

KLÖCKNER, Udo, Uwe RUECKSCHLOSS, Claudia GROSSMANN, Saskia MATZAT, Katja SCHUMANN, Henning EBELT, Ursula MÜLLER-WERDAN, Harald LOPPNOW, Karl WERDAN a Michael GEKLE. Inhibition of cardiac pacemaker channel hHCN2 depends on intercalation of lipopolysaccharide into channel-containing membrane microdomains. *J Physiol* [online]. 2014, **592**(Pt 6), 1199–1211. Dostupné z: doi:10.1113/jphysiol.2013.268540.

KOHMOTO, O., K. W. SPITZER, M. A. MOVSESIAN a W. H. BARRY. Effects of intracellular acidosis on $[Ca^{2+}]_i$ transients, transsarcolemmal Ca^{2+} fluxes, and contraction in ventricular myocytes. *Circulation Research*. 1990, **66**(3), 622–632. ISSN 0009-7330.

KUMAR, Anand, Daniel ROBERTS, Kenneth E. WOOD, Bruce LIGHT, Joseph E. PARRILLO, Satendra SHARMA, Robert SUPPES, Daniel FEINSTEIN, Sergio ZANOTTI, Leo TAIBERG, David GURKA, Aseem KUMAR a Mary CHEANG. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* [online]. 2006, **34**(6), 1589–1596. Dostupné z: doi:10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9.

LAFHEY, J. G., D. ENGELBERTS a B. P. KAVANAGH. Buffering hypercapnic acidosis worsens acute lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2000, **161**(1), 141–146. ISSN 1073-449X. Dostupné z: doi:10.1164/ajrccm.161.1.9905080.

LI, G., A. F. MARTIN a R. J. SOLARO. Localization of regions of troponin I important in deactivation of cardiac myofilaments by acidic pH. *Journal of*

Molecular and Cellular Cardiology [online]. 2001, **33**(7), 1309–1320. ISSN 0022-2828. Dostupné z: doi:10.1006/jmcc.2000.1392.

MAZOIT, Jean Xavier a Kamran SAMII. Binding of propofol to blood components: implications for pharmacokinetics and for pharmacodynamics. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 1999, **47**(1), 35–42. ISSN 0306-5251. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00860.x.

ORCHARD, C. H. a J. C. KENTISH. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. *The American Journal of Physiology*. 1990, **258**(6 Pt 1), C967–981. ISSN 0002-9513.

PAN, J. a W. J. TOMPKINS. A real-time QRS detection algorithm. *IEEE transactions on bio-medical engineering* [online]. 1985, **32**(3), 230–236. ISSN 0018-9294. Dostupné z: doi:10.1109/TBME.1985.325532.

PAPAIIOANNOU, Vasilios E., Arie O. VERKERK, Ahmed S. AMIN a Jaques M. T. DE BAKKER. Intracardiac origin of heart rate variability, pacemaker funny current and their possible association with critical illness. *Curr Cardiol Rev*. 2013, **9**(1), 82–96.

PUTTICK, R. M. a D. A. TERRAR. Effects of propofol and enflurane on action potentials, membrane currents and contraction of guinea-pig isolated ventricular myocytes. *British Journal of Pharmacology*. 1992, **107**(2), 559–565. ISSN 0007-1188.

RIVERS, E., B. NGUYEN, S. HAVSTAD, J. RESSLER, A. MUZZIN, B. KNOBLICH, E. PETERSON, M. TOMLANOVICH a Early Goal-Directed Therapy Collaborative Group. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001, **345**(19), 1368–1377.

SEELY, A. J. a N. V. CHRISTOU. Multiple organ dysfunction syndrome: exploring the paradigm of complex nonlinear systems. *Crit Care Med*. 2000, **28**(7), 2193–2200.

SINGER, Mervyn, Clifford S. DEUTSCHMAN, Christopher Warren SEYMOUR, Manu SHANKAR-HARI, Djillali ANNANE, Michael BAUER, Rinaldo BELLOMO, Gordon R. BERNARD, Jean-Daniel CHICHE, Craig M. COOPERSMITH, Richard S. HOTCHKISS, Mitchell M. LEVY, John C. MARSHALL, Greg S. MARTIN, Steven M. OPAL, Gordon D. RUBENFELD, Tom VAN DER POLL, Jean-Louis VINCENT a Derek C. ANGUS. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* [online]. 2016, **315**(8), 801–810. ISSN 1538-3598. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2016.0287.

SPRUNG, J., M. L. OGLETREE-HUGHES, B. K. MCCONNELL, D. R. ZAKHARY, S. M. SMOLSKY a C. S. MORAVEC. The effects of propofol on the contractility of failing and nonfailing human heart muscles. *Anesthesia and Analgesia*. 2001, **93**(3), 550–559. ISSN 0003-2999.

TANG, W. C., M. H. WEIL, R. J. GAZMURI, J. BISERA a E. C. RACKOW. Reversible impairment of myocardial contractility due to hypercarbic acidosis in the isolated perfused rat heart. *Critical Care Medicine*. 1991, **19**(2), 218–224. ISSN 0090-3493.

TRACEY, Kevin J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* [online]. 2007, **117**(2), 289–296. Dostupné z: doi:10.1172/JCI30555.

TRACEY, Kevin J. Reflex control of immunity. *Nature Reviews. Immunology* [online]. 2009, **9**(6), 418–428. ISSN 1474-1741. Dostupné z: doi:10.1038/nri2566.

TULPPO, Mikko P., Heikki V. HUIKURI, Elli TUTUNGI, Derek S. KIMMERLY, Adrian W. GELB, Richard L. HUGHSON, Timo H. MÄKIKALLIO a J. Kevin SHOEMAKER. Feedback effects of circulating norepinephrine on sympathetic outflow in healthy subjects. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* [online]. 2005, **288**(2), H710–715. ISSN 0363-6135. Dostupné z: doi:10.1152/ajpheart.00540.2004.

VINCENT, J. L., R. MORENO, J. TAKALA, S. WILLATTS, A. DE MENDONÇA, H. BRUINING, C. K. REINHART, P. M. SUTER a L. G. THIJIS. The SOFA (Sepsis-

related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Medicine*. 1996, **22**(7), 707–710. ISSN 0342-4642.

WICKLEY, Peter J., Toshiya SHIGA, Paul A. MURRAY a Derek S. DAMRON. Propofol decreases myofilament Ca²⁺ sensitivity via a protein kinase C-, nitric oxide synthase-dependent pathway in diabetic cardiomyocytes. *Anesthesiology*. 2006, **104**(5), 978–987. ISSN 0003-3022.

WICKLEY, Peter J., Toshiya SHIGA, Paul A. MURRAY a Derek S. DAMRON. Propofol modulates Na⁺-Ca²⁺ exchange activity via activation of protein kinase C in diabetic cardiomyocytes. *Anesthesiology*. 2007, **106**(2), 302–311. ISSN 0003-3022.

YANG, Xiao-Yu, Zhi-Bin ZHOU, Lu YANG, Xue ZHOU, Li-Jun NIU a Xia FENG. Hemodynamic responses during induction: comparison of Marsh and Schnider pharmacokinetic models. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* [online]. 2015, **53**(1), 32–40. ISSN 0946-1965. Dostupné z: doi:10.5414/CP202141.

ZORN-PAULY, Klaus, Brigitte PELZMANN, Petra LANG, Heinrich MÄCHLER, Hendrik SCHMIDT, Henning EBELT, Karl WERDAN, Bernd KOIDL a Ursula MÜLLER-WERDAN. Endotoxin impairs the human pacemaker current I_f. *Shock*. 2007, **28**(6), 655–661.

Seznam publikací autorky

JARKOVSKA, Dagmar, Monika BLUDOVSKA, Eliska MISTROVA, Vera KRIZKOVA, Dana KOTYZOVA, Tereza KUBIKOVA, Jana SLAVIKOVA, Sumeyye Nur EREK, Aleksandar DJORDJEVIC a Magdalena CHOTTOVA-DVORAKOVA. Expression of classical mediators in hearts of rats with hepatic dysfunction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2017a. (IF₂₀₁₅ = 1,704; přijato k otištění)

JARKOVSKA, Dagmar, Lenka VALESOVA, Jiri CHVOJKA, Jan BENES, Vojtech DANIHEL, Jitka SVIGLEROVA, Lukas NALOS, Martin MATEJOVIC a Milan STENGL. Heart-rate variability depression in porcine peritonitis-induced sepsis without organ failure. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* [online]. 2017b, **242**(9), 1005–1012. ISSN 1535-3699. Dostupné z: doi:10.1177/1535370217700521. (IF₂₀₁₅ = 2,542)

GRUNDMANOVÁ, Martina, Dagmar JARKOVSKÁ, Annabell SÜß, Zdeněk TŮMA, Michaela MARKOVÁ, Zdeněk GRUNDMAN, Ahmed EL-KADI, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Milan ŠTENGL a Jitka KUNCOVÁ. Propofol-induced mitochondrial and contractile dysfunction of the rat ventricular myocardium. *Physiological Research*. 2016, **65**(Supplementum 5), 601–609. ISSN 1802-9973. (IF₂₀₁₅ = 1,643)

JARKOVSKA, Dagmar, Lenka VALESOVA, Jiri CHVOJKA, Jan BENES, Jitka SVIGLEROVA, Blanka FLOROVA, Lukas NALOS, Martin MATEJOVIC a Milan STENGL. Heart Rate Variability in Porcine Progressive Peritonitis-Induced Sepsis. *Frontiers in Physiology* [online]. 2016, **6**, 412. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2015.00412. (IF₂₀₁₅ = 4,031)

MIKLÍKOVÁ, Michaela, Dagmar JARKOVSKÁ, Miroslava ČEDÍKOVÁ, Jitka ŠVIGLEROVÁ, Jitka KUNCOVÁ, Lukáš NALOS, Alena KOŘÍNKOVÁ, Václav LIŠKA, Daniel LYSÁK, Milena KRÁLÍČKOVÁ, Lucie VIŠTEJNOVÁ a Milan ŠTENGL. Vliv mesenchymálních kmenových buněk na in vitro kulturu dospělých prasečích kardiomyocytů. *Plzeňský lékařský sborník*. 2016, **82**, 35–48.

STENGL, Milan, Lenka LEDVINOVA, Jiri CHVOJKA, Jan BENES, Dagmar JARKOVSKA, Jaromir HOLAS, Patrik SOUKUP, Jitka SVIGLEROVÁ a Martin MATEJOVIC. Effects of clinically relevant acute hypercapnic and metabolic acidosis on the cardiovascular system: an experimental porcine study. *Critical Care (London, England)* [online]. 2013, **17**(6), R303. ISSN 1466-609X. Dostupné z: doi:10.1186/cc13173. (IF₂₀₁₃ = 5,035)