

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni

AKUTNÍ POŠKOZENÍ LEDVIN V SEPSI: PATOFYZIOLOGIE A LÉČEBNÉ ASPEKTY



Jiří Chvojka

Jednotka intenzivní péče

I.Interní klinika

FN a LF UK Plzeň

Autoreferát dizertační práce

2010

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy postgraduálního studia v oboru vnitřní nemoci na experimentálním pracovišti jednotky intenzivní péče I. Interní kliniky Fakultní nemocnice Plzeň při Lékařské fakultě v Plzni Univerzity Karlovy Praha.

Školitel:

Prof. MUDr. Martin Matějovič, PhD.

Přednosta I. Interní kliniky FN Plzeň

Autor:

MUDr. Jiří Chvojka

Jednotka intenzivní péče I. Interní kliniky FN Plzeň

Oponenti:

Doc. MUDr. Eduard Kasal, CSc.

Přednosta Anesteziologicko-resuscitační kliniky FN Plzeň

MUDr. Jan Maňák, PhD.

Klinika gerontologická a metabolická FN Hradec Králové

Doc. MUDr. Martin Balík, PhD.

Klinika Anesteziologie Resuscitace a Intenzivní Medicíny VFN Praha

Autoreferát byl rozeslán dne: 8.2.2011

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací v oboru

vnitřní nemoci se koná dne: 8.3.2011

Místo obhajoby: Šafránkův pavilon, posluchárna A, Alej Svobody 31, Plzeň

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty Univerzity

Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

předseda komise pro obhajobu dizertačních prací

v oboru vnitřní nemoci

1 ÚVOD

Sepse a septický šok představují jednu z nejčastějších příjmových diagnóz na jednotkách intenzivní péče (JIP). Společně s epidemií kardiovaskulárních chorob a nádorů, tak současná medicína čelí epidemii sepse, která se stává významným medicínským a socioekonomickým problémem. Incidence sepse každým rokem setrvale narůstá a představuje 10. nejčastější příčinu úmrtí. Jen v USA je ročně hospitalizováno pro sepsi více jak 750 000 pacientů, jejichž mortalita je enormní. Základním patofyziologickým mechanismem je nekontrolovaná systémová odpověď na infekční inzult, s aktivací pro- a proti- zánětlivých mechanismů, nadprodukcí širokého spektra cytokinů, endogenních působků a mediátorů, kyslíkových a dusíkatých radikálů. Jejich komplexní interakce na úrovni systémové a regionální cirkulace, mikrocirkulace, koagulačního systému, na úrovni cévního endotelu a na úrovni molekulární vedou k dysfunkci celé řady orgánů vzdálených od primárního infekčního ložiska. Klinicky se tento stav manifestuje multiorgánovým selháváním (MODS, multiple organ dysfunction syndrome). Mezi tyto orgánové dysfunkce patří akutní poškození ledvin (AKI, acute kidney injury), jehož je sepsa nejčastější příčinou. Incidence AKI proporcionálně roste s tíží sepse a postihuje až 51% pacientů se septickým šokem. Mortalita pacientů se septickým šokem a AKI je vysoká, renální dysfunkce vyžadující náhradu funkce ledvin je nezávislým rizikovým faktorem úmrtí a AKI tak představuje obávanou komplikaci sepse/septického šoku. Již malé zhoršení ledvinných funkcí ovlivňuje nepříznivě mortalitu a jak ukazují recentní klinické studie, AKI u kriticky nemocných významně ovlivňuje nejen krátkodobou, ale i dlouhodobou prognózu těchto pacientů. Ohroženi jsou zejména pacienti s již preexistující ledvinnou dysfunkcí, u nichž po epizodě akutního selhání ledvin vyžadujícího mimotělní kontinuální náhradu funkce dochází k rychlejší progresi do terminálního selhání. Rozlišení sepse od jiných příčin akutního poškození ledvin může být pro lékaře významným zjištěním, protože patofyziologie AKI v sepsi se pravděpodobně značně liší od jiných forem AKI a může tak být spojeno s odlišnou mortalitou a odpovědí na léčebné intervence. Jedním z důvodů, proč zůstává mortalita septického šoku, zejména je-li přítomno akutní renální selhání, vysoká, je absence kauzální terapie. Je pochopitelné, že k vývoji takové terapeutické intervence či cílené léčby je nejprve nezbytné důkladné pochopení patofyziologických mechanismů. Avšak i přes tato závažná fakta a intenzivní experimentální i klinický výzkum zůstává v oblasti patofyziologie akutního poškození ledvin v sepsi celá řada nejasností. Vzhledem k etickým aspektům nelze detailně změny vedoucí k AKI v sepsi sledovat u pacientů. Základní výzkum se tedy opírá především o zvířecí modely. I přes

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

Přibližně 4% pacientů s akutním poškozením ledvin dospěje do stádia vyžadujícího mimotělní metodu očišťování krve (RRT, renal replacement therapy) a RRT se tak stávají nedílnou součástí jejich terapie. Navzdory rutinnímu používání RRT stále existuje řada kontroverzních otázek, na jejichž zodpovězení není dostatek vědeckých důkazů. Týkají se především načasování zahájení/ukončení RRT, její intenzity či volby modality. V poslední době byla značně diskutovaná otázka přínosu těchto metod u septických pacientů jako podpůrné terapie z tzv. „non-renální“ indikace. Základním východiskem pro tento koncept je schopnost

kontinuálních očišťovacích metod eliminovat z organismu různé mediátory sepse. Sepse je charakterizována nadprodukcí širokého spektra pro- i protizánětlivých působků (cytokinů, eikosanoidů, vazogenních aminů apod.) Dosavadní experimentální a některé klinické práce prokázaly schopnost hemoeliminačních metod tyto působky odstraňovat. Ať již procesem hemofiltrace či difúze či adsorpcí na povrch dialyzační membrány. Některé práce prokázaly větší hemodynamickou stabilitu při použití vysokoobjemové hemofiltrace (HVHF, high-volume haemofiltration). Tento imunomodulační vliv na tkáňovou a intravaskulární inflamaci by teoreticky mohl ovlivnit stonání a přežívání septických pacientů. Zejména experimentální práce však měly řadu metodologických nedostatků. Nevhodně zvolená indukce sepse s krátkým trváním terapeutické intervence, zahájení kontinuálních metod v době či velmi krátce po indukci sepse. V době absence velkých randomizovaných studií se většina experimentálních prací zabývala pouze vlivem očišťovacích metod na hemodynamickou stabilitu, potřebu katecholaminů v septickém šoku a minimálně zkoumala vliv těchto metod na ostatní biologické systémy. Podobně, byla-li sledována v klinických studiích mortalita, byla porovnávána pouze s historickými kontrolami. Stanovili jsme si tedy za cíl sledovat vliv mimotělní očišťovací metody nejen na systémovou a regionální hemodynamiku, ale i na další na sobě nezávislé úrovně biologické odpovědi organismu na infekční inzult v maximálně relevantním experimentálním modelu.

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

Třetí část dizertace shrnuje práce, které bezprostředně navazují na náš základní výzkum. Jednou z dobře klinicky rozpoznatelných orgánových dysfunkcí v sepsi a septickém šoku je sepsí indukovaná kardiální dysfunkce, tzv. septická kardiomyopatie. Jedním z patofyziologických mechanismů vedoucích k septické kardiomyopatii je i narušený transport kalcia. Z dosavadních experimentálních prací vyplývá, že možným důvodem je redukce počtu kalciových kanálů typu L (ICaL, L-type calcium current) s následným zkrácením trvání akčního potenciálu. V našich experimentálních studiích na zvířecím modelu

septického šoku u prasete jsme se zaměřili na vliv sepse na kalciové kanály typu L, trvání akčního potenciálu a dále na vliv mimotělních očišťovacích metod na tyto parametry.

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

Sepse je typická svoji nadprodukcí rozličných pro- i protizánětlivých mediátorů a modulátorů imunitní odpovědi. Mezi takové mediátory patří i vazoaktivní intestinální peptid (VIP, vasoactive intestinal peptide), který by dle některých experimentálních prací mohl být případným terapeutickým cílem v sepsi. Nervový systém je pravděpodobně schopen modulovat imunitní odpověď organismu prostřednictvím autonomního nervového systému. Možným mediátorem této odpovědi může být i neuropeptid Y (NPY, neuropeptide Y). Snažili jsme se proto zjistit, zda použití hemofiltrace významně ovlivní tkáňové či plazmatické hladiny VIP a NPY v modelu fekální peritonitidy u prasete.

PŮVODNÍ PRÁCE

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

PATOFYZIOLOGIE AKI V SEPSI

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

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

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

AKI V SEPSI: LÉČEBNÉ ASPEKTY

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

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

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

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

PRÁCE PŘÍMO NAVAZUJÍCÍ NA DANOU PROBLEMATIKU

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

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

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

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

KUNCOVÁ, Jitka; **CHVOJKA, Jiří**; SÝKORA, Roman; ŠVÍGLEROVÁ, Jitka; ŠTENGL, Milan; NALOS, Lukáš; KROUŽECKÝ, Aleš; MATĚJOVIČ, Martin. Tissue concentrations

of vasoactive intestinal peptide are affected by peritonitis-induced sepsis and hemofiltration in pigs. *Physiol Res.* 2010. in press **IF 1,430**

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

PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Patofyziologie AKI v sepsi

Izolované akutní selhání ledvin vyžadující náhradu funkce ledvin je velmi vzácné. Akutní poškození ledvin u kriticky nemocných je obvykle součástí širšího syndromu, syndromu multiorgánové dysfunkce (MODS, multiple organ dysfunction syndrome), který se rozvíjí u kriticky nemocných a to nejen v důsledku sepse. Příčina vzniku AKI je obvykle multifaktoriální a je často velmi obtížné jednoznačně definovat jediného původce. Sepse však zůstává příčinou nejčastější. Naše současná léčba septického AKI je léčbou pouze podpůrnou opírající se o včasné rozpoznání a odstranění vyvolávající příčiny, adekvátní hemodynamickou resuscitaci a maximální vyvarování se iatrogenních inzultů, které mohou případně orgánové dysfunkce dále prohlubovat. Detailní rozbor soudobých poznatků týkajících se patofyziologických mechanismů vedoucích k akutnímu poškození ledvin v sepsi překračuje možnosti tohoto autoreferátu, proto uvádíme pouze krátké shrnutí.

Akutní tubulární nekróza, perfúze ledvin v sepsi

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

průtok v humánní medicíně, jsou dostupná data stran renální vazokonstrikce značně nejednotná a koncept ischemie ledvin se tak opírá především o experimentální modely. Některé experimentální a humánní studie ukazují, že za podmínek typické hyperdynamické sepse (tzn. za podmínek normálního nebo zvýšeného srdečního výdeje) dochází k poklesu glomerulární filtrace a diurézy i přes konstantní či dokonce zvýšený krevní průtok ledvinami. Teorie ledvinné ischemie vychází zejména z modelů s hypodynamickou cirkulací, ze stavů s nízkým srdečním výdejem. Sepsí navozená hypovolémie a vazoplegie vede k hypotenzi, která, je-li neléčená, vede k poklesu perfúzního tlaku ledvin, ztrátě autoregulace a může vyústit v ireverzibilní strukturální změny, tubulární nekrózu. Je-li včas léčena vyvolávající příčina septického šoku a je obnovena dostatečná perfúze ledvin, může se jednat stále o funkční a reverzibilní dysfunkci bez porušené integrity tubulárních buněk. I přes adekvátní úpravu hypovolémie tekutinovou resuscitací a hypotenze katecholaminovou podporou však u řady septických pacientů dochází k progresivnímu snížení funkce ledvin.

Glomerulární a peritubulární mikrocirkulace v sepsi

Rozvoj nových zobrazovacích metod, jako např. intravitální videomikroskopie, prokázal, že místem klíčových změn v sepsi je mikrocirkulace. Zároveň přibylo důkazů, že mikrocirkulace a její dysfunkce hraje důležitou úlohu i v rozvoji akutního poškození ledvin v sepsi. Pozornost se soustředí zejména na peritubulární mikrocirkulaci, která se zdá být významnou „obětí“ sepse a její dysfunkce předchází rozvoji akutního poškození ledvin. Patogeneze těchto změn je vysoce komplexní děj, v němž se kromě širokého spektra pro- a protizánětlivých cytokinů, uplatňují další mediátory, nadprodukce oxidu dusnatého (NO, nitric oxide), kyslíkových a dusíkatých radikálů (ROS, reactive oxygen species; RNOS reactive nitrogen species), metabolitů kyseliny arachidonové. Svoji roli sehrává také narušená rovnováha mezi pro- a anti-koagulačními mechanismy s posunutím rovnováhy směrem k prokoagulačnímu stavu. Výsledkem mikrovaskulárních změn v sepsi může být tkáňová hypoxie některých oblastí v ledvině.

Inflamace a ledviny

Nepříznivý vliv na ledvinné funkce v sepsi má vysoce pravděpodobně také vlastní zánětlivá odpověď organismu. Ačkoliv dosud není znám přesný molekulární mechanismus takového poškození, některé práce poukazují na souvislost mezi infiltrací ledvinného intersticia neutrofilů, intrarenální inflamací a ledvinnou dysfunkcí. Svoji roli jistě sehrávají prozánětlivé cytokiny, např. tumor nekrotizující faktor (TNF- α), který svým přímým či nepřímým vlivem

může nepříznivě ovlivňovat ledvinné funkce. Kromě vlastního poškození ledvin, má velikost systémové zánětlivé odpovědi i význam prognostický.

Tubulární dysfunkce a poškození

Jak již bylo řečeno výše, nemáme dostatek validních důkazů pro tvrzení, že akutní tubulární nekróza je dominantní strukturální změnou ledvinných tubulů v septickém AKI. Časné post-mortem histologické studie ledvin u pacientů zemřelých v sepsi nenalezly ve více než 90% žádné známky morfologického poškození ledvin. Častěji byly pozorovány pouze nespecifické histologické změny. Rozsah strukturálních změn v ledvinách se tak pravděpodobně mění v závislosti na tíži a délce trvání od mírného subletálního poškození po těžké strukturální změny.

Terapeutické aspekty AKI v sepsi

Přibližně 4% pacientů na jednotkách intenzivní péče si v důsledku svého kritického stonání vyžádají některou z forem mimotělní náhrady funkce ledvin. Možností jsou metody jak intermitentní, tak kontinuální (CRRT, continuous renal replacement therapy). Výhodou kontinuálních metod je větší hemodynamická tolerance, trvalá kontrola metabolické homeostázy. Stále neexistují jasná pravidla kdy a jakou modalitu zvolit a kolem dialyzační dávky existovala dosud intenzivní debata. Další hojně diskutovanou otázkou je využití těchto či jiných mimotělních očišťovacích metod v podpůrné terapii sepse/septického šoku a jejich dopad na přežití pacientů.

Vysokoobjemová hemofiltrace

Převládal názor, že časnější indikace a vyšší dávky dialýzy mohou příznivě ovlivnit průběh kritického stonání, mortalitu a časnější zotavení z AKI. Tento názor vycházel především z multicentrické studie zkoumající dopad rozdílných dialyzačních dávek, 20, 35 a 45 ml/kg/h, která prokázala výhodu vysokých dialyzačních dávek v podskupině septických pacientů a koncept této „vysokoobjemové“ hemofiltrace se stal atraktivním konceptem jako podpůrné terapie sepse. Základním mechanismem této teorie je schopnost hemofiltrace neselektivně odstraňovat různé mediátory sepse a očištění organismu od těchto působků by mělo vést k lepšímu přežívání těchto pacientů. Přestože se jedná o atraktivní myšlenku, na základě dostupných dat nebylo možno formulovat jednoznačná doporučení, mj. z důvodů absence kvalitních experimentálních prací zkoumajících vliv této metody na různé patofyziologické úrovně v klinicky relevantním modelu septického šoku.

Párová plazmafiltrace-adsorpce

S myšlenkou neselektivního odstranění širokého spektra mediátorů uplatňujících se v patogenezi sepse pracuje i mimotělní metoda označovaná jako párová plazmafiltrace-adsorpce (CPFA, coupled plasmafiltration adsorption). Principem metody je separace plazmy na plazmafiltru s následným průchodem této plazmy přes vysoce porozní syntetickou pryskyřici s vysokou adsorpční schopností. Tato styrenová pryskyřice má velkou kapacitu na svém povrchu vázat cirkulující mediátory sepse, cytokiny. Očištěná krev posléze prochází standardní hemofiltrační kapslí. Dostupná data sledující vliv CPFA v sepsi/septickém šoku jsou velmi chudá a opírají se pouze o jednu experimentální a dvě klinické studie. Všechny tyto práce byly však zatíženy řadou metodologických chyb, malým počtem zkoumaných probandů a absencí randomizace, díky čemuž nelze na jejich závěrech stavět jakákoliv klinická doporučení.

CÍLE STUDIÍ

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

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

ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

Experimentální model selete

Hlavním cílem v našich experimentech je dosáhnout, pokud možno, maximální klinické relevance, zajistit podobnost s danou klinickou situací v humánní medicíně. Zvířecí modely jsou nedílnou součástí základního výzkumu. Výhodou námi zvoleného modelu selete je nejen jeho velikost, která umožňuje dobrý nekomplikovaný chirurgický přístup, možnost široké instrumentace na orgánech hepatosplanchniku, ledvinách a cévních vstupech, ale také obdobnost anatomických a morfologických poměrů ledvin a dalších orgánů s anatomii lidskou. Všechny naše studie byly realizovány na 22 hodinovém modelu fekální peritonitidou navozeného septického šoku. Komplexní hemodynamická monitorace společně s tekutinovou resuscitací bránila významné hypovolémii jako možného faktoru přispívajícího k rozvoji intravaskulárního deficitu, který by mohl ovlivnit sledované hemodynamické a metabolické změny. V prevenci septické hypotenze byla použita katecholaminová podpora. Takový model z pohledu klinické relevance napodobuje humánní praxi obdobným rozvojem hyperdynamické sepse/septického šoku, nízkou systémovou vaskulární rezistencí, rozvojem progresivní orgánové dysfunkce. Léčba mimotělními očišťovacími metodami byla zahájena až v okamžiku plně rozvinuté sepse. Všechna měření a odběr vzorků byla provedena před indukcí sepse a dále po 12, 18 a 22 hodinách.

Měření systémové a regionální hemodynamiky, mikrocirkulace, odvozené výpočty

K měření parametrů systémové hemodynamiky byly použity arteriální a plicnicový katétr. Metoda dvojité transpulmonární diluční techniky umožnila měření nitrohruďního krevního objemu a tím zajistit optimální preload. Na úrovni regionální hemodynamiky nás zajímaly průtoky jednotlivými sledovanými cévami: zejména průtok renální tepnou, dále renální žilní tlak a renální vaskulární rezistence. Ve studiích s HVHF a CPFA jsme dále měřili průtok portální žilou, dále společnou jaterní tepnou. S použitím laser-dopplerometrických sond jsme za současné analýzy zpětně odraženého světla (back scattered light) hodnotili mikrovaskulární perfúzi renálního kortexu a střevní mukózy. Další metodou využitou ke sledování mikrocirkulačních změn ve sliznici střeva byla intravitální videomikroskopie (SDF, side-stream dark field imaging). Pomocí softwaru dodaného výrobcem jsme hodnotili tři sekvence natočené během každého sběru dat ze tří různých míst střevní sliznice ilea. Z analýzy krevních plynů v arteriální, smíšené žilní, portální, jaterní a renální žilní krvi a srdečního

výdeje/regionálního průtoku byla vypočtena systémová dodávka a konzumpce kyslíku, respektive regionální dodávka a konzumpce kyslíku v příslušných orgánech.

Analyzované parametry, krevní a histologické vzorky

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

SOUHRN STUDIÍ

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

U všech selat došlo k progresi hyperdynamické sepse do septického šoku a současně k rozvoji akutního poškození ledvin definovaného elevací plazmatického kreatininu a/nebo oligurií. Průtok renální tepnou byl po dobu experimentu nezměněn ve srovnání s kontrolní skupinou. Podobně nedošlo k signifikantním změnám renální cévní rezistence. Prokázali jsme však signifikantní zvýšení renálního žilního tlaku. I přes nezměněnou renální cévní rezistenci a zachovaný průtok renální tepnou již v časně fázi sepse došlo ke zhoršení mikrovaskulární perfúze kůry. I přes zvýšenou renální extrakci kyslíku se renální konzumpce kyslíku neměnila. Současně došlo k rozvoji významné regionální metabolické acidozy s nárůstem poměru laktát/pyruvát. Histologické vzorky odhalily pouze mírné morfologické změny na úrovni ledvinných tubulů, bez známek akutní tubulární nekrózy. Renální vazokonstrikce a pokles průtoku renální arterií tedy nebyla příčinou akutní dysfunkce ledvin v tomto klinicky

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

VYSOKOOBJEMOVÁ HEMOFILTRACE V SEPTICKÉM ŠOKU

U všech selat došlo po 12h k rozvoji hyperdynamické sepse. Progrese do septického šoku u kontrolní skupiny vedla ke zhoršení mikrocirkulace sliznice ilea a kůry ledviny i přes zachovanou regionální perfúzi. Současně se zhoršením mikrocirkulace došlo k významnému nárůstu L/P a KBR, tj. k poruše cytosolického a mitochondriálního redox stavu. Oběhovou podporu noradrenalinem vyžadovalo 6 selat v kontrolní skupině, 3 ve skupině sepse+HF a pouze u 2 ve skupině sepse+HVHF. Přesto HF ani HVHF nezabránilo rozvoji poruch mikrocirkulace ledvin, sliznice střeva, buněčného energetického metabolismu a příznivě neovlivnily ani parametry systémové inflamace, oxidativního/nitrosativního stresu, aktivace endotelu či koagulace. Vysokoobjemová hemofiltrace se jevila výhodnější při ovlivnění potřeby vazopresorické potřeby. Žádná z dodaných dávek hemofiltrace ale nedokázala zabránit rozvoji poruch mikrocirkulace a příznivě protektivně ovlivnit kterýkoli ze sledovaných parametrů a vysokoobjemová hemofiltrace tak nenabídla žádné výhody oproti konvenční dávce hemofiltrace.

PÁROVÁ PLAZMAFILTRACE-ADSORPCE V MODELU SEPTICKÉHO ŠOKU

Metoda CPFA nijak neovlivnila průběh septického šoku, neovlivnila příznivě potřebu katecholaminové podpory. Neovlivnila parametry systémové či regionální hemodynamiky. Naopak došlo ke zhoršení mikrocirkulace sliznice střeva hodnocené flow heterogenity indexem (FHI). Oproti kontrolní skupině nebyl rozdíl v parametrech kinetiky kyslíku, na úrovni buněčné energetiky (L/P, KBR). Nepozorovali jsme zlepšení či zmírnění systémové zánětlivé odpovědi (TNF- α , IL-6), v aktivaci endotelu (vWF, ADMA). Došlo k signifikantnímu zhoršení v míře oxidativního/nitrosativního stresu (TBARS, NOx) a v aktivaci koagulace (TAT, trombocyty). V našem klinicky relevantním modelu jsme tedy nepozorovali přínos metody CPFA v septickém šoku. CPFA nevedla k zabránění progrese sepse do septického šoku, neovlivnila tíži orgánových dysfunkcí, navíc vedla ke zhoršení oxidativního stresu a prohloubení prokoagulačního stavu.

SOUHRN VÝSLEDKŮ

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

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

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

Absence histologických známek akutní tubulární nekrózy a přítomnost pouze mírných změn za stavu manifestního ledvinného selhávání by mohla podporovat nově formulovanou teorii orgánové dysfunkce, teorii buněčné hibernace. V této teorii hrají zásadní roli mitochondrie.

Působením oxidativního/nitrosativního stresu dochází k porušení procesu oxidativní fosforylace se snížením produkce vysokoenergetických fosfátů s navozením hypometabolického stavu, který připomíná zvířecí hibernaci. Orgánová dysfunkce by v takovém případě byla pouze odrazem snahy zabránit kompletnímu energetickému zhroucení v kritickém stavu a představovala by pouze adaptivní stav na těžký prozánětlivý stav. Pokud by tato teorie byla pravdivá, mohla by v budoucnu opět naprosto změnit terapeutický přístup.

Kromě výše zmíněných současných možností terapie septických pacientů s AKI se v souladu se stávajícími doporučeními a závěry velkých klinických studií, a s přihlédnutím k výsledkům našich experimentů, nepřikláníme k využití mimotělních očišťovacích metod v „non-renální“ indikaci k léčbě sepse. Vyšší dávky kontinuálních metod či hybridní metody jako je CPFA nepřinášejí pacientům žádný prospěch a z patofyziologického hlediska nevedou k příznivému ovlivnění jakéhokoli biologického systému. Léčebně by tak měly být využívány pouze ke kontrole vnitřního prostředí u pacientů v septickém šoku se současně přítomnou ledvinnou dysfunkcí.

PRÁCE BEZPROSTŘEDNĚ NAVAZUJÍCÍ NA NÁŠ VÝZKUM

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

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

PODPORA

Náš výzkum byl podpořen VZ MSM 0021620819.

VÝBĚR LITERATURY

ANGUS, DC, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001, 29, s. 1303–1310.

BAIWA, A; KINSEY, GR; OKUSA, MD. Immune mechanisms and novel pharmacological therapies of acute kidney injury. *Curr Drug Targets.* 2009, 12, s. 1196 - 1204.

BELLOMO, R. et al. Intensity of continuous renal-replacement therapy in critically ill patients. *N Engl J Med.* 2009, 361, s. 1627–1638.

DE BACKER, D, et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care.* 2007, 11, R101.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

UCHINO, S. Epidemiology of acute renal failure in the world. *Curr Opin Crit Care*. 2006, 12, s. 538-543.

WU, L, et al. Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2007, 18, s. 1807-1815.

ACUTE KIDNEY INJURY IN SEPSIS – PATHOPHYSIOLOGICAL AND THERAPEUTICAL ASPECTS

Sepsis is the leading cause of death at non-coronary intensive care units and the mortality and morbidity resulting from sepsis remain enormous despite our substantial progress in diagnostic tools, monitoring and new therapeutic approaches. Sepsis is a complex syndrome resulting from the response of the organism to overwhelming infection with cytokine release, activation of pro- and anti-inflammatory pathways, immunological dysregulation, coagulation and endothelial activation and usually leads to multiorgan dysfunction. Acute kidney injury (AKI) is one of the most feared complications in septic critically ill patients because it further worsens prognosis and increases cost of care. In addition, sepsis and septic shock are the dominant causes of AKI, accounting for nearly 50% of episodes of AKI. The incidence of acute kidney injury proportionally rises with the severity of sepsis, occurring in 19% of patients with sepsis, 23% patients with severe sepsis and 51% patients with septic shock. Of note, even slight decline in renal functions results in higher morbidity and highlighting the potentially important role of the kidney dysfunction during the natural history of critical illness. The burden of septic AKI continues to increase highlighting the urgent need to improve our understanding of its pathophysiology to develop new treatment. There is now emerging evidence that pathogenesis of septic AKI involves distinct mechanisms as compared to non-septic causes of AKI.

Growing body of experimental and clinical evidence suggests the sepsis-induced AKI being the unique form of acute renal dysfunction. Historically embedded theory of ischemic acute tubular necrosis has been challenged even though haemodynamic parameters including the emerging concept of renal venous congestion are still of crucial importance for maintaining kidney functions. More and more studies reveal the complex network of simultaneously acting pathways with microcirculatory alterations and intrarenal inflammation being considered key factors. Whether septic AKI represents dominantly functional or structural organ dysfunction needs to be elucidated, but the absence of proof of major histological changes makes the theory of mitochondrial dysfunction plausible. Because of the growing burden of sepsis, the need to develop new pharmacological treatments and therapeutic interventions is of paramount importance. Undoubtedly, clinically relevant large animal models will continue to play a crucial role in the elucidation of biological pathways involved in AKI. Moreover, the implementation of powerful techniques (e.g. genomics and proteomics)

into the clinical and experimental research should allow us to understand the complex pathogenesis of AKI and develop useful diagnostic and treatment techniques in near future. Therefore the major aim of our experimental work was to establish clinically relevant animal model of progressive sepsis/septic shock and dynamically assess renal haemodynamic, microvascular and metabolic responses to, and ultrastructural sequelae of, sepsis in a porcine model of faecal peritonitis.

Renal replacement therapy (RRT) remains the cornerstone of management of patients with established AKI. Approximately 4% of all critically ill patients in the intensive care units require some of RRT modalities. Fundamental management issues remain controversial despite of routine use of RRT, including the timing of RRT initiation / cessation, its intensity as well as the choice of RRT modality. Moreover The role of haemofiltration or other extracorporeal replacement therapies as an adjunctive treatment of sepsis remains a contentious issue. To explore the biological effects of haemofiltration and adsorption techniques we compared the effects of standard and high-volume haemofiltration (HVHF) and coupled plasma filtration-adsorption (CPFA) in a peritonitis-induced model of porcine septic shock.

To expand our insight into pathophysiological mechanisms in sepsis and septic shock we explored the biological role of vasoactive intestinal peptide (VIP) and neuropeptide Y (NPY) and the influence of renal replacement therapies on these markers. We also investigated effects of continuous hemofiltration and of CPFA on electrophysiological properties of the septic heart.

Because the majority of critically-ill patients requires systemic or regional anticoagulation during extracorporeal renal replacement therapies. Unfortunately, none of these methods is optimal, as it is costly, inadequately effective, or associated with metabolit risks. Therefore we developed new approach and technique to prevent in-circuit clotting and conducted an experimental study designed to determine whether cooling of blood in CRRT extracorporeal circuit to 20_C with its subsequent rewarming to baseline temperature before returning it to the body will allow performing an extracorporeal procedure without anticoagulant use.