

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**



**SEPSE, SEPTICKÝ ŠOK A SYNDROM MULTIORGÁNOVÉ
DYSFUNKCE: VYBRANÉ CELULÁRNÍ IMUNITNÍ
MECHANIZMY A METODOLOGICKÉ ASPEKTY**

Dizertační práce

MUDr. Thomas Karvunidis

Plzeň 2014

OBSAH

SOUHRN.....	1
SUMMARY	3
PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK.....	5
1. ÚVOD	9
2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	12
2.1. OBECNÁ PATOFYZIOLOGIE SEPSE A (MULTI)ORGÁNOVÉ DYSFUNKCE.....	12
2.2. NEUTROFILY V PATOFYZIOLOGII SEPSE A (MULTI)ORGÁNOVÉ DYSFUNKCE	14
2.3. POSTAVENÍ TROMBOCYTŮ V PATOFYZIOLOGII SEPSE A (MULTI)ORGÁNOVÉ DYSFUNKCE	17
2.4. ENDOTEL V PATOFYZIOLOGII SEPSE A (MULTI)ORGÁNOVÉ DYSFUNKCE.....	23
2.5. ÚLOHA MIKROCIRKULACE V SEPSI A (MULTI)ORGÁNOVÉ DYSFUNKCI.....	26
2.6. HETEROGENITA A LIMITACE DOSTUPNÝCH STUDÍ V PROBLEMATICE SYSTÉMOVÉ INFEKCE A KONTINUA SEPSE-SEPTICKÝ ŠOK	28
3. TEORETICKÝ ZÁKLAD A VYBRANÉ TECHNOLOGICKÉ ASPEKTY UŽITÝCH ANALYTICKÝCH METOD.....	29
3.1. VYŠETŘOVÁNÍ A ANALÝZA MIKROCIRKULACE	29
3.2. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	30
3.3. AGREGOMETRIE	30
3.4. PROTEOMICKÁ ANALÝZA	31
4. PŮVODNÍ PRÁCE.....	32
4.1. PATOFYZIOLOGIE SEPSE – IMUNITNÍ ODPOVĚĎ A JEJÍ KOMPONENTY	32
4.2. PROTEOMIKA V INTENZIVNÍ PÉČI.....	32
5. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	33
6. ETICKÉ A LEGÁLNÍ ASPEKTY STUDÍ.....	34
7. METODY, STUDOVANÉ POPULACE A PROTOKOLY STUDÍ.....	35
7.1. STUDIE I: SEPTICKÝ ŠOK A NEUTROPENIE/CYTOPENIE - VLIV NA MIKROCIRKULACI.....	35
7.1.1. DESIGN STUDIE A SOUBOR NEMOCNÝCH	35
7.1.2. PROTOKOL STUDIE	35
7.1.3. DEMOGRAFICKÁ, (MAKRO)HEMODYNAMICKÁ A LABORATORNÍ DATA	35
7.1.4. METODY VYŠETŘOVÁNÍ A ANALÝZY MIKROCIRKULACE.....	36
7.1.5. STATISTICKÁ ANALÝZA	36
7.2. STUDIE II: ÚLOHA TROMBOCYTŮ V SEPTICKÉM ŠOKU	37
7.2.1. DESIGN STUDIE A SOUBOR NEMOCNÝCH	37
7.2.2. PROTOKOL STUDIE	37
7.2.3. DEMOGRAFICKÁ, (MAKRO)HEMODYNAMICKÁ A LABORATORNÍ DATA	37
7.2.4. METODY ANALÝZY TROMBOCYTŮ PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ.....	37
7.2.5. AGREGOMETRICKÁ ANALÝZA TROMBOCYTŮ.....	38
7.2.6. PROTEOMICKÁ ANALÝZA.....	38

7.2.7.	STATISTICKÁ ANALÝZA	39
7.3.	STUDIE III: ZMĚNY PLAZMATICKÉHO PROTEOMU V ČASNÉ FÁZI EXPERIMENTÁLNÍHO SEPTICKÉHO ŠOKU	40
7.3.1.	DESIGN STUDIE A SOUBOR SUBJEKTŮ	40
7.3.2.	PROTOKOL STUDIE	40
7.3.3.	(MAKRO)HEMODYNAMICKÁ A LABORATORNÍ DATA	40
7.3.4.	PROTEOMICKÁ ANALÝZA	40
7.3.5.	STATISTICKÁ ANALÝZA	41
7.4.	STUDIE IV: PROTEOMICKÁ ANALÝZA SPEKTRA BÍLKOVIN ADSORBOVANÝCH NA MEMBRÁNĚ MIMOTĚLNÍHO SYSTÉMU NÁHRADY FUNKCE JATER	42
7.4.1.	DESIGN STUDIE	42
7.4.2.	PROTOKOL STUDIE	42
7.4.3.	PROTEOMICKÁ ANALÝZA	42
7.4.4.	STATISTICKÁ ANALÝZA	42
8.	VÝSLEDKY STUDIÍ A DISKUZE	43
8.1.	STUDIE I: SEPTICKÝ ŠOK A NEUTROPENIE/CYTOPENIE – VLIV NA MIKROCIRKULACI	43
8.2.	STUDIE II: ÚLOHA TROMBOCYTŮ V SEPTICKÉM ŠOKU	45
8.3.	STUDIE III: ZMĚNY PLAZMATICKÉHO PROTEOMU V ČASNÉ FÁZI EXPERIMENTÁLNÍHO SEPTICKÉHO ŠOKU	47
8.4.	STUDIE IV: PROTEOMICKÁ ANALÝZA SPEKTRA BÍLKOVIN ADSORBOVANÝCH NA MEMBRÁNĚ MIMOTĚLNÍHO SYSTÉMU NÁHRADY FUNKCE JATER	48
9.	ZÁVĚR.....	49
10.	LITERATURA.....	50
11.	PODPORA A PODĚKOVÁNÍ.....	63
12.	TABULKY.....	64
13.	OBRÁZKY	74
14.	PŘÍLOHY	81
14.1.	ORIGINÁLNÍ PRÁCE V ČASOPISECH S IF, KTERÉ JSOU SOUČÁSTÍ DIZERTAČNÍ PRÁCE:	81
14.2.	ORIGINÁLNÍ PRÁCE V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH BEZ IF, KTERÉ JSOU SOUČÁSTÍ DIZERTAČNÍ PRÁCE:	81
14.3.	ORIGINÁLNÍ PRÁCE V ČASOPISECH S IF ČI V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH BEZ IF SOUVISEJÍCÍ S PROBLEMATIKOU DIZERTAČNÍ PRÁCE:	82

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně. Všechnu literaturu a ostatní zdroje, z nichž jsem při její přípravě čerpal, řádně cituji a uvádím v seznamu literatury.

Souhlasím se zapůjčováním této dizertační práce.

Datum: 15.3.2014

Podpis: Thomas Karvunidis

SOUHRN

Sepse a septický šok se syndromem multiorgánové dysfunkce jsou častým život ohrožujícím stavem a hrozbou současné medicíny. Jejich patofyziologie a z ní plynoucí možnosti cílené léčby a prevence zůstává i přes dlouholeté snahy stále nejasná. Svoji roli v tomto komplexním procesu sehrává množství mediátorů a elementů (např. leukocyty, trombocyty, endotel, mikrocirkulace aj.). Cílem této dizertační práce je pokusit se blíže popsat vybrané celulární imunitní mechanizmy v patofyziologii sepse, septického šoku a syndromu multiorgánové dysfunkce pomocí řady analytických metod, zahrnujících mimo jiné postupy zobrazení mikrocirkulace, průtokové cytometrie a proteomické analýzy.

Za použití intravitální videomikroskopie bylo v první originální práci studováno postavení a role neutrofilů v procesu poškození mikrocirkulace u septických nemocných jako jednoho z centrálních patofyziologických mechanismů systémové infekce. Tato studie historicky poprvé dokumentuje charakter změn mikrocirkulace v septickém šoku u nemocných s postchemoterapeutickou cytopenií. Postižení mikrocirkulace bylo identické u septických nemocných s neutropenií (resp. cytopenií) i bez ní. Z uvedeného lze usuzovat, že neutrofilů nejspíše nejsou těmi determinujícími celulárními elementy v tomto patofyziologickém procesu. Dosud nepublikovaným a překvapujícím zjištěním bylo zaznamenané postižení mikrocirkulace jedinců s neutropenií bez známek sepse. Tato alterace mikrovaskulatury dosahovala stejné tíže jako u nemocných s těžkou sepsí či septickým šokem.

Cílem další originální studie, tvořící tuto dizertační práci, byl popis stavu a dynamiky změn trombocytů v septickém šoku. Multifaktoriální analýza destiček prokázala jejich významnou aktivaci se současnou poruchou agregace a poruchu sekrece již v iniciální fázi septického šoku. Zjištěná alterace obsahu α -granul destiček může vypovídat o změnách indukovaných již na úrovni megakaryocytů v kostní dřeni a současně nevylučuje extranukleární cesty syntézy nových funkčních proteinů s následnými změnami fenotypu trombocytů v sepsi.

Dále tato dizertační práce komentuje klinicky relevantní experimentální studii na velkých savcích (selatech) zaměřenou na identifikaci proteinů krevní plazmy v časně fázi septického šoku. Literárně poprvé zde bylo pomocí srovnávací proteomické analýzy identifikováno množství unikátních plazmatických proteinů a popsána dynamika změn jejich koncentrací v tomto patofyziologickém stavu.

Poslední z komentovaných studií popisuje použití proteomické analýzy v identifikaci spektra proteinů selektivně navázaných na obě adsorpční jednotky extrakorporálního systému náhrady funkce jater (Prometheus™) při jeho užití v léčbě nemocného s akutní dekompenzací chronického onemocnění jater.

Aktuální stav problematiky imunitní odpovědi v sepsi, jejích mechanismů a komponent, úlohy trombocytů a postavení proteomických analytických metod v jejich studiu prezentují tři původní přehledové články, které jsou součástí této dizertační práce.

Klíčová slova

Sepse – orgánová dysfunkce - patofyziologie – neutrofilly – trombocyty – mikrocirkulace - proteomika

SUMMARY

Sepsis and septic shock with multiple organ dysfunction syndrome are frequent life-threatening conditions. Despite long-time scientific effort, their exact pathophysiology, causal treatment, and prevention remain obscure. The numbers of mediators and elements (e.g. leukocytes, thrombocytes, endothelium/microcirculation etc.) have been suggested as key mediators in the process of initiation and modulation of this dreadful disease. The aim of the thesis is to better describe and document the cellular mechanisms in the pathophysiology of sepsis, septic shock and multiple organ dysfunction syndrome using different analytic methods including microcirculation assessment, flowcytometry, and proteomics.

The first original manuscript studied the role of neutrophils in the process of microcirculation impairment in septic shock patients, as a central pathophysiological mechanism of systemic inflammation. The real-time intravital videomicroscopy technique was used. This is the first clinical study reporting microvascular changes in septic shock patients with chemotherapy-induced cytopenia. The microcirculation injury was identical in cytopenic compared to non-cytopenic septic patients, suggesting neutrophils – the pivotal elements of immune response – might not be the determining elements alone in this pathophysiological process. Moreover, association of chemotherapy-induced cytopenia without sepsis with significant alteration of sublingual microcirculation was surprising and yet unpublished as well.

The next study was aimed to characterize the role of platelets and dynamics of their phenotype changes in septic shock patients. Multifactorial analysis revealed their significant activation together with alteration of their aggregation and secretion very early in the septic shock. The complex evaluation of the thrombocytes in such clinical setting was applied. The alteration of α -granules content was detected. These changes could reflect alterations at the level of megakaryocytes in the bone marrow. Simultaneously, extranuclear pathways of the synthesis of new functional proteins with consequent phenotype changes of platelets could not be excluded.

Next, clinically relevant experimental study in large animals (piglets) was aimed to analyze dynamic changes in plasma proteome during an early phase of septic shock. Differential proteomic analysis identified a number of unique peptides, and described the dynamics of their plasmatic concentrations. To the best of our knowledge, such findings were published for the first time.

The last original study utilized proteomic analysis to assess proteins bound on both adsorption units of the extracorporeal liver replacement (support) method (Prometheus™). For the first time, surprisingly broad spectrum of such proteins was identified.

Three review articles are integral parts of this thesis. They describe current knowledge of immune response, its mechanisms, and components including neutrophils and platelets, and role of proteomics in the study of these issues.

Keywords

Sepsis – organ dysfunction – pathophysiology – neutrophils – thrombocytes – microcirculation – proteomics

PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

2-DE – 2-rozměrná elektroforéza (2-D electrophoresis)

ADAMTS 13 – disintegrin a metaloproteináza s trombospondinovým motivem (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif member 13 (vWF cleaving protease))

ADP – adenosin difosfát (adenosine diphosphate)

APACHE II – klasifikační systém/skóre tíže onemocnění (acute physiology and chronic health evaluation II)

APC – antigen prezentující buňka(-y) (antigen presenting cell(s))

AU – agregační jednotka (aggregation unit)

AUC – plocha pod křivkou (area under curve)

aPTT – aktivovaný parciální tromboplastinový čas

ATB – antibiotikum(-a)

BC – B-lymfocyt(-y) (B-cell(s))

CARS – syndrom kompenzační protizánětlivé odpovědi (compensatory anti-inflammatory response syndrome)

CD – diferenční skupina (cluster of differentiation/designation)

CRP – C-reaktivní protein (C-reactive protein)

DAMP – molekuly uvolňované při tkáňovém poškození (damage(danger)-associated molecular pattern(s))

DC – dendritická(-é) buňka(-ky) (dendritic cell(s))

DF – dechová frekvence

DIC – disseminovaná intravaskulární koagulace (disseminated intravascular coagulation)

DO₂ – dodávka kyslíku (O₂)

EC – endoteliální buňka(-y) (endothelial cell(s))

ET – endotelin (endothelin)

FCM – průtoková cytometrie (flow cytometry)

FcR-Ig – receptor pro Fc fragment imunoglobulinu

FHI – index funkční heterogenity (functional heterogeneity index)

FP SA – frakční separace plazmy a adsorpce (fractionated plasma separation and adsorption)

G-CSF – faktor stimulující kolonie – granulocyty (granulocytes-colony stimulating factor)

GOLD – klasifikační systém chronické obstrukční plicní nemoci (global initiative for chronic obstructive lung disease)

GP – glykoprotein

HR – srdeční frekvence (heart rate)

CHOPN – chronická obstrukční plicní nemoc

ICAM – intercelulární adhezní molekula (intercellular adhesion molecule)

IL – interleukin

JIP – jednotka intenzivní péče

KDIGO – mezinárodní iniciativa pro onemocnění ledvin (Kidney Disease Improving Global Outcomes)

LFA-1 – antigen asociovaný s lymfocyty – 1 (lymphocyte function-associated antigen-1)

LMWH – nízkomolekulární heparin (low-molecular weight heparin)

LTA – spektrofotometrická agregometrie (light-transmittance aggregometry)

LPS – lipopolysacharid (lipopolysaccharide)

MAP – střední arteriální tlak (mean arterial pressure)

MEA – impedanční multielektrodová agregometrie (multiple electrode aggregometry)

MFI – střední průtokový index (mean flow index)

MHC – hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)

MLADI – technologie proteomické analýzy (matrix-assisted laser desorption/ionization)

MODS – syndrom multiorgánové dysfunkce (multiple organ dysfunction syndrome)

MS – hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

NET – neutrofilní extracelulární past(i) (neutrophil extracellular trap(s))

NKC - NK-buňka(-y) (natural killer cell(s))

NO – oxid dusnatý (nitric oxide)

NOS – NO syntáza (NO synthase)

NYHA – klasifikační systém dušnosti (New York Heart Association)

OPS – ortogonální polarizační spektrální zobrazení (orthogonal polarization spectral imaging)

PAF – destičkový aktivační faktor (platelet activation factor)

PAMP – unikátní molekuly patogenů (antigenní determinanty) (pathogen-associated molecular pattern)

PCT – prokalcitonin

PF4 – destičkový faktor 4 (platelet factor 4)

PICS – syndrom přetrvávajícího zánětu, imunosuprese a katabolizmu (persistent inflammation immunosuppression and catabolism syndrome)

PMN – polymorfonukleáry

PMP-1 – destičkový mikrobicidní protein-1 (platelet microbicidal protein-1)

PPV – proporce perfundovaných cév (proportion of perfused vessels)

PRP – koncentrát trombocytů v krevní plazmě (platelet-rich plasma)

PRR – motivy rozpoznávající receptor(y) (pattern recognition receptor(s))

PSGL-1 – ligand pro glykoprotein P-selektin (P-selectin glycoprotein ligand-1)

PT – protrombinový čas

PVD – denzita perfundovaných cév (perfused vessel density)

RANTES - chemokin C-C motiv ligand 5 (CCL5) (regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted)

RRT – náhrada funkce ledvin (renal replacement therapy)

SDF – zobrazovací technika v temném poli (sidestream dark-field imaging)

SIRS – syndrom systémové zánětlivé odpovědi (systemic inflammatory response syndrome)

SOFA – skóre determinující rozsah orgánového poškození (sequential organ failure assessment)

TC – T-lymfocyt(y) (T-cell(s))

TF – tepová frekvence

TLR – Toll-like receptor(y) (Toll-like receptor(s))

TOF – technologie proteomické analýzy (time-of-flight)

TP – časový bod (timepoint)

TPO – trombopoetin (thrombopoietin)

TRALI – potransfuzní poškození plic (transfusion-related acute lung injury)

Tregs – regulační T-lymfocyty (regulatory T-cells)

TVD – celková denzita cév (total vessel density)

TXA2 – tromboxan A2 (thromboxan A2)

UFH – nefrakcionovaný heparin (unfractionated heparin)

U – jednotka (unit)

UPV – umělá plicní ventilace

VCAM – vaskulární adhezivní molekula (vascular cell adhesion molecule)

VO₂ – konzumpce kyslíku (O₂)

vWF – von Willebrandův faktor (von Willebrand factor)

1. ÚVOD

Sepse je jedním z nejstarších a nejméně objasněných syndromů v humánní medicíně. Sepsí obecně označujeme život ohrožující stav, který vzniká, pokud odezva organismu na infekci poškozuje vlastní tkáň a orgány [Vincent et al. Lancet 2013]. Těžká sepsa je charakterizována přítomností (multi)orgánové dysfunkce (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), septický šok navíc ještě hypotenzí refrakterní k tekutinové resuscitaci a/nebo hyperlaktatemií [Delinger et al. Crit Care Med 2013, Angus et al., NEJM 2013] (tab. 1).

Kontinuum sepse – těžká sepsa – septický šok je desátou nejčastější příčinou smrti všeobecně a nejčastější příčinou smrti na nekoronárních jednotkách intenzivní péče. Incidence sepse je 50-95 případů na 100000 obyvatel a zvyšuje se přibližně o 10% ročně [Martin et al., NEJM 2003, Annane et al., Lancet 2005]. Septičtí nemocní tvoří více než 10% jedinců hospitalizovaných na jednotkách intenzivní péče [Angus et al., CCM 2001]. Extrapolací počtu léčených pacientů z provedených epidemiologických studií [Martin et al., NEJM 2003, Vincent et al., JAMA 2009] lze odhadnout celosvětovou roční incidenci dosahující více než 19 miliónů septických nemocných [Adhikari et al., Lancet 2010]. Odpovídající ekonomické náklady spojené s léčbou těchto jedinců dosahují také astronomických hodnot (13000 až 30000\$/pacient [Eber et al. Arch Intern Med 2010; Dick et al., BMC Health Serv Res 2012]).

Sepsa, těžká sepsa a septický šok mohou být důsledkem komunitní či nozokomiální infekce. Nejčastější příčinou je pneumonie tvořící až polovinu případů, následují intaabdominální infekce a infekce močového traktu [Vincent et al., JAMA 2009, Ranieri et al., NEJM 2012]. Velké epidemiologické studie ukázaly změny dominance kauzálních mikroorganismů v průběhu posledních 3-4 dekád [Martin et al., NEJM 2003, Vincent et al., JAMA 2009]. Zatímco v letech 1979 – 1987 převažovaly gram-negativní bakterie, v letech následujících byly systémové infekce zapříčiněny častěji gram-pozitivními patogeny. Novější multicentrická práce na populaci 14000 nemocných ze 75 zemí pak dokládá opět vyšší frekvenci gram-negativních mikroorganismů (62%) [Vincent et al., JAMA 2009]. Důležitou roli také sehrávají systémové mykotické infekce, jejichž incidence ve zmiňovaném období prudce vzrůstá (o >200%) a spolu s vyšší incidencí gram-negativních infekcí dokládá současný význam nozokomiálních nákaz [Martin et al., Expert Rev Anti Infect Ther 2012].

Rizikové faktory vzniku a rozvoje sepse se vztahují jednak k samotné predispozici jedince k infekčnímu onemocnění, tak i k riziku/pravděpodobnosti rozvoje orgánového postižení při systémovém zánětu. Větší náchylnost k infekcím je dobře popsána u imunodeficitních stavů (vrozených i získaných vč. imunosupresivní léčby), chronických orgánových dysfunkcí (chronická obstrukční plicní nemoc, chronické onemocnění srdce, chronické onemocnění ledvin, chronická hepatopatie aj.) a nádorových onemocnění. Rovněž věk, pohlaví, rasa a etnicita ovlivňují incidenci sepse, která je vyšší u malých dětí a starých jedinců, u mužů a afroameričanů [Angus et al., CCM 2001; Mayr et al., JAMA 2010]. Rizika rozvoje (multi)orgánové dysfunkce u jedinců se systémovou infekcí jsou méně přímočará a objasněná. Mohou zahrnovat virulenci invadujícího mikroorganismu,

genetickou predispozici hostitele, aktuální zdravotní stav a preexistující orgánovou dysfunkci spolu s načasováním terapeutických intervencí [Angus et al., CCM 2001]. Polymorfizmem genů kódujících nejrůznější prozánětlivé i protizánětlivé cytokiny a jiné mediátory vrozené a/nebo získané imunity podílející se na zánětlivé odpovědi organismu a vzniku a rozvoji orgánového poškození se zabývala již celá řada studií. I přesto jsou zatím výsledky nekonzistentní, mimo jiné i díky výrazné heterogenitě testovaných populací septických nemocných [Chung LP et al., Crit Rev Clin Lab Sci 2011; Namath et al., Crit Care Nurs Clin North Am 2011]. Také asociace genové exprese a vlastních patofyziologických mechanismů sepse, multiorgánového selhání či terapeutické odpovědi je více než otázná. Sekvenování lidské DNA vedlo k identifikaci >30000 genů [Venter et al., Science 2001; Lander et al., Nature 2001]. Počet jimi kódovaných proteinů je však mnohem větší (>1000000) díky množství možných posttranslačních modifikací a/nebo vzájemných interakcí proteinů [Hoehn et al., CCM 2005]. Určité naděje byly vkládány do transkriptomiky – analýzy (m)RNA – s o něco přesnější kvantitativní i kvalitativní identifikací genové exprese. Ale i zde byla korelace se skutečnou produkcí proteinů a jejich funkcemi velmi slabá [MacBeath et al., Nat Genet 2002]. Genomika a transkriptomika mají tedy pouze velmi omezený potenciál v predikci výsledné struktury, dynamiky a funkce proteinů a odvozeně i v možnostech detailního studia systémové inflamace a orgánového postižení. Ve světle těchto poznatků se přímá analýza proteinů, jejich dynamiky, funkce a vzájemných vztahů v jednotlivých kompartmentech jeví jako nejvhodnější k pochopení patofyziologie sepse. Blíže bude tato modalita – proteomika – diskutována níže, již v rámci komentáře původních prací.

Bez možností moderní intenzivní péče s včasnou diagnostikou, antibiotickou léčbou a prostředky podpory některých orgánových funkcí je těžká sepse a septický šok letálním onemocněním. Ale i přes značné pokroky v diagnostice a léčbě, dodržování všeobecně akceptovaných terapeutických algoritmů a téměř dvacetiletý výzkum je mortalita sepse víceméně stacionární v závislosti na tíži onemocnění (30-40%) a koreluje s počtem dysfunkčních orgánů/systémů a s délkou trvání těchto stavů [Martin et al., NEJM 2003; Annane et al., Lancet 2005; Vincent et al. – SOAP, CCM 2006]. Neuspokojivá mortalita sepse a negativní výsledky recentních studií vedou k zamyšlení nad správností hypotéz týkajících se patofyziologie těchto stavů, zejména na subcelulární úrovni. Vzhledem k mimořádné heterogenitě, charakteristické pro populaci septických nemocných, může snaha o uniformní léčbu těchto nemocných jako jednodité skupiny vysvětlit tyto terapeutické neúspěchy. Ilustrativním příkladem je selhání drtivé většiny protizánětlivých strategií [Riedemann et al., Nat Med 2003; Boomer et al., JAMA 2011], jejichž užití bylo založeno na předpokladu přehnané prozánětlivé imunitní reakce organismu v odpovědi na invazivní infekci. Zjevně nelze očekávat terapeutický úspěch při snaze o izolované ovlivnění jediného mediátoru nebo funkce v celé řadě deregulovaných a dysfunkčních patofyziologických dějů a mechanismů. V současné době lze tedy spíše uvažovat o „imunitní deregulaci“ jako o velmi heterogenním stavu, který vede k progresi a udržování systémového zánětu, orgánovému poškození, nozokomiálním infekcím a v řadě případů až k úmrtí nemocných.

Mechanismy vedoucí k úmrtí nemocných v septickém šoku se v průběhu vlastního onemocnění liší. Od refrakterního cirkulačního šoku v důsledku extenzivní aktivace imunitního systému s masivním uvolněním prozánětlivých mediátorů v úvodní časné fázi – systémová zánětlivá odpověď (systemic

inflammatory response syndrome, SIRS), až po MODS, „syndrom přetrvávajícího zánětu, imunosuprese a katabolizmu“ (persistent inflammation immunosuppression and catabolism syndrome, PICS) a komplikující nozokomiální či oportunní/endogenní infekce při exhausci [Gentile et al., J Trauma Acute Care Surg 2012]. Z klinické praxe však víme, že většina nepřeživších (>80%) umírá až mnohem později po iniciální resuscitaci a léčbě primárního septického šoku s charakteristickými znaky imunosuprese, zatímco skupina přeživších je zřejmě tvořena jedinci, kteří byli schopni spontánně upravit a balancovat imunitní funkce bez specifické imunomodulační léčby [Monneret et al., Intensive Care Med 2006; Xiao et al., J Exp Med 2011].

Těžištěm této dizertační práce je snaha o detailnější popis a porozumění celulární patofyziologii kontinua sepse. Tyto poznatky mohou napomoci nejenom vlastního odhalování mechanismů, interakcí a orchestrace imunitní odpovědi hostitele, ale i identifikaci potenciálních terapeutických cílů a také biomarkerů k včasné detekci, diagnostice a stratifikaci zmiňovaných patologických stavů.

2. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

2.1. OBECNÁ PATOFYZIOLOGIE SEPSE A (MULTI)ORGÁNOVÉ DYSFUNKCE

Pohled na patofyziologii sepse prodělává v posledních dvou dekádách velmi dynamický vývoj. Původní pojetí charakterizující sepsi jako přemrštěnou zánětlivou odpověď organismu, zodpovědnou za její projevy a případnou (multi)orgánovou dysfunkci, byl v čase nahrazen konceptem dvoufázového průběhu [Bone et al., Chest 1997; Hotchkiss et al., NEJM 2003]. Zde iniciální systémová zánětlivá odpověď hostitele (systemic inflammatory response syndrom – SIRS, sepse) přechází v čase do syndromu kompenzační protizánětlivé odpovědi organismu (compensatory anti-inflammatory response syndrome – CARS). Další studium však ukázalo, že infekční stimuly spouští mnohem komplexnější, velmi individuální, variabilní a prolongovanou reakci hostitele, při které jsou již od samotného úvodu simultánně zapojeny prozánětlivé a protizánětlivé mechanismy, jenž se podílí jak na kontrole infekce, eliminaci invadujícího patogenu, reparaci tkáňového poškození, tak i na druhé straně na orgánovém postižení a imunoparalýze se sekundárními infekčními komplikacemi [van der Poll et al., Lancet Infect Dis 2008; Xiao et al., J Exp Med 2011; Hotchkis et al. Nat Rev Immunol 2013; Karvunidis et al., Anest Intenziv Med 2013].

K zachování integrity a homeostázy lidského organismu je nezbytné zabránit invazi patogenů do jeho tkání a orgánů a následnému rozšíření do celého organismu. Základním prostředkem bránícím průniku mikrobů jsou neporušené fyziologické epiteliální bariéry. Při jejich narušení slouží složky vrozeného imunitního systému (tab. 2) jako druhá linie obrany [Littman et al., Cell 2010]. Tato vrozená imunitní odpověď je společná všem vícebuněčným organismům. Je víceméně bezprostřední, nespecifická a je primárně určena k rychlé eradikaci patogenů a prevenci poškození tkání. Aktivace imunitní odpovědi se děje cestou tzv. motivy-rozpoznávajících receptorů (pattern-recognition receptors, PRRs). Vzhledem ke komplexnosti a relativní dlouhověkosti savců včetně člověka je však potřeba další obranné linie organismu s imunologickou pamětí, mimořádnou specificitou a účinností a vývoj získané (adaptivní) imunity byl tedy logickým evolučním krokem umožňujícím přežití a vývoj vyšších živočišných forem. Její plné aktivace a funkce je dosaženo až po několika desítkách hodin až dnů. Systém získané imunity zahrnuje komponenty buněčné imunitní odpovědi (T-lymfocyty), primárně určené k reakci na intracelulární patogeny, a součásti humorální (protilátkové) imunitní odpovědi (B-lymfocyty a imunoglobuliny), primárně cílené na extracelulární mikroorganismy a toxiny (tab. 2). K interakcím T-lymfocytů s ostatními složkami imunitního systému a patogeny slouží tzv. T-buněčný receptor (T-cell receptor, TCR) exprimovaný na jejich povrchu. B-lymfocyty k těmto účelům užívají monoklonální imunoglobuliny vázané v buněčné membráně (B-cell receptor, BCR).

Povrchové struktury všech patogenů obsahují limitovaný počet unikátních a u vyšších živočichů se nevyskytujících molekul – tzv. patogen-associated molecular patterns (PAMP) (tab. 3). Tyto struktury jsou rozpoznávány specifickými receptory buněčných elementů vrozené imunity (antigen-prezentující buňky, antigen-presenting cells, APC) a jinými buňkami (některé populace lymfocytů, endoteliální a epiteliální buňky) pomocí již zmíněných tzv. motivy-rozpoznávajících receptorů (pattern recognition

receptors, PRR). V současné době je popsáno celkem pět základních skupin PRR (tab. 3) [Cinel et al., Crit Care Med 2009; Opal et al., Int J Antimicrob Agents 2010; Netea et al., NEJM 2011; Larosa et al., Curr Infect Dis Rep 2012]. Obdobnými „alarmy“ aktivujícími imunitní systém jsou skupiny „endogenních“ specifických molekul uvolňovaných při tkáňovém poškození – tzv. damage-associated molecular patterns (DAMP) (tab. 3). Uvolnění významného množství DAMP do cirkulace vede k zánětlivé odpovědi klinicky neodlišitelné od reakce na infekční agens [Cinel et al., Crit Care Med 2009]. DAMP jsou zřejmě také schopny udržovat systémovou zánětlivou odpověď a tedy i MODS i v době, kdy již došlo k úplné eliminaci primárního infekčního agens [Sursal et al., Shock 2013].

Rozpoznáním specifických antigenních domén invadujícího patogenu (PAMP) povrchovými receptory je zahájena intracelulární signalizace cestou široké skupiny tzv. sekundárních posílů (second messengers) vedoucí k aktivaci intranukleárních proteinových komplexů kontrolujících transkripci DNA (např. nukleární faktor-kappa B, NF- κ B) a tedy další kaskádě dějů – produkce prozánětlivých a protizánětlivých působků, adhezivních molekul, strukturálních molekul aj. – v rámci komplexní zánětlivé odpovědi organismu.

Iniciální imunitní odpověď organismu na mikrobiální infekci, ale i na sterilní stimuly (trauma, popáleniny, hemoragický šok) je fenotypicky vysoce stereotypní a uniformní a v rámci zmíněných stavů navzájem v podstatě klinicky neodlišitelná. Studie genových expresí a transkripčních profilů cirkulujících leukocytů nemocných s tupými traumaty, popáleninami a infekcí (resp. zdravých dobrovolníků po aplikaci malé dávky endotoxinu - lipopolysacharidu, LPS – PAMP) dokládají globální změny v intracelulárních funkcích a signalizacích zaujímajících >80% genů [Calvano et al., Nature 2005; Xiao et al., J Exp Med 2011; Larosa et al., Infect Dis Rep 2012]. Detekce těchto změn genových expresí umožňuje časné odlišení sepse od neinfekčního SIRS [Průcha et al., Shock 2004; Johnson et al., Ann Surg 2007; Tang et al., Crit Care Med 2009; Xiao et al., J Exp Med 2011]. Tato možnost včasného rozpoznání infekční etiologie není samoučelná, jelikož smrtnost sepse je v porovnání s neinfekčním systémovým zánětem téměř dvojnásobná [Sprung et al., Intensive Care Med 2006]. Dosavadní paradigma dvoufázového průběhu zánětlivé odpovědi organismu striktně časově oddělující iniciální prozánětlivou fázi (SIRS) a následující kompenzační protizánětlivou fázi (CARS) lze na základě těchto poznatků chápat odlišně [Xiao et al., J Exp Med 2011]. Uvedené práce ukazují, že alterace prozánětlivých a protizánětlivých genů je simultánní již v samotném úvodu onemocnění a že rozdíly v expresích genů mezi přeživšími a nepřeživšími nemocnými jsou kvantitativní, nikoliv kvalitativní. Právě míra a délka změny exprese příslušných genů, odpovídající imunitní deregulaci, zřejmě sehrává roli při morbiditě a mortalitě v akutní fázi systémového zánětu, ale i v rozvoji sekundárních komplikací, jakými jsou nozokomiální infekce či protražované orgánové postižení [Xiao et al., J Exp Med 2011; Gentile et al., Shock 2013]. Uvedené ukazuje, že nejen vlastní spontánní úprava, jak je zmíněno výše, ale také včasnost a rychlost normalizace adaptivní genové exprese v odpovědi na inflamatorní stimuly („genomic storm“) a tedy funkcí imunitního systému jsou důležité pro nekomplikovaný průběh sepse.

2.2. NEUTROFILY V PATOFYZIOLOGII SEPSE A (MULTI)ORGÁNOVÉ DYSFUNKCE

Neutrofilní granulocyty jsou nejpočetnější populací buněk periferní krve zdravých jedinců (>50% buněčnosti) a byly vždy označovány jako klíčové elementy vrozené imunity. Jsou výsledným produktem proliferace a diferenciací myeloidní buněčné řady v kostní dřeni, kde parciálně maturují a jsou následně vyplavovány do periferní krve. Zde lze odlišit dvě velmi dynamicky se měnící a navzájem prolínající populace – populaci cirkulující v krevním proudu a populaci marginující na endotelu cév. Zánik neutrofilů probíhá v retikuloendoteliálním systému a také opět v kostní dřeni. Tradičně jsou tyto elementy považovány za esenciální efektorové buňky v patofyziologii vzniku a progresi sepse a MODS [Brown et al., Lancet 2006; Kovach et al., Curr Opin Infect Dis 2012]. Mezi základní diagnostická kritéria systémového zánětu a sepse patří i počet leukocytů resp. neutrofilů a zastoupení jejich nezralých forem (tab. 1). Jejich zvýšený počet je dán excesivním uvolněním z kostní dřene a/nebo uvolněním populace marginujících elementů do krevního proudu.

Jak již bylo zmíněno výše, v průběhu sepse se střetávají protichůdné stimuly - prozánětlivé a protizánětlivé; mechanismy imunopotenciace a imunoparalýzy. Svoji roli v tomto mají i neutrofilové, a to jak kvantitativní – svým počtem, tak i kvalitativní – svými funkcemi. V porovnání s jinými buněčnými elementy imunitního systému, jejichž počet může klesat v důsledku centrální suprese v kostní dřeni, apoptózy či sekvestrace mimo krevní proud, počet polymorfonukleárů bývá většinou zvýšen, stejně jako jsou potencovány jejich syntetické a fagocytární funkce. Méně často se setkáme s neutropenií definovanou jako absolutní počet neutrofilů $<0,5 \times 10^9/l$, jež bývá zpravidla spojována s vyšší incidencí infekčních komplikací, komplikovaným a protražovaným průběhem stonání a horší prognózou kontinua sepse – septický šok [Klustersky et al., Clin Infect Dis 2004; Caggiano et al., Cancer 2005; Penack et al., Ann Hematol 2006; Kuderer et al., Cancer 2006; Ramzi et al., Hematology 2007]. Ale ani terapeutické snahy o korekci neutropenie u septických nemocných aplikací rekombinantního růstového faktoru granulocytů (colony stimulating factor – granulocytes, G-CSF) nevedly ke snížení mortality i přes dokumentované zkrácení doby neutropenie [Nelson et al., J Infect Dis 1998; Root et al., Crit Care Med 2003].

Neutrofilové exprimují množství PRR – Toll-like receptorů (TLR), které rozpoznávají PAMP či endogenní alarminy (DAMP). Aktivace PRR/TLR spouští kaskádu intracelulárních pochodů vedoucí k alteraci genové exprese cestou NK- κ B a mitogeny aktivované proteinkinázy (mitogen-activated protein kinase, MAPK) s produkcí cytokinů, chemokinů, antimikrobiálních peptidů a reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species – ROS). Současně dochází k migraci do místa infekce, adhezi neutrofilů k endotelu, jeho aktivaci, chemotaxi dalších buněčných komponent zánětlivé odpovědi. Jakožto profesionální fagocyty jsou neutrofilní granulocyty schopny internalizace patogenů, jejich destrukce, zpracování a prezentace jejich epitopů (PAMP) dalším buňkám imunitního systému. Destrukce pohlcených mikroorganismů probíhá fúzí vakuoly obsahující patogen (fagozomu) se specifickými intracelulárními granuly za vzniku tzv. fagolysozomu [Urban et al., Cell Microbiol 2006; Stearns-Kurosawa et al., Annu Rev Pathol 2011]. Primární (azurofilní) granula obsahují katepsin G, elastázy, myeloperoxidázy a protein zvyšující permeabilitu bakterií (bacteria permeability increasing protein, BPIP). Sekundární granula přispívají obsahem lysozymu, laktoferinu a řady metaloproteáz. Dalším

mechanismem eliminace invadujících mikroorganismů je tvorba neutrofilních extracelulárních pastí (neutrophil extracellular traps, NET). NET jsou extracelulární intravaskulární komplexní struktury tvořené nukleárním chromatinem, histony, cytoplazmatickými proteiny neutrofilů a samotnými neutrofilii. Usnadňují lokalizaci, izolaci a zničení infekčních agens, ale mohou také protrahovat a prohlubovat proces inflamace a poškození tkání [Urban et al., PLoS Pathol 2009; Mantovani et al., Nat Rev Immunol 2011; Stearns-Kurosawa et al., Annu Rev Pathol 2011; Kovach et al., Curr Opin Infect Dis 2012; Kaplan et al., J Immunol 2012]. Za ideální situace tato potentní kombinace produkce prozánětlivých mediátorů atrahující a aktivující dostatečný počet imunokompetentních elementů a intracelulární destrukce mikroorganismů vede k jejich kompletní a rychlé eradikaci. Pokud však dojde k úniku a přežití patogenů (extrémní nálož nebo významná virulence) akceleruje i zapojení neutrofilů (a dalších antigen prezentujících i efektorových buněk) s excesivní produkcí prozánětlivých mediátorů, poškozením a aktivací endotelu, progresí do šoku a MODS („collateral damage“) [O’Neil et al., Nat Rev Drug Discov 2006; Weighardt et al., Immunobiology 2007; Stearns-Kurosawa et al., Annu Rev Pathol 2011].

Podstatným jevem v kontrole infekce je kumulace imunokompetentních (imunomodulujících i efektorových) buněk v místě zánětu. Vazba neutrofilů k vaskulárnímu endotelu je zprostředkována a kontrolována sekvenční aktivitou dvou skupin adhezivních molekul, které jsou v excesivní míře exprimovány na jejich povrchu po jejich aktivaci prozánětlivými signály (tab. 4). První skupinou jsou selektiny, které zajišťují iniciální vazbu a tzv. rolling neutrofilů. Druhá skupina – integrinů – slouží k pevné adhezi [Gonzales-Amaro et al., Crit Rev Immunol 1999]. Tyto adhezivní molekuly interagují se svými specifickými protějšky – ligandy – na povrchu endoteliálních buněk, umožňují intercelulární signalizaci a aktivaci endoteliálních buněk. V plicní vaskulatuře mohou neutrofilii v důsledku lokálního, ale i vzdáleného zánětu následně pronikat endotelem, migrovat a sekvestrovat v plicním intersticiu a/nebo alveolech a působit přímě poškození tkáně. Mimo plicní cévy způsobující adherující neutrofilii nepřímě poškození okolních tkání (výše zmiňovaný „collateral damage“) okluzí mikrovaskulatury s hypoperfuzí/hypoxií příslušné oblasti a současně indukci endoteliální dysfunkce s porušením těsné integrity endotelu, zvýšením kapilární permeability, dalším uvolněním prozánětlivých a vazoaktivních mediátorů a navozením typické heterogenity krevního toku (maldistribuce/“shunting“) v mikrocirkulaci. Tuto zásadní úlohu neutrofilů v iniciaci a potenciaci ischemicko-reperfuzní dysfunkce mikrocirkulace a poškození tkání dokládá řada studií [Fondevila et al., Exp Mol Pathol 2003; Buras et al., Neurol Res 2007; Yilmaz et al., Neuromolecular Med 2010]. Všechny mechanismy jako interakce a intercelulární signalizace neutrofil-endoteliální buňka, neutrofil-trombocyt a neutrofil-erytrocyt vedou k agregaci krevních elementů v mikrocirkulaci, její obturaci a uvolnění širokého spektra mediátorů a následně k popisovanému selhání mikrocirkulace. Na podkladě těchto poznatků by se mohla zdát (terapeutická) deplece leukocytů/neutrofilů výhodná ve smyslu prevence rozvoje a progresu těchto patofyziologických procesů vedoucích až k šoku a MODS. Několik experimentálních studií skutečně prokázalo absenci alterace mikrocirkulace na zvířecích subjektech s deplecí neutrofilů [Hernandez et al., Am J Physiol 1987; Korhuis et al., Am J Physiol 1988; Carden et al., Circ Res 1990; Suematsu et al., Lab Invest 1994; Turnage et al., Ann Surg 1995; Dawson et al., Keio J Med 1996; Bertuglia et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; Hoesel et al., Shock 2005].

Data popisující stav a chování mikrocirkulace/endoteliální dysfunkce u septických nemocných s významnou leukocytopenií však dosud chyběla. Právě snaha o objasnění těchto interakcí byla podnětem k uskutečnění první z originálních prací komentovaných níže [Karvunidis et al., Intensive Care Med 2012].

2.3. POSTAVENÍ TROMBOCYTŮ V PATOFYZIOLOGII SEPSE A (MULTI)ORGÁNOVÉ DYSFUNKCE

Trombocyty jsou bezjaderné nejmenší krevní elementy vznikající odštěpením z megakaryocytů v kostní dřeni. Jsou vysoce diferencovanými buňkami sehrávajícími esenciální úlohu v procesu primární zástavy krvácení tvorbou trombu. Současně, jako součást přirozených obranných mechanismů hostitele, produkcí cytokinů, expresí adhezivních molekul s následnou přímou intercelulární interakcí a signalizací (trombocyt-endoteliální buňka, trombocyt-neutrofil) iniciují a modulují imunitní odpověď [Vincent et al., Crit Care Med 2002; Levi et al., Hematology 2005; Zarbock et al., Blood Rev 2007; Hundelshausen et al., Circ Res 2007; Smyth et al., J Thromb Haemost 2009; Semple et al., Cell Mol. Life Sci., 2010]. Účastní se také procesu hojení ran a patogeneze hematogenních metastáz [Jurk et al., Semin Thromb Hemost 2005]. Jsou významným zdrojem velkého množství bioaktivních mediátorů, které produkují, skladují a secernují [Smyth et al., J Thromb Haemost 2009].

Funkce destiček může být arbitrárně rozdělena do čtyř fází (aktivace, adheze, agregace a degranulace), které jsou ve skutečnosti velmi dynamické a vzájemně provázané a prolínající se: adheze, aktivace, agregace a sekrece [Jurk et al., Semin Thromb Haemost 2005]. Tyto funkce a interakce trombocytů jsou podmíněny intaktní kaskádou změn, kterými procházejí v průběhu jejich aktivace. Konsekvencí aktivace destiček je sekrece obsahu granul - degranulace. Dochází k uvolnění několika agonistů destiček, koagulačních faktorů, heparin-vázajících proteinů, růstových faktorů, vazoaktivních látek a expresi membránových receptorů zprostředkovávajících interakce s leukocyty či endoteliálními buňkami. Řada z takto uvolněných molekul (ADP, serotonin atd.) potencují stimulaci a aktivaci dalších trombocytů a atrahují je do místa poškození cévní stěny či infekce (tab. 5). Krevní destičky však nejsou jen pasivní zásobárnou bioaktivních látek. V průběhu jejich aktivace je řadou enzymatických pochodů produkováno množství lipidových derivátů - eikosanoidů, jako tromboxan A₂ (TXA₂) a prostaglandiny. Současně v transcelulárním metabolismu produkují prozánětlivé i protizánětlivé cytokiny. Trombocyty mají navíc několik jedinečných extranukleárních cest translace mRNA na proteiny tzv. signál-dependentním mechanismem, na jejichž konci je sekrece mimo jiné i IL-1 β či TF a tedy i propojení hemostázy a inflamace [Weyrich et al., J Thromb Haemost 2009].

Vedle klíčové role trombocytů v procesu hemostázy a hojení poškození vaskulárního endotelu je lze ve světle recentních poznatků považovat za nedílnou součást přirozené imunity. Dokonce je možno o nich mluvit nejen jako o neimunitních buňkách vykazujících některé imunitní funkce, ale přímo jako o imunokompetentních elementech, které jsou schopny iniciace, potenciace a modulace zánětlivé odpovědi organismu. Tato tvrzení podporuje jejich společný původ v kostní dřeni s buňkami myeloidní krevní řady. Stejně jako například neutrofilů a/nebo monocytů/makrofágů, destičky exprimují PRR pro PAMP a DAMP, jsou schopny ingescence a destrukce invadujících patogenů, produkují a secernují celou řadu působků umožňující intercelulární signalizaci. Funkční povrchové PRR (TLR, FcR-Ig, CR a jiné) umožňují vazbu trombocytů na invadující patogeny, jejich části či produkty [Semple et al., Nat Rev Immunol 2011]. Literatura dokumentuje přítomnost některých subtypů TLR (TLR 1, 2, 4 a 9) na

neaktivovaných trombocytech [Shiraki et al., Thromb Res 2004; Andonegui et al., Blood 2005]. Jejich aktivace vazbou specifických PAMP (lipopolysacharidy, lipoproteiny aj.) spouští kaskádu dobře popsaných dějů, které vedou k aktivaci destiček, produkci prozánětlivých i protizánětlivých mediátorů, sekvestraci trombocytů v mikrocirkulaci zejména plic a jater (TLR-dependentní trombocytopenie) a aktivaci imunitního systému cestou prezentace PAMP klasickým buňkám imunitního systému [Hundelshausen et al., Circ Res 2007; Beaulieu et al., Thromb Res 2010; Ishii et al., Curr Infect Dis Rep 2004; Aslam et al., Blood 2006; Alves-Filho et al., Thromb Res 2005]. TLR jsou přítomny rovněž na megakaryocytech v kostní dřeni [Stohlawetz et al., Thromb Haemost 1999] a existuje řada důkazů experimentálních studií o jejich roli v trombopoeze [Jayachandran et al., J. Appl. Physiol, 2007]. Vazby PAMP nejsou pouze pasivní, ale vedou ke konformačním změnám dalších povrchových molekul, mobilizaci a expresi dalších receptorů z cytosolu jako např. CD40-ligandu (CD40L). CD40L je prominentní molekulou secernovanou trombocyty ve velkém množství po jejich aktivaci exogenními stimuly. Objem produkce CD40L se navíc zdá závislý na velikosti a typu stimulace, což ukazuje na adaptivitu odpovědi destiček [Berthet et al., Clin Immunol 2012]. Některé studie ukazují na kvalitativně odlišnou aktivaci trombocytů vyjádřenou rozdílnými profily produkovaných cytokinů v závislosti na konkrétním PAMP [Semple et al., Nat Rev Immunol 2011; Yeaman et al., Cell Mol Life Sci 2010; Cox et al., J Thromb Haemostat 2011; McNicol et al., J Thromb Haemost 2011; Chen et al., Haematologica 2013].

Aktivované trombocyty exprimují na svém povrchu řadu adhezivních molekul sloužících k mezibuněčnému kontaktu a signalizaci (tab. 4). Jednou z nich je i P-selektin (CD62p), integrální membránový glykoprotein patřící do rodiny selektinových adhezivních receptorů. Nachází se na povrchu nejen destiček, ale i makrofágů/monocytů a aktivovaných endoteliálních buněk. Dalšími selektiny jsou E-selektin exprimovaný na membráně aktivovaných endoteliálních buněk a L-selektin na povrchu leukocytů. P-selektin hraje esenciální roli v interakci trombocytů s leukocyty. Jeho vazebným protějškem s velkou afinitou je tzv. P-selektin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), který se nachází na povrchu leukocytů i samotných destiček. Vazba P-selektin – PSGL-1 (event. současně GP Ib/IX – vWF či GP Ia/IIa – kolagen při porušení integrity endotelu) a následná silná vazba komplexu GPIIb/IIIa v membráně trombocytů přes fibrinogenový můstek na intercellular adhesion molekule-1 (ICAM-1) na povrchu endotelu umožňuje adhezi destiček v místě invaze patogenů či porušení cévní stěny. Současně dochází obdobnými mechanismy (selektin, ICAM-1) na stejném místě i k adhezi leukocytů (polymorfonukleárů, monocytů/makrofágů). K zachycení, adhezi a aktivaci leukocytů může dojít i mechanismem tzv. second capture, kdy k endotelu pevně adherující trombocyty zachytávají cirkulující („resting“) leukocyty, dochází k interakci trombocyt-leukocyt (polymorfonukleáry, PMN), aktivaci PMN a následně k „rollingu“ těchto PMN po vrstvě destiček a postupnému průniku přes cévní stěnu [Zarbock et al., Blood Rev 2007].

Jak již bylo diskutováno výše, sepse je provázána signifikantní aktivací neutrofilů. PAMP jako lipopolysacharid (LPS) spouští kaskádu změn vedoucí k strukturálním změnám neutrofilů, zvýšení jejich rigidity, expresi adhezivních molekul, jejich cílenou migraci („homing“) do mikrocirkulace plic a jater, což může být jedním z mechanismů následné dysfunkce těchto orgánů. Na druhou stranu může

být migrace neutrofilů do plic i aktivním mechanismem imunitního systému v průběhu systémové inflamace. Sekvestraci PMN do těchto orgánů záhy následuje i akumulace trombocytů v takto postižené mikrocirkulaci. Úloha neutrofilů se v tomto procesu jeví jako esenciální, jak dokumentují některé experimentální práce [Andonegui et al., Blood, 2005]. Patofyziologické pochody tohoto fenoménu nejsou zcela objasněny. Existuje několik možností: i) přímá interakce trombocytů s imobilizovanými PMN a aktivovanými endoteliálními buňkami (EC) v cílové oblasti, ii) atrakce destiček jejich agonisty (ADP, trombin) secernovanými v těchto cílových tkáních aktivovanými PMN a EC [Peters et al., J. Immunol. Methods 1997; Zarbock et al., Blood Rev 2007] a iii) zvýšená vazba trombocytů exponovaných LPS na imobilizované neutrofile [Clark et al., Nat. Med., 2007]. Aktivované neutrofile navázané na trombocyty uvolňují do cirkulace řadu biologicky aktivních molekul a navíc i DNA a dohromady vytváří NET [Brinkmann et al., Science 2004; Ma et al., J Thromb Haemost 2008]. Tato vazba neutrofilů/NET a destiček, propojující procesy inflamace a trombózy/hemostázy se je velmi důležitá k efektivní fagocytóze, destrukci a eliminaci patogenů [Manfredi et al., Curr Opin Hematol 2010; Semeraro et al., Blood 2011; Fuchs et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012]. Aktivované trombocyty indukují tvorbu NET [Clark et al., Nat Med 2007]. Jako většina patofyziologických pochodů při systémové inflamaci může popisovaná interakce PMN/NET a trombocytů vést k začarovanému kruhu dalšího formování NET a aktivace dalších destiček a tak k propagaci zánětu, poškození a aktivaci endotelu, poruše mikrocirkulace a dalšímu tkáňovému/orgánovému poškození.

Další cestou intercelulární komunikace trombocytů s buňkami přirozené imunity je interakce receptoru CD40 a jeho ligandu CD40L. Exprese transmembránového proteinu CD40L (CD154) na povrchu destiček se po jejich aktivaci zvyšuje [Inwald et al., Circ Res 2003]. Vazba na již zmíněný CD40 na povrchu endoteliálních buněk, monocytů, dendritických buněk, B-lymfocytů ale také trombocytů vede k zvýšení exprese adhezivních molekul (ICAM-1, VCAM-1), produkci cytokinů a tím další aktivaci imunitního systému [Henn et al., Nature, 1998; Inwald et al., Circ Res 2003; Pignatelli et al., Circulation 2004; Inwald et al., Circ Res 2003]. Trombocyty interakcí CD40L-CD40 indukují maturaci dendritických buněk, což je centrálním mechanismem v rozvoji získané imunity proti invadujícím patogenům [Elzey et al., Immunity 2003]. Stejným mechanismem mohou destičky indukovat změnu izotypů B-lymfocytů a augmentaci odpovědi CD8+ T-lymfocytů, což vede k lepší obraně proti virovým infekcím [Elzey et al., Immunity 2003].

Funkce trombocytů jsou úzce spojeny s velkým množstvím molekul, z nichž více než 300 je destičkami secernováno. Část z nich je společných granulocytární-megakaryocytární vývojové buněčné řadě a zůstává v granulách destiček v průběhu jejich maturace od odštěpení z megakaryocytu v kostní dřeni až do finálního funkčního stavu trombocytů cirkulujících v krevním řečišti. Další skupina je tvořena molekulami absorbovanými z okolí. Poslední a z pohledu původu nejzajímavější skupinou jsou působky syntetizované v maturovaných trombocytech *de novo*, ačkoliv jedinými zdroji nukleových kyselin v destičkách a tedy cestami syntézy nových proteinů jsou/mohou být pouze mitochondriální DNA a RNA pohlcených a destruovaných buněk organismu (např. nádorových buněk) [Semple et al., Nat Rev Immunol 2011; Garraud et al., Thromb Res 2011]. Dynamika molekulárního fenotypu trombocytů je po jejich aktivaci extrémní. Množství molekul

z buněčného povrchu je internalizováno do cytosolu, skryto do mikrostruktur (mikropartikulí) odvozených z buněčné membrány či liberováno do krevního proudu. Toto proteolytické uvolnění proteinů/glykoproteinů z povrchu destiček je zcela odlišným procesem než vlastní sekrece látek ze zásobních granul s/bez přechodné exprese na buněčném povrchu (sCD40L, sCD62P aj.) [Whiteheart et al., Blood 2011].

V procesech regulace a modulace imunitní odpovědi organismu je důležitá celá řada působků secernovaných a/nebo uvolňovaných trombocyty. Jedním z mnoha je i vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor – VEGF). VEGF je klíčová molekula v kontrole cévní permeability. Její působení je zprostředkováno vazbou s povrchovým VEGF receptorem 2 (VEGF-receptor-2 – VEGFR-2) v membráně endoteliálních buněk. Kromě toho má významnou roli v angiogenezi a hojení ran. VEGF je produkován řadou buněk, mimo jiné monocyty periferní krve a trombocyty. Množství stimulů asociovaných s inflamací/sepsí (jako LPS, TNF- α) a hypoxií (cestou hypoxia-inducible factor-1 α -transcription factor – HIF-1 α -TF) zvyšuje produkci a sekreci VEGF [van der Flier et al., Shock 2005]. Řada studií prokazuje asociaci mezi zvýšenou plazmatickou hladinou VEGF a sepsí [van der Flier et al., Shock 2005; Yano et al., J Exp Med 2006]. Navíc některá data ukazují na možnou souvislost mezi plazmatickou hladinou VEGF a tíží sepse/orgánové dysfunkce a mortalitou [van der Flier et al., Shock 2005].

Trombocytopenie, arbitrárně definovaná jako počet trombocytů $<150 \times 10^9/l$, je častým jevem v sepsi či septickém šoku. Její incidence je přibližně 35-44%. U 20-25% těchto nemocných zjišťujeme počet destiček $<100 \times 10^9/l$ a 12-15% pacientů má těžkou trombocytopenii ($<50 \times 10^9/l$) [Vanderschueren et al., Crit Care Med 2000; Strauss et al., Crit Care Med 2002; Vincent et al., Crit Care Med 2002; Levi et al., Crit Care Med 2004]. Frekventní asociace trombocytopenie a systémové infekce a kontinua sepse-septický šok svědčí pro aktivní roli destiček v patofyziologii těchto stavů [Vincent et al., Crit Care Med 2002; Yaguchi et al., J Thromb Haemost 2004]. Počet destiček typicky významně klesá v prvních čtyřech dnech rozvoje systémové infekce [Akca et al., Crit Care Med 2002].

Primárním důsledkem trombocytopenie u kriticky nemocných je zvýšení rizika krvácení. U pacientů s těžkou trombocytopenií ($<50 \times 10^9/l$) je toto riziko čtyřikrát až pětkrát vyšší [Vanderschueren et al., Crit Care Med 2000; Strauss et al., Crit Care Med 2002] a obecně se zvyšuje při systémové inflamaci [Levi et al., Semin Thromb Hemost 2008]. Riziko intracerebrálního krvácení nemocných přijatých na JIP je relativně nízké (0,3-0,5%), ale až 88% těchto nemocných má současně počet krevních destiček $<100 \times 10^9/l$ [Oppenheim-Eden et al., Intensive Care Med 1999]. Bez ohledu na příčinu je trombocytopenie nezávislým prediktorem mortality na JIP s relativním rizikem 1,9-4,2 dle multivariantských analýz [Vanderschueren et al., Crit Care Med 2000; Strauss et al., Crit Care Med 2002]. Trombocytopenie perzistující déle než 4 dny po přijetí na JIP či pokles počtu krevních destiček o $>50\%$ výchozích hodnot v průběhu pobytu na JIP jsou spojeny se čtyřnásobným až šestinásobným zvýšením mortality [Vanderschueren et al., Crit Care Med 2000; Akca et al., Crit Care Med 2002]. Počet trombocytů se ukazuje být silnějším nezávislým ukazatelem mortality na JIP než některé skórovací systémy (APACHE II, MODS). Sepse je jasným nezávislým rizikovým faktorem pro rozvoj trombocytopenie a současně tíže sepse/septického šoku koreluje i s její závažností [Vanderschueren

et al., Crit Care Med 2000; Mavrommatis et al., Crit Care Med 2000; Strauss et al., Crit Care Med 2002; Russwurm et al., Shock 2002].

Mechanismus vzniku a progresu trombocytopenie v sepsi/septickém šoku není v současnosti zcela jasný. Vysvětlení sníženou produkcí trombocytů v kostní dřeni je v logickém rozporu s vysokými hladinami produkci destiček stimulujícími prozánětlivými cytokiny (TNF- α , IL-6 atd.) a trombopoetinu u nemocných v sepsi [Stohlawetz et al., Thromb Haemost 1999; Folman et al., Thromb Haemost 2000]. Konzumpce trombocytů hraje také důležitou roli v rozvoji trombocytopenie v sepsi a to v důsledku vysoké produkce trombinu, který je nejvíce potentním aktivátorem destiček *in vivo*. Příkladem může být disseminovaná intravaskulární koagulace (DIC). Trombocyty mohou být také aktivovány přímo endotoxinem a dalšími proinflamatorními mediátory (PAF atd.) [Zimmerman et al., Crit Care Med 2002; Weyrich et al., Trends Immunol 2004]. Výše diskutovaná přímá interakce/vazba destiček s invadujícími patogeny s následnou ingescí a destrukcí těchto komplexů profesionálními makrofágy i sekvestrace trombocytů v mikrocirkulaci jejich vazbou s neutrofilů (destičkové TLR4) a endotelem (destičkové adhezivní molekuly – selektiny, integriny, GPIIb/IIIa aj.) rovněž vedou k trombocytopenii [Andonegui et al., Blood 2005; Antczak et al., Clin Vaccine Immunol 2011; Jenne et al., PLoS One 2011; Gawaz et al., Intensive Care Med 1997; Secor et al., Intensive Care Med 2010]. Množství publikovaných studií dokladuje roli celé řady molekul v patogenezi trombocytopenie při systémové inflamaci [DeJoy et al., J Infect Dis 1994; Suputtamongkol et al., Antimicrob Agents Chemother 2000; Cavaillon et al., Scand J Infect Dis 2003; Panes et al., Blood 2004; Muller et al., FASEB J 2003; McMaken et al., PLoS One 2011; Brunetti et al., Thromb Haemost 2000].

Vše uvedené dokládá extrémní změny fenotypu trombocytů v procesu jejich aktivace ať již cestou PAMP či DAMP. Změny ve složení proteinů/glykoproteinů v trombocytech a jejich kompartmentech jsou natolik dynamické a pro jejich funkce a role v procesech hemostázy a imunomodulace natolik klíčové, že se snaha o jejich bližší poznání a pochopení stala cílem výzkumu a studií. Jen několik málo kvalitních studií se však dosud zabývalo vlastní problematikou alterace funkce destiček v sepsi [Yaguchi et al., J Thromb Haemost 2004]. Odmyslíme-li si slabinu většiny klinických studií septických nemocných, kterou je extrémní heterogenita souboru nemocných daná samotnou povahou kontinua systémové inflamace – sepse – septický šok – MODS, stojí za diskuzi a kritiku i volba metod analýzy destičkových funkcí. Použité globální metody k vyšetření funkcí destiček (např. agregometrie) a/nebo stanovení plazmatických hladin působků uvolněných z membrán a/nebo granul trombocytů (ELISA) jsou jen velmi hrubým odhadem aktuálního stavu trombocytů či jejich interakcí. Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM) již sice umožňuje detailnější pohled na roli trombocytů v sepsi, stále se však jedná o metodu nepřímé identifikace některých klíčových membránových znaků s limitovanou citlivostí a reprodukcibilitou. Vzhledem k absenci buněčného jádra a jen malému obsahu mRNA, jsou trombocyty výborným cílem pro proteomické studie. Proteomika může být dostatečně senzitivní v přímé detekci složení proteinů jednotlivých kompartmentů destiček a to v jednotlivých stavech jejich aktivace a funkce. Existuje řada prací popisujících proteom destiček v různých stavech aktivace a charakterizujících různé skupiny proteinů trombocytů – proteiny cytoskeletu, proteiny uplatňující se v přenosu signálů, proteiny syntetizované destičkami v neaktivním stavu a proteiny syntetizovanými a

secernovanými aktivovanými trombocyty [Maguire et al., J Thromb Haemost 2003; Maguire et al., Trends Cardiovas 2004; Gnatenko et al., Blood 2006; Garcia et al., Mass Spectrom Rev 2005]. Popis, charakteristiky a diskuze o jednotlivých metodách analýzy funkčního stavu trombocytů jsou uvedeny níže (kap. 3).

Všechny uvedené a mnohé další skutečnosti a podrobnější poznatky z oblasti úlohy trombocytů při systémovém zánětu a orgánové dysfunkci včetně aktuálního přehledu vyšetřovacích metod vhodných k jejich studiu shrnuje a diskutuje originální přehledová práce, která je součástí této dizertační práce [Karvunidis et al., Anest Intenziv Med 2012].

Se snahou o detailnější pohled na nehemostatické funkce trombocytů a popis jejich dynamických změn v časně fázi sepse se zapojením řady analytických metod byla na reprezentativní populaci nemocných provedena originální studie, která je jako součást této dizertační práce komentována níže [Karvunidis et al., *manuskript v přípravě*].

2.4. ENDOTEL V PATOFYZIOLOGII SEPSE A (MULTI)ORGÁNOVÉ DYSFUNKCE

Díky úzké vazbě celulárních patofyziologických procesů endoteliální dysfunkce s poruchou mikrocirkulace a již komentovaným intercelulárním interakcím endotelu s neutrofilami a trombocyty (či obecně s imunokompetentními elementy) je i tato problematika nedílnou součástí této dizertační práce a zaslouží si alespoň stručný přehledový komentář.

Endotel je velmi dynamická buněčná vrstva tvořící vnitřní výstelku cév všech kalibrů od aorty až po nejmenší kapiláry – mikrocirkulaci. Svou masou buněk (okolo 10^{13}) s povrchem 5000-7000m² a celkovou hmotností až 1,5kg patří mezi největší tkáňové/orgánové systémy lidského těla [Ait-Oufella et al., Intensive Care Med 2010]. Endoteliální buňky (EC) v jedné vrstvě vytvářejí komplexní rozhraní oddělující cirkulující krev od subendoteliální tkáně a dalších tkání v okolí cév. Intercelulární prostory endotelu jsou zcela nepropustné („tight junctions“) či omezeně a řízeně propustné („gap junctions“) pro ionty, metabolity, jiné působky a jejich vehikulum – intravaskulární a/nebo intersticiální tekutinu. EC jsou pevně spojeny s bazální membránou bohatou na kolagen a jiné glykoproteiny a jejich intravaskulární povrch je kryt velmi tenkou a fragilní vrstvou zvanou glykokalyx. Glykokalyx zajišťuje antikoagulační/antiagregační vlastnosti intaktního endotelu svým negativním elektrickým nábojem proteoglykanů a glykoproteinů a biochemickými vlastnostmi přítomných glykosaminoglykanů (heparansulfát, dermatansulfát aj.) [Luft et al., Fed Proc 1966; Sugahara et al., Curr Opin Struct Biol 2003; Reitsma et al., Pflugers Arch 2007; Ait-Oufella et al., Intensive Care Med 2010]. Endotel zajišťuje mnoho fyziologických funkcí: cévní tonus, hydrodynamiku/fluiditu krevního proudění, pohyb nutrientů a buněk a růst nových cév. Při porušení morfologické či funkční integrity endoteliální vrstvy jako je tomu při systémovém zánětu/sepsi dochází k alteraci vazomotorické regulace, endotel vykazuje proadhezivní, prokoagulační, antifibrinolytické vlastnosti a je nedílnou součástí mechanismů imunitní odpovědi hostitele. Základní funkce a vlastnosti endotelu jsou shrnuty v tab. 6.

Endotel se zásadní měrou podílí na regulaci vazomotorického tonu cév za aktuálních fyzikálních a chemických podmínek. EC produkují a uvolňují řadu vazodilatačních substancí (oxid dusnatý – NO, prostacyklin aj.) a vazokonstrikčních mediátorů (endotelin, destičky aktivující faktor – platelet activating factor - PAF aj.). Zatímco je produkce NO konstitutivní a modulovaná řadou rozličných stimulů, syntéza a sekrece dalších vazoaktivních působků je pouze indukibilní. NO je nejdůležitějším vazodilatátorem [Furchgott et al., Nature 1980]. Vzniká z L-argininu pomocí konstitutivní endoteliální NO syntázy (eNOS) [Stamler et al., Science 1992]. Celá řada působků stimuluje eNOS cestou specifických receptorů: ADP, bradykinin, substance P, agonisté muskarinových receptorů. Pozitivně působí také fyzikální síly jako tření krevního proudu („shear stress“) a pulzatilní napětí cévní stěny [Loscalzo et al., Circulation 1994]. Dalšími izoformami NOS jsou kalcium-dependentní neuronální NOS (nNOS) a kalcium-independentní indukibilní NOS (iNOS). Poslední jmenovaná je aktivována zejména prozánětlivými cytokiny [Moncada et al., Pharmacol Rev 1991; Hauser et al., Anesth Analg 2005; Pacher et al., Physiol Rev 2007] a produkce NO je tisícinásobně větší než bazální syntéza pomocí eNOS. NO v takové kvantitě navozuje významnou vazodilataci mikrocirkulace, což vede k hypotenzi, maldistribuci krevního proudu/srdečního výdeje a projevům šoku. NO je kromě vazodilatačního efektu potentním inhibítozem aktivace trombocytů a jejich adheze k endotelu a narušuje tvorbu primární

hemostatické trombocytární zátky [Pacher et al., *Physiol Rev* 2007]. Endotelin (ET) je produkován endoteliálními buňkami pouze v odpovědi na stimuly a to například v podobě hypoxie a/nebo třecích sil krevního proudu („shear stress“) aj. a navozuje dlouhotrvající vazodilataci [Levin et al., *N Engl J Med* 1995]. Prostacyklin je eikosanoid, derivát arachidonové kyseliny, jenž navozuje lokální vazodilataci a inhibici agregace trombocytů. Fosfolipid PAF, rovněž derivát kyseliny arachidonové, naopak způsobuje vazokonstrikci a stimuluje a potencuje adhezi leukocytů k endotelu [Imaizumi et al., *J Intern Med* 1995; Lorant et al., *Semin Cell Biol* 1995].

Endoteliální buňky exprimují proměnlivé množství adhezivních molekul (selektiny, integriny aj.) sloužících k intercelulárnímu kontaktu s leukocyty a trombocyty v procesech vrozené imunitní odpovědi – lokalizace, kontroly a eliminace invadujících patogenů, jak bylo diskutováno výše (viz kapitola 2.2. a kapitola 2.3. a tab. 4). Endotel má rovněž svoji roli v mechanismech adaptivní imunity. Expresí MHC I a MHC II interagují s CD8+ a CD4+ TC [Pober et al., *Transplantation* 1996; Marelli-Berg et al., *J Exp Med* 1996]. Dále je na povrchu EC dokladována přítomnost kostimulačních molekul běžných na buněčných membránách „klasických“ APC (dendritické buňky, makrofágy, BC) [Ait-Oufella et al., *Nat Med* 2006].

Endotel se aktivně podílí na obraně organismu adaptivní schopností imobilizovat patogeny a/nebo PAMP, aktivací, atrakcí a celého spektra imunokompetentních elementů včetně trombocytů, uvolňováním prozánětlivých mediátorů a indukci a modulaci (lokálního) prokoagulačního a antifibrinolytického fenotypu a stavu k prevenci šíření infekce krevním proudem. Obdobně jako u jiných/dalších mechanismů imunitní odpovědi hostitele, dochází při deregulaci těchto primárně lokalizovaných a fokusovaných adaptivních obranných pochodů ke generalizaci a amplifikaci uvedených změn – endoteliální dysfunkci – vedoucí k progresi zánětu a k vzdálenému tkáňovému poškození [Ait-Oufella et al., *Intensive Care Med* 2010; Lee et al., *Curr Opin Hematol* 2011]. V sepsi dochází k morfologickým změnám v endoteliální vrstvě – rozvolnění pevného spojení endotelu s bazální membránou a subendoteliálnímu prosáknutí/edému [Leclerc et al., *Crit Care Med* 2000; Ait-Oufella et al., *Intensive Care Med* 2010; Lee et al., *Curr Opin Hematol* 2011]. Současně dochází k zániku/apoptóze endoteliálních buněk cestou aktivace kaspáz [Hu et al., *Microvasc Res* 2009], i přestože jsou EC díky mechanismu aktivního uvolňování aktivované kaspázy-3 z cytozolu (což je považováno za únikový manévr buňky z procesu programované buněčné smrti) více odolné k procesu apoptózy [Shioiri et al., *Biochem Biophys Acta* 2009]. Dalšími změnami jsou fragmentace cytoplazmy a vakuolizace buněčného jádra. Tyto procesy jsou pozorovatelné již po několika minutách od aktivace endotelu PAMP či prozánětlivými cytokiny [Mutunga et al., *Am J Resp Crit Care Med* 2001]. Všechny tyto změny vedoucí k porušení integrity souvislé vrstvy glykokalyxu a endotelu umožňují průnik imunokompetentních buněk, zánětlivých cytokinů a plazmy do intersticiu. Rychlé zvýšení permeability pro albumin, které se objevuje již v prvních šesti hodinách po iniciálním inzultu, postihuje systémovou i plicní cirkulaci značně heterogenně [Heckel et al., *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004].

Diskutované alterace morfologického a funkčního stavu endotelu v sepsi – endoteliální dysfunkce – sehrávají jednu z centrálních rolí v modulaci a progresi a tedy v patofyziologii systémové infekce, kontinua sepse-septického šoku a rozvoji tkáňových a orgánových dysfunkcí. Endoteliální dysfunkce

se zdá být velmi dobrým prediktorem tíže a prognózy sepse [Shapiro et al., Crit Care 2010]. Dostupná literární data dokumentují celou řadu možných plazmatických markerů endoteliální dysfunkce. Nadějnými a recentní studií validovanými se zdají například solubilní VCAM-1, (sVCAM-1), solubilní ICAM-1 (sICAM-1), solubilní E-selektin (sE-selektin), solubilní fms-like tyrozinkináza-1 (sFLT-1), PAI-1, angiopoetin-1 (Ang-1), angiopoetin-2 (Ang-2), von Willebrandův faktor (vWF), ADAMTS-13 aj. [Paulus et al., Biomarkers 2011; Skibsted et al., Shock 2013]. Skibstedova studie popisuje dobrou korelaci zvýšené plazmatické hladiny některých z těchto molekul s tíží sepse, rozvojem orgánové dysfunkce a nemocniční mortalitou.

2.5. ÚLOHA MIKROCIRKULACE V SEPSI A (MULTI)ORGÁNOVÉ DYSFUNKCI

Aktivace imunokompetentních buněčných elementů včetně trombocytů a jejich interakce s endotelem s následným rozvojem endoteliální dysfunkce jsou považovány za klíčové patofyziologické pochody vedoucí k sepsi indukované alteraci mikrocirkulace. Za mikrocirkulaci arbitrárně označujeme všechny cévy a jejich větvení o průměru <100 μ m; skládá se z arteriol, kapilární sítě a postkapilárních venul. Je to místo, kde dochází k přestupu transportovaného kyslíku do okolních tkání. Nejdůležitějšími determinantami krevního průtoku jsou zde obecně krevní tlak, tonus arteriol, hemorheologie a průchodnost kapilár. Struktura a funkce mikrocirkulace je vysoce heterogenní v různých tkáních a orgánových systémech.

Selhání cirkulace vedoucí k neadekvátní dodávce a distribuci O₂ je podstatou a definicí šokového stavu. Pokud je vyvolávající příčinou systémová infekce, jedná se o šok septický. Terapeutické snahy a opatření cílené dle všeobecně akceptovaných aktualizovaných doporučení [Rivers et al., N Engl J Med 2001; Lin et al., Shock 2006; Dellinger et al., Crit Care Med 2012] pouze na normalizaci makrohemodynamických parametrů (klinický stav, perfúzní krevní tlak, globální markery oxygenace, laktátémie aj.) jsou v řadě případů neúspěšné, nezabraňují rozvoji a progresi šokového stavu a MODS a nevedou ke zlepšení postižení na úrovni mikrocirkulace [De Backer et al., Crit Care Med 2013]. Právě dysfunkce mikrocirkulace, jež je spolu s endoteliální dysfunkcí a deregulací celulárních i humorálních imunitních funkcí součástí bludného kruhu („*circulus vitiosus*“), je jedním z centrálních patofyziologických mechanismů sepse [De Baker et al., Am J Resp Crit Care Med 2002; Sakr et al., Crit Care Med 2004; Spronk et al., Crit Care 2004; Ince et al., Crit Care 2005]. Popisované změny jsou dokumentovány také u jiných stavů – traumat, popálenin, ischemicko-reperfúzního poškození i srdečního selhání/kardiogenního šoku [Harris et al., Semin Pediatr Surg 1995; Boros et al., Acta Physiol Hung 2003; De Backer et al., Am Heart J 2004; Lenz et al., Injury 2007; Tenenhaus et al., Clin Plast Surg 2012].

Regulační mechanismy kontrolující perfúzi mikrocirkulace lze hrubě rozdělit na myogenní (reagující na mechanické stimuly – tlak, tah, „shear stress“), metabolické (reagující na O₂, CO₂, laktát a H⁺) a neurohumorální. Tento kontrolní systém užívá autokrinní a parakrinní interakce a signalizace k řízení krevního průtoku mikrocirkulací cílenému k zajištění adekvátní/optimální oxygenací tkání [Lehr et al., J Pathol 2000]. Endotel v tomto systému sehrává roli senzorickou a hladká svalovina roli efektorovou [Vallet et al., Crit Care Med 2002]. Informace o aktuálním lokálním stavu mikrohemodynamiky je šířena dále intercelulární signalizací v rámci endoteliálních buněk [Lidington et al., J Cell Physiol 2002]. Současně se endotel podílí na kontrole a modulaci koagulace a imunitních funkcí, které přímo ovlivňují funkce mikrocirkulace.

Autoregulační mechanismy, a tedy funkce mikrocirkulace, jsou významně narušeny v patologických stavech zmiňovaných výše. Tato alterace je zapříčiněna sníženou deformabilitou erytrocytů a leukocytů [Astiz et al., Crit Care Med 1995], zvýšením počtu aktivovaných neutrofilů a trombocytů a jejich adhezí k endotelu [Linderkamp et al., Pediatr Res 1998], protrombogenním fenotypem endotelu a aktivací koagulační kaskády s tvorbou mikrotrombů [Diaz et al., Histol Histopathol 1998], změnou

reologických vlastností krve (deformabilita krevních elementů, zvýšená viskozita – proteiny akutní fáze, fibrin), dysfunkcí cévních autoregulačních mechanismů [Avontuur et al., Cardiovasc Res 1997], otevřením arterio-venózních spojek [Cronenwett et al., Surgery 1997]. Uvedené změny vedou ke zvýšení permeability cév, heterogenitě distribuce krevního toku/srdečního výdeje [Spronk et al., Crit Care 2004; Ince et al., Crit Care 2005; Trzeciak et al., Acad Emerg Med 2008] a v důsledku k nepoměru dodávky O₂ (DO₂) a metabolitů k požadavkům příslušných tkání (VO₂). Právě tato heterogenita perfúze cév na úrovni mikrocirkulace je typickým nálezem v sepsi. V těsné blízkosti můžeme pozorovat kapiláry zcela neperfundované a cévy s normálním a dokonce abnormálně zvýšeným průtokem krve [Bateman et al., Crit Care 2003; De Backer et al., Am J Respir Crit Care Med 2002; Lam et al., J Clin Invest 1994; Nakijima et al., Am J Resp Crit Care Med 2001; Ince et al., Crit Care 2005; Spronk et al., Crit Care 2004; Trzeciak et al., Acad Emerg Med 2008]. Tato nekonzistence vede k tomu, že v určitých regionech mikrocirkulace je pO₂ (μpO₂) nižší než žilní pO₂. Tento fenomén (tzv. „pO₂ gap“) je kvantitativním odrazem míry a závažnosti heterogenity průtoku krve mikrocirkulací – zkratování („shunting“) a jasně odlišuje sepsi/septický šok od šoku hypovolemického či hemoragického [Ince et al., Crit Care Med 1999; Sinaasappel et al., J Physiol (Lond) 1999; Schwarte et al., J Appl Physiol 2005]. Existence míst s poruchou krevního průtoku díky heterogenitě krevního průtoku a tedy i zásobení O₂ - tkáňová dysoxie - s navazující mitochondriální dysfunkcí a poruchou extrakce O₂ [Fink et al., Acta Anesthesiol Scand Suppl 1997; Ince et al., Crit Care Med 2000] ústí v poškození tkání. Dochází k němu i navzdory zvýšenému srdečnímu výdeji a DO₂, které zpravidla ve většině případů provází sepsi/septický šok [Spronk et al., Crit Care 2004; Donati et al., Crit Care Res Pract 2013]. Heterogenní krevní perfúze způsobuje mnohem významnější alteraci tkáňové oxygenace než homogenně/globálně snížená [Walley et al., J Appl Physiol 1996; Goldman et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006].

Změny/poškození mikrocirkulace zřejmě nejsou jen prostým (epi)fenomémem provázejícím systémový zánět a/nebo septický šok. Vedle svého patofyziologického významu mají bezpochyby i význam prognostický, což prokazuje celá řada studií [De Backer et al., Am J Respir Crit Care Med 2002; Sakr et al., Crit Care Med 2004; Trzeciak et al., Ann Emerg Med 2007; Trzeciak et al., Intensive Care Med 2008; Top et al., Crit Care Med 2011; De Backer et al., Crit Care Med 2013]. Tyto práce dokladují významné zlepšení perfúze mikrovaskulatury u přeživších nemocných [De Backer et al., Am J Respir Crit Care Med 2002; Trzeciak et al., Ann Emerg Med 2007] v porovnání s nepřeživšími [Sakr et al., Crit Care Med 2004; Top et al., Crit Care Med 2011] a to ani v případech úspěšné léčby šokového stavu [Sakr et al., Crit Care Med 2004].

Spolu s poznáním významu dysfunkce mikrocirkulace se vyvíjely vyšetřovací metody, které umožňují její detailní zobrazení s kvalitativním a (semi)kvantitativním zhodnocením perfúze. Jejich přehled je diskutován níže (kap. 5.4.) a také v komentované původní práci, která je součástí této dizertační práce [Karvunidis et al., Intensive Care Med 2012].

2.6. HETEROGENITA A LIMITACE DOSTUPNÝCH STUDIÍ V PROBLEMATICE SYSTÉMOVÉ INFEKCE A KONTINUA SEPSE-SEPTICKÝ ŠOK

Ze všech uvedených informací o buněčných elementech a mikrocirkulaci/endoteliální dysfunkci vyplývá ambivalentnost jejich rolí v sepsi a MODS. Vedle jejich přirozených funkcí a postavení v rámci imunitního dohledu, imunitní odpovědi a patofyziologie sepse a orgánového poškození mohou hrát roli i konfliktní data plynoucí z dosavadních experimentálních i humánních studií.

Pro vývoj a přežití každého rostlinného i živočišného druhu je výhodná maximální diverzita v genetické výbavě jedinců v mezích fylogeneticky výhodných a ověřených genotypů. Odpověď imunitního systému je i přes uniformitu základních patofyziologických mechanismů vždy zcela unikátní v závislosti na genetické predispozici (genotypu), chronickém zdravotním stavu – chronických orgánových dysfunkcích a komorbiditách (diabetes mellitus aj.), stavu imunitního systému (primární/sekundární imunodeficity, imunosupresivní léčba), nutričním stavu, biologických atributech invadujícího patogenu (virulence, rezistence, konkrétní kmen/druh patogenu, nálož patogenu), místě vstupu infekce do organismu, časové prodlevě mezi rozvojem infekce a zahájením léčby a v neposlední řadě také na zvolených léčebných postupech (katecholaminy, UPV, ATB, RRT, krystaloidy/koloidy, sedace, inzulin aj.) [Janols et al., Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013].

Snaha o jednotnou diagnostiku a uniformní léčbu septických nemocných jako jedolité skupiny může parciálně vysvětlit dosavadní neúspěchy většiny protizánětlivých agens a strategií [Riedemann et al., Nat Med 2003; Boomer et al., JAMA 2011], jejichž užití bylo založeno na předpokladu „pouhé“ přehnané imunitní reakce organismu v odpovědi na invazivní infekci u tak heterogenní populace. Zjevně nelze očekávat terapeutický úspěch při snaze o izolované ovlivnění jediného mediátoru nebo funkce v celé řadě deregulovaných a dysfunkčních patofyziologických dějů a mechanismů. V současné době lze tedy spíše uvažovat o „imunitní deregulaci“ jako o velmi heterogenním stavu, který vede k progresi a udržování systémového zánětu, orgánovému poškození (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), nozokomiálními infekcím a v řadě případů až k úmrtí nemocných.

Ve světle současných poznatků lze systémový zánět v přítomnosti infekčního agens považovat za přísně individuální a patogen- a hostitel-specifický proces imunitní deregulace. V souladu s těmito poznatky byly všechny původní studie zařazené do této dizertační práce koncipovány se snahou o maximální homogenitu studovaných populací a subpopulací, uniformní a rigorózní preanalytické a vlastní analytické postupy a užití vnitřních a vnějších kontrol kvality získaných dat. Samozřejmě s vědomím, že i populace vysoce selektovaných septických nemocných je stále významně heterogenní. Původní přehledová práce [Karvunidis et al. Anest. Intenziv Med 2013] také mimo jiné poukazuje na vhodnost individualizovaného přístupu (diagnostického i terapeutického) ke každému konkrétnímu septickému nemocnému a znalosti jejich aktuálního imunologického profilu nemocných.

3. TEORETICKÝ ZÁKLAD A VYBRANÉ TECHNOLOGICKÉ ASPEKTY UŽITÝCH ANALYTICKÝCH METOD

3.1. VYŠETŘOVÁNÍ A ANALÝZA MIKROCIRKULACE

Existuje celá řada metod vyšetřování stavu mikrocirkulace. Lze analyzovat přímo perfúzi mikrocirkulace (zobrazovací metody) a/nebo nepřímo stanovovat proměnné tkáňové oxygenace (parciální tlak O_2 či CO_2 ve tkáních – tpO_2 či $tpCO_2$, saturace tkání O_2 – near-infrared spectroscopy - NIRS). Všechny metody hodnotí stav mikrocirkulace v daném časovém okamžiku a v dané lokalitě. Generalizovat takto získaná data lze následně vždy s určitou mírou chyb a opatrností s ohledem na podmínky, stav a lokalizaci místa měření [De Backer et al., Intensive Care Med 2010; De Backer et al., J Clin Monitor Comput 2013].

Jednou z metod používanou k vyšetřování stavu mikrocirkulace je laser-dopplerometrické vyšetření. Analýzou zpětně odraženého světla („back-scattered light“) je možné stanovit celkový průtok krve v určitém objemu tkáně ($0,5 - 1,0\text{mm}^3$). Nelze posoudit heterogenitu průtoku, která však je charakteristická pro mikrocirkulaci v sepsi. V současné době lze tuto metodu klinicky použít ke stanovování perfúze v kůži, regionu, který je extrémně citlivý k arteficiální vazokonstrikci a změnám daným působením vnější teploty a katecholaminů [De Backer et al., J Clin Monitor Comput 2013]. Z těchto důvodů není tato metoda ke studiu mikrocirkulace septických nemocných vhodná. V experimentálních studiích byla tato metoda s úspěchem užitá k vyšetření perfúze i kůry ledvin [Chvojka et al., Crit Care 2008; Benes et al., Crit Care 2011].

Videomikroskopie nehtového lůžka zobrazuje pomocí prosvícení této oblasti světlem běžného viditelného spektra za současného světelně mikroskopického vyšetření mikrovaskulatury této oblasti, ovšem se všemi artefakty, které přináší tato periferní lokalizace a její charakter. Tedy významné ovlivnění perfúze v důsledku okolní teploty, tělesné teploty, stavu volémie, srdečního výdeje a v neposlední řadě i použití katecholaminů a/nebo vazodilatátorů.

Další metodou zobrazení mikrocirkulace je ortogonální polarizační spektrální zobrazení (orthogonal polarization spectral imaging – OPS) vylepšené technologií „sidestream dark-field“ (SDF) [Goedhart et al., Opt Express 2007]. Principem této zobrazovací metody (intravitální videomikroskopie) je prosvícení tenké povrchové vrstvy sliznice polarizovaným světlem o vlnové délce cca 530nm emitovaným LED zdroji po obvodu objektivu přístroje, které je pohlcováno hemoglobinem bez ohledu na stav jeho oxygenace [Slaaf et al., Int J Microcirc Clin Exp 1995; Groner et al., Nat Med 1999]. Odražené depolarizované světlo je zachyceno optikou přístroje a přivedeno na CCD zobrazovací čip (videomikroskop). Touto metodou lze v reálném čase zobrazit síť kapilár a venuly, arterioly jsou zpravidla umístěny v hlubších vrstvách a nejsou dosažitelné. Erytrocyty jsou zobrazovány jako tmavé objekty (pohlcují světlo přístroje – viz výše), okolní tkáň/cévy pak ve škále šedi. Získaná data umožňují semikvantitativní hodnocení stavu/změn mikrocirkulace vč. tolik důležité informace o její heterogenitě. I přes značnou časovou náročnost v analýze a hodnocení se jedná v současné době o nejlepší dostupnou metodu vyšetření mikrocirkulace v klinických podmínkách u lůžka nemocného [De

Backer et al., Am J Resp Crit Care Med 2002; De Backer et al., Am Heart J 2004; Sakr et al., Crit Care Med 2004; Boerma et al., Crit Care 2005; De Backer et al., Crit Care 2007; Ospina-Tascon et al., Intensive Care Med 2010; De Backer et al., Crit Care Med 2010; Karvunidis et al., Intensive Care Med 2012]. K získání videosekvencí adekvátní kvality pro zajištění dostatečné reprodukovatelnosti je nezbytné vždy dodržovat doporučený pracovní postup a řadu opatření [De Backer et al., Crit Care 2007].

3.2. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Všechny buněčné elementy jsou a mohou být charakterizovány, stejně jako jejich změny v čase, analýzou exprimovaných membránových či intracelulárních antigenů/molekul. S ohledem na logistiku vyšetření, flexibilitu, časovou náročnost a reprodukovatelnost je k tomuto účelu jednoznačně nejvhodnější metodou průtoková cytometrie (flow cytometry – FCM). Tato analytická modalita má velký potenciál v časné diagnostice infekce a posouzení imunitního stavu.

Technologie FCM umožňuje velmi snadno kvantifikovat jednotlivé základní (nejen) buněčné elementy analyzovaného vzorku („cell counting“, „cell sorting“) na základě jejich velikosti (forward scatter – FS) a komplexnosti povrchové a vnitřní struktury (side scatter – SS). Nejrozličnější antigeny sledovaných buněk (receptory, adhezivní molekuly, strukturální proteiny atd.) mohou být zpravidla označeny monoklonálními protilátkami konjugovanými s různými fluorochromy, které jsou excitovány laserem a jejichž emisní signály jsou snímány a následně digitálně zpracovány. Jedná se o rychlou a přesnou metodu umožňující současné měření několika parametrů až na 10000 buňkách za sekundu. Umožňuje identifikaci různých buněčných typů uvnitř smíšené populace i analýzu jednotlivých subpopulací v rámci jedné definované buněčné populace. K nevýhodám FCM patří nedostatečná míra mezilaboratorní standardizace, z čehož pramení v řadě případů diskutabilní reprodukovatelnost výsledků, složitá preanalytika vč. nutnosti dodání biologického materiálu (např. vzorku krve) k vyšetření bezprostředně po odběru a to zejména v případě analýzy trombocytů, které jsou extrémně dynamickými elementy s proměnlivou expresí povrchových molekul [Průcha et al. Čas Lek Cesk 2009; Venet et al. Crit Care 2011; Karvunidis et al., Anest Intenziv Med 2012].

3.3. AGREGOMETRIE

Standardem v monitoraci funkce trombocytů je agregometrie. Technologie spektrofotometrické agregometrie (light-transmittance aggregometry – LTA) je založena na principu absorpce světla v agregátech trombocytů po jejich stimulaci agonisty [Shah et al. Curr Opin Haematol 2007]. Impedanční agregometrie (multiple electrode aggregometry – MEA) [Toth et al., Thromb Haemost 2006; Shah et al. Curr Opin Haematol 2007; Williams et al., Thromb Haemost 2010] ze vzorků plné krve je v porovnání se starší metodou LTA, užívající pro vyšetření pouze plazmu bohatou na destičky (platelet-rich plasma – PRP), mnohem fyziologičtější, přesnější, uživatelsky jednodušší, časově méně

náročná a zejména výsledky jsou konsolidovanější a reprodukovatelnější [Rechner et al., Hämostaseologie 2011; Seidel et al., Hämostaseologie 2011]. Principem metody je změna resp. zvýšení impedance v důsledku adheze aktivovaných destiček na elektrody přístroje. Výsledky analýzy jsou vyjádřeny magnitudou, dynamikou a celkovou agregační schopností trombocytů (plocha pod křivkou závislosti míry agregace v čase, area under the curve – AUC) ve vzorku v tzv. agregačních jednotkách (aggregation units – AU) (obr. 1).

3.4. PROTEOMICKÁ ANALÝZA

Ucelený obraz změn při systémovém zánětu může podat posouzení exprese jednotlivých genů buněčných elementů účastnících se těchto procesů analýzou mRNA pomocí čipových metodik (gene-chip analysis, micro-arrays, transkriptomika) [Bauer et al., Int J Med Microbiol 2010; Xiao et al., J Exp Med 2011; Wong et al., Crit Care 2012]. Další úroveň exprese genů je jejich translace do proteinů. Vzhledem k tomu, že v tomto procesu dochází k množství změn podstatných pro konečnou funkci proteinů - potranslačních modifikací, může stanovení skutečně produkovaných bílkovin a jejich funkce poskytnout přesnější obraz změn v odpovědi na systémovou infekci. Strukturální i funkční analýzou proteinů v konkrétním kompartmentu (plazma, leukocyty, trombocyty atd.) se zabývá proteomika [Bauer et al., Int J Med Microbiol 2010; Karvunidis et al., Shock 2009]. Přes velký potenciál a robustnost uvedených metod, jsou tyto vyhrazeny pouze experimentálním či univerzitním pracovištím a také interpretace a klinické použití velkého objemu dat, které produkují, jsou problematické a široce diskutované.

Vzhledem k absenci buněčného jádra a jen malému obsahu mRNA, jsou trombocyty výborným cílem pro proteomické studie. Existuje řada prací popisujících proteom destiček v různých stavech aktivace. Množství proteomických technik (2-DE či chromatografie následovaná různými variantami hmotnostní spektrometrie) umožňujících charakterizaci různých skupin proteinů trombocytů – proteiny cytoskeletu, proteiny uplatňující se v přenosu signálů, proteiny syntetizované destičkami v neaktivním stavu a proteiny syntetizovanými a secernovanými aktivovanými trombocyty. Technologie a metodika proteomické analýzy trombocytů je shrnuta v přehledné práci Angela Garcíi [Garcia et al., Mass Spectrom Rev 2005]. Tentýž autor pomocí 2-DE následované analýzou tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) identifikoval 311 genových produktů trombocytů [Garcia et al., Proteomics 2004]. Největší část z těchto proteinů tvoří signální molekuly (24%), proteiny účastnící se zpracování bílkovin (22%) a regulační proteiny cytoskeletu trombocytů (15%).

Metody proteomické analýzy jsou vhodné rovněž ke kvantitativnímu a kvalitativnímu vyšetřování proteinů krevní plazmy a jejich případných dynamických změn v průběhu různých (pato)fyziologických stavů jakými jsou například systémová infekce, sepse, septický šok či užití nejrůznějších extrakorporálních arteficiálních náhrad orgánů.

4. PŮVODNÍ PRÁCE

Tato dizertační práce vychází z komentovaného souboru původních klinických prací, jedné experimentální studie a přehledových článků, jejichž seznam je uveden níže.

4.1. PATOFYZIOLOGIE SEPSE – IMUNITNÍ ODPOVĚĎ A JEJÍ KOMPONENTY

Karvunidis, Thomas; Chvojka, Jiří; Lysák, Daniel; Kroužecký, Aleš; Raděj, Jaroslav; Novák, Ivan a Matějovič, Martin. Trombocyty v sepsi. *Anest Intenziv Med.* 2010; 21:342-350.

Karvunidis, Thomas; Chvojka, Jiří; Lysák, Daniel; Sýkora, Roman; Kroužecký, Aleš; Raděj, Jaroslav; Novák, Ivan a Matějovič, Martin. Septic shock and chemotherapy-induced cytopenia: effect on microcirculation. *Intensive Care Med.* 2012; 38:1336-1344. **IF 5,258** (STUDIE I).

Karvunidis, Thomas; Lysák, Daniel; Chvojka, Jiří; Ledvinová, Lenka; Raděj, Jaroslav; Novák, Ivan a Matějovič, Martin. Imunitní homeostáza (deregulace?) v sepsi a septickém šoku. *Anest Intenziv Med.* 2013; 24:250-263.

Karvunidis, Thomas; Lysák, Daniel; Moravec, Jiří; Mareš, Jan a Matějovič, Martin. *Nonhemostatic role of thrombocytes in sepsis. (manuskript v přípravě)* (STUDIE II).

4.2. PROTEOMIKA V INTENZIVNÍ PÉČI

Karvunidis, Thomas; Mareš, Jan; Thongboonkerd, Visith a Matějovič, Martin. Recent progress of proteomics in critical illness. *Shock.* 2009; 31:545-552. **IF 2,612**

Thongboonkerd, Visith; Chiangjong, Wararat; Mareš, Jan; Moravec, Jiří; Tůma, Zdeněk; **Karvunidis, Thomas;** Sinchaikul, Supachok; Chen, Shui-Tein; Opatrný, Karel a Matějovič, Martin. Altered plasma proteome during an early phase of peritonitis induced sepsis. *Clin Sci (Lond).* 2009;116:721-730. **IF 4,859** (STUDIE III)

Mareš, Jan; Thongboonkerd, Visith; Tůma, Zdeněk; Moravec, Jiří; **Karvunidis, Thomas** a Matějovič, Martin. Proteomic analysis of proteins bound to adsorption units of extracorporeal liver support system under clinical conditions. *J Proteome Res,* 2009; 8:1756-1764. **IF 5,056** (STUDIE IV)

5. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem této dizertační práce je:

1. popis a analýza změn perfúze mikrocirkulace u septických nemocných s postchemoterapeutickou neutropenií, resp. cytopenií, porovnání s nálezy u populace jedinců se septickým šokem a normálním počtem krevních elementů a posouzení paradigmatu centrální role neutrofilů v procesu poškození mikrocirkulace;
2. multifaktoriální analýza nehemostatických charakteristik trombocytů v časně fázi rozvoje septického šoku;
3. analýza a kvantifikace změn v profilu plazmatických proteinů v časně fázi sepse v klinicky relevantním experimentálním zvířecím modelu sepse při sterkorální peritonitidě pomocí proteomické analýzy;
4. kvalitativní a kvantitativní analýza vazby plazmatických proteinů na adsorpční jednotky systému pro extrakorporální náhradu funkce jater u nemocného s jejich selháním.

6. ETICKÉ A LEGÁLNÍ ASPEKTY STUDIÍ

Všechny naše klinické studie byly vždy řádně schváleny Etickou komisí při Lékařské fakultě a Fakultní nemocnici v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze. Od všech participantů v klinických studiích byl získán informovaný souhlas s účastí ve studii. Bez ohledu na zařazení do studií byli všichni nemocní vždy léčeni dle nejnovějších a ověřených medicínských poznatků (*lege artis*).

Experimentální studie na zvířatech byla provedena v souladu se závaznými doporučeními pro práci s laboratorními zvířaty a studijní protokol byl schválen Komisí pro práci s pokusnými zvířaty Univerzity Karlovy.

7. METODY, STUDOVANÉ POPULACE A PROTOKOLY STUDIÍ

Podrobný popis a charakteristika skupin nemocných, procesy a podmínky zařazení či naopak nezařazení do studií, povaha a použité metody jsou podrobně popsány v příložených původních pracích. Proto jsou níže pouze stručně zmíněny užití metodické aspekty a je diskutována jejich volba v kontextu daných populací jedinců a studií.

7.1. STUDIE I: SEPTICKÝ ŠOK A NEUTROPENIE/CYTOPENIE - VLIV NA MIKROCIRKULACI

7.1.1. DESIGN STUDIE A SOUBOR NEMOCNÝCH

Studie byla koncipována jako prospektivní monocentrická a observační.

Soubor nemocných byl rozdělen na tři skupiny: pacienti se septickým šokem bez neutropenie/cytopenie (SS), nemocní se septickým šokem a postchemoterapeutickou neutropenií/cytopenií (NSS) a neutropeničtí/cytopeničtí nemocní bez známek systémové infekce (NEUTR). Pro posouzení změn mikrocirkulace v porovnání se zdravou populací byla zařazena i skupina zdravých dobrovolníků.

7.1.2. PROTOKOL STUDIE

V prvním časovém bodě studie (timepoint – TP1) byly provedeny všechny iniciační vyšetření, měření, sběry dat a odběry biologického materiálu k plánovaným vyšetřením, a to ideálně do 12 hodin, respektive maximálně do 24 hodin, od naplnění kritérií těžké sepse/septického šoku a/nebo neutropenie resp. cytopenie. U přeživších nemocných po spolehlivé rezoluci septického stavu a/nebo neutropenie a za současné absence známek nové komplikující systémové infekce byla provedena kontrolní vyšetření, měření, sběr dat a odběry vzorků k analýzám (TP 2). Paralelně byla stejnými postupy vyšetřena skupina nemocných bez známek systémové infekce s cytopenií navozenou chemoterapií (TP1) a po reparaci krevních elementů byly tyto analýzy zopakovány (TP2).

7.1.3. DEMOGRAFICKÁ, (MAKRO)HEMODYNAMICKÁ A LABORATORNÍ DATA

Shromažďovaná demografická data byla následující: pohlaví, věk, zdroj infekce, skóre tíže onemocnění (APACHE II, SOFA), JIP mortalita a nemocniční mortalita. Zaznamenávané proměnné makrohemodynamiky a laboratorních parametrů zahrnovaly srdeční/tepovou frekvenci (TF), střední arteriální tlak (mean arterial pressure – MAP), centrální žilní tlak (central venous pressure – CVP), diuréza (ml/h), arteriální krevní plyny (pO_2 , pCO_2), parametry acidobazické rovnováhy (pH, HCO_3^- , BE), laktatémie (arteriální), saturaci krve kyslíkem (SpO_2 ; pulzní oxymetrie a laboratorní stanovení), saturaci venózní krve kyslíkem v centrální žíle ($S_{cv}O_2$), kompletní krevní obraz, kompletní koagulační vyšetření (aPTT, PT, trombinový čas, D-dimery, AT) a laboratorní markery orgánových funkcí

(bilirubin, urea a kreatinin) a systémového zánětu (CRP). Doplňujícími byly informace o užití a dávce vazoaktivních a inotropních léků a analgosedace.

7.1.4. METODY VYŠETŘOVÁNÍ A ANALÝZY MIKROCIRKULACE

Ve studii byla vyšetřována mikrocirkulace v oblasti sublinguální mukózy příručním zařízením technologií OPS-SDF s pětinasobným optickým zvětšením (Microscan, MicroVision Medical, Amsterdam, Nizozemí). Získání a záznam videosekvencí byl vždy prováděn pracovníky s dostatečnými a prověřenými znalostmi, dovednostmi a zkušenostmi v této oblasti [Chvojka J et al., Crit Care 2008; Sýkora R et al., Intensive Care Med 2009; Matějovič et al., J Int Med Res 2011]. Od každého nemocného zařazeného do studie byly získány videosekvence o minimální délce 20s z pěti odlišných míst sliznice pod jazykem. Tyto byly uloženy pod anonymním kódovým označením na pevný disk počítače k pozdější analýze. Následně byly snímek po snímku analyzovány za pomoci dedikovaného softwaru (Microscan Analysis Software a Automated Vascular Analysis v3.0, MicroVisionMedical, Amsterdam, Nizozemí) a získány stabilní videosekvence k hodnocení mikrocirkulace. Kvantitativní analýza spočívala ve stanovení celkové hustoty cév na dané ploše (total vessel density – TVD). Tento parametr byl kalkulován jako celková délka cév o průměru <20 μ m dělená odpovídající plochou a výsledek byl poté uveden v mm/mm². Dále byla vizuálně kategorizována perfúze mikrovaskulaturou: kontinuální perfúze (průtok krve minimálně 20s), intermitentní perfúze (absence průtoku minimálně 50% sledovaného času) a žádná perfúze (absence průtoku krve nejméně 20s). Parametr proporce perfundovaných cév (proportion of perfused vessels – PPV) vyjádřený v procentech (%) byl stanoven následovně: 100 x (celkový počet cév – [cévy bez perfúze + cévy s intermitentním průtokem]) / celkový počet cév. Proměnná informující o hustotě skutečně perfundovaných cév v dané oblasti/ploše – hustota perfundovaných cév (perfused vessel density – PVD) byl získán násobením TVD parametrem PPV. Semikvantitativní hodnocení heterogenity krevního toku mikrocirkulací bylo vyjádřeno parametry index středního průtoku (mean flow index – MFI) a index heterogenity průtoku (flow heterogeneity index – FHI) [Boerma et al., Crit Care 2005; De Backer et al., Crit Care 2007; Trzeciak et al., Ann Emerg Med 2007]. Parametry TVD, PPV, PVD a MFI byly vypočteny ve všech pěti lokalitách u každého jedince a následně průměrovány.

7.1.5. STATISTICKÁ ANALÝZA

Získaná data byla statisticky zpracována pomocí softwarů Sigma Stat 3.5 (Dundas Software GmbH, Spolková republika Německo) a Statistika 7.1 (StatSoft Inc., Česká republika). Všechna data jsou prezentována jako mediány s interkvartilovým rozpětím (interquartile range, IQR) pokud není uvedeno jinak. Nejprve byla potvrzena či vyloučena normální distribuce dat konkrétních proměnných pomocí (Kolmogorovův-Smirnovův test). Proměnné mezi jednotlivými skupinami ve stejných časových bodech byly porovnávány testem Kruskal-Wallis one way analysis of variances (ANOVA) on ranks. Data mezi dvěma timepointy jednotlivých skupin nemocných byla srovnávána Mann-Whitney rank-sum testem. Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

7.2. STUDIE II: ÚLOHA TROMBOCYTŮ V SEPTICKÉM ŠOKU

7.2.1. DESIGN STUDIE A SOUBOR NEMOCNÝCH

Studie byla koncipována jako prospektivní monocentrická a observační.

Soubor nemocných byl rozdělen na tři skupiny: pacienti se septickým šokem bez trombocytopenie a DIC (SS), nemocní se septickým šokem a trombocytopenií bez DIC (SST) a jedinci v septickém šoku s DIC (SSD). Toto rozdělení bylo zvoleno k možnému posouzení případných odlišností nehemostatických funkcí destiček při trombocytopenii a DCI. Trombocytopenie byla arbitrárně definována jako počet destiček $<100 \times 10^9/l$. DIC byla diagnostikována s užitím parametrů počtu trombocytů, fibrin-degradačních produktů, protrombinového času a hladiny fibrinogenu dle validovaných doporučení ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) [Taylor FB et al. Thromb Haemost 2001; Bakhtiari K et al. Crit Care Med 2004; Gando S et al. Crit Care Med 2006].

7.2.2. PROTOKOL STUDIE

Pracovní protokol studie byl rozdělen na tři fáze. V první (časový bod 1, timepoint 1, TP1) byli nemocní splňující kritéria přijetí zařazeni do studie a současně byly provedeny všechny iniciační vyšetření, měření, sběry dat a odběry biologického materiálu k plánovaným vyšetřením (TP 1) a to ideálně do 12 hodin, respektive maximálně do 24 hodin, od naplnění kritérií septického šoku. Dle získaných výsledků byly subjekty zařazeny do jednotlivých podskupin, jak je popsáno výše (kap. 7.2.1). Ve druhé fázi byli pacienti léčeni dle aktuálních doporučení a poznatků. U všech přeživších nemocných po spolehlivé rezoluci septického stavu, trombocytopenie a DIC a za současné absence známek nové komplikující systémové infekce byla provedena kontrolní vyšetření, měření, sběr dat a odběry vzorků k analýzám (TP 2).

7.2.3. DEMOGRAFICKÁ, (MAKRO)HEMODYNAMICKÁ A LABORATORNÍ DATA

Shromažďovaná demografická data byla následující: pohlaví, věk, zdroj infekce, skóre tíže onemocnění (APACHE II, SOFA), JIP mortalita a nemocniční mortalita. Zaznamenávané proměnné makrohemodynamiky a laboratorních parametrů zahrnovaly srdeční/tepovou frekvenci (TF), střední arteriální tlak (mean arterial pressure – MAP), centrální žilní tlak (central venous pressure – CVP), diuréza (ml/h), arteriální krevní plyny (pO_2 , pCO_2), parametry acidobazické rovnováhy (pH, HCO_3^- , BE), laktatémie (arteriální), saturaci krve kyslíkem (SpO_2 ; pulzní oxymetrie a laboratorní stanovení), saturaci venózní krve kyslíkem v centrální žíle ($S_{cv}O_2$), kompletní krevní obraz, kompletní koagulační vyšetření (aPTT, PT, trombinový čas, D-dimery, AT) a laboratorní markery orgánových funkcí (bilirubin, urea a kreatinin) a systémového zánětu (CRP a event. PCT). Doplnujícími byly informace o užití a dávce vazopresorů a inotropních léků a analgosedace.

7.2.4. METODY ANALÝZY TROMBOCYTŮ PRŮTOKOVOU CYTOMETRIÍ

Multifaktoriální analýza trombocytů zahrnovala i stanovení aktivace trombocytů a její magnitudy. K tomuto účelu jsme použili FCM stanovení membránové exprese znaku CD41/CD61 (GPIIb/IIIa,

PAC-1) (obr. 1), který po aktivaci trombocytu podléhá konformační změně. Současně byla identifikována přítomnost adhezivní molekuly CD62p (P-selektin), která je po aktivaci destiček uvolněna z α -granul, vystavena v buněčné membráně a relativně rychle uvolněna do cirkulace jako sCD62p [Shebuski et al., J Pharmacol Exp Ther 2002; Yaguchi et al., J Thromb Haemost 2004; Michelson et al., Pathophysiol Haemost Thromb 2006]. Ke stanovení byly použity komerční kity reagensí PAC-1-FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) a anti-CD62-PE (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), průtokový cytometr (Becton Coulter Epics XL, Franklin Lakes, NJ, USA) s analytickým softwarem (Becton System II, Franklin Lakes, NJ, USA).

Vzhledem k významné reaktivitě trombocytů *in vivo*, velmi dynamickým změnám jejich fenotypu, potřebě znalosti „normálních hodnot“ a také jako externí kontrola kvality FCM vyšetření byla výše uvedená analýza provedena i na demograficky neadjustovaném vzorku zdravých dobrovolníků (N=24).

7.2.5. AGREGOMETRICKÁ ANALÝZA TROMBOCYTŮ

Dynamickým funkčním testem použitým v této studii bylo vyšetření agregace trombocytů – agregometrie. Vzorky plné krve odebrané v TP1 a TP2 speciálním odběrovým systémem s hirudinem (zabránění arteficiální aktivace trombocytů) byly bezprostředně po odběru vyšetřeny metodou MEA (Multiplate, Dynabite Medical, Mnichov, SRN). Použity byly protokoly aktivace destiček následujícími agonisty: ADP (P2Y₁₂ receptor), ASPI (receptor pro kyselinu arachidonovou) a TRAP (trombin receptor agonist peptide-6 - GPIIb/IIIa). Výsledky analýzy byly vyjádřeny magnitudou, dynamikou a celkovou agregační schopností trombocytů (plocha pod křivkou závislosti míry agregace v čase, area under the curve – AUC) ve vzorku v tzv. agregačních jednotkách (aggregation units – AU) a dále statisticky zpracovány (obr. 2).

7.2.6. PROTEOMICKÁ ANALÝZA

Vlastní proteomická analýza použitá v této studii se skládala z několika kroků [Zellner et al., Electrophoresis 2005; Shevchenko et al., Nat Protocols 2006; Mares et al., Proteomics – Clin Appl 2010]. Jako v případě jiných vyšetření bylo vzhledem k extrémní reaktivitě trombocytů nezbytné zpracování a vyšetření vzorků plné krve zahájit bezprostředně po jejich odběru. V procesu izolace trombocytů byly tyto separovány od zbylých krevních elementů šetrnou centrifugací, čímž byla získána plazma bohatá na destičky (PRP). Destičky byly následně odděleny od plazmy, aby se zabránilo jejich další arteficiální aktivaci, metodou gelové filtrace (size-exclusion chromatography – SEC). Dalším krokem byla precipitace proteinů ze získaného koncentrátu trombocytů, již bylo dosaženo další centrifugací a ošetřením chladem a etanolem. Získané purifikované precipitované destičkové proteiny byly následně separovány dvourozměrnou elektroforézou (2-DE) (obr. 3) a vybrané proteiny (rozdílná exprese v septickém šoku a po rezoluci systémové infekce) poté z gelu mobilizovány (in-gel tryptic digestion) [Shevchenko et al., Nat Protocols 2006; Karvunidis et al., Shock 2009]. V současné době probíhá analýza těchto proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry – MALDI-TOF/TOF). Výsledkem budou

identifikované proteiny, charakterizující konkrétní funkční stav trombocytů ve všech sledovaných skupinách.

7.2.7. STATISTICKÁ ANALÝZA

Dosud získaná data byla statisticky zpracována pomocí softwarů Sigma Stat 3.5 (Dundas Software GmbH, Spolková republika Německo) a Statistika 7.1 (StatSoft Inc., Česká republika). Všechna data jsou prezentována jako mediány s interkvartilovým rozpětím (interquartile range, IQR) pokud není uvedeno jinak. Nejprve byla potvrzena či vyloučena normální distribuce dat konkrétních proměnných pomocí Kolmogorovova-Smirnovova testu. Proměnné mezi jednotlivými skupinami ve stejných časových bodech byly porovnávány testem Kruskal-Wallis one way analysis of variances (ANOVA) on ranks. Data mezi dvěma timepointy jednotlivých skupin nemocných byla srovnávána Mann-Whitney rank-sum testem. Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

7.3. STUDIE III: ZMĚNY PLAZMATICKÉHO PROTEOMU V ČASNÉ FÁZI EXPERIMENTÁLNÍHO SEPTICKÉHO ŠOKU

7.3.1. DESIGN STUDIE A SOUBOR SUBJEKTŮ

Tato experimentální studie byla provedena jako monocentrická prospektivní na zavedeném klinicky relevantním zvířecím modelu septického šoku selete [Chvojka et al. Crit Care 2008; Sykora et al. Intensive Care Med 2009; Benes et al. Crit Care 2011].

7.3.2. PROTOKOL STUDIE

Testované zvířecí subjekty byly v úvodu experimentu anestetizovány, instrumentovány a extenzivně monitorovány. Následovala šestihodinová zotavovací perioda, na jejímž konci byla provedena první série vyšetření, měření a odběru biologických vzorků k analýzám (vč. proteomiky) – TP1. Poté byla indukována peritonitida inokulací definovaného množství autologní stolice do břišní dutiny. Všechny selata vyvinula hyperdynamický septický šok a po 12 hodinách byla provedena druhá série měření, vyšetření a odběru vzorků - TP2. Následně byl pokus ukončen standardizovaným usmrčením zvířat intravenózní aplikací koncentrovaného roztoku KCl za hluboké celkové anestezie.

7.3.3. (MAKRO)HEMODYNAMICKÁ A LABORATORNÍ DATA

V experimentu byly sledovány kompletní hemodynamické parametry, proměnné oxygenace, laboratorní markery systémové zánětlivé odpovědi (leukocyty, CRP, TNF- α , IL-6 aj.), oxidativního a nitrosativního stresu (TBARS, NOx) a další běžné laboratorní hodnoty. Ke korekci možného vlivu diluce při tekutinové resuscitaci studovaných subjektů v septickém šoku byla většina plazmatických hladin proměnných přepočítána na aktuální hladinu plazmatických proteinů.

7.3.4. PROTEOMICKÁ ANALÝZA

Srovnávací proteomická analýza plazmy v časně fázi experimentálního septického šoku využila separaci a imobilizaci proteinů párových vzorků 2D gelovou elektroforézou (Ettan IPGphor II IEF System a SE260 mini-vertical electrophoresis unit, GE Healthcare) po jejich předchozí přípravě a ekvilibraci koncentrací bílkovin (200 μ g/vzorek). Následným softwarovým srovnáním získaných obrazů gelů (Image Master 2D Platinum, GE Healthcare) před a po indukci septického šoku byly vybrány kandidátní fixované proteiny s významně odlišnou intenzitou. Tyto byly z gelu opět mobilizovány a resuspendovány k další analýze a identifikaci pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MALDI-Q-TOF MS a MS/MS, Micromass Q-TOF Ultima, MSVision). Získaná data byla softwarově porovnána (ProteinLynx GlobalSERVER 2.0) s databází proteinů savců (National Center for Biotechnology Information, NCBI) a funkční zařazení identifikovaných proteinů a jejich postavení v biologických procesech bylo provedeno za využití softwaru Pathway Tools 12.5 (<http://bioinformatics.ai.sri.com/ptools/>) [Karp et al. Science 2001; Karp et al. Bioinformatics 2002].

7.3.5. STATISTICKÁ ANALÝZA

Všechny data jsou prezentována formou průměru a směrodatné odchylky pokud není uvedeno jinak. K porovnání dat ve dvou časových bodech byl použit párový Studentův t-test či Wilcoxonův test. Hladina statistické významnosti byla stanovena na hodnotu $p < 0,05$.

7.4. STUDIE IV: PROTEOMICKÁ ANALÝZA SPEKTRA BÍLKOVIN ADSORBOVANÝCH NA MEMBRÁNĚ MIMOTĚLNÍHO SYSTÉMU NÁHRADY FUNKCE JATER

7.4.1. DESIGN STUDIE

Deskriptivní proteomická analýza proteinů adsorbovaných na membráně extrakorporálního systému náhrady funkce jater u 37 letého nemocného s akutním selháním jater v terénu chronické hepatopatie etylické etiologie.

7.4.2. PROTOKOL STUDIE

Pacient byl léčen pomocí přístroje pro mimotělní náhradu funkce jater (Fractioned Plasma Separation, Adsorption and Dialysis - Prometheus™, Homburg, SRN) s regionální citrátovou antikoagulací. Systém se skládal ze dvou adsorpčních kolon obsahujících partikule (styrendivinybenzen kopolymer) s neutrálním resinem (P1) a anionovým měničem (P2) (obr.4). Po šesti hodinách byla procedura ukončena a obě kolony důkladně promyty. Proteiny navázané v první, neutrální, koloně byly mobilizovány sodiumdodecylsulfátem (SDS), ve druhé, aniontové, pak kyselinou octovou. Získané eluáty obsahující adsorbované proteiny byly použity k další analýze.

7.4.3. PROTEOMICKÁ ANALÝZA

Eluáty obou kolon (P1 a P2) byly purifikovány a dialyzovány (Serva-Electrophoresis, Heidelberg, SRN), rozděleny do tří alikvot a obsažené proteiny následně separovány 2D elektroforézou (IPG, Invitrogen; MiniProtean, Bio-Rad). Obdobně byl zpracován i vzorek krevní plazmy nemocného (CTRL) odebraný před zahájením náhrady funkce jater. Všech devět výsledných gelů s imobilizovanými proteiny bylo digitalizováno pomocí scanneru (Epson Perfection 4900 Photo Scanner). Z každé trojice snímků v rámci jednoho původního vzorku (P1 nebo P2 nebo CTRL) byl softwarově syntetizován jeden kompozitní snímek a ten byl následně analyzován (PDQuest 2-D v. 8.1, Bio-Rad). Byly srovnávány relativní denzity jednotlivých proteinů a za signifikantní byly považovány více než dvojnásobné rozdíly v jejich intenzitě.

Vybrané kandidátní proteiny s významnými změnami koncentrací/intenzit mezi jednotlivými vzorky byly z gelů imobilizovány, resuspendovány a následně vyšetřeny pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF/TOF Analyzer, Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Získaná hrubá data byla shromážděna a analyzována softwarově (GPS Explorer 3.6, Applied Biosystems). Z nich byla provedena identifikace proteinů porovnáním s databází humánních bílkovin (Swiss-Prot protein database, release 54.6, 4.12.2007).

7.4.4. STATISTICKÁ ANALÝZA

Data byla zpracována pomocí softwaru Sigma Plot/Sigma Stat 12.0 (SPSS Inc., USA) a jsou prezentována jako relativní hodnoty či průměry se směrodatnou odchylkou. K porovnání hodnot mezi jednotlivými vzorky byl použit Mann-Whitney rank sum test, k posouzení asociací mezi jednotlivými proměnnými pak Spearmanův korelační test.

8. VÝSLEDKY STUDIÍ A DISKUZE

8.1. STUDIE I: SEPTICKÝ ŠOK A NEUTROPENIE/CYTOPENIE – VLIV NA MIKROCIRKULACI

Skupiny nemocných se septickým šokem (SS a NSS) se s výjimkou věku v demografických datech nelišily, a to ani v mortalitě. Identické byly rovněž makrohemodynamické a laboratorní proměnné. Tíže neutropenie/cytopenie byla ve skupinách NSS a NEUTR srovnatelná. Přímá vizualizace mikrocirkulace v sublinguální oblasti u nemocných v septickém šoku prokázala významné změny perfúze mikrovaskulatury s alterací magnitudy průtoku (parametry TVD, PPV a PVD) i charakteristickým zvýšením heterogenity krevního průtoku (parametry MFI a FHI), bez ohledu na přítomnost neutropenie/cytopenie. Tyto změny plně korespondují s již literárně dokumentovanými v populaci septických jedinců [Trzeciak et al. Ann Emerg Med 2007; Boerma et al., Crit Care Med 2007; Ruiz et al., Crit Care 2010].

Analýza mikrocirkulace prokázala její signifikantní postižení ve všech sledovaných skupinách v porovnání s kontrolní populací jedinců. Mezi skupinami SS a NSS nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Alterace mikrocirkulace nemocných s postchemoterapeutickou neutropenií/cytopenií bez známek systémové infekce (NEUTR) byla identická s postižením obou populací septických nemocných (SS a NSS). Navíc jsme nezaznamenali jakýkoliv prospěch (ve smyslu méně závažného klinického průběhu; viz též kap. 2.2.) neutropenie/cytopenie u nemocných se septickým šokem a neutropenií v porovnání se septickými nemocnými s normálním počtem leukocytů. Z uvedeného lze usuzovat, že role periferních cirkulujících leukocytů zřejmě není rozhodující v rozvoji alterace mikrocirkulace v sepsi. Na druhou stranu nelze vyloučit případný vliv a roli již aktivovaných reziduálních neutrofilů marginujících a sekvastrovaných v mikrocirkulaci. Svoji roli jistě mohou sehrávat i další imunokompetentní elementy jako NK-buňky a/nebo dendritické buňky a samozřejmě i trombocyty [Leung et al., Clin Dev Immunol 2010; Efron et al., Shock 2003; Zarbock et al., Blood Rev 2007; Karvunidis et al., Anesteziol Intenziv Med 2013]. Nezanedbatelný vliv může mít také poškození endotelu chemoterapií [Wakabayashi et al., Curr Med Chem 2003; Albin et al., J Natl Cancer Inst 2010; Senkus et al., Cancer Treat Rev 2011].

Zajímavá a opět překvapující data přinesla i analýza období reparace změn mikrocirkulace. Zlepšení perfúze mikrovaskulatury (zejména heterogenity průtoku vyjádřeného proměnnými MFI a FHI) bylo signifikantně lepší ve skupině NSS než u septických nemocných s normálním počtem neutrofilů (viz obr. 1 a 2 v původní práci). Vysvětlení není zcela zřejmé. Lze uvažovat o souvislosti s významně rychlejším poklesem CRP, hrubě ukazujícím na vývoj/rezoluci infekce, u populace NSS, přičemž interval TP1 – TP2 byl u obou skupin stejný [Schmit et al., Infection 2008]. Zda v rychlejší kontrole infekce sehrávají roli reparované imunokompetentní buňky včetně neutrofilů nebo se na ní podílela přetrvávající trombocytopenie u NSS, není možné z dostupných dat vyvozovat.

I přes menší počet jedinců ve studovaných vzorcích populace tato studie prokazuje, že ani těžká postchemoterapeutická cytopenie nemodifikuje poruchu mikrocirkulace v septickém šoku. Obecné

mechanizmy a klinický význam poškození mikrovaskulatury v souvislosti s myeloablativní terapií nejsou zjevné a vybízejí k navazujícímu výzkumu.

8.2. STUDIE II: ÚLOHA TROMBOCYTŮ V SEPTICKÉM ŠOKU

Základní demografická data se v jednotlivých skupinách této studie nelišila. Pouze mortalita byla významně vyšší ve skupině nemocných se septickým šokem a současnou DIC (SSD). Tuto více než dvojnásobnou mortalitu v porovnání s ostatními dvěma skupinami jedinců v septickém šoku (SS a SST), však nebylo možno predikovat užitými standardními skórovacími systémy (APACHE II a SOFA), jejichž hodnoty se v jednotlivých skupinách statisticky významně nelišily (tab. 7). Také míra trombocytopenie (tab. 8), která se dle literárních dat jeví silným a nezávislým prediktorem mortality [Vanderschueren et al., Crit Care Med 2000; Mavrommatis et al., Crit Care Med 2000; Strauss et al., Crit Care Med 2002; Russwurm et al., Shock 2002], a která byla nejnižší (byť nedosahovala statistické významnosti) v nemocných ve skupině SST, nepředpovídala tento nepříznivý vývoj stavu pacientů.

Data získaná flowcytometrickou analýzou povrchových/membránových markerů aktivace trombocytů (konformační změna GP IIb/IIIa a exprese CD62p) ukazují a potvrzují přítomnost aktivovaných destiček v iniciální fázi septického šoku (TP 1) napříč všemi třemi studijními podskupinami (tab. 9 a obr. 5). Míra exprese těchto znaků v době kompletní rezoluce systémového zánětu (TP 2) trendově poklesla. Inverzní dynamikou změn je charakterizována agregační schopnost trombocytů. Dle MEA je agregační schopnost destiček v době rozvinutého septického šoku zejména ve skupinách SST a SSD významně porušena. Vzhledem k tomu, že dynamika agregace (časový parametr – „aggregation velocity“) je napříč skupinami identická, nelze pozorovaný efekt snížení agregačních schopností připisovat pouze sníženému počtu trombocytů, jak by se na první pohled mohlo zdát (tab. 9 a obr. 2). Sekreční schopnost trombocytů charakterizovaná plazmatickými hladinami růstových faktorů VEGF a PDGF je v septickém stavu obdobně jako výše diskutovaná agregační schopnost významně snížená (tab. 9).

Souhrnně studie prokazuje aktivaci trombocytů, expresi adhezivních molekul se současnou poruchou jejich hemostatické funkce (porucha agregace) a alteraci sekrece v iniciální fázi rozvinutého septického šoku. CD62p (P-selektin) i VEGF jsou za normálních okolností obsaženy v α -granulích a tedy simultánní zvýšení exprese P-selektinu a snížení sekrece VEGF je v logickém rozporu. Lze uvažovat o alteraci obsahu α -granul již na úrovni megakaryocytů kostní dřeně v důsledku systémového zánětu. Dynamika těchto změn by však musela být velmi významná a uvažovaná alterace genové exprese na úrovni megakaryocytů by musela probíhat již od samého počátku systémové infekce, jelikož naše data popisují stav již 12-24 hodin od splnění kritérií těžké sepse/septického šoku. Na druhé straně lze také zvažovat extranukleární cesty (*de novo*) syntézy funkčních proteinů a fenotypické změny na úrovních již maturovaných cirkulujících trombocytů [Weyrich et al. J Thromb Haemost 2009]. Právě tyto změny ve složení proteinů, a tedy možné cesty alterující signalizace mohou být identifikovány v současné době probíhající proteomickou analýzou studovaných dvou funkčních stavů trombocytů (obr. 6).

S ohledem na dostupné výsledky této studie je třeba zmínit potenciální slabiny uvedené práce. Malý počet nemocných v jednotlivých skupinách může být příčinou nedostatečné statistické síly uvedených dat a maskovat i potenciálně silné trendy uvedených změn (exprese markerů aktivace a adhezivních

molekul). I přes snahu o maximální homogenitu celého souboru nemocných i jednotlivých podskupin lze v kontextu současného paradigmatu přísně individualizované hostitel- a patogen-specifické imunitní odpovědi diskutovat variabilitu souboru s ohledem na vyvolávající infekční agens a/nebo zdroj infekce. Potenciální chybovost lze v použitých analytických metodách spatřovat zejména ve flowcytometrickém stanovení membránových znaků aktivace trombocytů. Počet těchto molekul je velmi nízký, v pásmu těsně nad detekční schopností použité technologie (detekce fluorescence). Zbývající použité metody jsou již dostatečně robustní. V neposlední řadě je nezbytné si uvědomit, že studované trombocyty jsou součástí cirkulující populace a že trombocyty bezprostředně zavzaté do procesu (lokální) inflamace, jejichž fenotyp a funkce mohou být zásadně změněny a odlišné, jsou již marginující k endotelu a nejsou tak standardním vyšetřením dostupné.

Tato práce unikátně integruje uvedené množství a kombinaci analytických metod ve studiu nehemostatických funkcí trombocytů v sepsi. Představuje komplexní náhled na změny jejich fenotypu, které jsou důsledkem a současně i příčinou progresu sepse. Navazující výzkum může vést k identifikaci potenciálních terapeutických cílů k selektivní modulaci nehemostatických funkcí

8.3. STUDIE III: ZMĚNY PLAZMATICKÉHO PROTEOMU V ČASNÉ FÁZI EXPERIMENTÁLNÍHO SEPTICKÉHO ŠOKU

Tato studie byla první studující změnu plazmatického proteomu u klinicky relevantního modelu septického šoku na velkém savci.

Všech sedm experimentálních subjektů vyvinulo hyperdynamický septický šok (tab. 1 v původní práci). Srovnání plazmatických proteinů před a 12 hodin po indukci septického šoku kvantitativní analýzou jejich intenzity při 2DE vedlo k identifikaci 36 proteinů s odlišnou intenzitou (obr. 1v původní práci). Z těchto bylo 30 s vyšší intenzitou v septickém šoku a 6 s intenzitou sníženou. Všechny tyto proteiny byly následně analyzovány pomocí Q-TOF MS a MS/MS. Po vyloučení všech izoform v důsledku potranslačních modifikací bylo nakonec identifikováno 22 unikátních proteinů s vyšší expresí a 5 se sníženou expresí v časně fázi experimentálního septického šoku. Jejich molekulární funkce, začlenění do biologických procesů a subcelulární lokalizace byly určeny pomocí softwaru Pathway Tools a jsou shrnuty v tab. S1 (suplementum originálního článku v příloze). Obecně se jedná o proteiny účastnící se zánětlivé odpovědi hostitele (např. haptoglobin, CD14, vitronectin aj.), procesů oxidativního či nitrosativního stresu (hemopexin, cytochrom P450f3sfApp414 aj.) a řada z nich by teoreticky po jejich bližším poznání a případné validaci mohla sloužit jako časné markery systémové infekce.

Tato studie také mimo jiné ukazuje možnosti analytické metody – proteomiky – ve studiu patofyziologie sepse.

8.4. STUDIE IV: PROTEOMICKÁ ANALÝZA SPEKTRA BÍLKOVIN ADSORBOVANÝCH NA MEMBRÁNĚ MIMOTĚLNÍHO SYSTÉMU NÁHRADY FUNKCE JATER

Promytím adsorpčních kolon FPSA bylo získáno celkem 4113mg (47,2mg/ml) (P1) a 8280mg (97,2mg/ml) (P2). Jejich následnou separací 2DE bylo identifikováno 148 (P1) a 163 (P2) proteinových stop. Většina (95%) proteinových stop bylo zaznamenáno v intervalu molekulární hmotnosti (MW) 30-150kDa a izoelektrického bodu (pI) 4,8-8,6. Charakteristika separovaných proteinů se mezi P1 a P2 významně lišila (celkem 64 proteinů s odlišnou intenzitou, $p < 0,05$) (obr. 1. originální práce). Právě dle MW a pI bylo možné konstatovat, že adsorpční kolona P1 váže preferenčně proteiny s vysokou molekulární hmotností, kdežto P2 odstraňuje z cirkulace proteiny kyselé.

Všechny proteinové stopy s relativní intenzitou větší než 1000ppm byly z gelů mobilizovány a dále analyzovány pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie. Ze 109 proteinů z P1 jich bylo úspěšně charakterizováno 72 představujících celkem 18 unikátních proteinů (tab. 1 původního manuskriptu). Třicet unikátních proteinů bylo výsledkem MS analýzy 113 a následně identifikovaných 93 bílkovin (tab. 2 původní práce).

Membrána systému Prometheus užitá k separaci plazmy měla filtrační koeficient (sieving coefficient) 0,9 pro proteiny s MW 40kDa a 0,1 pro proteiny s MW 300kDa. Tak byla umožněna volná filtrace bílkovin až do velikosti albuminu a nedocházelo k prostupu fibrinogenu a gamaglobulinů a jejich ztrátám. Naše analýza souhlasně s tímto předpokladem detekovala proteiny do MW 200kDa. Očekávaně také došlo k selektivní adsorpci bílkovin v jednotlivých kolonách, zejména díky jejich elektrickému náboji (P1 – neutrální, P2 – kladný) jak dokazuje preferenční vazba proteinů s negativním nábojem v P2. Překvapující však bylo zjištění, že v P1 jsou adsorbovány bílkoviny s větší MW. Toto pozorování nelze zcela vysvětlit ani danou charakteristikou propustnosti filtru P1 a zapojením v sérii s P2, jelikož filtrační koeficient P1 pro proteiny s MW 200kDa je stále 0,2 a tedy i tyto molekuly mohou filtrem procházet směrem k P2. Možnou chybou může být limitovaná schopnost 2DE v detekci hydrofobních proteinů, které mají větší afinitu k neutrálnímu resinu v P1 a mohly tak uniknout analýze.

Vzhledem k tomu, že se v případě této studie jedná o data získaná analýzou jednoho nemocného, nelze z nich činit klinické závěry s ohledem na význam selektivně odstraňovaných proteinů v patogenezi a vývoji selhání jater a další vývoj klinického stavu nemocného (prospěšnost či naopak). V některých konkrétních případech identifikovaných bílkovin lze o konsekvencích jejich eliminace v konkrétním klinickém stavu spekulovat, jak uvádí detailně původní práce.

Studie však ukazuje využitelnost a vhodnost proteomické analýzy v bližším poznání užití FPSA a otvírá pole pro další výzkum a poznání.

9. ZÁVĚR

Tato dizertační práce zabývající se celulárními imunitními mechanizmy, metodologickými aspekty monitorace mikrocirkulace, užití průtokové cytometrie a proteomické analýzy v patofyziologii sepse, septického šoku a MODS v klinické studii prokazuje absenci rozdílu změn mikrocirkulace u nemocných v septickém šoku bez a s postchemoterapeutickou cytopenií a oponuje dosavadní paradigma centrální role neutrofilů v indukci a modulaci poškození mikrovaskulatury. Současně také rozporuje stávající důkazy o protektivním vlivu neutropenie (a trombocytopenie) na tyto změny. Paralelně však generuje otázky na alternativní mechanizmy a odpovědné elementy v genezi poškození mikrocirkulace a endoteliální dysfunkce těchto nemocných.

Další komentovaná klinická studie na obdobné populaci nemocných inovativně prokazuje alteraci sekrečního profilu trombocytů již v iniciální fázi systémového zánětu, respektive septického šoku. Patofyziologický mechanismus těchto změn však z dostupných dat není zcela zjevný a vzhledem k jejich značné dynamice lze teoreticky usuzovat na velmi časnou signalizaci v kostní dřeni vedoucí ke změnám genové exprese megakaryocytů a následné změně obsahu destičkových granul. Alternativou může být extranukleární proteosyntéza či posttranslační modifikace proteinů v důsledku zmiňované inflamatorní signalizace s následnou rychlou změnou fenotypu trombocytů. Oba zmíněné mechanizmy se samozřejmě mohou také uplatňovat současně. Tyto otázky by mohla zodpovědět v současné době probíhající proteomická analýza trombocytů, jejíž data a z nich plynoucí závěry budou v druhé době začleněny do uvedené studie.

Originální experimentální práce zabývající se srovnávací proteomickou analýzou krevní plazmy v iniciální fázi septického šoku v klinicky relevantním modelu za použití velkých savců prokazuje časné signifikantní změny plazmatického proteomu. Úspěšně byla dokumentována celá řada změn v proteinovém spektru v důsledku systémové infekce. Většina z identifikovaných bílkovin se účastní vlastní zánětlivé odpovědi hostitele či procesů oxidativního a nitrosativního stresu. Práce také ukazuje možnosti této metody a postupů v identifikaci nových potenciálních biomarkerů či terapeutických cílů.

Poslední původní práce identifikovala pomocí postupů proteomické analýzy široké spektrum proteinů adsorbovaných v kolonách systému pro extrakorporální náhradu funkce jater u nemocného s jaterním selháním a rovněž prokázala vhodnost užitých metod k tomuto účelu. Mimo vlastní popis eliminovaných bílkovin poukazuje práce na potřebu detailních znalostí mechanismů (nejen) této orgánové náhrady. Obecně jsou tyto terapeutické postupy použity při vyčerpání konzervativních léčebných možností a často v kritických stavech s velmi křehkou homeostázou.

10. LITERATURA

- Adhikari NK, et al. Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet*. 2010;376(9749):1339-1346
- Ait-Oufella H, et al. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010;36(8):1286-1298
- Ait-Oufella H, et al., Natural regulatory T cells control development of atherosclerosis in mice. *Nat Med*. 2006;12(2):178-180
- Akca S, et al. Time course of platelet count in critically ill patients. *Crit Care Med*. 2002;30(4):753-756
- Albini A, et al. Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(1):14-25
- Alves-Filho JC, et al. Toll-like receptors on platelets: the key for disseminated intravascular coagulation in sepsis? *Thromb Res*. 2005;115(6):537-8
- Andonegui G, et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*. 2005;106(7):2417-2423
- André P, et al. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106(8):896-899
- Angus D, et al. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med*. 2001;29(7):109-116
- Angus D, et al. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-851
- Anname D, et al. Septic shock. *Lancet*. 2005;365(9453):63-78
- Antczak AJ, et al. Internalization of IgG-coated targets result in activation and secretion of soluble CD40 ligand and RANTES by human platelets. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(2):210-216
- Aslam R, et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood*. 2006;107(2):637-641
- Astiz ME, et al. Microvascular function and rheologic changes in hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med*. 1995;23(2):265-271
- Avontuur JA, et al. Nitric oxide causes dysfunction of coronary autoregulation in endotoxemic rats. *Cardiovasc Res*. 1997;35(2):368-376
- Bakhtiari K, et al. Prospective validation of the International Society of Thrombosis and Haemostasis scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Crit Care Med*. 2004;32(12):2416-2421
- Bateman RM, et al. Bench-to bedside review: microvascular dysfunction on sepsis—hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care*. 2003;7(5):359-373
- Bauer M, et al. Molecular diagnostics of sepsis—where are we today? *Int J Med Microbiol*. 2010;300(6):411-413
- Beaulieu LM, et al. The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thromb Res*. 2010;125(3):205-209
- Benes J, et al. Searching for mechanisms that matter in early septic acute kidney injury: an experimental study. *Crit Care*. 2011;15(5):R256

Berthet J, et al. Human platelets can discriminate between various Bacterial LPS isoforms via TLR4 signaling and differential cytokine secretion. *Clin Immunol.* 2012;145(3):189-200

Bertuglia S, et al. Protective effects of leukopenia and tissue plasminogen aktivátor in microvascular ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(3):H755-761

Boerma EC, et al. Quantifying Bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study. *Crit Care.* 2005;9(6):R601-606

Boerma EC, et al. Relationship between sublingual and intestinal microcirculatory perfusion in patients with abdominal sepsis. *Crit Care Med.* 2007;35(4):1055-1060

Bone RC, et al. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease proces. *Chest.* 1997;112(1):235-243

Boomer JS, et al. Immunosupression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA.* 2011;306(23):2594-2605

Boros M, et al. Microcirculatory dysfunction during intestinal ischemia-reperfusion. *Acta Physiol Hung.* 2003;90(4):263-279

Brandt E, et al. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J Leukocyte Biol.* 2000;67(4):471-478

Brinkmann V, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535

Brown KA, et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet.* 2006;368(9530):157-169

Brunetti M, et al. Polymorphonuclear leukocyte apoptosis is inhibited by platelet-released mediators, role of TGFbeta-1. *Thromb Haemost.* 2000;84(3):478-483

Buras JA, et al., Endothelial-neutrophil interactions during ischemia and reperfusion injury: basic mechanisms of hyperbaric oxygen. *Neurol Res.* 2007;29(2):127-131

Caggiano V, et al. Incidence, cost, and mortality of neutropenia hospitalization associated with chemotherapy. *Cancer.* 2005;103(9):1916-1924

Calvano SE, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature.* 2005;437(7061):1032-1037

Carden DL, et al. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res.* 1990;66(5):1436-1444

Cavaillon JM, et al. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis.* 2003;35(9):535-544

Cinel I, et al. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med.* 2009;37(1):291-304

Clark SR, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13(4):463-469

Clemetson KJ, et al. Platelets and pathogens. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(4):495-498

Cox D, et al. Bacteria-platelet interactions. *J Thromb Haemost.* 2009;7(11):1865-1866

Cox D, et al. Platelets and the innate immune system: mechanisms of Bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2011;9(6):1097-1107

Cronenwett JL, et al. Cost-effectiveness of carotid endarterectomy in asymptomatic patients. *J Vasc Surg.* 1997;25(2):298-309

Damien P, et al. Highly active antiretroviral therapy alters inflammation linked to platelet cytokines in HIV-1-infected patients. *J Infect Dis.* 2013;208(5):868-870

Dawson DA, et al. Polymorphonuclear leukocytes and microcirculatory perfusion in acute stroke in the SHR. *Keio J Med.* 1996;45(3): 248-252

De Backer D, et al. Microvascular alterations in patients with acute severe heart failure and cardiogenic shock. *Am Heart J.* 2004;147(1):91-99

De Backer D, et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Resp Crit Care Med.* 2002;166(1):98-104

De Backer D, et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care.* 2007;11(5):R101

De Backer D, et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. *Crit Care Med.* 2013;41(3):791-799

De Backer D, et al. Monitoring the microcirculation in the critically ill patient: current methods and future approaches. *Intensive Care Med.* 2010;36(11):1813-1825

De Backer D, et al. Monitoring the microcirculation. *J Clin Monitor Comput.* 2013;26(5):361-366

DeJoy SQ, et al. Effect of CL 184,005, a platelet-activating factor antagonist in a murine model of Staphylococcus aureus-induced gram-positive sepsis. *J Infect Dis.* 1994;169(1):150-156

Dellinger RP, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock 2012. *Crit Care Med.* 2012;41(2):580-637

Díaz NL, et al. Histochemical and ultrastructural study of skeletal muscle in patients with sepsis and multiple organ failure syndrome (MOFS). *Histol Histopathol.* 1998;13(1):121-128

Dick A, et al. Long-term survival and healthcare utilization outcomes attributable to sepsis and pneumonia. *BMC Health Serv Res.* 2012;12:432

Donati A, et al. From macrohemodynamic to the microcirculation. *Crit Care Res Pract.* 2013;2013:892710

Eber MR, et al. Clinical and economic outcomes attributable to health care-associated sepsis and pneumonia. *Arch Intern Med.* 2010;170(4):347-353

Efron P, et al. Sepsis and the dendritic cell. *Shock.* 2003;20(5):386-401

Elzey BD, et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity.* 2003;19(1):9-19

Fink M, et al. Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 1997;110:87-95

Flaujac C, et al. Platelets and viruses: an ambivalent relationship. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(4):545-556

Folman CC, et al. Platelets release thrombopoietin (Tpo) upon activation: another regulatory loop in thrombocytopoiesis? *Thromb Haemost.* 2000;86(6):923-930

Fondevila C, et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Exp Mol Pathol.* 2003;74(2):86-93

Fuchs TA, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1777-1783

Furchgott RF, et al. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288(5789):373-376

Gando S, et al. A multicenter, prospective validation of disseminated intravascular coagulation criteria for critically ill patients: comparing current criteria. *Crit Care Med.* 2006;34(3):625-631

Garcia A, et al. Applying proteomics technology to platelet research. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24(6):918-930

Garcia A, et al. Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 2004;4(3):656-668

Garraud O, et al. Bench-to-bedside review: Platelets and active immune functions – new clues for immunopathology? *Crit Care.* 2013;17(4):236

Garraud O, et al., Pathogen sensing, subsequent signalling, and signalosome in human platelets. *Thromb Res.* 2011;127(4):283-286

Gawaz M, et al. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 1997;23(4):379-385

Gentile LF, et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72(6):1491-1501

Gentile LF, et al. DAMPs, PAMPs, and the origins of SIRS in bacterial sepsis. *Shock.* 2013;39(1):113-114

Gnatenko DV, et al. Proteomic approaches to dissect platelet function: Half the story. *Blood.* 2006;108(13):3983-3991

Goedhart PT, et al. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Opt Express.* 2007;15(23):15101-15114

Goldman D, et al. Effect of decreased O₂ supply on skeletal muscle oxygenation and O₂ consumption during sepsis: role of heterogeneous capillary spacing and blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(6):H2277-2285

Gonzales-Amaro R, et al. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit Rev Immunol.* 1999;19(5-6):389-429

Groner W, et al. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat Med.* 1999;5(10):1209-1212

Harris BH, et al. The immune response to trauma. *Semin Pediatr Surg.* 1995;4(2):77-82

Hauser B, et al. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-scale studies. *Anesth Analg.* 2005;101(2):488-498

Heckel K, et al. Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287(4):L867-878

Henn V, et al. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*. 2001;98(4):1047-1054

Henn V, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391(6667):591-594

Hernandez LA, et al. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol*. 1987;253(3):H699-703

Hoehn GT, et al. Proteomics. *Crit Care Med*. 2005;33(12):S444-448

Hoesel LM, et al. Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock*. 2005;24(1):40-47

Hotchkiss RS, et al. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138-150

Hotchkiss RS, et al. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunction to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(12):862-874

Hu H, et al. Calpain-1 induces apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells under septic conditions. *Microvasc Res*. 2009;78(1):33-39

Von Hundelshausen P, et al. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2007;100(1):27-40

Chen WF, et al. Platelet protease-activated receptor (PAR)4, but not PAR1, associated with neutral sphingomyelinase responsible for thrombin-stimulated ceramide-NF- κ B signaling in human platelets. *Haematologica*. 2013;98(5):793-801

Chung LP, et al. Genetic predisposition to respiratory infection and sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2011;48(5-6):250-268

Chvojka J, et al. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. *Crit Care*. 2008;12(6):R164

Imaizumi TA, et al. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med*. 1995;238(1):5-20

Ince C, et al. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005;9(4):S13-19

Ince C, et al. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med*. 1999;27(7):1369-1377

Ince C, et al. Microcirculation in distress: a new resuscitation end point? *Crit Care Med*. 2000;32(9):1963-1964

Inwald DP, et al. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res*. 2003;92(9):1041-1048

Ishii KJ, et al. Toll-like receptors and sepsis. *Curr Infect Dis Rep*. 2004;6(5):361-366

Janols H, et al. Heterogeneity among septic shock patients in a set of immunoregulatory markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;

Jayachandran M, et al. In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. *J Appl Physiol*. 2007;102(1):429-433

Jenne CN, et al. The use of spinning-disk confocal microscopy for the intravital analysis of platelet dynamics in response to systemic and local inflammation. *PLoS One* 2011;6(9):e25109

Johnson SB, et al. Gene expression profiles differentiate between sterile SIRS and early sepsis. *Ann Surg.* 2007;245(4):611-621

Jurk K, et al. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(4):381-392

Karp PD, et al. Pathway databases: a case study in computational symbolic theories. *Science.* 2001;293(5537):2040-2044

Karp PD, et al. The Pathway Tools software. *Bioinformatics.* 2002;18(Suppl. 1):S225-232

Kasten KR, et al. T cells are potent early mediators of the host response system. *Shock.* 2010;34(4):327-336

Kasten KR, et al., T-cell activation differentially mediates the host response to sepsis. *Shock.* 2010;34(4):377-383

Kaushansky K, et al. Thrombopoietin. *N Engl J Med.* 1998;339(11):746-754

Kerrigan SW, et al. Platelet-bacterial interactions. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(4):513-523

Klustersky J, et al. Management of fever in neutropenic patients with different risk of complication. *Clin Infect Dis.* 2004;39(1):S32-37

Korthuis RJ, et al. Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1988;254(5):H823-827

Kovach MA, et al. The function of neutrophils in sepsis. *Curr Opin Infect Dis.* 2012;25(3):321-327

Kroužecký A, et al. Regional cooling of the extracorporeal blood circuit: a novel anticoagulation approach for renal replacement therapy? *Intensive Care Med.* 2009;35(2):364-370.

Kuderer NM, et al. Mortality, morbidity, and cost associated with febrile neutropenia in adult cancer patients. *Cancer.* 2006;106(10):2258-2266

Lam C, et al. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J Clin Invest.* 1994;94(5):2077-2083

Lander ES, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001;409(6822):860-921;

Larosa SP, et al. Immune aspects of sepsis and hope for new therapeutics. *Curr Infect Dis Rep.* 2012;14(5):474-483

Leclerc J, et al. A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med.* 2000;28(11):3672-3678

Lee WL, et al. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr Opin Hematol.* 2011;18(3):191-196

Lehner T, et al. The role of CCR5 chemokine ligands and antibodies to CCR5 coreceptors in preventing HIV infection. *Trends Immunol.* 2002;23(7):347-351

Lehr HA, et al. Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy. *J Pathol.* 2000;190(3):373-386

Lenz A, et al. Systemic inflammation after trauma. *Injury*. 2007;38(12):1336-1345

Leung B, et al. NKT cells in sepsis. *Clin Dev Immunol*. 2010;ID414650

Levi M, et al. Beyond sepsis: activated protein C and ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med*. 2004;32(5):S309-312

Levi M, et al. Platelets. *Crit Care Med*. 2005;33(12):S523-525

Levi M, et al. Platelets in sepsis. *Hematology*. 2005;10(1):S129-131

Levi M, et al. Thrombocytopenia in critically ill patients. *Semin Thromb Hemost*. 2008;34(5):417-424

Levi M, et al. Hemostasis and thrombosis in critically ill patients. *Semin Thromb Hemost*. 2008;34(5):415-426

Levin ER, et al. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995;333(6):356-363

Levy MM, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definition conference. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1250-1256

Levy JA, et al. The unexpected pleiotropic activities of RANTES. *J Immunol*. 2009;182(7):3945-3946

Lewis JC, et al. Phagocytosis in human platelets: localization of acid-positive phagosomes following latex uptake. *Blood*. 1976;47(5):833-840

Lidington EA, et al. Conditional immortalization of growth factor-responsive cardiac endothelial cells from H-2K(b)-tsA58 mice. *J Cell Physiol*. 2002;282(1):C67-74

Lin SM, et al. A modified goal-directed protocol improves clinical outcomes in intensive care unit patients with septic shock: a randomized controlled trial. *Shock*. 2006;26(6):551-557

Linderkamp O, et al. Passive deformability of mature, immature, and active neutrophils in healthy and septicemic neonates. *Pediatr Res*. 1998;44(6):946-950

Littman DR, et al. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010;140(9):845-858

Liu et al., *J Immunol* 2005

Looney MR, et al. Neutrophil sandwiches injure the microcirculation. *Nat Med*. 2009;15(4):364-366

Lorant DE, et al. Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion. *Semin Cell Biol*. 1995;6(5):295-303

Loscalzo J, et al., Ischemia, hyperemia, exercise, and nitric oxide. Complex physiology, and complex molecular adaptations. *Circulation*. 1994;90(5):2556-2559

Luft JH, et al. Fine structures of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red. *Fed Proc* 1966;25(6)

MacBeath G, et al. Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet*. 2002;32(5):526-562

Maguire J, et al. Platelet proteomics. *J Thromb Haemost*. 2003;1(7):1593-1601

Maguire PB, et al. Application of proteomics to the study of platelet regulatory mechanisms. *Trends Cardiovas*. 2004;14(6):207-220

Manfredi AA, et al. Dangerous connections: neutrophils and the phagocytic clearance of activated platelets. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(1):3-8

Mantovani A, et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):519-531

Marelli-Berg FM, et al. Major histocompatibility complex class II-expressing endothelial cells induce allospecific nonresponsiveness in naive T cells. *J Exp Med*. 1996;183(4):1603-1612

Mares J, et al. Proteomic profiling of blood-dialyzer interactome reveals involvement of lecithin complement pathway in hemodialysis-induced inflammatory response. *Proteomics – Clin Appl*. 2010;4(10-11):829-838

Martin GS, et al. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(6):701-706

Martin GS, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348(16):1546-1554

Matějovič M, et al. A 24-h work shift in intensive care personnel: biological pathways between work stress and ill health. *J Int Med Res*. 2011;39(2):629-639

Mavrommatis AC, et al. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med*. 2000;28(2):451-457

Mayr FB, et al. Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. *JAMA* 2010;303(24):2495-2503

McDermott DH, et al. Chemokines and their receptor in infectious disease. *Springer Sem Immunopathol*. 2000;22(4):393-415

McMaken S, et al. Thrombospondin-1 contributes to mortality in murine sepsis through effects on innate immunity. *PLoS One*. 2011;6(5):e19654

McNicol A, et al. Streptococcus sanguinis-induced cytokine release from platelets. *J Thromb Haemost*. 2011;9(10):2038-2049

Ma AC et al. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost*. 2008;6(3):415-420

Michelson AD, et al. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2006;35(1-2):67-82

Moncada S, et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109-142

Monneret G, et al. Persisting low monocyte human leukocyte-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006;32(8):1175-1183

Muller I, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB*. 2003;17(3):476-478

Mutunga M, et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Resp Crit Care Med*. 2001;163(1):195-200

Nakijima Y, et al. Microcirculation in intestinal villi: a comparison between hemorrhagic and endotoxin shock. *Am J Resp Crit Care Med*. 2001;164(8):1526-1530

Namath A, et al. Genetic polymorphism in sepsis. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2011;23(1):181-202

Nelson S, et al. A randomized controlled trial of filgrastim as an adjunct to antibiotics for treatment of hospitalized patients with community-acquired pneumonia. CAP Study Group. *J Infect Dis.* 1998;178(4):1075-1080

Netea MG, et al. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N Engl J Med.* 2011;364(1):60-70

Opal SM, et al. New perspectives on immunomodulatory therapy for bacteraemia and sepsis. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(2):S70-73

Oppenheim-Eden A, et al. Spontaneous intracerebral hemorrhage in critically ill patients: incidence over six years and associated factors. *Intensive Care Med.* 1999;25(1):63-67

Ospina-Tascon G, et al. Effect of fluids on microvascular perfusion in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2010;36(6):949-955

Pacher P, et al. Nitric oxide peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315-424

Paulus P, et al. Biomarkers of the endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis. *Biomarkers.* 2011;16(1):S11-21

Penack O, et al. Management of sepsis in neutropenia: guidelines of the infectious disease working party (AGIHO) of the German society of hematology and oncology (DGHO). *Ann Hematol.* 2006;85(7):424-433

Petersen F, et al. Platelet factor 4-induced neutrophil-endothelial cell interaction: involvement of mechanisms and functional consequences different from those elicited by interleukin-8. *Blood.* 1999;94(12):4020-4028

Phipps RP, et al. Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet.* 2001;357(9273):2023-2024

Pignatelli P, et al. Gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation.* 2004;110(10):1326-1329

Pleass RJ, et al. Platelet power: sticky problems for sticky parasites? *Trends Parasitol.* 2009;25(7):269-299

Pober JS, et al. Can graft endothelial cells initiate a host anti-graft immune response? *Transplantation.* 1996;61(3):343-349

Prucha M, et al. Expression profiling: toward an application in sepsis diagnostics. *Shock.* 2004;22(1):29-33

Prucha M et al. Průtoková cytometrie a její využití. *Cas Lek Cesk.* 2009;148(12):583

Ramzi J, et al. Predictive factors of septic shock and mortality in neutropenic patients. *Hematology.* 2007;12(6):543-548

Ranieri VM, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med.* 2012;366(22):2055-2064

Rechner AR, et al. Platelet function testing in clinical diagnostics. *Hämostaseologie.* 2011;31(2):79-87

Reitsma S, et al. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 2007;454(3):345-359

Riedemann NC, et al. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med.* 2003;9(5):517-524

Rivers E, et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1368-1377

Root RK, et al. Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. *Crit Care Med.* 2003;31(2):367-373

Ruiz C, et al. Sublingual microcirculatory changes during high-volume hemofiltration in hyperdynamic septic shock patients. *Crit Care.* 2010;14(5):R170

Russwurm S, et al. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock.* 2002;17(4):263-268

Sakr Y, et al. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32(9):1825-1831

Secor D, et al. Impaired microvascular perfusion in sepsis requires activated coagulation and P-selectin-mediated platelet adhesion in capillaries. *Intensive Care Med.* 2010;36(11):1928-1934

Seidel H, et al. Monitoring of antiplatelet therapy. Current limitations, challenges, and perspectives. *Hämostaseologie.* 2011;31(1):41-51

Semeraro F, et al. Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. *Blood.* 2011;118(7):1952-1961

Semple JW, et al. Platelets and innate immunity. *Cell Mol. Life Sci.* 2010;67(4):499-511

Semple JW, et al. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):264-274

Senkus E, et al. Cardiovascular effects of systemic cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(4):300-311

Shapiro NI, et al. The Association of endothelial cell signalling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care.* 2010;14(5):R182

Shebuski RJ, et al. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;300(3):729-735

Shevchenko A, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protocols.* 2006;1(6):2856-2860

Shioiri T, et al. Caspase-3 is activated and rapidly released from human umbilical vein endothelial cells in response to lipopolysaccharide. *Biochem Biophys Acta.* 2009;1792(10):1011-1018

Shiraki R, et al. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb Res.* 2004;113(6):379-385

Schmit X, et al. The time course of blood C-reactive protein concentrations in relation to the response to initial antimicrobial therapy in patients with sepsis. *Infection.* 2008;36(3):213-219

Schwarte LA, et al. Redistribution of intestinal microcirculatory oxygenation during acute hemodilution in pigs. *J Appl Physiol.* 2005;98(3):1070-1075

- Sinaasappel M, et al. Microvascular oxygen pressure in the pig intestine during haemorrhagic shock and resuscitation. *J Physiol (Lond)*. 1999;514(1):245-253
- Skibsted S, et al. Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis. *Shock*. 2013;39(5):427-432
- Slaaf DW, et al. Oxygen- and pressure-dependent functional capillary density in rabbit tenuissimus muscle. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1995;15(5):271-275
- Smyth SS, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2009;7(11):1759-1766
- Spronk PE, et al. Bench-to-bedside review: sepsis a disease of the microcirculation. *Crit Care*. 2004;8(6):462-468
- Sprung CL, et al. An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med*. 2006;32(3):421-427
- Stamler JS, et al. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992;258(5090):1989-1902
- Stearns-Kurosawa DJ, et al., The pathogenesis of sepsis. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:19-48
- Stohlawetz P, et al. Effects of endotoxemia on thrombopoiesis in men. *Thromb Haemost*. 1999;81(4):613-917
- Strauss R, et al. Thrombocytopenia in patients in the medical intensive care unit: bleeding prevalence, transfusion requirements, and outcome. *Crit Care Med*. 2002;30(8):1765-1771
- Suematsu M, et al., Spatial and temporal correlation between leukocyte behavior and cell injury in postischemic rat skeletal muscle microcirculation. *Lab Invest*. 1994;70(5):684-695
- Sugahara K, et al., Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol*. 2003;13(5):612-620
- Suputtamongkol Y, et al. A double-blind, placebo-controlled study of an infusion of lexipafant (platelet-activating factor receptor antagonist) in patients with severe sepsis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):693-696
- Sursal T, et al. Plasma Bacterial and mitochondrial DNA distinguish bacterial sepsis from sterile systemic inflammatory response syndrome and quantify inflammatory tissue injury in nonhuman primates. *Shock*. 2013;39(1):55-62
- Sýkora R, et al. High versus standard-volume haemofiltration in hyperdynamic porcine peritonitis: effects beyond haemodynamics? *Intensive Care Med*. 2009;35(2):371-380
- Štengl M, et al. Effects of clinically relevant acute hypercapnic and metabolic acidosis on the cardiovascular system: an experimental porcine study. *Crit Care*. 2013;17(6):R303.
- Tang BM, et al. Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis. *Crit Care Med*. 2009;37(3):882-888
- Taylor FB Jr, et al. Towards definition, clinical and laboratory criteria, and scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*. 2001;86(5):1327-1330
- Tenenhaus M, et al. Surgical advances in burn and reconstructive plastic surgery: new a emerging technologies. *Clin Plast Surg*. 2012;39(4):435-443

Top AP, et al. Persistent low microcirculatory vessel density in nonsurvivors of sepsis in pediatric intensive care. *Crit Care Med.* 2011; 39(1):8-13

Toth O, et al. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost.* 2006;96(6):781-788

Trzeciak S, et al. Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. *Acad Emerg Med.* 2008;15(5):399-413

Trzeciak S, et al. Early microcirculatory perfusion dearangement in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med.* 2007; 49(1):88-98

Trzeciak S, et al. Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 in patients with sepsis. *Intensive Care Med.* 2008;34(12):2210-2217

Turnage RH, et al. Neutrophil regulation of splanchnic blood flow after hemorrhagic shock. *Ann Surg.* 1995;222(1):66-72

Urban CF, et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans*, yeast, and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006;8(4):668-676

Urban CF, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defence against *Candida albicans*. *PLoS Pathol.* 2009;5(10):e1000639

Vallet B, et al. Endothelial cell dysfunction and abnormal tissue perfusion. *Crit Care Med.* 2002;30(5):S229-234

van der Flier M, et al. Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. *Shock.* 2005;23(1):35-38

van der Poll T, et al. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(1):32-43

Vanderschueren S, et al. Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med.* 2000;28(6):1871-1876

Venet F, et al. Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU – from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions. *Crit Care.* 2011;15(5):231-239

Venter JC, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;29(5507):1304-1351

Vincent JL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006;34(2):344-353

Vincent JL, et al. Platelet function in sepsis. *Crit Care Med.* 2002;30(5):S313-317

Vincent JL, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009;302(21):2323-2329

Vincent JL, et al. Sepsis definitions: time for change. *Lancet.* 2013;381(9868):774–775

Wakabayashi I, et al. Vascular actions of anthracycline antibiotics. *Curr Med Chem.* 2003;10(5):427-436

Walley KR, et al., Heterogeneity of oxygen delivery impairs oxygen extraction by peripheral tissues: theory. *J Appl Physiol.* 1996;81(2):885-894

- Weighardt H, et al. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology*. 2007;212(9-10):715-722
- Weyrich AS, et al. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. *J Thromb Haemost*. 2009;7(2):241-246
- Weyrich AS, et al. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol*. 2004;25(9):489-495
- White JG, et al. A „touch“ of the White platelet syndrome. *Platelets*. 2005;16(6):346-366
- Whiteheart SW, et al. Platelet granules: surprise packages. *Blood*. 2011;118(5):1190-1191
- Williams CD, et al. Application of platelet function testing to the Bedside. *Thromb Haemost*. 2010;103(1):29-33
- Wong HR, et al. Clinical review: sepsis and septic shock—the potential of gene arrays. *Crit Care*. 2012;16(1):204
- Xiao W, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 2011;208(13):2581-2590
- Yaguchi A, et al., Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost*. 2004;2(12):2096-2102
- Yano K, et al. Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality, *J Exp Med*. 2006
- Yeaman MR, et al. Bacterial-platelet interactions: virulence meets host defence. *Future Microbiol*. 2010;5(3):471-506
- Yeaman MR, et al. Platelets in defense against Bacterial pathogens. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(4):525-544
- Yeaman MR, et al. Bacterial-platelet interaction: virulence meets host defence. *Future Microbiol*. 2010;5(3):471-506
- Yilmaz G, et al. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. *Neuromolecular Med*. 2010;12(2):193-204
- Zarbock A, et al. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev*. 2007;21(2):99-111
- Zellner M, et al. Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis*. 2005;26(12):2481-2489
- Zimmerman GA, et al. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med*. 2002;30(5):S294-301

11. PODPORA A PODĚKOVÁNÍ

Velice rád bych poděkoval prof. MUDr. Martinu Matějovičovi, PhD., mému školiteli a učiteli, za jeho podporu, příkladný lidský i profesní přístup, neutuchající pevnou vůli, nezměrnou dávku motivace, trpělivosti a shovívavosti nejen po celou dobu mého postgraduálního studia.

Díky také patří všem mým kolegům, bez ohledu na podíl v uvedené vědecké práci, za jejich podporu a rady.

V neposlední řadě mi je ctí poděkovat mé rodině a všem mým blízkým za jejich nesmírnou lásku, podporu a trpělivost a zejména mému synovi Nicholasovi, jenž je vždy sluncem na zatažené obloze všednodennosti a jehož optimizmus, zvědavost a hravost je pro mne více než inspirující.

Všechny původní práce vznikly díky podpoře těchto výzkumných projektů:

1. VZ MSM 0021620819 a Projekt Ministerstva zdravotnictví ČR koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00669806 – FN Plzeň,
2. Program rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy – PRVOUK (projekt P36) a
3. Projekt OP VaVpl Biomedicínského centra LF v Plzni (CZ.1.05/2.1.00/03.0076).

12. TABULKY

Tab. 1: Diagnostická kritéria sepse, těžké sepse a septického šoku.

Tab. 2: Přehled základních složek imunitní odpovědi, jejich charakteristika a funkce.

Tab. 3: PAMP, DAMP a PRR.

Tab. 4: Vybrané povrchové adhezivní molekuly endoteliálních buněk, trombocytů a neutrofilů a jejich vzájemné interakce.

Tab. 5: Charakteristika granul trombocytů.

Tab. 6: Funkce a vlastnosti endotelu.

Tab. 7: Studie II – demografická charakteristika.

Tab. 8: Studie II – hemodynamika a laboratorní hodnoty.

Tab. 9: Studie II – speciální vyšetření trombocytů.

Tab. 1: Diagnostická kritéria sepse, těžké sepse a septického šoku

Sepse (dokumentovaná nebo suspektní infekce PLUS ≥ 1 položka z následujících)

Systémové/celkové symptomy

- horečka (teplota tělesného jádra $>38,3^{\circ}\text{C}$)
- hypotermie (teplota tělesného jádra $<36^{\circ}\text{C}$)
- tachykardie (TF $>90/\text{min}$)
- tachypnoe
- alterace stavu vědomí
- otoky a/nebo pozitivní tekutinová bilance/retence tekutin ($>20\text{ml}/\text{kg t. hm. za 24hod.}$)
- hyperglykémie ($>6,7\text{mmol}/\text{l}$) bez předcházejícího diabetu mellitu

Zánětlivé proměnné

- leukocytóza ($>12 \times 10^9/\text{l}$)
- leukocytopenie ($<4 \times 10^9/\text{l}$)
- přítomnost $>10\%$ nezralých leukocytárních/granulocytárních forem
- elevace CRP (>2 SD nad horní limit normálního rozmezí)
- elevace PCT (>2 SD nad horní limit normálního rozmezí)

Hemodynamické proměnné

- hypotenze (SAP $<90\text{mmHg}$, MAP $<70\text{mmHg}$, snížení SAP o $>40\text{mmHg}$ a/nebo >2 SD pod dolní limit normálního pro daný věk)
- elevace saturace smíšené žilní krve ($>70\%$)
- elevace srdečního výdeje (CI $>3,5\text{l}/\text{min}/\text{m}^2$)

Známky orgánové dysfunkce

- arteriální hypoxémie ($\text{paO}_2/\text{FiO}_2 <300$)
- akutní oligurie (diuréza $<0,5\text{ml}/\text{kg}/\text{h}$ nebo $<45\text{ml}/\text{h}$ nejméně 2 hodiny)
- elevace sérového kreatininu (o $>44\mu\text{mol}/\text{l}$)
- koagulopatie (INR $>1,5$ a/nebo aPTT $>60\text{s}$)
- paralytický ileus
- trombocytopenie ($<100 \times 10^9/\text{l}$)
- hyperbilirubinémie (celkový bilirubin $>68\mu\text{mol}/\text{l}$)

Známky poruchy tkáňové perfúze

- hyperkaltatémie ($>1\text{mmol}/\text{l}$)
- zpomalení kapilárního návratu a/nebo mramoráč kůže

Těžká seps (seps PLUS známky orgánové dysfunkce)

Septický šok (těžká seps PLUS hypotenze refrakterní k adekvátní tekutinové resuscitaci a/nebo hyperlaktatémie)

CRP: C-reaktivní protein; PCT: prokalcitonin; SD: standardní odchylka; SAP: systolický arteriální tlak; MAP: střední arteriální tlak; CI: srdeční index, cardiac index; INR: international normalized ratio; aPTT: aktivovaný parciální tromboplastinový čas

Upraveno dle: Angus et al., N Engl J Med 2013

Tab. 2: Přehled základních složek imunitní odpovědi, jejich charakteristika a funkce.

Buněčné elementy	Charakteristika	Funkce v sepsi
Přírozený imunitní systém		
Monocyty/makrofágy	fagocyty a APCs exprese MHC II - HLADR, CD14, TLRs, CD80/86	důležitý zdroj cytokinů, chemokinů, TF konverze na DC ve tkáních - APC
Dendritické buňky (DC)	primární APCs exprese CD14, TLRs, CD80/86, MHC II	klíčové propojení přirozené a získané imunity APCs pro CD4+ T-lymfocyty, produkce cytokinů
Myeloidní supresorové buňky Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)	exprese Gr1+ CD11b obsahují RNS	produkce IL-10, suprese expanze CD4+ lymfocytů a jejich produkce cytokinů cestou produkce velkého množství NO
Neutrofil	primární fagocyty exprese CD14, CD11/CD18, CD64, TLRs, PSGL-1	eliminace a destrukce patogenů proteázami, ROS, RNS poškození tkání proteázami, ROS, RNS
NK-buňky/lymfocyty	absence TCR, CD3-CD56+ lymfocyty exprese KIRs, CD16/FcγRIII	přímá cytotoxicita, produkci cytokinů iniciují zánětlivou odpověď, produkce TNF, IL-10 atd.
NK-T-buňky/lymfocyty	exprese αβTCR	cytotoxicita a modulace imunitní odpovědi zejm. při mykobakteriální či mykotické infekci
γδ T-lymfocyty	preferenčně lokalizovány v mukózách exprese γδTCR, CD3; absence αβTCR	součástí mukózní bariéry, potence inflamace produkcí IFNγ a TNFα, přímá cytotoxicita(perforin/granzym), imunomodulace produkci IL-10
Adaptivní imunitní systém		
CD4+ lymfocyty Th1 (T-lymfocyty)	exprese αβTCR, CD3+CD4+ buňkami zprostředkovaná imunita	imunostimulační funkce, Th1 cytokiny: TNF, IFNγ, IL-2 klíčová role u toxického šoku, podléhají apoptóze
CD4+ lymfocyty Th2 (T-lymfocyty)	exprese αβTCR, CD3+CD4+ buňkami zprostředkovaná imunita	imunosupresivní funkce, Th2 cytokiny: IL-4, IL-10, IL-13
CD4+ lymfocyty Th17 (T-lymfocyty)	preferenčně lokalizovány v mukózách	eliminace patogenů, zpomalení hojení ran, produkce IL-17, IL- 22
CD8+ lymfocyty (T-lymfocyty)	exprese αβTCR, CD3+CD8+ buňkami zprostředkovaná imunita	přímá cytotoxicita, eliminace patogenů produkce TNF a IFNγ
Treg lymfocyty (T-lymfocyty)	exprese CD4+CD25+, FoxP3	imunomodulace, kontrola a suprese imunitní odpovědi a fibrogenese, produkce IL-10, TGFβ
B-lymfocyty	exprese BCR, CD19, CD20, CD80/86, MHC II humorální imunita	produkce protilátek, APCs, imunologická paměť

APC: antigen presenting cells; MHC: major histocompatibility antigen; TF: tkáňový faktor; TCR: T-cell receptor; BCR: B-cell receptor; NK: natural killer cell; IL: interleukin; IFN: interferon; TNF: tumor necrosis factor; TGF: tissue growth factor; KIR: killer immunoglobulin receptor; RNS: reactive nitrogen species; ROS: reactive oxygen species; TLR: toll-like receptors; CD: cluster of differentiation/designation

Upraveno dle: Karvunidis et al., Anest Intenziv Med 2013

Tab. 3: PAMP, DAMP a PRR.

Motivy/molekuly	Zdroj	PRR
Bakteriální PAMP		
Lipopolysacharid	G- bakterie	CD14, MD-2/TLR4
Lipoteichoová kyselina	G+ bakterie	CD14, TLR2/TLR6
Peptidoglykan	G+/G- bakterie	CD14, TLR2, NOD2, NOD1
Triacyllipopeptidy	G+/G- bakterie	TLR1/TLR2
Diacylpeptidy	<i>Mycoplasma spp.</i>	TLR2/TLR6
Poriny, OMPs	<i>Neisseria spp.</i>	TLR2
Flagellin	bičíkaté bakterie	TLR5
Nemetylovaná CpG DNA	bakterie, některé viry	TLR9
dsDNA	<i>Francisella tularensis</i>	AIM2
Virové PAMP		
Virové genomy	RNA viry	RLH
dsDNA	DNA viry	AIM2
dsRNA	dsRNA viry	TLR3
ssRNA	ssRNA viry	TLR7/TLR8
viry exprimované proteiny	RNA a DNA viry	TLR2/TLR4
Mykotické PAMP		
Fosfolipomannan	<i>Candida albicans</i>	TLR2
Mannan	<i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	TLR4, CLR (dectin-2/FcRγ)
Mannosylové rezidua	<i>Candida albicans</i>	TLR4, CLR
β-glukany	<i>Candida spp.</i> , <i>Aspergillus spp.</i>	TLR2, CLR (dectin-1)
DAMP		
S100a protein	vlastní tkáň hostitele	TLR4, RAGE
HMGB1	vlastní tkáň hostitele	TLR2/TLR4, RAGE
HSPs	vlastní tkáň hostitele	TLR4
Fibrinogen, fibronektin	vlastní tkáň hostitele	TLR4
Hyaluronan	vlastní tkáň hostitele	TLR4
Hem	vlastní tkáň hostitele	TLR4

PRR: pattern recognition receptors; PAMP: pathogen-associated molecular patterns; DAMP: danger-associated molecular patterns; OMPs: outer membrane protein; CpG: cytosine-phosphate-guanine; HMGB1: high mobility group box 1; HSP: heat shock proteins; TLR: toll-like receptor; NOD: nucleotide-binding oligomerization domain leucine-rich-repeat containing receptors; CLR: C-type lectin receptor; RAGE: receptor for advanced glycation end products; RLH: retinoic acid-inducible gene-1-helicase; AIM2: absent in melanoma protein 2

Upraveno dle: Karvunidis et al., Anest Intenziv Med 2013

Tab. 4: Vybrané povrchové adhezivní molekuly endoteliálních buněk, trombocytů a neutrofilů a jejich vzájemné interakce.

endoteliální buňky	↔	trombocyty	↔	neutrofilů
CD40	↔	CD40L	↔	CD40
fibrinogen, fibronectin	↔	GPIIb/IIIa	↔	macrophage antigen-1 (Mac-1)
P-selektin, vWF	↔	GPIb	↔	Mac-1, ICAM-1
		ICAM-2	↔	LFA-1
neznámý, susp. GPIIb	↔	P-selektin	↔	PGSL-1, L-selektin

Tab. 5: Charakteristika granul trombocytů.

Typ granul	Funkční skupina molekul	Molekuly
denzní granula	nukleotidy	adenin: ADP, ATP guanin: GDP, GTP
	aminy	serotonin histamin
	RANTES	
	bivalentní kationty	
α-granula	adhezní molekuly	P-selektin (CD62p)
		platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31)
		GPIIb/IIIa (αIIbβ3 integrin, CD41/CD61)
		von Willebrandův faktor (vWF)
		thrombospondin-1 (TSP-1)
	mitogenní faktory	vitronectin
		fibronectin
platelet-derived growth factor (PDGF) vascular endothelial growth factor (VEGF) endothelial cell growth factor (ECGF) epidermal growth factor (EGF) platelet factor-4 (PF-4) insulin-like growth factor-1 (IGF-1) transforming growth factor-β (TGF-β)		
koagulační faktory	fibrinogen, plasminogen, protein S, kininogeny koagulační faktory V, VII, XI a XIII	
inhibitory proteáz	C1 inhibitor plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) α2-plasmin inhibitor (α2-PI) tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	
	imunoglobuliny albumin	
lysozomy	glykosidázy	
	proteázy	
	kationické proteiny	

ADP: adenosindifosfát; ATP: adenosintrifosfát; GDP: guanosindifosfát; GTP: guanosintrifosfát; GP: glykoprotein; CD: cluster of differentiation/designation; RANTES: regulated on activation, normal T-cells expressed and secreted

Upraveno dle: Karvunidis et al., Anest Intenziv Med 2010

Tab. 2: Přehled základních složek imunitní odpovědi, jejich charakteristika a funkce.

Buněčné elementy	Charakteristika	Funkce v sepsi
Přirozený imunitní systém		
Monocyty/makrofágy	fagocyty a APCs exprese MHC II - HLA-DR, CD14, TLRs, CD80/86	důležitý zdroj cytokinů, chemokinů, TF konverze na DC ve tkáních - APC
Dendritické buňky (DC)	primární APCs exprese CD14, TLRs, CD80/86, MHC II	klíčové propojení přirozené a získané imunity APCs pro CD4+ T-lymfocyty, produkce cytokinů
Myeloidní supresorové buňky Myeloid-derived suppressor cells (MDSC)	exprese Gr1+ CD11b obsahují RNS	produkce IL-10; suprese expanze CD4+ lymfocytů a jejich produkce cytokinů cestou produkce velkého množství NO
Neutrofil	primární fagocyty exprese CD14, CD11/CD18, CD64, TLRs, PSGL-1	eliminace a destrukce patogenů proteázami, ROS, RNS poškození tkání proteázami, ROS, RNS
NK-buňky/lymfocyty	absence TCR, CD3-CD56+ lymfocyty exprese KIRs, CD16/FcγRIII	přímá cytotoxicita, produkci cytokinů iniciují zánětlivou odpověď, produkce TNF, IL-10 atd.
NK-T-buňky/lymfocyty	exprese αβTCR	cytotoxicita a modulace imunitní odpovědi zejm. při mykobakteriální či mykotické infekci
γδ T-lymfocyty	preferenčně lokalizovány v mukózách exprese γδTCR, CD3; absence αβTCR	součástí mukózní bariéry, potence inflamační produkci IFNγ a TNFα; přímá cytotoxicita (perforin/granzym), imunomodulace produkci IL-10
Adaptivní imunitní systém		
CD4+ lymfocyty Th1 (T-lymfocyty)	exprese αβTCR, CD3+CD4+ buňkami zprostředkovaná imunita	imunostimulační funkce, Th1 cytokiny: TNF, IFNγ, IL-2 klíčová role u toxického šoku, podléhají apoptóze
CD4+ lymfocyty Th2 (T-lymfocyty)	exprese αβTCR, CD3+CD4+ buňkami zprostředkovaná imunita	imunosupresivní funkce; Th2 cytokiny: IL-4, IL-10, IL-13
CD4+ lymfocyty Th17 (T-lymfocyty)	preferenčně lokalizovány v mukózách	eliminace patogenů, zpomalení hojení ran, produkce IL-17, IL-22
CD8+ lymfocyty (T-lymfocyty)	exprese αβTCR, CD3+CD8+ buňkami zprostředkovaná imunita	přímá cytotoxicita, eliminace patogenů produkce TNF a IFNγ
Treg lymfocyty (T-lymfocyty)	exprese CD4+CD25+, FoxP3	imunomodulace, kontrola a suprese imunitní odpovědi a fibrogenese, produkce IL-10, TGFβ
B-lymfocyty	exprese BCR, CD19, CD20, CD80/86, MHC II humorální imunita	produkce protilátek, APCs, imunologická paměť

APC: antigen presenting cells; MHC: major histocompatibility antigen; TF: tkáňový faktor; TCR: T-cell receptor; BCR: B-cell receptor; NK: natural killer cell; IL: interleukin; IFN: interferon; TNF: tumor necrosis factor; TGF: tissue growth factor; KIR: killer immunoglobulin receptor; RNS: reactive nitrogen species; TLR: toll-like receptors; CD: cluster of differentiation/designation

Upraveno dle: Karvunidis et al., Anest Intenziv Med 2013

Tab. 7: Studie II [Karvunidist et al., manuskript v přípravě] - demografická data

proměnná	septický šok (SS)	septický šok s trombocytopenií (SST)	septický šok s DIC (SSD)
počet subjektů	7	5	10
mužské pohlaví (%)	57	40	90
věk (roky)	65 (57;75)	69 (48;74)	64 (58;73)
zdroj infekce (%)			
pneumonie	14,2	60	0
intraabdominální	42,8	0	10
uroinfekce	28,4	20	30
jiná (měkké tkáně aj.)	14,2	20	60
APACHE II	23 (16;26)	34 (18;36)	19 (17;29)
SOFA	9 (5;10)	15 (10;18)	11 (6;13)
mortalita na JIP (%)	14	20	30
nemocniční mortalita (%)	14	20	40

Tab. 8: Studie II [Karvunidis et al., manuskript v přípravě] - hemodynamická a laboratorní data

proměnná	skupina	TP1	TP2
MAP (mmHg)	SS	74 (69;81)	81 (80;103)
	SST	76 (75;84) §	101 (96;105)
	SSD	74 (68;75) §	88 (82;91)
HR (min ⁻¹)	SS	100 (72;112)	91 (82;100)
	SST	105 (82;100)	107 (76;109)
	SSD	99 (78;115)	86 (79;87)
CVP (mmHg)	SS	10 (8;12)	N/A
	SST	11 (8;13)	N/A
	SSD	10 (6;11)	N/A
SpO ₂ (%)	SS	94 (92;96) §	98 (96;99)
	SST	98 (94;98)	97 (97;97)
	SSD	95 (93;97) §	98 (96;98)
pH	SS	7,37 (7,27;7,43)	7,44 (7,41;7,47)
	SST	7,30 (7,18;7,42) §	7,52 (7,50;7,65) ‡
	SSD	7,38 (7,23;7,41) §	7,48 (7,46;7,49)
pO ₂ (kPa)	SS	10,3 (8,8;12,9) §	8,4 (7,9;9,3)
	SST	12,0 (8,1;15,3)	8,8 (8,6;10,1)
	SSD	9,7 (8,7;12,1)	10,8 (9,1;11,5)
pCO ₂ (kPa)	SS	5,1 (4,0;7,0)	5,0 (4,4;5,3)
	SST	5,6 (4,7;6,7)	4,1 (2,8;5,5)
	SSD	5,2 (4,3;5,6)	4,6 (4,2;4,8)
BE	SS	0,0 (-11,8;5,8)	-0,3 (-3,6;2,4)
	SST	-8,7 (-10,7;4,1)	1,10 (0,6;10,2)
	SSD	-9,0 (-10,7;0,0) §	2,6 (0,5;5,7)
a-lactate (mmol/l)	SS	1,2 (1,0;1,9)	1,7 (1,3;2,0)
	SST	2,9 (1,7;4,6)	1,2 (1,0;1,4)
	SSD	3,5 (1,9;7,7) *	0,8 (0,7;1,5) §
ANC (x10 ⁹ /L)	SS	16,3 (10,8;34,3) §	7,7 (7,2;9,3)
	SST	16,0 (10,1;23,5)	11,4 (6,5;11,7)
	SSD	16,2 (9,2;19,8) §	6,8 (6,2;8,4)
Hb (g/L)	SS	104 (91;113)	100 (90;112)
	SST	113 (94;119)	89 (89;122)
	SSD	105 (97;129)	95 (89;109)
trombocyty (x10 ⁹ /L)	SS	261 (148;297)	362 (224;479)
	SST	38 (14;73) ‡ §	302 (235;428)
	SSD	87 (47;146) * §	298 (154;455)
PT (s)	SS	15,7 (15,4;17,0) §	14,8 (13,2;15,2)
	SST	15,0 (14,1;17,3)	14,2 (13,9;15,2)
	SSD	21,9 (18,3;22,2) § * †	14,8 (13,9;16,0)
aPTT (s)	SS	36,1 (32,5;40,9)	36,3 (32,0;39,0)
	SST	43,6 (33,9;47,7)	35,1 (32,3;40,4)
	SSD	47,6 (43,1;60,6) § *	41,0 (39,0;43,1)
FBG (g/L)	SS	8,3 (7,3;9,0) §	6,3 (4,5;7,2)
	SST	6,7 (5,4;8,1)	6,0 (3,6;6,7)
	SSD	6,7 (5,2;7,2) *	5,9 (3,5;6,7)
D-dimery (mg/L)	SS	5,0 (2,2;5,0) §	2,0 (1,1;2,9)
	SST	3,2 (2,2;5)	0,5 (0,5;3,9)
	SSD	5,0 (4,8;5) §	1,3 (1,0;2,5)

§: statisticky významný rozdíl TP1 vs. TP2

*: statisticky významný rozdíl SSD vs. SS

†: statisticky významný rozdíl SST vs. SSD

‡: statisticky významný rozdíl SST vs. SS

Tab. 9: Studie II [Karvunidis et al., manuskript v přípravě] - speciální vyšetření trombocytů

proměnná	skupina	TP1	TP2
CD41/CD61	SS	0,31 (0,30;0,35)	0,31 (0,24;0,36)
	SST	0,31 (0,27;0,37) §	0,22 (0,21;0,26)
	SSD	0,30 (0,24;0,37)	0,29 (0,28;0,35)
ΔCD41/CD61	SS		0,00 (-0,06;0,08)
	SST		0,05 (0,02;0,13)
	SSD		0,01 (-0,11;0,03)
CD62p (P-selektin)	SS	0,54 (0,28;0,56)	0,55 (0,47;0,57)
	SST	0,58 (0,48;0,70)	0,51 (0,46;0,98)
	SSD	0,52 (0,39;0,66)	0,49 (0,39;0,49)
ΔCD62p	SS		-0,03 (-0,11;-0,01)
	SST		0,12 (-0,31;0,29)
	SSD		0,00 (-0,19;0,21)
ADP - AUC (U)	SS	25 (15;58) §	54 (28;60)
	SST	11 (3;25) §	74 (74;79)
	SSD	21 (11;37) §	66 (62;69)
ADP - velocity (AU/min)	SS	7 (5;10)	13 (8;18)
	SST	5 (4;7) §	17 (16;19)
	SSD	8 (4;14)	17 (14;19)
ADP-aggregation (AU)	SS	30 (20;68)	85 (50;91)
	SST	24 (11;43) §	123 (88;124)
	SSD	52 (23;60)	77 (62;101)
ASPI - AUC (U)	SS	56 (34;76)	84 (69;106)
	SST	17 (8;30) §	87 (82;96)
	SSD	30 (8;53) §	77 (61;96)
ASPI - velocity (AU/min)	SS	9,1 (7,1;23,2) §	22,5 (15,5;37,0)
	SST	7,0 (4,2;8,8) §	37,8 (30,7;40,2)
	SSD	9,5 (4,8;19,1) §	32,7 (23,1;33,6)
ASPI-aggregation (AU)	SS	91,4 (71,9;107,1)	132,0 (118,5;154,4)
	SST	36,4 (23,6;52,2) §	125,0 (115,7;145,5)
	SSD	51,3 (23,8;118,2) §	167,3 (122,7;176,0)
TRAP - AUC (U)	SS	73 (59;90)	88 (76;103)
	SST	49 (13;61) §	101 (98;122)
	SSD	38 (27;51) * §	76 (72;94)
TRAP - velocity (AU/min)	SS	23,1 (15,9;25,2)	23,8 (17,8;36,9)
	SST	16,7 (4,8;21,9) §	37,0 (33,5;41,6)
	SSD	12,7 (12,0;15,0) §	31,6 (26,4;34,3)
TRAP-aggregation (AU)	SS	96,6 (89,3;104,3)	132,0 (121,0;156,7)
	SST	72,0 (24,1;82,5) §	166,2 (152,1;184,4)
	SSD	59,9 (45,3;90,0) §	147,4 (89,0;169,2)
VEGF (pg/l)	SS	218 (142;302)	148 (126;191)
	SST	39 (17;57) ‡ §	274 (84;417)
	SSD	57 (17;136) * §	363 (213;505)
PDGF (pg/l)	SS	2155 (1255;6534)	2962 (1812;13376)
	SST	506 (537;1305) §	4978 (3790;6370)
	SSD	1657 (320;3514) §	4978 (3790;6106)

§: statisticky významný rozdíl TP1 vs. TP2

*: statisticky významný rozdíl SSD vs. SS

‡: statisticky významný rozdíl SST vs. SS

13. OBRÁZKY

Obr. 1: Průtoková cytometrie trombocytů (CD41/CD61 – PAC-1 FITC).

Obr. 2: Agregometrie trombocytů.

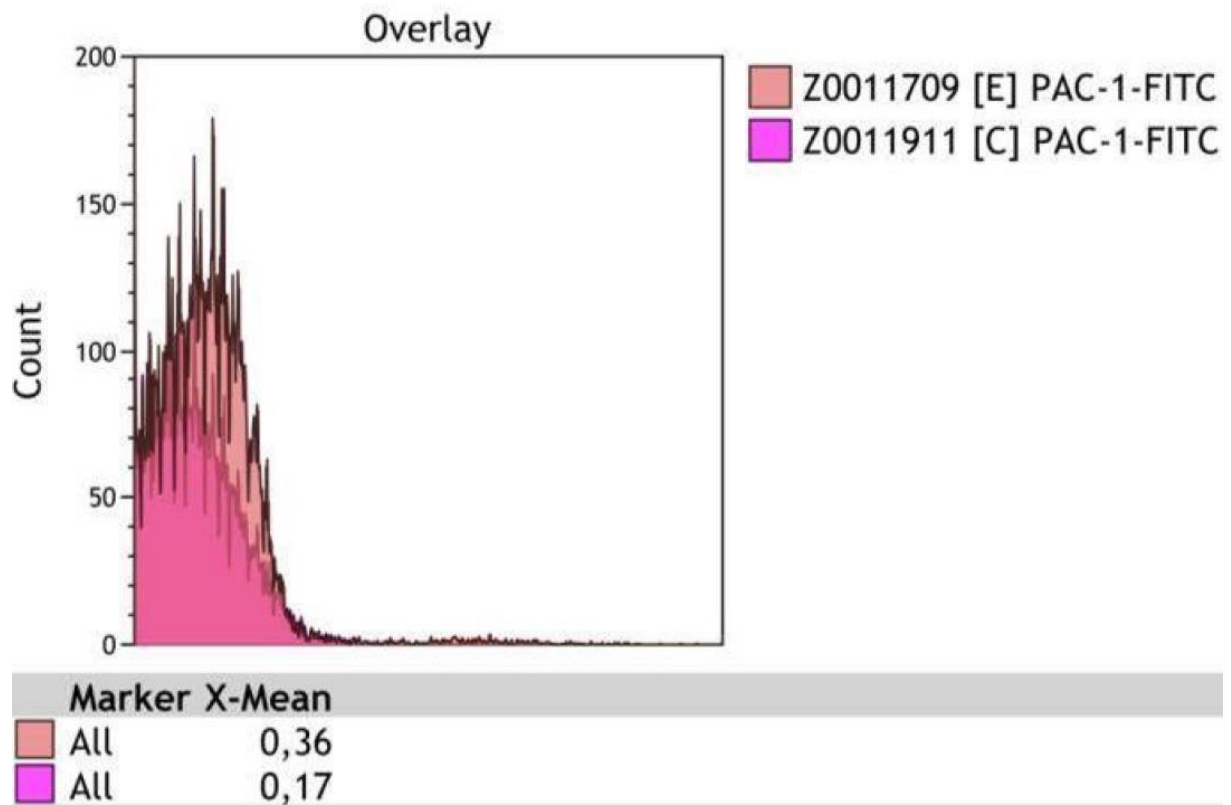
Obr. 3: Proteomická analýza – 2DE.

Obr. 4: Schéma FPSA – Prometheus.

Obr. 5: Agregometrie trombocytů – grafy.

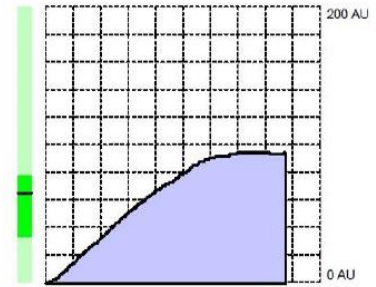
Obr. 6: Ukázka 2DE separace proteinů trombocytů.

Obr. 1: Průtoková cytometrie trombocytů (CD41/CD61 – PAC-1 FITC).

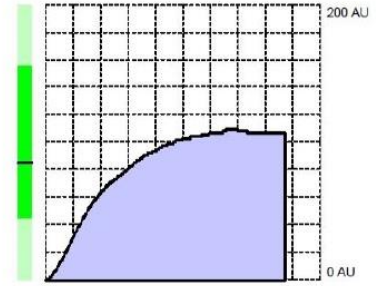


Obr. 2: Agregometrie trombocytů.

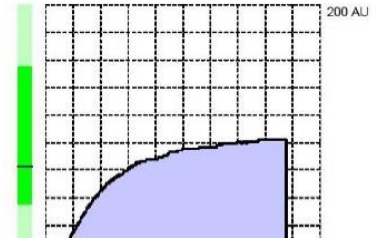
Patient id :
Test name :ADPtest HS (Hirudin blood), V2
Start of Test: 22. Mar. 2010, 12:48:49
Area under the curve :58 U (30 - 70)
Aggregation :RUO: 96.0 AU
Velocity :RUO: 12.3 AU/min.



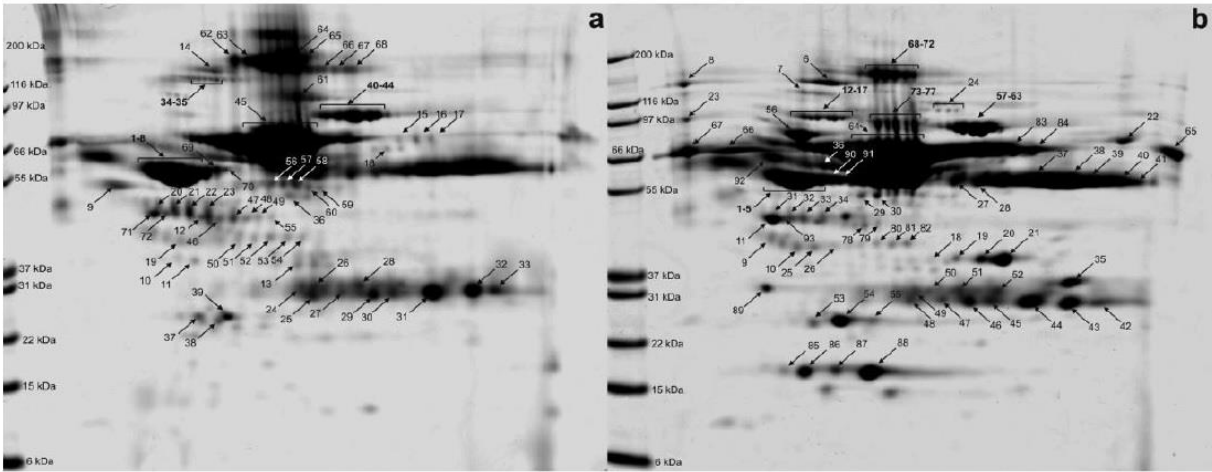
Patient id :
Test name :ASPItest (Hirudin blood), V2
Start of Test: 22. Mar. 2010, 12:49:01
Area under the curve :76 U (40 - 140)
Aggregation :RUO: 110.3 AU
Velocity :RUO: 22.9 AU/min.



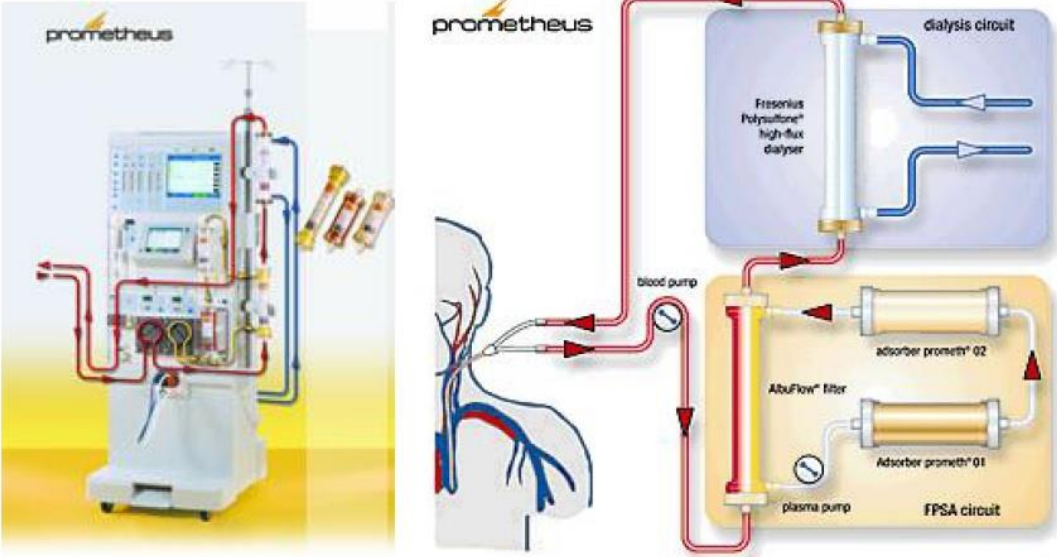
Patient id :
Test name :TRAPtest (Hirudin blood), V2
Start of Test: 22. Mar. 2010, 12:49:13
Area under the curve :73 U (50 - 140)
Aggregation :RUO: 104.3 AU
Velocity :RUO: 23.1 AU/min.



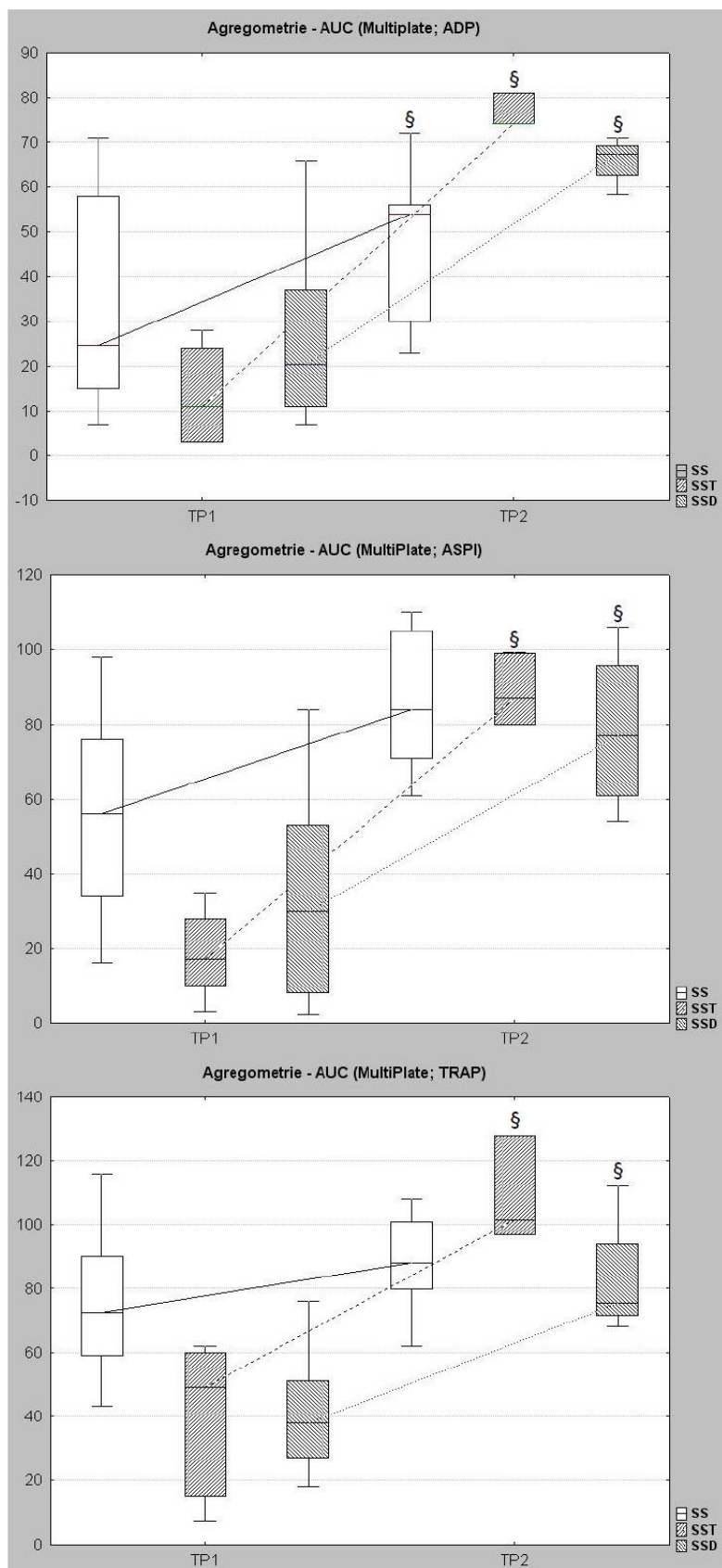
Obr. 3: Proteomická analýza – 2DE.



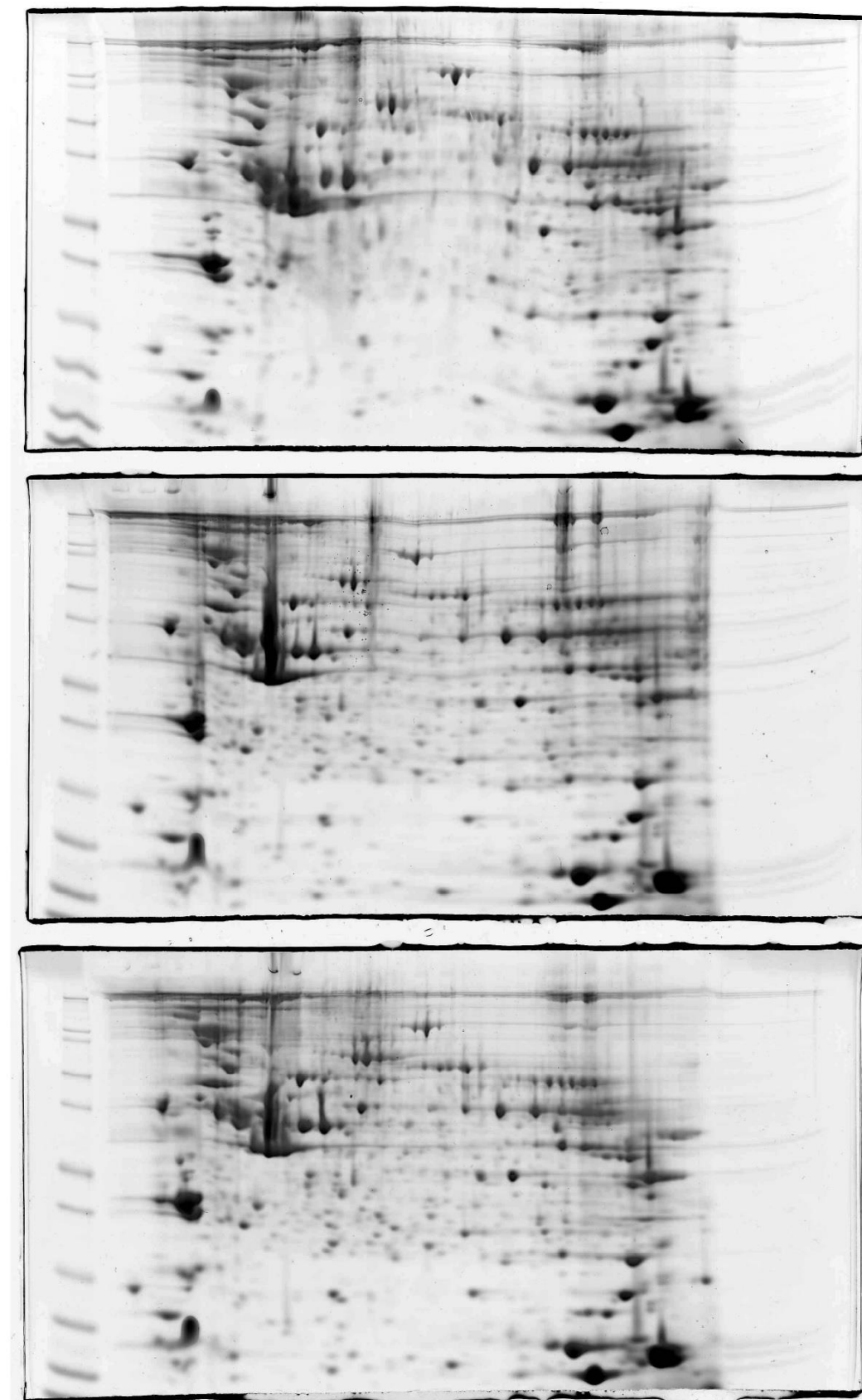
Obr. 4: Schéma FPSA – Prometheus.



Obr. 5: Agregometrie trombocytů – grafy.



Obr. 6: Ukázka 2DE separace proteinů trombocytů.



14. PŘÍLOHY

14.1. ORIGINALNÍ PRÁCE V ČASOPISECH S IF, KTERÉ JSOU SOUČÁSTÍ DIZERTAČNÍ PRÁCE:

I. Septic shock and chemotherapy-induced cytopenia: effect on microcirculation.

Karvunidis Thomas, Chvojka J, Lysak D, Sykora R, Kroužecký A, Radej J, Novak I, Matejovic M.
Intensive Care Med. 2012; 38(8):1336-1344. IF 5,258

II. Recent progress of proteomics in critical illness.

Karvunidis T, Mares J, Thongboonkerd V, Matejovic M.
Shock. 2009; 31(6):545-552. IF 2,612

III. Proteomic analysis of proteins bound to adsorption units of extracorporeal liver support system under clinical conditions.

Mares J, Thongboonkerd V, Tuma Z, Moravec J, Karvunidis T, Matejovic M.
J Proteome Res. 2009;8(4):1756-1764. IF 5,056

IV. Altered plasma proteome during an early phase of peritonitis induced sepsis.

Thongboonkerd V, Chiangjong W, Mares J, Moravec J, Tuma Z, Karvunidis T, Sinchaikul S, Chen ST, Opatrný K, Matejovic M.
Clin Sci (Lond). 2009;116(9):721-730. IF 4,859

14.2. ORIGINALNÍ PRÁCE V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH BEZ IF, KTERÉ JSOU SOUČÁSTÍ DIZERTAČNÍ PRÁCE:

V. Imunitní homeostáza (deregulace?) v sepsi a septickém šoku.

Karvunidis T, Lysák D, Chvojka J, Ledvinová L, Raděj J, Novák I, Matějovič M.
Anest Intenziv Med. 2013;24(4):250-263

VI. Trombocyty v sepsi.

Karvunidis T, Chvojka J, Lysák D, Kroužecký A, Raděj J, Novák I, Matějovič M.
Anest Intenziv Med. 2010;21(6):342-350

14.3. ORIGINALNÍ PRÁCE V ČASOPISECH S IF ČI V RECENZOVANÝCH ČASOPISECH BEZ IF SOUVISEJÍCÍ S PROBLEMATIKOU DIZERTAČNÍ PRÁCE:

Sepsis and acute kidney injury are bidirectional.

Matejovic M, Chvojka J, Radej J, Ledvinova L, Karvunidis T, Krouzecky A, Novak I.

Contrib Nephrol. 2011;174:78-88. IF 1,49

Pharmacokinetic evaluation of voriconazole treatment in critically ill patients undergoing continuous venovenous hemofiltration.

Radej J, Krouzecky A, Stehlik P, Sykora R, Chvojka J, Karvunidis T, Novak I, Matejovic M.

Ther Drug Monit. 2011;33(4):393-397. IF 2,234

The safety and efficacy of a new anticoagulation strategy using selective in-circuit blood cooling during haemofiltration--an experimental study.

Krouzecky A, Chvojka J, Sykora R, Radej J, Karvunidis T, Novak I, Hanzlikova J, Bultasova L, Ruzicka J, Petrankova Z, Matejovic M.

Nephrol Dial Transplant. 2011;26(5):1622-1627. IF 3,371

New developments in septic acute kidney injury.

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

Physiol Res. 2010;59(6):859-869. IF 1,531

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

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

Intensive Care Med. 2009;35(2):371-380. IF 5,258

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

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

Shock. 2009;31(5):473-480. IF 2,612

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

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

Intensive Care Med. 2009;35(2):364-370. IF 5,258

Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs.

Chvojka J, Sykora R, Kroužecký A, Radej J, Varnerova V, Karvunidis T, Hes O, Novak I, Radermacher P, Matejovic M.

Crit Care. 2008;12(6):R164. IF 4,72

Syndrom multiorgánové dysfunkce – od molekul k lůžku.

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

Anest Intenziv Med. 2010;21(3)158-164

Náhrada a podpora funkce ledvin u kriticky nemocných – update 2009.

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

Anest Intenziv Med. 2010;21(3)153-157

Akutní poškození ledvin u kriticky nemocných – update 2009.

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

Anest Intenziv Med. 2010;21(3)146-152

Plazmafiltrace spojená s adsorpcí v experimentálním septickém šoku – překlad originálního článku.

Sýkora R, Chvojka J, Kroužecký A, Raděj J, Kuncová J, Varnerová V, Karvunidis T, Novák I, Matějovič M.

Anest Intenziv Med. 2010;21(2)95-103

Pacientka s těžkou protražovanou hypoglykemií

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

Anest Intenziv Med. 2009;20(4):200-202

24letý muž s horečkami, multiorgánovou dysfunkcí a rychle progredujícím ARDS.

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

Vnitr Lek. 2009;55(10):991-994

Vysokoobjemová versus standardní hemofiltrace v experimentální sepsi při peritonitidě.

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

Anest Intenziv Med. 2009;20(5):246-256

Regionální chlazení mimotělního okruhu – nová možnost antikoagulačního zajištění metod kontinuální náhrady funkce ledvin

Kroužecký A, Sýkora R, Chvojka J, Karvunidis T, Raděj J, Novák I, Růžička J, Beneš J, Petránková Z, Bolek L, Matějovič M.

Anest Intenziv Med. 2009;20(3):143-148

Perzistentní průjmy, hypotenze a polyneuropatie.

Sýkora R, Raděj J, Novák I, Kroužecký A, Mareš J, Irová I, Hadravská S, Chvojka J, Karvunidis T, Maňáková T, Matějovič M.

Vnitr Lek. 2008 Nov;54(11):1106-1110

Hemoeliminační metody v léčbě sepse: současný stav.

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

Vnitr Lek. 2008;54(10):1000-1005

Kortikosteroidy v léčbě ALI/ARDS

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

Anest Intenziv Med. 2008;19(6):314-318

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

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

Anest Intenziv Med. 2008;19(3):154-158

Novinky v nefrologii kriticky nemocných.

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

Anest Intenziv Med. 2008;19(1):23-25

I. Septic shock and chemotherapy-induced cytopenia: effect on microcirculation.

Karvunidis Thomas, Chvojka J, Lysak D, Sykora R, Krouzecky A, Radej J, Novak I,
Matejovic M.

Intensive Care Med. 2012; 38(8):1336-1344. IF 5,258

Citace:

Year in review in Intensive Care Medicine 2012. II: Pneumonia and infection, sepsis, coagulation, hemodynamics, cardiovascular and microcirculation, critical care organization, imaging, ethics and legal issues.

Antonelli M, Bonten M, Cecconi M, Chastre J, Citerio G, Conti G, Curtis JR, Hedenstierna G, Joannidis M, Macrae D, et al.

Intensive Care Med. 2013 Mar; 39(3):345-64. Epub 2013 Jan 5. IF 5,258

Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock.

De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent JL.

Virulence. 2014 Jan 1; 5(1):73-79. Epub 2013 Sep 25. IF 2,787

Ocenění:

Ocenění České společnosti intenzivní medicíny ČLS-JEP za nejlepší publikaci v zahraničním časopise s IF v roce 2013.

Thomas Karvunidis
Jiri Chvojka
Daniel Lysak
Roman Sykora
Ales Krouzecky
Jaroslav Radej
Ivan Novak
Martin Matejovic

Septic shock and chemotherapy-induced cytopenia: effects on microcirculation

Received: 20 September 2011
Accepted: 8 April 2012

© Copyright jointly held by Springer and ESICM 2012

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:[10.1007/s00134-012-2582-4](https://doi.org/10.1007/s00134-012-2582-4)) contains supplementary material, which is available to authorized users.

T. Karvunidis · J. Chvojka · R. Sykora ·
A. Krouzecky · J. Radej · I. Novak ·
M. Matejovic (✉)
1st Department of Medicine, Intensive Care
Unit, Charles University in Prague, Medical
School and Teaching Hospital in Pilsen,
Alej Svobody 80,
304 60 Pilsen, Czech Republic
e-mail: matejovic@fnplzen.cz
Tel.: +420-377-103501
Fax: +420-377-103506

D. Lysak
Department of Hematology and Oncology,
Teaching Hospital in Pilsen,
Pilsen, Czech Republic

Abstract Purpose: Neutrophil and platelet activation and their interactions with endothelial cells are considered central features of sepsis-induced microcirculatory alterations. However, no study has evaluated the microvascular pattern of septic shock patients with chemotherapy-induced severe cytopenia. **Methods:** Demographic and hemodynamic variables together with sublingual microcirculation recording [orthogonal polarization spectral imaging enhanced by sidestream dark-field technology (OPS-SDF) videomicroscopy] were collected in four groups of subjects: septic shock (SS, $N = 9$), septic shock in cytopenic patients (NSS, $N = 8$), cytopenia without infection (NEUTR, $N = 7$), and healthy controls (CTRL, $N = 13$). Except for controls, all measurements were repeated after complete resolution of septic shock and/or neutropenia. Video files were processed using appropriate software tool and semiquantitatively evaluated [total vascular density (TVD, mm/mm^2), perfused vessel density (PVD, mm/mm^2), proportion of perfused vessels (PPV, %), mean flow index (MFI), and flow heterogeneity index (FHI)]. **Results:** Compared with controls, there were statistically significant microcirculatory alterations within all tested groups of patients (TVD: SS = 8.8, NSS = 8.8,

NEUTR = 9.1 versus CTRL = 12.6, $p < 0.001$; PVD: SS = 6.3, NSS = 6.1, NEUTR = 6.9 versus CTRL = 12.5, $p < 0.001$; PPV: SS = 71.6, NSS = 68.9, NEUTR = 73.3 versus CTRL = 98.7, $p < 0.001$; MFI: SS = 2.1, NSS = 1.9, NEUTR = 2.1 versus CTRL = 3.0, $p < 0.05$; FHI: SS = 1.0, NSS = 0.9, NEUTR = 0.6 versus CTRL = 0.0, $p < 0.001$). No significant differences were detected between SS, NSS, and NEUTR groups at baseline. Incomplete restoration of microcirculatory perfusion was observed after septic shock and/or neutropenia resolution with a trend towards better recovery in MFI and FHI variables in NSS as compared with SS patients. **Conclusions:** Microvascular derangements in septic shock did not differ between noncytopenic and cytopenic patients. Our data might suggest that profound neutropenia and thrombocytopenia do not render microcirculation more resistant to sepsis-induced microvascular alterations. The role and mechanisms of microvascular alterations associated with chemotherapy-induced cytopenia warrant further investigation.

Keywords Sepsis · Microcirculation · Neutropenia · Organ dysfunction · Chemotherapy

Introduction

Neutrophils are suggested as key players in pathophysiology and natural progression of sepsis, septic shock, and multiple organ dysfunction syndrome (MODS) [1, 2]. They have a pivotal role in the defense against bacterial infections, as shown by neutropenia (e.g., after chemotherapy and/or immunotherapy), which increases susceptibility to infection and sepsis [3]. Neutrophils are effector cells initializing and providing the pathogen-associated molecular pattern discrimination of invading microorganisms. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, proteases, elastases, adhesive molecules, endothelium activation, internalization, and pathogen destruction are just a brief list of their mechanisms taking part in the systemic inflammatory response and its consequences [1].

Microcirculatory dysfunction is a complex and pivotal element of the pathogenesis of severe sepsis and septic shock [4–9]. Blood flow heterogeneity (maldistribution/shunting), red blood cell (RBC) rigidity, adhesion, activation and aggregation of leukocytes (neutrophils and macrophages), activation of coagulation cascade and thrombocytes, deregulated production of nitric oxide (NO), oxidative stress, and endothelial dysfunction itself are all involved in sepsis-induced microvascular failure. In particular, activated leukocytes and platelets can adhere to the vessel wall, aggregate, and impair flow through the microcirculation [4, 10]. In addition to mechanical obstruction of capillaries, leukocytes are capable of inducing and propagating endothelial and tissue injury by releasing a myriad of toxic mediators. Several studies have implicated a major role for neutrophils in the genesis of ischemia/reperfusion-mediated microvascular dysfunction [11–13]. In support of this notion, the protective effects of leukocyte depletion against reperfusion injury have also been demonstrated in experimental settings [14–16]. By contrast, the pattern of microvascular alterations in septic patients with profound depletion of leukocytes and platelets has not been described so far. Therefore, the aim of our study is to analyze changes of microvascular perfusion in septic shock patients with chemotherapy-induced cytopenia and compare these changes with those recorded from standard septic shock population.

Materials and methods

Study design and patients

This prospective single-center observational study was approved by the Local Ethics Committee of the Charles University Medical School and Teaching Hospital in Pilsen. The recruitment of subjects was performed in the tertiary medical Intensive Care Unit (ICU) of the 1st

Department of Medicine, Charles University Medical School and Teaching Hospital in Pilsen, Czech Republic and in the Department of Hematology and Oncology of the same institution. Adult patients (>18 years) fulfilling generally accepted criteria for septic shock [17], with (NSS group) or without (SS group) neutropenia [defined as absolute neutrophil count (ANC) $<1 \times 10^9/L$] and adult patients with drug-induced (chemotherapy- and/or immunotherapy-induced) neutropenia (Table 2) without infection (NEUTR group) were enrolled into the study. Healthy volunteers to form the control group (CTRL group) were recruited from ICU medical staff. Informed consent was obtained from all subjects or their substitutes-in-law (mechanically ventilated and/or unconscious and/or consecutively deceased patients).

Demographics

Demographic variables such as race, gender, age, source of infection, severity of illness scores [Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score II (APACHE II), Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA)], ICU mortality, and in-hospital mortality were collected.

Hemodynamic and laboratory measurements

The measurement of systemic hemodynamics included heart rate (HR), mean arterial blood pressure (MAP), central venous pressure (CVP), and central venous oxygen saturation (ScvO₂). Laboratory assessment of pH, base excess (BE), arterial partial pressure of oxygen (p_aO₂), arterial partial pressure of carbon dioxide (p_aCO₂), arterial lactate, blood count [particularly white blood cells/absolute neutrophil count (WBC/ANC), hemoglobin (Hb), and platelets (PLT)] were performed. Complementary data indicating application and dose of vasoactive and inotrope agents (noradrenaline/norepinephrine, dobutamine, levosimendan, etc.) as well as analgosedation were recorded.

Microcirculation assessment and analysis

The microcirculatory network was evaluated in the sublingual mucosa region using an orthogonal polarization spectral (OPS) imaging enhanced by sidestream dark-field technology (OPS-SDF) device (Microscan; MicroVision Medical, Amsterdam, The Netherlands) [18]. A number of cautions and recommended steps were followed to obtain video sequences of adequate quality to ensure sufficient reproducibility (see also the Electronic Supplementary Material, ESM1). Skilled researchers (T.K., J.Ch. and R.S.) performed bedside video acquisition and image analyses. After gentle removal of saliva, steady video recordings of at least 20 s from five different

sublingual areas were obtained while avoiding pressure artifacts and stored as anonymous code-marked (random number generator) AVI files on hard drive to allow subsequent computerized frame-by-frame analysis [19]. Video clips were assessed in blinded fashion using dedicated software (Microscan Analysis Software and Automated Vascular Analysis v3.0; MicroVisionMedical, Amsterdam, The Netherlands) following the recommended workflow within the software environment to get steady video loops. Their quantitative analysis is represented by total vascular density (TVD), calculated as total length of microvessels of diameter $<20 \mu\text{m}$ divided by total surface of respective area (expressed as mm/mm^2). Next, vessel perfusion was categorized visually as present (continuous flow for at least 20 s), absent (no flow for at least 20 s), or intermittent (at least 50 % of the time with no flow). The proportion of perfused vessels (PPV, %) was calculated as follows: $100 \times (\text{total number of vessels} - [\text{no flow} + \text{intermittent flow}]) / \text{total number of vessels}$. Perfused vessel density (PVD) was then derived by multiplying vessel density (TVD) by the proportion of perfused vessels (PPV). Semiquantitative software-assisted analysis of microvascular blood flow heterogeneity was expressed by mean flow index (MFI) and flow heterogeneity index (FHI) as described in literature [10, 19, 20] to characterize heterogeneity of blood flow in different clinical states. TVD, PVD, PPV, and MFI scores were calculated from all five different sublingual areas of each study subject and then averaged (see also the Electronic Supplementary Material, ESM2).

Study protocol

Demographic, clinical, and laboratory data together with the first set of sublingual microcirculation OPS-SDF image recording were collected within the first 24 h after septic shock and/or neutropenia development (timepoint 1, TP1). The second set of data collection was performed within 24 h after shock and/or neutropenia resolution (timepoint 2, TP2), defined as durable weaning from vasoactive agent(s) and/or $\text{ANC} > 1 \times 10^9/\text{L}$ persisting for more than 24 h. In the control group, two sets of data collection were gathered within an interval of 24 h.

Statistical analysis

After excluding normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test), differences between study groups were analyzed using Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) on ranks. Differences between the two timepoints within one group were tested using Mann–Whitney rank-sum test. $p < 0.05$ was considered significant. Data are showed as median (M) and interquartile range (IQR) if not stated otherwise.

Results

Study population characteristics and demographics are summarized in Tables 1 and 2. Seventeen patients with

Table 1 Demographic characteristics

Variable	Septic shock (SS)	Septic shock with neutropenia (NSS)	Neutropenia (NEUTR)	Controls (CTRL)
No. of subjects	9	8	7	13
Male gender (%)	7 (77.8)	7 (87.5)	4 (57.1)	10 (76.9)
Age (years)	77 (55.8; 81.3)*, #, †	62 (45.5; 63.5)*	56 (47.5; 63.0)*	36 (34.0; 41.0)
Infection source (%)				
Pneumonia	4 (44.4)	6 (75.0)	N/A	N/A
Intraabdominal	3 (33.3)	2 (25.0)	N/A	N/A
Genitourinary	2 (22.3)	0 (0)	N/A	N/A
APACHE II	22 (22; 35)	21 (19; 23)	N/A	N/A
SOFA	16 (12; 17)	16.5 (11; 17)	N/A	N/A
Mechanical ventilation (%)	9 (100)	7 (87.5)	0 (0)	N/A
ICU mortality (%)	2 (22.2)	4 (50)	N/A	N/A
In-hospital mortality (%)	6 (66.7)	4 (50)	N/A	N/A
Duration of septic shock (days)	5 (4; 5)	5 (4; 12)	N/A	N/A
Duration of neutropenia (days)	N/A	7 (4; 12)	20 (13; 21)	N/A
Chemoth./immunoth.–TP1 interval (days)	N/A	11 (8; 119) [§]	6 (4; 6)	N/A
TP1–TP2 interval (days)	4 (3; 4) [†]	4 (3; 12) [§]	16 (13; 23)	1 (1; 1)
G-CSF Rx, number (%)	0	5 (62.5)	1 (14.3)	N/A

APACHE II Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score II, SOFA Sequential Organ Failure Assessment Score, ICU intensive care unit, G-CSF Rx granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) application

* Statistical significance versus CTRL ($p < 0.05$); # statistical significance SS versus NSS ($p < 0.05$); † statistical significance SS versus NEUTR ($p < 0.05$); § statistical significance NSS versus NEUTR ($p < 0.05$)

Table 2 Characteristics of neutropenic groups (NSS and NEUTR)

Patient	Group	Hematologic disease	Disease status	SCT	Chemotherapy/immunotherapy	G-CSF	Mortality
1	NSS	MDS RAEB II	PR	No	Idarubicin + cytosine arabinoside + mitoxantrone	Yes	Yes
2		B-ALL	CR	No	Idarubicin + cytosine arabinoside + etoposide	No	No
3		AML/MDS RAEB II	Newly diagnosed	No	Idarubicin + cytosine arabinoside	No	Yes
4		CLL	PR	No	Dexamethasone + carmustine + etoposide + cytosine arabinoside + melphalan	Yes	Yes
5		CLL	Progression	No	Fludarabine + rituximab + alemtuzumab	Yes	Yes
6		AML	CR	alloPBST	Fludarabine + melphalan	Yes	Yes
7		B-ALL	CR	alloPBST	Busulfan + cyclophosphamide	Yes	No
8		AML/APL	Newly diagnosed	No	Idarubicin + cytosine arabinoside + mitoxantrone	No	No
9	NEUTR	B-ALL	Newly diagnosed	No	Daunorubicin + vincristine + prednisone + imatinib	No	No
10		B-ALL	Newly diagnosed	No	Daunorubicin + vincristine + prednisone	No	No
11		AML/MDS	Newly diagnosed	No	Idarubicin + cytosine arabinoside	No	No
12		AML	Newly diagnosed	No	Idarubicin + cytosine arabinoside	No	No
13		AML	CR	No	Idarubicin + cytosine arabinoside + mitoxantrone	Yes	No
14		AML	Newly diagnosed	No	Idarubicin + cytosine arabinoside	No	No
15		AML	Newly diagnosed	No	Idarubicin + cytosine arabinoside	No	No

SCT stem cell transplantation/bone marrow transplantation, G-CSF granulocyte colony-stimulating factor, MDS myelodysplastic syndrome, MDS RAEB MDS refractory anemia with excess of blasts, B-ALL acute B-lymphocytic leukemia, AML acute myeloid

leukemia, CLL chronic lymphocytic leukemia, APL acute promyelocytic leukemia, PR partial remission, CR complete remission, alloPBST allogeneic peripheral blood stem cell transplantation

septic shock (9 without and 8 with neutropenia), 7 infection-free neutropenic patients, and 13 controls were enrolled. Six individuals with septic shock died in the ICU. Eleven patients who recovered from septic shock and/or neutropenia were accessible for the TP2 follow-up. The TP1–TP2 interval did not differ between the two septic shock groups (SS and NSS), but was significantly longer in the NEUTR group. All seven neutropenic patients without infection had uneventful recovery and were discharged from the hospital.

Systemic hemodynamic and laboratory variables

Hemodynamic and laboratory variables as well as vasopressor support were comparable between SS and NSS groups (Table 3). By definition, patients in NSS and NEUTR groups had significantly lower number of ANC as compared with SS and CTRL groups. Similarly, the number of circulating platelets was markedly lower in NSS and NEUTR patients. Severity of pancytopenia was identical in both NSS and NEUTR group. In this cohort, granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, filgrastim 48MU, 0.48 mg/day) was prescribed to shorten the neutropenic period in five (62.5 %) and one (14.3 %) cases, respectively.

Microcirculation variables

Sublingual microcirculation characteristics expressed as TVD, PVD, PPV, MFI, and FHI are shown in Table 4 and Figs. 1, 2 (see also the Electronic Supplementary Material, ESM3). Compared with healthy controls, there were statistically significant derangements in all measured microvascular parameters in both SS and NSS groups. No differences were detected between septic shock patients without neutropenia (SS group) and those with leukocyte depletion (NSS group) at TP1. Surprisingly, the microcirculatory assessment of infection-free patients with neutropenia (NEUTR group) also revealed significant alterations in all microvascular variables. Although the microvascular changes failed to normalize completely in all three groups of patients (SS, NSS, NEUTR), there was a trend towards better recovery in MFI and FHI variables in NSS as compared with SS patients.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first clinical study reporting evaluation of microvascular changes in septic shock patients with chemotherapy-induced cytopenia.

Table 3 Hemodynamic and laboratory variables

Variable	Group	TP1	TP2
MAP (mmHg)	SS	77 (74; 80)* [†]	81 (76; 86) ^{†,‡}
	NSS	77 (74; 82)* [§]	82 (80; 95) ^{§,‡}
	NEUTR	97 (95; 98)	91 (85; 96)
	CTRL	93 (78; 103)	93 (83; 102)
Noradrenaline (µg/kg/min)	SS	0.6 (0.3; 0.8)	0 (0; 0) [‡]
	NSS	0.5 (0.3; 1.0)	0 (0.0; 0.1) [‡]
	NEUTR	N/A	N/A
	CTRL	N/A	N/A
HR (min ⁻¹)	SS	92 (80; 121)*	89 (73; 92)
	NSS	110 (85; 116)* [§]	86 (72; 93)
	NEUTR	73 (65; 83)	87 (78; 89) [‡]
	CTRL	68 (62; 72)	70 (60; 77)
CVP (mmHg)	SS	11 (8; 12) [†]	11 (10; 13) [†]
	NSS	10 (9; 15) [§]	9 (7; 12)
	NEUTR	4 (2; 6)	5 (3; 8)
	CTRL	N/A	N/A
pH	SS	7.35 (7.31; 7.38) [†]	7.49 (7.45; 7.52) [‡]
	NSS	7.42 (7.38; 7.44)	7.49 (7.45; 7.52)
	NEUTR	7.46 (7.44; 7.47)	7.47 (7.40; 7.48)
	CTRL	N/A	N/A
p _a O ₂ (kPa)	SS	11.1 (9.2; 13.2)	11.0 (10.7; 15.3)
	NSS	12.8 (10.9; 16.2)	16.0 (13.6; 19.0)
	NEUTR	10.9 (10.2; 12.2)	11.1 (9.4; 12.1)
	CTRL	N/A	N/A
p _a CO ₂ (kPa)	SS	5.6 (4.9; 6.4)	5.7 (4.8; 5.9)
	NSS	5.0 (3.6; 5.5)	5.1 (4.7; 5.5)
	NEUTR	4.3 (4.3; 4.6)	4.8 (4.7; 5.4)
	CTRL	N/A	N/A
BE	SS	-2.2 (-7.0; 2.8)	6.5 (4.1; 8.3) [‡]
	NSS	-1.7 (-6.9; 1.7)	4.5 (3.2; 8.7)
	NEUTR	0 (-1.4; 0.6)	1.6 (0.8; 5.3)
	CTRL	N/A	N/A
SaO ₂ (%)	SS	95 (92.7; 98)	97 (96; 98)
	NSS	98 (96; 98)	98 (96; 99)
	NEUTR	98 (97.8; 98.2)	97 (95; 98)
	CTRL	N/A	N/A
ScvO ₂ (%)	SS	72 (66; 76)	75 (72.2; 77.8)
	NSS	68.5 (59.0; 71.5)	66 (55.5; 72.0)
	NEUTR	65 (62.7; 68.0)	76 (71.5; 78.0)
	CTRL	N/A	N/A
a-lactate (mmol/l)	SS	2.9 (1.9; 4.5)	1.8 (1.2; 2.0) [‡]
	NSS	3.0 (1.3; 6.2)	1.8 (1.2; 2.3) [‡]
	NEUTR	0.9 (0.6; 2.2)	0.9 (0.8; 0.9)
	CTRL	N/A	N/A
Hb (g/L)	SS	109 (100; 132) ^{#,†}	91 (89; 122)
	NSS	92 (80; 94)	95 (88; 98)
	NEUTR	79 (76; 89)	98 (90; 105) [‡]
	CTRL	N/A	N/A
ANC (×10 ⁹ /L)	SS	25.1 (14.7; 32.4) ^{#,†}	12.3 (10.2; 20.4) ^{#,†,‡}
	NSS	0.3 (0.2; 0.8)	1.9 (1.6; 5.4) [‡]
	NEUTR	0.7 (0.4; 0.8)	2.3 (2.0; 4.8) [‡]
	CTRL	N/A	N/A
Platelets (×10 ⁹ /L)	SS	196 (127; 332) ^{#,†}	216 (115; 298)
	NSS	12 (10; 14)	22 (12; 396)
	NEUTR	17 (14; 24)	95 (50; 209) [‡]
	CTRL	N/A	N/A
CRP (mg/L)	SS	212 (160; 268) [†]	111 (95; 214) ^{#,†,‡}
	NSS	314 (153; 357) [§]	35 (24; 67) ^{§,‡}
	NEUTR	12 (3; 26)	8 (5; 10)
	CTRL	N/A	N/A
aPTT (s)	SS	34.2 (32.8; 43.9)	35.6 (31.1; 37.8)
	NSS	40.0 (35.9; 48.8)	33.4 (27.9; 48.4)
	NEUTR	34.4 (32.3; 40.0)	33.6 (28.2; 35.8)
	CTRL	N/A	N/A

Table 3 continued

Variable	Group	TP1	TP2
INR	SS	1.6 (1.4; 1.7) [†]	1.2 (1.2; 1.4) [‡]
	NSS	1.7 (1.6; 2.0) [§]	1.3 (1.2; 1.7) [§]
	NEUTR	1.1 (1.1; 1.2)	1.2 (1.1; 1.2)
	CTRL	N/A	N/A

MAP mean arterial pressure, HR heart rate, CVP central venous pressure, p_aO_2 arterial partial pressure of oxygen, p_aCO_2 arterial partial pressure of carbon dioxide, BE base excess, SaO_2 arterial (hemoglobin) oxygen saturation, $ScvO_2$ central venous oxygen saturation, a -lactate arterial lactate, ANC absolute neutrophil count, Hb hemoglobin, CRP C-reactive protein, aPTT activated partial thromboplastin time, INR international normalized ratio (PT)

* Statistical significance versus CTRL ($p < 0.05$); #statistical significance SS versus NSS ($p < 0.05$); †statistical significance SS versus NEUTR ($p < 0.05$); §statistical significance NSS versus NEUTR ($p < 0.05$); ‡statistical significance versus TP1 ($p < 0.05$)

Table 4 Vessel density and perfusion variables

Variable	Group	TP1	TP2
TVD (mm/mm ²)	SS	8.8 (8.7; 9.0)*	9.3 (9.2; 9.4)* [‡]
	NSS	8.8 (8.2; 8.9)*	9.3 (9.3; 9.4)* [‡]
	NEUTR	9.1 (9.1; 9.3)* [§]	9.6 (9.2; 9.9)*
	CTRL	12.6 (11.2; 15.8)	12.5 (11.9; 13.7)
PVD (mm/mm ²)	SS	6.3 (6.1; 6.7)*	7.8 (7.2; 7.8)* [‡]
	NSS	6.1 (5.7; 6.5)*	7.7 (7.6; 7.9)* [‡]
	NEUTR	6.9 (6.3; 7.1)*	8.4 (7.8; 8.6)* [‡]
	CTRL	12.5 (11.2; 15.6)	12.5 (11.9; 14.1)
PPV (%)	SS	71.6 (69.8; 72.0)*	79.6 (77.9; 81.2)* [‡]
	NSS	68.9 (67.3; 71.2)*	81.9 (81.0; 85.7)* [‡]
	NEUTR	73.3 (72.0; 76.1)*	86.7 (83.3; 88.0)* [‡]
	CTRL	98.7 (98.4; 99.1)	99.0 (98.2; 99.3)

TVD Total vascular density (mm/mm²), PVD perfused vessel density (mm/mm²), PPV (%) proportion of perfused vessels

* Statistical significance versus CTRL ($p < 0.05$); #statistical significance SS versus NEUTR ($p < 0.05$); §statistical significance NSS versus NEUTR ($p < 0.05$); ‡statistical significance versus TP1 ($p < 0.05$)

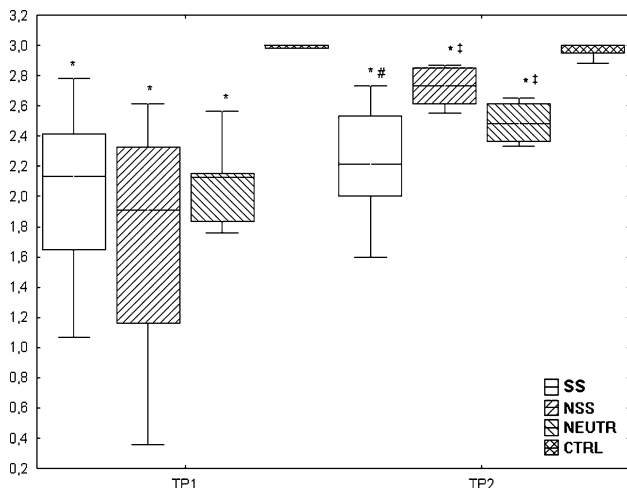


Fig. 1 Mean flow index (MFI [1]) in patients with septic shock (SS; $n = 9$), septic shock with cytopenia (NSS; $n = 8$), cytopenia without sepsis (NEUTR; $n = 7$), and healthy volunteers (CTRL; $n = 13$) at baseline (TP1) and after resolution of septic shock and/or neutropenia (TP2). *Statistical significance versus CTRL group ($p < 0.05$); #statistical significance SS versus NSS ($p < 0.05$); ‡statistical significance versus TP1 ($p < 0.05$)

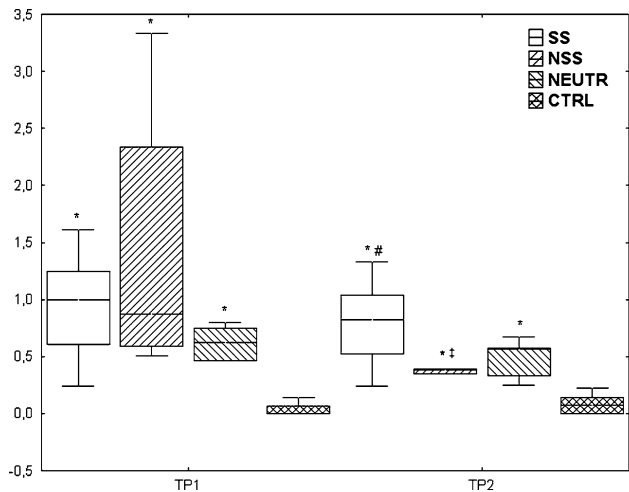


Fig. 2 Flow heterogeneity index (FHI [1]) in patients with septic shock (SS; $n = 9$), septic shock with cytopenia (NSS; $n = 8$), cytopenia without sepsis (NEUTR; $n = 7$), and healthy volunteers (CTRL; $n = 13$) at baseline (TP1) and after resolution of septic shock and/or neutropenia (TP2). *Statistical significance versus CTRL group ($p < 0.05$); #statistical significance SS versus NSS ($p < 0.05$); ‡statistical significance versus TP1 ($p < 0.05$)

Direct visualization of sublingual microcirculation revealed that both the character and magnitude of microvascular alterations observed in septic patients with chemotherapy-induced severe leukocyte and platelet depletion did not differ from those seen in noncytopenic septic patients. Surprisingly, chemotherapy-induced cytopenia per se was associated with similar significant alterations of sublingual microcirculation.

Several clinical studies carried out over the past decade have demonstrated marked alterations in microvascular perfusion during sepsis [4, 9, 10]. Although a limited number of clinical studies reported the same microvascular variables, the magnitude of the changes observed in our study corresponds to those reported previously [10, 21, 22] (see also the Electronic Supplementary Material, ESM4). Similarly, emerging evidence supports the key participation of circulating leukocytes in mediating microvascular dysfunction in various states of

acute inflammation [1, 23, 24]. Mechanisms whereby activated leukocytes contribute to microcirculatory failure include increased neutrophil–endothelial, neutrophil–platelet, and neutrophil–red blood cell interactions in the inflamed microcirculation, all resulting in leukocyte capillary plugging and release of a broad spectrum of cytotoxic mediators [24]. It is therefore reasonable to speculate that neutrophil depletion could provide some protection against sepsis-induced alterations in microvascular perfusion. In support of this notion, several experimental studies showed preserved microcirculatory functions in neutrophil-depleted animals challenged with ischemia/reperfusion insult [14–16, 25–29]. In addition, adhesion molecules-deficient mice exhibited improved capillary blood flow during gut ischemia/reperfusion injury [30]. Similarly, neutrophil depletion attenuated pulmonary vasomotor dysfunction in endotoxin-induced acute lung injury [31]. Finally, abnormal sublingual microvascular blood flow and its normalization were reported in a patient diagnosed with and treated for chronic myeloid leukemia [32].

Nonetheless, the examination of the microcirculation in our study has shown that neutrophil depletion did not afford any measurable protection against sepsis-mediated microvascular failure. From this finding, it could be argued that circulating peripheral leukocytes might not be a dominant prerequisite for microcirculatory distress in sepsis. Indirect support for the notion that the action of neutrophils is not required in the genesis of microvascular and tissue injury was provided by an earlier study showing the development of acute respiratory distress syndrome even in patients with profound neutropenia [33]. On the other hand, our results cannot refute the pivotal role of residual neutrophils sequestered in the microvasculature [1]. Indeed, Hirsh et al. [34] hypothesized that failure of cyclophosphamide-induced severe neutropenia to protect mice from sepsis-induced acute lung injury could be ascribed to the persistence of residual lung polymorphonuclear cells. Furthermore, the presence of cellular subset of neutrophils with specific phenotype, level of activation, and secretory profile seems to be more important than their absolute count [1]. Not only activated neutrophils themselves are able to trigger microcirculatory changes. The role of natural killer cells (NK cells) and/or dendritic cells, potent immunomodulatory elements [35, 36], should be taken into consideration. Moreover, there are other mechanisms, not assessed in our study, that are capable of promoting microvascular changes, such as endothelial cell injury resulting from direct toxicity of cytokines and free radicals or activation of coagulation cascade leading to the formation of widespread microvascular thrombosis [37]. Finally, direct chemotherapy-driven endothelial injury preceding the development of sepsis might have outweighed the potentially protective effects of profound leukocyte depletion.

Since all neutropenic patients had concomitant severe chemotherapy-induced thrombocytopenia, one could also consider the role of low platelet count in microvascular responses to sepsis. Indeed, there is growing evidence for the involvement of platelets in the microvascular dysfunction under conditions of systemic inflammation [38–41]. Like leukocytes, platelets produce a large number of chemokines that have the potential to impair endothelial barrier function [38]. Given these considerations, platelet depletion occurring before an onset of sepsis could actually be perceived as protective against sepsis-induced microvascular alterations. However, our data suggest that even profound thrombocytopenia does not alter the septic microvascular phenotype seen on OPS imaging.

As mentioned above, the finding of microvascular derangements seen even in sepsis-free patients with chemotherapy-induced cytopenia represents another important and striking feature of the present study. To our knowledge, this is the first evidence obtained from directly visualized microcirculation to show that chemotherapy per se might be associated with microvascular toxicity. The absence of any apparent acute illness or organ dysfunction in these patients raises the as yet unrecognized possibility of chemotherapy-triggered, albeit clinically hidden, endothelial toxicity [42–45]. The chemotherapeutic regimen used in our patient population, in particular anthracyclines and cytosine arabinoside, carries potential toward direct [46] as well as indirect [via reactive oxygen species/nitric oxide synthase (NOS) pathway] [37] endothelial cell injury. Moreover, expression of adhesion molecules (integrins, cadherins) and subsequently intercellular connections/interactions of endothelial cells are modified or disrupted when treated with such chemotherapeutics [46]. Alternatively, the role of residual circulating activated hematological tumor cells and/or various cytokines released from them after chemotherapy-induced cell lysis in mediating microvascular alterations should also be taken into consideration [47–49]. However, the significance of this observation remains unclear and warrants further studies.

Interestingly, the recovery of microvascular changes in cytopenic septic patients was significantly better in terms of blood flow heterogeneity (MFI and FHI) as compared with septic patients without neutropenia. The exact reason for this observation is not readily apparent. Despite comparable resolution of septic shock state, we can speculate that the control of sepsis could have been better in cytopenic septic patients as suggested by more rapid, more prominent reduction in C-reactive protein [50]. The role of persistent thrombocytopenia in the microvascular repair is tempting, but purely speculative. Of note, in previous studies neutropenia recovery has been associated with worsening of pulmonary dysfunction, in particular when supported by granulocyte colony-stimulating factor [51]. In this context, our study did not

reveal microvascular toxicity related to the neutropenia recovery.

There are some limitations to our study that should be mentioned. First, one should take into account limitations of the method used for microvascular assessment in our study [8]. The OPS technique provides optical imaging of hemoglobin-containing microvascular structures, without allowing us to analyze leukocyte–endothelial interactions directly. Therefore, our approach provides only a rough estimate of the changes, and moderate or more subtle microcirculatory alterations could not be detected. In addition, relatively low number of subjects in all groups could limit the power to disclose differences. Furthermore, our control group was not age-matched. Hence, one could argue that control values in the control group might have been different in age-matched individuals because of microvascular aging and/or comorbidities. Nevertheless, Boerma et al. [21] measured the same values of MFI obtained at the stoma site of otherwise healthy outpatient individuals with median age of 59 years. Finally, a number of molecular events that might play a role in the

microvascular dysfunction in sepsis were not examined. These include leukocyte/neutrophil functional analysis, assessment of leukocyte–endothelial interaction(s), adhesive molecules, as well as markers of endothelial dysfunction.

Within the boundaries of the limitations, our study showed that profound chemotherapy-induced cytopenia did not modify the pattern of sepsis-induced microvascular dysfunction. Although our study could suggest that even profound neutropenia and thrombocytopenia do not render microcirculation more resistant to sepsis-induced microvascular distress, the role of residual polymorphonuclear cells and platelets cannot be excluded. The mechanisms and consequences of microvascular changes associated with myeloablative chemotherapy warrant further investigation.

Acknowledgments This work was supported by a research grant MSM 0021620819 (Replacement of and support to some vital organs).

References

- Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF (2006) Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368:157–169
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM (2005) Septic shock. *Lancet* 365:63–78
- Hotchkiss RS, Karl IE (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348:138–150
- De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL (2002) Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 166:98–104
- Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, Creteur J, Vincent JL (2004) Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med* 32:1825–1831
- Ince C (2005) The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care* 9(Suppl 4):S13–S19
- De Backer D, Ortiz JA, Salgado D (2010) Coupling microcirculation to systemic hemodynamics. *Curr Opin Crit Care* 16:250–254
- De Backer D, Ospina-Tascon G, Salgado D, Favory R, Creteur J, Vincent JL (2010) Monitoring the microcirculation in the critically ill patient: current methods and future approaches. *Intensive Care Med* 36:1813–1825
- Pottecher J, Derudder S, Teboul JL, Georger JF, Laplace C, Benhamou D, Vicaute E, Duranteau J (2010) Both passive leg raising and intravascular volume expansion improve sublingual microcirculatory perfusion in severe sepsis and septic shock patients. *Intensive Care Med* 36:1867–1874
- Trzeciak S, Dellinger RP, Parrillo JE, Guglielmi M, Bajaj J, Abate NL, Arnold RC, Colilla S, Zanotti S, Hollenberg SM, Microcirculatory Alterations in Resuscitation and Shock Investigators (2007) Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med* 49:88–98
- Fondevila C, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW (2003) Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Exp Mol Pathol* 74:86–93
- Buras JA, Reenstra WR (2007) Endothelial-neutrophil interactions during ischemia and reperfusion injury: basic mechanisms of hyperbaric oxygen. *Neurol Res* 29:127–131
- Yilmaz G, Granger DN (2010) Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. *Neuromolecular Med* 12:193–204
- Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ (1990) Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res* 66:1436–1444
- Dawson DA, Ruetzler CA, Carlos TM, Kochanek PM, Hallenbeck JM (1996) Polymorphonuclear leukocytes and microcirculatory perfusion in acute stroke in the SHR. *Keio J Med* 45:248–252
- Bertuglia S, Colantuoni A (2000) Protective effects of leukopenia and tissue plasminogen activator in microvascular ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H755–H761
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, International Sepsis Definitions Conference (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29:530–538
- Goedhart PT, Khalilzadeh M, Bezemer R, Merza J, Ince C (2007) Sidestream dark field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Opt Express* 15:15101–15114

19. De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, Goedhart P, Büchele G, Ospina-Tascon G, Dobbe I, Ince C (2007) How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care* 11:R101
20. Boerma EC, Mathura KR, van der Voort PH, Spronk PE, Ince C (2005) Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study. *Crit Care* 9:R601–R606
21. Boerma EC, van der Voort PH, Spronk PE, Ince C (2007) Relationship between sublingual and intestinal microcirculatory perfusion in patients with abdominal sepsis. *Crit Care Med* 35:1055–1060
22. Ruiz C, Hernandez G, Godoy C, Downey P, Andresen M, Bruhn A (2010) Sublingual microcirculatory changes during high-volume hemofiltration in hyperdynamic septic shock patients. *Crit Care* 14:R170
23. Lehr HA, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (2000) Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy? *J Pathol* 190:373–386
24. Looney MR, Matthay MA (2009) Neutrophil sandwiches injure the microcirculation. *Nat Med* 15:364–366
25. Hernandez LA, Grisham MB, Twhig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN (1987) Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 253:H699–H703
26. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN (1988) Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 254:H823–H827
27. Suematsu M, DeLano FA, Poole D, Engler RL, Miyasaka M, Zweifach BW, Schmid-Schönbein GW (1994) Spatial and temporal correlation between leukocyte behavior and cell injury in postischemic rat skeletal muscle microcirculation. *Lab Invest* 70:684–695
28. Hoesel LM, Neff TA, Neff SB, Younger JG, Olle EW, Gao H et al (2005) Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock* 24:40–47
29. Turnage RH, Kadesky KM, Rogers T, Hernandez R, Bartula L, Myers SI (1995) Neutrophil regulation of splanchnic blood flow after hemorrhagic shock. *Ann Surg* 222:66–72
30. Horie Y, Wolf R, Anderson DC, Granger DN (1997) Hepatic leukostasis and hypoxic stress in adhesion molecule-deficient mice after gut ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 99:781–788
31. Sheridan BC, McIntyre RC Jr, Moore EE, Meldrum DR, Agrafojo J, Fullerton DA (1997) Neutrophils mediate pulmonary vasomotor dysfunction in endotoxin-induced acute lung injury. *J Trauma* 42:391–396
32. Meinders AJ, Elbers P (2009) Images in clinical medicine. Leukocytosis and sublingual microvascular blood flow. *N Engl J Med* 360:e9
33. Ognibene FP, Martin SE, Parker MM, Schlesinger T, Roach P, Burch C, Shelhamer JH, Parrillo JE (1986) Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N Engl J Med* 315:547–551
34. Hirsh M, Carmel J, Kaplan V, Livne E, Krausz MM (2004) Activity of lung neutrophils and matrix metalloproteinases in cyclophosphamide-treated mice with experimental sepsis. *Int J Exp Pathol* 85:147–157
35. Leung B, Harris HW (2010) NKT cells in sepsis. *Clin Dev Immunol* 2010:414650
36. Efron P, Moldawer LL (2003) Sepsis and the dendritic cell. *Shock* 20:386–401
37. Gando S (2010) Microvascular thrombosis and multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 38:S35–S42
38. Levi M (2005) Platelets in sepsis. *Hematology* 10(Suppl 1):129–131
39. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K (2007) Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev* 21:99–111
40. Weyrich AS, Zimmerman GA (2004) Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol* 25:489–495
41. Ma AC, Kubes P (2008) Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost* 6:415–420
42. Wakabayashi I, Groschner K (2003) Vascular actions of anthracycline antibiotics. *Curr Med Chem* 10:427–436
43. Vasquez-Vivar J, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Pritchard KA Jr, Kalyanaram B (1997) Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from Adriamycin. *Biochemistry* 36:11293–11297
44. Tynl K (2011) Critical role for oxidative stress, platelets, and coagulation in capillary blood flow impairment in sepsis. *Microcirculation* 18:152–162
45. Senkus E, Jassem J (2011) Cardiovascular effects of systemic cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 37:300–311
46. Albini A, Pennesi G, Donatelli F, Cammarota R, De Flora S, Noonan DM (2010) Cardiotoxicity of anticancer drugs: the need for cardio-oncology and cardio-oncological prevention. *J Natl Cancer Inst* 102:14–25
47. Giles FJ (2001) The vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. *Oncologist* 6(Suppl 5):32–39
48. Podar K, Anderson KC (2005) The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 105:1383–1395
49. Lopez-Pedraza C, Barbarroja N, Dorado G, Siendones E, Velasco F (2006) Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies. *Leukemia* 20:1331–1340
50. Schmit X, Vincent JL (2008) The time course of blood C-reactive protein concentrations in relation to the response to initial antimicrobial therapy in patients with sepsis. *Infection* 36:213–219
51. Azoulay E, Attalah H, Yang K, Herigault S, Jouault H, Brun-Buisson C, Brochard L, Harf A, Schlemmer B, Delclaux C (2003) Exacerbation with granulocyte colony-stimulating factor of prior acute lung injury during neutropenia recovery in rats. *Crit Care Med* 31:157–165

II. Recent progress of proteomics in critical illness.

Karvunidis T, Mares J, Thongboonkerd V, Matejovic M.

Shock. 2009;31(6):545-552. IF 2,612

Citace:

Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates.

Wynn JL, Wong HR.

Clin Perinatol. 2010 Jun; 37(2):439-79. IF 2,58

Computational approaches for translational clinical research in disease progression.

McGuire MF, Iyengar MS, Mercer DW.

J Investig Med. 2011 Aug; 59(6):893-903. IF 1,746

Bioinformatics insights into acute lung injury/acute respiratory distress syndrome.

Fang X, Bai C, Wang X.

Clin Transl Med. 2012 Jun 9; 1(1):9. Epub 2012 Jun 9.

Review Article

RECENT PROGRESS OF PROTEOMICS IN CRITICAL ILLNESS

Thomas Karvunidis,^{*†} Jan Mares,^{*‡} Visith Thongboonkerd,[§] and Martin Matejovic^{*†}

**Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Pilsen, and [†]Medical ICU and [‡]Proteomic Laboratory, 1st Department of Internal Medicine, University Hospital Pilsen, Pilsen, Czech Republic; and [§]Medical Proteomics Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

Received 9 Jul 2008; first review completed 11 Aug 2008; accepted in final form 30 Sep 2008

ABSTRACT—Critical illness, such as sepsis or septic shock with multiple organ dysfunction syndrome, is the leading cause of morbidity and mortality in intensive care units. The complexity of critical illness requires a robust methodology to explore the underlying mechanisms. Proteomics represents a powerful postgenomic biotechnology used for simultaneous examination of a large number of proteins or the proteome. Recent progress in proteomic techniques allows thorough evaluation of molecular changes associated with critical illness, thereby permitting to identify novel biomarkers and therapeutic targets. This review provides an update on the recent progress and potential of rapidly evolving proteomics approach to facilitate new discoveries in the field of critical care medicine.

KEYWORDS—Biomarker, gel electrophoresis, intensive care, mass spectrometry, organ failure

INTRODUCTION

Critical illness, such as sepsis or septic shock with multiple organ dysfunction syndrome (MODS), is a life-threatening condition, which frequently leads to death even if treated properly. It is the leading cause of death among patients in non-coronary intensive care units, killing approximately 20% to 50% of severely affected patients (1). In recent years, exciting advances have been made in the understanding of the pathophysiology and treatment of sepsis. Pathogens, via their microbial-associated molecular patterns, trigger sequential intracellular events in immune cells, endothelium, and the neuroendocrine system. Proinflammatory mediators (TNF- α , IL-1 β , IL-6, prostaglandins, leukotrienes, platelet activating factor (PAF), proteases, reactive oxygen species, NO, adhesive molecules, etc.) that contribute to eradication of invading microorganisms are produced, whereas the anti-inflammatory mediators (IL-4, IL-10, IL-13, transforming growth factor β , etc.) control this response (2). The inflammatory response leads to damage to host tissues, whereas the anti-inflammatory response causes leukocyte reprogramming and changes in immune status. Although this concept is generally accepted, the exact signal transduction and other molecular pathways during the deregulated inflammatory response remain obscure. Stepping forward onto the molecular level, we can precisely identify these signaling messengers (intracellular, intercellular, and/or interorgan) and biomarkers for rapid and

accurate diagnosis and monitoring, discover the exact mechanisms of organ dysfunction, develop new drugs, and monitor their therapeutic effects.

The sequencing of the human genome (Human Genome Project) and that of numerous pathogens have opened the door for proteomics by providing a sequence-based framework for mining proteomes. There are approximately more than 30,000 human genes defined by DNA sequencing (3, 4), but an exact assessment of the total number of proteins is more difficult to establish. In addition, different types of posttranslational modifications or interactions with other proteins contribute to the changes in biological activities of proteins, thereby greatly expanding the total number of molecules in the proteome, reaching more than 1,000,000 distinct variants (5). Hence, the proteome is not a stable invariant mixture of proteins, but it is a highly dynamic complex of distinct subproteomes specific to a body tissue, cell, organelle, or biological fluid. Alternatively speaking, gene expression studies can accurately predict neither the structure and dynamics nor the function of respective proteins. In this context, it was thought that mRNA levels could be used for approximation of protein expression and activity. However, the poor correlation between them clearly underscores the need for large-scale proteomics studies (6). Importantly, because proteins carry out the function of genes, the knowledge of proteome is expected to provide fundamental information about cellular functions, both under physiological and pathological conditions. Indeed, proteins lie at the heart of human physiology, comprising ion channels, enzymes, chemical messengers, and the infrastructure, allowing a biological system to function. Similarly, as virtually all disease states are caused by alterations in protein expression and modifications, the identification of these changes by proteomic analysis is of utmost importance to reveal relevant drug targets, therapeutic proteins and disease biomarkers. In support of this concept, approximately one third

Address reprint requests to Martin Matejovic, MD, PhD, Medical ICU, 1st Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine and University Hospital Pilsen, Alej svobody 80, 304 60 Plzen, Czech Republic. E-mail: matejovic@fnplzen.cz.

This work was supported by a research grant MSM 0021620819 (replacement of and support to some vital organs).

DOI: 10.1097/SHK.0b013e3181986eab

Copyright © 2009 by the Shock Society

from newly released drugs are protein-based biologics, such as monoclonal antibodies and growth factors.

A BRIEF OVERVIEW OF PROTEOMICS AND TECHNICAL CONSIDERATIONS

The term *proteome* was first defined and introduced by Wilkins et al. (7) to describe the protein complement encoded by the genome. There are several definitions for proteomics, for example, “the systematic analysis of proteins for their identity, quantity, and function” described by Peng and Gygi (8). The term *proteomics* has also evolved to mean large-scale analysis of proteins including all isoforms, modifications, and their interactions between these molecules as well as the description of their structure and higher-order complexes. The primary goal of proteomic research is to provide a deeper understanding of the role of specific proteins in health and/or disease (9–11). Proteomic approaches can be subdivided into three distinct types: structural, expressional, and functional proteomics (12). Structural proteomics aims to map nature and structure of all proteins within cell or particular organelles (e.g., mitochondria). Expressional proteomics provides quantitative measures and comparisons of proteins between samples from different biological states (normal versus diseased, native versus manipulated, etc.). The goal of functional proteomics is to identify proteins that undergo changes in response to a specific biological condition (e.g., protein-protein interactions, posttranslational modifications, subcellular localization). Especially functional proteomics has the potential to better understand molecular mechanisms involved in sepsis and MODS (13). Incorporating data from proteomic studies to disease-specific histopathology, traditional functional and biochemical measurements, imaging techniques, and clinical outcomes should yield significant breakthroughs in our molecular understanding of sepsis and MODS (14).

Although technological armamentarium used in proteomics is rapidly evolving, currently, no single methodology has the capacity to address all the analytical challenges. Commonly used methods for current proteomics studies include two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), liquid chromatography coupled to electrospray ionization–tandem MS (LC-ESI MS/MS), surface-enhanced laser desorption/ionization coupled to TOF MS (SELDI-TOF MS), capillary electrophoresis coupled to MS, and microarrays. Among these techniques, each of them has both advantages and limitations. Two-dimensional gel electrophoresis is available in most of proteomics laboratories and is simple to perform. However, 2-DE is time-consuming and not applicable for proteins or polypeptides smaller than 10 kDa or larger than 200 kDa. Its use is still limited for highly hydrophobic proteins (8). Liquid chromatography coupled to tandem MS (LC-MS/MS) offers the advantage of high sensitivity together with automation, but it is counterbalanced by rather time consumption and possibly excessive sensitivity for interfering compounds (15). Moreover, quantitative analysis using LC-MS/MS is rather com-

plicated. Surface-enhanced laser desorption/ionization coupled to TOF MS is an easy-to-use system with an automation and high-throughput manner. Only a small amount (i.e., <10 μ L) of biological sample is required for SELDI-TOF MS analysis. However, the information obtained from SELDI-TOF MS is restricted only to a particular group of proteins (based on type of the chip), and its reproducibility has to be concerned (15). Capillary electrophoresis coupled to MS is another sensitive and high-throughput system that requires only a small sample quantity. However, it is not well suited for analysis of proteins with molecular masses greater than 20 kDa (15). Microarrays technology is one of the ideal methods for proteome profiling (16). This approach allows the high-throughput profiling of multiple proteins in the sample and offers an opportunity to discover low-molecular-weight biomarkers that may be missed by other (more commonly used) techniques (17). Nevertheless, its applications are still limited by the difficulty to make the arrays to cover all the urinary proteins and the availability of antibodies or other ligands (17). Other limitations include the conservation of protein functionality during immobilization, as well as the provision of the required absolute and relative sensitivity (17).

PROTEOMIC ANALYSIS OF CRITICAL ILLNESS USING ANIMAL MODELS

The analysis of various experimental species in the large-scale identification of tissue and biological fluids is important for the progress in the understanding of molecular mechanisms involved in critical illness. In particular, the utilization of clinically relevant models integrating information about protein changes in diseased tissues with other pathophysiological data is expected to reveal novel disease mechanisms, drug targets, and biomarkers (Table 1).

The pathogenic mechanisms underlying sepsis are still largely unknown, but it is likely that significant alterations in mitochondrial function underlie the disease processes and determine their progression and outcome (18). Crouser et al. (19) analyzed cat liver mitochondrial protein (MP) expression patterns during acute normotensive, resuscitated endotoxemia to discover novel insights into mitochondrial responses to acute systemic inflammation. Fourteen differentially expressed proteins involved in a number of critical liver functions were identified in samples obtained 4 h after treatment. Increased expressions of urea cycle enzymes, heat shock protein (HSP) 60, and manganese superoxide dismutase were detected, whereas expressions of HSP-70, F1-ATPase, and key enzymes regulating lipid metabolism were reduced. These differentially expressed proteins may play a role in the endotoxin-induced mitochondrial dysfunction contributing to the altered organ function during endotoxemia. Another study investigating the proteomic alteration of hepatic mitochondria during sepsis was performed by Chen et al. (20) in rats with cecal ligation and puncture (CLP)–induced sepsis. Using 2-DE, approximately 120 dominant spots were separated and visualized distinctly. Among them, three spots with the same molecular weight (56.4 kDa), MP1, MP2, and MP3, were significantly altered in septic specimens. When subsequently analyzed by LC-MS/

TABLE 1. Summary of selected proteomics studies of critical illness using animal models

Publication date	Authors	Proteomic technique	Sample	Disease model	Findings
2006	Crouser et al. (19)	2-DE followed by LC-MS/MS	Cat liver mitochondria	Endotoxemia induced by LPS from <i>E. coli</i>	During endotoxemia, mitochondrial levels of urea cycle enzymes, HSP-60, and manganese superoxide dismutase were increased, whereas HSP-70, F1-ATPase, and key enzymes regulating lipid metabolism were decreased
2007	Chen et al. (20)	2-DE followed by LC-MS/MS	Rat liver mitochondria	Sepsis induced by CLP	ALDH2 activity was preserved in heated septic rats, whereas it was downregulated in nonheated objects; these results suggest posttranslational modification; highly possible the phosphorylation in ALDH2 may play a functional role in the pathogenesis of sepsis and provide a novel protective mechanism of heat shock treatment
2007	Ren et al. (21)	2-DE followed by MALDI-TOF/TOF MS/MS	Mouse plasma	Sepsis induced by CLP	Plasma levels of transferrin, hemopexin, kininogen, α -1-antitrypsin precursor, leucine-rich α -2-glycoprotein, α -2-HS-glycoprotein, α -1-acid-glycoprotein, transthyretin, serum amyloid protein P, apolipoprotein A-I precursor, and complement C3 were altered during sepsis in mice; most of these altered proteins remained in <i>N</i> -glycosylation status, but had changes of their <i>N</i> -glycans during sepsis
2006	Duan et al. (22)	2-DE followed by MALDI-TOF MS and nano-LC-ESI MS/MS	Rat skeletal muscle	Cutaneous burn together with CLP	Transferrin, chaperone proteins (HSP-60, HSP-27, HSP- β 6, and GrpE protein homologue 1), and metabolic enzymes (ATP-synthase β chain, cytochrome C oxidase polypeptide Va and Vb, fatty acid-binding protein, etc.) were all downregulated within the burn-sepsis group; within the group of structural proteins, only myosin regulatory light chain 2 was decreased, whereas MyBP-H, actin, and parvalbumin α were upregulated in burned-septic mice
2006	Chang et al. (23)	2-DE followed by MALDI-TOF MS (and Western blotting assay)	Rat RVLM	Endotoxemia induced by LPS from <i>E. coli</i>	HSP-60 redistributed from mitochondria to cytosol in the RVLM ensured neuroprotection against fatal cardiovascular depression during endotoxemia via reduced activation of the cytochrome C-caspase 3 cascade of apoptotic signaling
2005	Li et al. (24)	2-DE coupled with MALDI-TOF MS (and Western blotting assay)	Rat RVLM	Endotoxemia induced by LPS from <i>E. coli</i>	<i>De novo</i> synthesized HSP-70 in RVLP may provide neuroprotection against cardiovascular depression during the fatal endotoxemia via reduced activation of apoptotic signaling and enhancing the sympathoexcitatory NOS I/PKG signaling pathway together with inhibiting the sympathoinhibitory NOS II/peroxynitrite cascade in the RVLP, respectively; HSP-90 seems to be ineffective in this context
2006	Holly et al. (26)	2-D DIGE followed by MALDI-TOF MS	Rat urine	Sepsis induced by CLP	Sepsis-induced ARF caused changes in urinary excretion of several proteins including albumin, brush-border enzymes (e.g., meprin-1 α), and serine protease inhibitors; using the meprin-1 α inhibitor actinonin, animals treated with actinonin had lower serum creatinine level compared with the vehicle-treated animals after induction of sepsis
2007	Dear et al. (27)	DIGE coupled with MALDI-TOF MS (and Western blotting assay)	Mouse livers	Sepsis induced by CLP	The inhibition of the CD147 receptor for cyclophilin attenuated sepsis-induced acute renal failure and inflammatory response
2008	Grigoryev et al. (28)	Functional genomic analysis	Murine kidney and lung tissues	Ischemic AKI	The inflammatory transcriptome (109 genes) of both kidney and lungs had similar changes on the innate immunity genes <i>Cd14</i> , <i>Socs3</i> , <i>Saa3</i> , <i>Lcn2</i> , and <i>Il1r2</i> ; functional genomic analysis of these genes suggested that IL-10 and IL-6 signaling was involved in the distant effects of local inflammation, and this was supported by increased serum levels of IL-10 and IL-6 after I/R
2007	Shao et al. (62)	Diagonal gel electrophoresis coupled with LC-MS, SDS-PAGE (and PCR)	Cell cultures, mouse peritoneal macrophages, mouse diaphragm muscle	Sepsis/septic shock induced by LPS from <i>E. coli</i>	Forty-one proteins directly cleaved by caspase 1 were identified; among these were chaperones, cytoskeletal and translation machinery proteins, and proteins involved in immunity; series of unexpected proteins along the glycolytic pathway were also identified, including aldolase, triose-phosphate isomerase, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, α -enolase, and pyruvate kinase; <i>in vivo</i> , stimuli fully activated caspase 1 (including sepsis) caused pronounced processing of these proteins in the macrophages and diaphragm muscle

Adapted from Matejovic (61).

SDS-PAGE indicates sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; MALDI-TOF/TOF indicates MALDI-TOF tandem MS; PCR, polymerase chain reaction; MyBP-H, myosin-binding protein H; ARF, acute renal failure.

MS, these three spots all were revealed to be an identical enzyme—aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2), an important protector against oxidative stress. Two variants of ALDH2, termed MP1 and MP2, were downregulated, whereas MP3 was upregulated during sepsis. Of note, the heat shock pretreatment could preserve the ALDH2 activity 18 h after CLP. The authors suggest that posttranslational modification in ALDH2 may play a functional role in the pathogenesis of sepsis and provide a novel protective mechanism of heat shock treatment.

A comprehensive global analysis of plasma protein changes during the evolution of sepsis represents another crucial step to elucidate the mechanisms of septic pathophysiology and to identify protein-based biomarkers. Ren et al. (21) monitored the plasma proteomic responses to sepsis induced by CLP in a mouse model. Although no significantly different plasma proteomes were detected at early stage of sepsis (4 h after CLP) compared with sham animals, marked changes in plasma proteins occurred 24 h after CLP. Moreover, most sepsis-responsive

proteins were upregulated with multiple modified forms. From the clinical point of view, these results support the generally accepted need for therapeutic intervention during the first 12 to 24 h of sepsis development, when the maximum of potentially reversible changes takes place.

Skeletal muscle wasting is a serious complication of a wide range of diseases including sepsis. Duan et al. (22) characterized changes in the skeletal muscle proteome of rats subjected to a cutaneous burn covering 20% of the total body surface area, followed by sepsis induced by CLP 2 days later. They identified 17 different spots representing 15 proteins between the groups of burn-CLP and sham-sham. All the spots were reliably identified through MALDI-TOF MS, and identities of the spots for transferrin, ATP-synthase β chain, and parvalbumin α were further confirmed by nano-LC-ESI MS/MS analysis. As expected, transferrin—the negative acute-phase protein—was downregulated within the burn-sepsis group. Chaperone proteins (HSP-60, HSP-27, HSP- β 6, and GrpE protein homologue 1) and metabolic enzyme group (ATP-synthase β chain, cytochrome C oxidase polypeptide Va and Vb, fatty acid-binding protein, etc.) were all downregulated as well. Within the group of structural proteins, only myosin regulatory light chain 2 was decreased, whereas myosin-binding protein H, actin, and parvalbumin α were, as the only three proteins within all detected ones, upregulated in burned-septic mice. Taking together, the coordinated downregulation of chaperone proteins and metabolic enzymes suggests that impaired cellular functions may contribute to the mechanisms of muscle wasting in response to severe injury. Moreover, *in vitro* induction of heat shock response as documented by chaperone expression protected against muscle protein degradation. This finding supports the concept that the decrease in chaperone proteins may sensitize to oxidative stress, a potent inducer of muscle atrophy.

The neuroprotective role of HSP chaperones has recently been evaluated using a proteomic approach. Chang et al. (23) tried to evaluate the hypothesis that HSP-60 reduces cardiovascular fatality during brainstem death via antiapoptotic action in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) in the rat model of endotoxemia. Two-dimensional gel electrophoresis coupled with MALDI-TOF MS and Western blotting analysis revealed a progressive augmentation of HSP-60 expression in the RVLM after *i.v.* administration of *Escherichia coli* LPS (30 mg/kg). Moreover, endotoxemia elicited approximately 60% fatality in these rats within 240 min compared with 100% mortality by 180 min if these animals were pretreated with microinjection of an anti-HSP-60 antibody into the bilateral RVLM 1 h before the induction of endotoxemia. The authors concluded that HSP-60 redistributed from mitochondria to cytosol in the RVLM ensured neuroprotection against fatal cardiovascular depression during endotoxemia via reduced activation of the cytochrome C-caspase 3 cascade of apoptotic signaling. Li et al. (24) investigated the neuroprotective role of the 70-kD HSP-70 and the 90-kDa HSP-90 using sequential samples taken from RVLM according to the three phases of cardiovascular response during endotoxemia as described by Chan et al. (25). The expression of HSP-70, but not HSP-90, in the RVLM was augmented compared with

sham subjects. Functional blockade of HSP-70 in the RVLM by an anti-HSP-70 antiserum or prevention of synthesis by an antisense *hsp-70* oligonucleotide exacerbated mortality or potentiated the cardiovascular depression during the experiment. These two studies support the neuroprotective role of *de novo* synthesized HSP-60 and HSP-70 mediated by preventing cardiovascular depression during the fatal endotoxemia via reduced activation of apoptotic signaling and the enhancing the sympathoexcitatory NOS I/Protein Kinase G (PKG) signaling pathway together with inhibiting the sympathoinhibitory NOS II/peroxynitrite cascade in the RVLM, respectively. The HSP-90 seems to be ineffective in this context.

With an effort to discover novel biomarkers and potential drug targets, Holly et al. (26) compared the urinary proteomics in the cohort of CLP-induced septic rats with acute kidney injury (AKI) and in the subgroup of the ones that did not develop AKI. They identified three groups of proteins with relative expression difference. Circulating proteins (such as albumin) were increased; serine protease inhibitors were decreased, and “kidney-specific” proteins were either increased (aminopeptidase) or decreased (meprin-1 α). Altogether, 30 differentially expressed proteins were detected. Subsequently, actinonin, an inhibitor of the brush-border enzymes (especially meprin-1 α), was given to the CLP mouse model at 0 and 6 h after surgery. Mice treated with actinonin had significantly lower serum creatinine level compared with placebo-treated group 24 h after CLP. Difference in gel electrophoresis (DIGE) has also been used to characterize protein changes in the liver of mice with sepsis after CLP (27). In this study, dynamic changes in the liver proteome revealed that the spectrum of altered proteins differed from 6 to 24 h. These altered proteins had a range of functions such as acute-phase response, oxidative stress, NO metabolism, coagulation, apoptosis, and mitochondrial functions. Importantly, the comparison of early and late protein changes enabled the authors to identify and validate candidate markers. Indeed, the inhibition of the receptor (CD147) for one of these proteins, cyclophilin, attenuated sepsis-induced acute renal failure and inflammatory response. A number of studies in humans and animal models have demonstrated that AKI could have a significant effect on the function of extrarenal organs. Grigoryev et al. (28) have identified transcriptomic and histological changes in both kidney and lung tissues in the murine model of ischemic AKI. The inflammatory transcriptome (109 genes) of both organs had similar changes on the innate immunity genes *Cd14*, *Socs3*, *Saa3*, *Lcn2*, and *Il1r2*. Functional genomic analysis of these genes suggested that IL-10 and IL-6 signaling was involved in the distant effects of local inflammation, and this was supported by increased serum levels of IL-10 and IL-6 after ischemia/reperfusion (I/R). This study uncovers the important link between renal and remote organ dysfunction/failure during AKI and suggests potential candidate molecules for novel biomarkers and therapeutic targets.

A limiting factor of these rodent animal models, which might be of particular relevance in the context of proteomics, is that their normal pattern of gene expression, regulation of inflammation, cardiovascular response to endotoxin or bacteria,

or their tissue antioxidative capacity and susceptibility to oxidative stress is rather different from that in larger mammals including humans (29–31).

PROTEOMIC ANALYSIS OF PATIENTS WITH CRITICAL ILLNESS

Although the proteomic approach to study sepsis and MODS in clinical setting is still in an early stage, some important data have been generated, making further exploratory studies to better understand the molecular mechanisms and pathophysiology of sepsis and MODS more feasible (14) (Table 2).

Qian et al. (32) performed comparative proteome analysis of human plasma after *in vivo* LPS administration using 2-DE LC-MS/MS. They identified 804 nonimmunoglobulin plasma proteins that expanded the known human plasma proteome. There were 32 proteins whose plasma levels were significantly increased 9 h after LPS administration. Twenty-eight of them had not previously been identified as the upregulated proteins during endotoxemia. They could play important roles in the pathophysiology and regulation of the inflammatory response. Using 2-DE coupled with MALDI-TOF MS, Kalenka et al. (33) identified four differentially expressed serum proteins between survivors and nonsurvivors at day 28 within the cohort of 18 patients with sepsis and/or septic shock. Blood samples were obtained within the first 12 h after the diagnosis. Three of the identified proteins (complement factor B, haptoglobin, and clusterin) had decreased serum levels in the subgroup of nonsurvivors, whereas serum level of the α -1-B-glycoprotein was increased within this subgroup. This pilot study suggests that early alterations in plasma levels of some proteins in patients with septic shock could help to identify at-risk patients. Similarly, the proteomic and genomic technologies have been used to explore the responses to thoracoabdominal aortic aneurysm repair and to assess whether the circulating plasma protein profile could discriminate between a dichotomous clinical outcome (34). Indeed, by determining seven plasma proteins that distinguished patients who developed MODS from those who did not, the authors suggest that plasma proteome may identify the outcome after visceral I/R injury. Interestingly, many of these differences occurred even before the surgical injury, indicating that not only genetic predisposition but also pre-existing inflammatory state may determine the subsequent development of MODS. In addition, urine proteomics applied in 40 patients after hematopoietic stem cell transplantation revealed 13 sepsis-specific polypeptides allowing a distinction of patients with graft-versus-host disease from those with sepsis with a specificity of 97% and a sensitivity of 100% (35). Buhimschi et al. (36) determined the relationship between four amniotic fluid proteomic biomarkers (human neutrophil defensins 2 and 1, calgranulins C and A) characteristic of intra-amniotic inflammation, funisitis (i.e., perivascular infiltrates of inflammatory cells that are considered as one of the strongest hallmarks of microbial invasion of the amniotic cavity and fetal inflammatory syndrome), and early-onset sepsis in premature neonates. The mass restricted (MR) score of all women in preterm labor

was then generated and ranged from 0 to 4 (none to all biomarkers present). The data revealed that calgranulin C had the strongest association with clinically significant funisitis, whereas calgranulin A had the strongest association with early-onset sepsis. Amniotic fluid proteomic analysis showed that women with MR scores 3 to 4 are more likely to have histological funisitis and deliver neonates with early-onset sepsis. Finally, Shen et al. (37) performed the human plasma protein profiling after immunodepletion treatment to remove the most abundant proteins (serum albumin, transferrin, haptoglobin, antitrypsin, IgG, and IgA) from patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis. The unique combination of immunodepletion with high-resolution protein separation and MS analysis enabled the detection of approximately 3,000 lower-abundance plasma proteins and the ultimate observation of 10 potential sepsis biomarkers with the downregulation of seven proteins (complement component C4, C-reactive protein precursor, plasminogen precursor, apolipoprotein A-II, plasma protease C1 inhibitor precursor, transthyretin precursor, and serum amyloid P-component precursor) as well as the upregulation of three proteins (apolipoprotein A-I, antithrombin-III precursor, and serum amyloid A-4 protein precursor) observed in plasma from SIRS patients.

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) remains an important cause of high morbidity, mortality, and health care costs in critically ill patients (38). Nevertheless, no single protein marker identified by traditional laboratory methods has demonstrated enough specificity and sensitivity to serve as a reliable predictor of outcome. Recent advancements make proteomics more practical and feasible for researchers in the field of pulmonary medicine using bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung tissue, and exhaled breath condensates as the source of protein analysis (39). A detailed proteomic approach to the study of pulmonary edema fluid and plasma in patients with acute lung injury (ALI) was first used by Bowler et al. (39). In their study, most of the proteins identified in edema fluid were plasma proteins, supporting the theory of impaired alveolocapillary barrier. Importantly, the authors showed that, in contrast to normal subjects, most of ALI patients expressed proteins with multiple posttranslational modifications (e.g., orosomucoid, haptoglobin) that would otherwise be overlooked by other methods. Although some of these novel changes could serve as new biomarkers, the significance of revealed modifications warrants further studies. Liquid chromatography MS/MS was used by Schnapp et al. (40) to further analyze the protein profile of BALF in ARDS. The authors could demonstrate the role of insulinlike growth factor-binding protein 3 in repressing apoptosis of lung fibroblasts in the pathogenesis of ALI/ARDS as this protein was significantly overexpressed in patients at risk of ARDS and with established ARDS. The highest level was found at the early stage of ARDS, from days 1 to 3, with decreasing level when the disease progressed. Proteomic analysis of BALF also identified the potential importance of heparin-binding epidermal growth factor-like protein, the potent mitogen, and chemotactic factor for fibroblasts which may play a role in the fibroproliferative response during ALI/ARDS.

TABLE 2. Summary of selected proteomics studies of patients with critical illness

Publication date	Studied by	Proteomic technique	Sample	Disease model	Findings
2005	Qian et al. (32)	2-D LC-MS/MS	Human plasma	Endotoxemia induced by LPS administration	32 Proteins were identified whose plasma levels were significantly increased 9 h after the LPS administration; 28 of them were not previously identified as the upregulated proteins during endotoxemia
2006	Kalenka et al. (33)	2-DE followed by MALDI-TOF MS	Human serum	Sepsis and septic shock	Complement factor B, haptoglobin, and clusterin had lower serum levels in the nonsurvivors, whereas α -1-B-glycoprotein level was lower in the survivors
2007	Buhimschi et al. (36)	SELDI-TOF MS	Human amniotic fluid	Early-onset sepsis in premature neonate	Calgranulin C had the highest association with clinically significant funisitis, whereas calgranulin A had the strongest association with early-onset sepsis; women with MR scores 3–4 were more likely to have histological funisitis and to deliver neonates with early-onset sepsis
2006	Shen et al. (37)	3-D LC-MS/MS after previous immunodepletion	Human plasma	SIRS and sepsis	Detection of approximately 3,000 lower-abundance plasma proteins and the ultimate observation of 10 potential sepsis biomarkers with the downregulation of seven proteins (complement component C4, C-reactive protein precursor, plasminogen precursor, apolipoprotein A-II, plasma protease C1 inhibitor precursor, transthyretin precursor, serum amyloid P-component precursor) as well as the upregulation of three proteins (apolipoprotein A-I, antithrombin-III precursor, serum amyloid A-4 protein precursor) observed in plasma from SIRS patients after immunodepletion
2006	Bowler et al. (39)	Various techniques	Pulmonary edema fluid and plasma	ALI	Most of the proteins identified in edema fluid were plasma proteins, supporting the theory of impaired alveolocapillary barrier
2006	Schnapp et al. (40)	LC-MS/MS	BALF	ARDS	The authors could demonstrate the role of IGFBP-3 in repressing apoptosis of lung fibroblasts in the pathogenesis of ALI/ARDS as this protein was significantly overexpressed in patients at risk of ARDS and with established ARDS; HB-EGF may play a role in the fibroproliferative response during ALI/ARDS
2005	Nguyen et al. (46)	SELDI-TOF MS	Human urine	ARF after cardiopulmonary bypass	Urinary proteins with masses of 6.4, 28.5, 43, and 66 kd have increased levels during ARF
2005	Lefler et al. (47)	2-DE followed by MALDI-TOF MS or MALDI-TOF/TOF MS/MS	Human CRRT ultrafiltrate	AKI	Proteins identified were albumin, apolipoprotein A-IV, β 2-microglobulin, lithostathine, mannose-binding lectin-associated serine protease 2-associated protein, plasma retinol-binding protein, transferrin, transthyretin, vitamin D-binding protein, and Zn α -2-glycoprotein
2007	Vanhoutte et al. (48)	SELDI-TOF MS	Human urine	Mild ischemic AKI after CABG surgery	A set of SELDI spectra (with mass ranges of 3–70 kd) could differentiate patients with early AKI after CABG surgery from healthy individuals
2007	Vanhoutte et al. (48)	2-DE followed by LC-MS/MS	Human urine	Mild ischemic AKI after CABG surgery	Retinol-binding protein, agrin, regenerating protein, lipocalin, Zn α -2-glycoprotein, gelsolin, carbonic anhydrase, actin, haptoglobin, perlecan, immunoglobulins, prostaglandin, amylase, transferrin, Bence Jones protein, and cystatin had increased levels in the urine of CABG patients with AKI
2008	Grigoryev et al. (28)	Functional genomic analysis	Murine kidney and lung tissues	Ischemic AKI	The inflammatory transcriptome (109 genes) of both kidney and lungs had similar changes on the innate immunity genes Cd14, Socs3, Saa3, Lcn2, and Il1r2. Functional genomic analysis of these genes suggested that IL-10 and IL-6 signaling was involved in the distant effects of local inflammation, and this was supported by increased serum levels of IL-10 and IL-6 after I/R
2005	Karsan et al. (54)	LC-MS/MS	Membranes of human endothelial cells	LPS-activated endothelial cell	358 Proteins from the lipid-rich microdomains of LPS-activated endothelial cell membranes have been identified

Adapted from Matejovic (61).

3-D LC-MS/MS indicates three-dimensional LC coupled to tandem MS; CRRT, continuous renal replacement therapy; IGFBP-3, insulinlike growth factor-binding protein 3; HB-EGF, heparin-binding epidermal growth factor-like protein.

Acute kidney injury represents a significant but often underrecognized problem in clinical medicine with high (and permanently increasing) incidence, particularly in critically ill patients (41–44). Currently, there is a lack of precise biomarkers that can be used for early diagnosis of AKI. Using proteomics, a considerably large amount of data has recently been generated resulting in the discovery of various AKI biomarkers in plasma [Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and cystatin C] and urine (NGAL, KIM-1, IL-18, cystatin C, β 1-microglobulin, fetuin-A, and meprin) (45). Nguyen et al. (46) used the SELDI-TOF MS to identify urinary biomarker patterns that predict AKI in patients undergoing cardiopulmonary bypass. Their analysis revealed a marked enhancement of protein biomarkers with molecular masses of approximately 6.4, 28, 43, and 66 kDa, reaching

100% sensitivity and specificity for the prediction of AKI after cardiopulmonary bypass. In another proteomic profiling study in humans, Lefler et al. (47) characterized proteins removed by continuous renal replacement therapy in a patient with AKI. Proteins identified were albumin, apolipoprotein A-IV, β 2-microglobulin, lithostathine, mannose-binding lectin-associated serine protease 2-associated protein, plasma retinol-binding protein, transferrin, transthyretin, vitamin D-binding protein, and Zn α -2-glycoprotein. The clinical implication of this knowledge is unclear at present, but may contribute to better understanding of protein/mediator removal by hemopurification techniques. Vanhoutte et al. (48) showed that SELDI-TOF MS is a useful tool to differentiate patients with early AKI after coronary artery bypass graft (CABG) surgery. According to their results, urine proteomic patterns

with molecular masses of approximately 3 to 70 kDa could discriminate patients with mild ischemic AKI after CABG surgery from healthy individuals.

Proteomics of blood cells and human endothelium could bring us another piece of knowledge into the jigsaw of pathogenesis not only of blood diseases. The endothelium plays a central role in the pathophysiology of various critical conditions associated with systemic inflammatory response (49–53). Karsan et al. (54) described a method to isolate membranes from LPS-activated endothelial cells and performed proteomic analysis of them. The authors detected 358 proteins, of which half were classified as membrane proteins, and pointed out that this could be the way to the deeper understanding of the gram-negative sepsis pathophysiology. Coagulation abnormalities and thrombocytopenia/thrombocytopeny are common in sepsis, and the number of platelets correlates with its severity (55–57). Platelets play previously unrecognized roles in fundamental biological processes including inflammation, host defense and thrombosis, and the critical pathways implicated in sepsis and MODS (57). In this context, because of the absence of nucleus and only little amount of mRNA, platelets are excellent candidates for proteomic approaches. Indeed, the proteomic approach has recently been shown to be capable of dissecting the broad spectrum of molecular mechanisms responsible for platelet-related diseases and better understanding their role in the innate and adaptive immunity response (58–60).

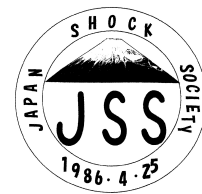
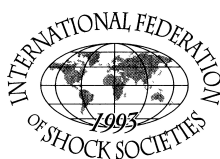
CONCLUSION

Proteomics has the potential to move up to the forefront of critical care researchers as well as clinicians because it not only helps in unraveling the molecular-based mechanisms of many diseases, but also permits the discovery of new biomarkers for early and rapid diagnosis and integrates this knowledge into the daily routine patient management and treatment.

REFERENCES

- Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546–1554, 2003.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: Septic shock. *Lancet* 365:63–78, 2005.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al.: The sequence of the human genome. *Science* 291:1304–1351, 2001.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921, 2001.
- Hoehn GT, Suffredini AF: Proteomics. *Crit Care Med* 33:S444–S448, 2005.
- MacBeath G: Protein microarrays and proteomics. *Nat Genet* 32(suppl):526–532, 2002.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Williams KL, Hochstrasser DF: Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis* 17:830–838, 1996.
- Peng J, Gygi SP: Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 36:1083–1091, 2001.
- de Hoog CL, Mann M: Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:267–293, 2004.
- Phizicky E, Bastiaens PI, Zhu H, Snyder M, Fields S: Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 422:208–215, 2003.
- Hanash S: Disease proteomics. *Nature* 422:226–232, 2003.
- Graves PR, Haystead TA: Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:39–63, 2002.
- Nguyen A, Yaffe MB: Proteomics and systems biology approaches to signal transduction in sepsis. *Crit Care Med* 31:S1–S6, 2003.
- Wang X, Adler KB, Chaudry IH, Ward PA: Better understanding of organ dysfunction requires proteomic involvement. *J Proteome Res* 5:1060–1062, 2006.
- Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V, Argiles A, Jankowski V, Girolami MA, Jankowski J, Mischak H: Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J Am Soc Nephrol* 18:1057–1071, 2007.
- Liu BC, Zhang L, Lv LL, Wang YL, Liu DG, Zhang XL: Application of antibody array technology in the analysis of urinary cytokine profiles in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 26:483–490, 2006.
- Angenendt P: Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discov Today* 10:503–511, 2005.
- Levy RJ: Mitochondrial dysfunction, bioenergetic impairment, and metabolic down-regulation in sepsis. *Shock* 28:24–28, 2007.
- Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Mandich DV, Green-Church KB: A proteomic analysis of liver mitochondria during acute endotoxemia. *Intensive Care Med* 32:1252–1262, 2006.
- Chen HW, Kuo HT, Hwang LC, Kuo MF, Yang RC: Proteomic alteration of mitochondrial aldehyde dehydrogenase 2 in sepsis regulated by heat shock response. *Shock* 28:710–716, 2007.
- Ren Y, Wang J, Xia J, Jiang C, Zhao K, Li R, Xu N, Xu Y, Liu S: The alterations of mouse plasma proteins during septic development. *J Proteome Res* 6:2812–2821, 2007.
- Duan X, Berthiaume F, Yarmush D, Yarmush ML: Proteomic analysis of altered protein expression in skeletal muscle of rats in a hypermetabolic state induced by burn sepsis. *Biochem J* 397:149–158, 2006.
- Chang AY, Chan JY, Chou JL, Li FC, Dai KY, Chan SH: Heat shock protein 60 in rostral ventrolateral medulla reduces cardiovascular fatality during endotoxaemia in the rat. *J Physiol* 574:547–564, 2006.
- Li FC, Chan JY, Chan SH, Chang AY: In the rostral ventrolateral medulla, the 70-kDa heat shock protein (HSP70), but not HSP90, confers neuroprotection against fatal endotoxemia via augmentation of nitric-oxide synthase I (NOS I)/protein kinase G signaling pathway and inhibition of NOS II/peroxynitrite cascade. *Mol Pharmacol* 68:179–192, 2005.
- Chan JY, Wang SH, Chan SH: Differential roles of iNOS and nNOS at rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. *Shock* 15:65–72, 2001.
- Holly MK, Dear JW, Hu X, Schechter AN, Gladwin MT, Hewitt SM, Yuen PS, Star RA: Biomarker and drug-target discovery using proteomics in a new rat model of sepsis-induced acute renal failure. *Kidney Int* 70:496–506, 2006.
- Dear JW, Leelahavanichkul A, Aponte A, Hu X, Constant SL, Hewitt SM, Yuen PS, Star RA: Liver proteomics for therapeutic drug discovery: inhibition of the cyclophilin receptor CD147 attenuates sepsis-induced acute renal failure. *Crit Care Med* 35:2319–2328, 2007.
- Grigoryev DN, Liu M, Hassoun HT, Cheadle C, Barnes KC, Rabb H: The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 19:547–558, 2008.
- Reade MC, Young JD: Of mice and men (and rats): implications of species and stimulus differences for the interpretation of studies of nitric oxide in sepsis. *Br J Anaesth* 90:115–118, 2003.
- Bauer M, Reinhart K: From mice and MOF: rodent models, immune modulation, and outcome in the critically ill. *Crit Care Med* 34:921–923, 2006.
- Dunn MJ: Studying heart disease using the proteomic approach. *Drug Discov Today* 5:76–84, 2000.
- Qian WJ, Jacobs JM, Camp DG, Monroe ME, Moore RJ, Gritsenko MA, Calvano SE, Lowry SF, Xiao W, Moldawer LL, et al.: Comparative proteome analyses of human plasma following *in vivo* lipopolysaccharide administration using multidimensional separations coupled with tandem mass spectrometry. *Proteomics* 5:572–584, 2005.
- Kalenka A, Feldmann RE Jr, Otero K, Maurer MH, Waschke KF, Fiedler F: Changes in the serum proteome of patients with sepsis and septic shock. *Anesth Analg* 103:1522–1526, 2006.
- Feezor RJ, Baker HV, Xiao W, Lee WA, Huber TS, Mindrinos M, Kim RA, Ruiz-Taylor L, Moldawer LL, Davis RW, et al.: Genomic and proteomic determinants of outcome in patients undergoing thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *J Immunol* 172:7103–7109, 2004.
- Kaiser T, Kamal H, Rank A, Kolb HJ, Holler E, Ganser A, Hertenstein B, Mischak H, Weissinger EM: Proteomics applied to the clinical follow-up of patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 104:340–349, 2004.
- Buhimschi CS, Buhimschi IA, bdel-Razeq S, Rosenberg VA, Thung SF, Zhao G, Wang E, Bhandari V: Proteomic biomarkers of intra-amniotic inflammation: relationship with funisitis and early-onset sepsis in the premature neonate. *Pediatr Res* 61:318–324, 2007.
- Shen Z, Want EJ, Chen W, Keating W, Nussbaumer W, Moore R, Gentile TM, Siuzdak G: Sepsis plasma protein profiling with immunodepletion,

- three-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry, and spectrum counting. *J Proteome Res* 5:3154–3160, 2006.
38. Rubenfeld GD, Herridge MS: Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest* 131:554–562, 2007.
 39. Bowler RP, Ellison MC, Reisdorph N: Proteomics in pulmonary medicine. *Chest* 130:567–574, 2006.
 40. Schnapp LM, Donohoe S, Chen J, Sunde DA, Kelly PM, Ruzinski J, Martin T, Goodlett DR: Mining the acute respiratory distress syndrome proteome: identification of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-binding protein-3 pathway in acute lung injury. *Am J Pathol* 169:86–95, 2006.
 41. Lameire N, Van BW, Vanholder R: Acute renal failure. *Lancet* 365:417–430, 2005.
 42. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, et al.: Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 294:813–818, 2005.
 43. Palevsky PM: Epidemiology of acute renal failure: the tip of the iceberg. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:6–7, 2006.
 44. Liangos O, Wald R, O'Bell JW, Price L, Pereira BJ, Jaber BL: Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:43–51, 2006.
 45. Devarajan P: Proteomics for the Investigation of acute kidney injury. *Contrib Nephrol* 160:1–16, 2008.
 46. Nguyen MT, Ross GF, Dent CL, Devarajan P: Early prediction of acute renal injury using urinary proteomics. *Am J Nephrol* 25:318–326, 2005.
 47. Lefler DM, Pafford RG, Black NA, Raymond JR, Arthur JM: Identification of proteins in slow continuous ultrafiltrate by reversed-phase chromatography and proteomics. *J Proteome Res* 3:1254–1260, 2004.
 48. Vanhoutte KJ, Laarakkers C, Marchiori E, Pickkers P, Wetzels JF, Willems JL, van den Heuvel LP, Russel FG, Masereeuw R: Biomarker discovery with SELDI-TOF MS in human urine associated with early renal injury: evaluation with computational analytical tools. *Nephrol Dial Transplant* 22:2932–2943, 2007.
 49. Aird WC: The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 101:3765–3777, 2003.
 50. Vallet B: Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? *Crit Care* 7:130–138, 2003.
 51. Boos CJ, Goon PK, Lip GY: The endothelium, inflammation, and coagulation in sepsis. *Clin Pharmacol Ther* 79:20–22, 2006.
 52. Matsuda N, Hattori Y: Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res* 43:117–137, 2007.
 53. Abraham E, Singer M: Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med* 35:2408–2416, 2007.
 54. Karsan A, Blonder J, Law J, Yaquian E, Lucas DA, Conrads TP, Veenstra T: Proteomic analysis of lipid microdomains from lipopolysaccharide-activated human endothelial cells. *J Proteome Res* 4:349–357, 2005.
 55. Vanderschueren S, De WA, Malbrain M, Vankerschaever D, Frans E, Wilmer A, Bobbaers H: Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit Care Med* 28:1871–1876, 2000.
 56. Strauss R, Wehler M, Mehler K, Kreutzer D, Koebnick C, Hahn EG: Thrombocytopenia in patients in the medical intensive care unit: bleeding prevalence, transfusion requirements, and outcome. *Crit Care Med* 30:1765–1771, 2002.
 57. Levi M: Platelets. *Crit Care Med* 33:S523–S525, 2005.
 58. Maguire PB, Moran N, Cagney G, Fitzgerald DJ: Application of proteomics to the study of platelet regulatory mechanisms. *Trends Cardiovasc Med* 14:207–220, 2004.
 59. Maguire PB, Fitzgerald DJ: Platelet proteomics. *J Thromb Haemost* 1:1593–1601, 2003.
 60. Gnatenko DV, Perrotta PL, Bahou WF: Proteomic approaches to dissect platelet function: half the story. *Blood* 108:3983–3991, 2006.
 61. Matejovic M, Radermacher P, Thongboonkerd V: From hemodynamics to proteomics: unraveling the complexity of acute kidney injury in sepsis. In Vincent JL, ed.: *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008.
 62. Shao W, Yeretssian G, Doiron K, Hussain SN, Saleh M: The caspase-1 digestome identifies the glycolysis pathway as a target during infection and septic shock. *J Biol Chem* 282:36321–36329, 2007.



III. Proteomic analysis of proteins bound to adsorption units of extracorporeal liver support system under clinical conditions.

Mares J, Thongboonkerd V, Tuma Z, Moravec J, Karvunidis T, Matejovic M.

J Proteome Res, 2009;8(4):1756-1764. IF 5,056

Citace:

Characterization of proteins secreted by pancreatic cancer cells with anticancer drug treatment in vitro.

Takata T, Ishigaki Y, Shimasaki T, Tsuchida H, Motoo Y, Hayashi A, Tomosugi N.

Oncol Rep. 2012 Dec; 28(6):1968-76. Epub 2012 Sep 5. IF 2,297

Proteomic Analysis of Proteins Bound to Adsorption Units of Extracorporeal Liver Support System under Clinical Conditions

Jan Mares,^{*,†} Visith Thongboonkerd,[‡] Zdenek Tuma,[§] Jiri Moravec,[§] Thomas Karvunidis,[†] and Martin Matejovic[†]

Department of Internal Medicine I, Charles University Medical School and Teaching Hospital, Plzen, Czech Republic, Medical Proteomics Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok, Thailand, and Proteomic Laboratory, Charles University Medical School, Plzen, Czech Republic

Received November 7, 2008

Fractionated Plasma Separation, Adsorption and Dialysis (Prometheus) has a well-documented capacity to remove protein-bound organic toxins in patients with liver failure. However, the compositions of adsorbed proteins remain unknown. Elution of both adsorbers constituting Prometheus system was performed following a 6-h session in a patient with acute on chronic liver failure. Sodium dodecylsulphate was employed to elute proteins from the neutral adsorber (P1), while acetic acid was applied to the cationic one (P2). Eluted proteins were resolved by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and identified by mass spectrometry (MS). Totally, 4113 and 8280 mg of proteins were obtained from P1 and P2 eluates, 2-DE yielded 148 and 163 protein fractions in P1 and P2, respectively. MS identified 18 unique proteins in P1, and 30 unique proteins in P2 sample. Proteins with the highest selective adsorption (as determined by eluate to plasma ratio) included transthyretin (37), trypsin-2 (29), prothrombin (23), hyaluronan-binding protein 2 (13) and plasma retinol-binding protein (8.7), all of which adsorbed to P2. We identified a large number of proteins removed by extracorporeal liver support system. A selective adsorption was demonstrated in a subset of proteins depending on the type of adsorber and proteins' characteristics.

Keywords: Liver failure • adsorption • proteome • elimination • Prometheus

Introduction

Temporary replacement of liver function by means of Fractionated Plasma Separation, Adsorption and Dialysis (Prometheus) is a novel technology available for patients with acute and acute on chronic liver failure.^{1,2} There is a considerable pool of patients who may benefit from extracorporeal liver support if it proves effective and safe. In the near future, treatment of patients with liver metastases (colorectal cancer, etc.), exploiting new techniques of liver resection, could depend on the possibility of bridging the patient over the period necessary for transplant procurement or liver regeneration. Improving outcomes of liver transplants and new approaches to stimulation of liver regeneration (growth factors administration, stem cells technology, etc.) are promising definitive solutions in such cases. In some patients with toxic liver damage (e.g., alcoholic), spontaneous recovery may be awaited.

The system's capacity for removal of both water-soluble and albumin-bound toxins generated and retained in liver failure

(bilirubin, ammonium, phenols, cholic acids, etc.) has been well-established.^{3,4} However, we have very limited information about the elimination of other compounds. Available data show that plasma levels of high-abundance proteins (i.e., albumin, fibrinogen, and IgG) remain virtually unchanged during the procedure.⁵ Significant clearance of peptides and proteins (e.g., β 2-microglobulin) by adsorption has been demonstrated to occur during hemodialysis.⁶⁻⁸ By virtue of its design, Prometheus is much more prone to adsorb proteins, especially due to its adsorbing capacity for hydrophobic molecules and owing to the beads' microarchitecture (with vast surface exposed to plasma).

Liver failure is associated with impaired proteosynthesis, accumulation, and dysregulation of signaling peptides and cytokines. Therefore, it seems crucial to ascertain proteins removed by the method before we investigate it in large clinical trials or even adopt in routine practice. We can speculate that removing proteins, especially those with high biological activities, can either improve or further deteriorate the vulnerable equilibrium in patients with liver failure. This issue has been addressed by several groups of investigators. Rifai et al.⁵ did not find changes in plasma levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and coagulation factors II and V during Prometheus procedure. However, Stadlbauer et al.⁹ observed differential concentrations of IL-6, IL-8, IL-10 and

* To whom correspondence should be addressed. Jan Mares, MD, Department of Internal Medicine I Charles University Medical School and Teaching Hospital, Alej Svobody 80, 301 60 Plzen, Czech Republic. Phone: 00420-37-7103650. Fax: 00420-37-7103506. E-mail: mares@fnplzen.cz.

[†] Department of Internal Medicine I, Charles University Medical School and Teaching Hospital.

[‡] Mahidol University.

[§] Proteomic Laboratory, Charles University Medical School.

TNF- α between the inlet and outlet of the system and showed that their clearance was probably outweighed by rapid production.

As the system has a high affinity to both hydrophilic and hydrophobic molecules, and the plasma-filter used to separate plasma from blood cells has a molecular weight (MW) cutoff of 300 kDa,¹⁰ there is a wide range of plasma proteins susceptible to adsorption and removal. A selection of target molecules for analysis seems to be quite difficult under these circumstances. It is therefore disputable whether we can derive system's characteristics (in terms of substance clearance) from plasma concentrations of selected proteins measured with specific immunoassays. However, recent advancement in the postgenomic biotechnologies, particularly proteomics that can simultaneously examine a large number of proteins with a wide variety of physicochemical properties, may overcome this limitation.

The aim of this study was to develop a technique allowing analysis of proteins adsorbed to the Prometheus system, to validate it by accomplishing proteomic identification of proteins released by the elution, and to provide a pilot characteristic of the proteins adsorbed to the Prometheus adsorption units.

Methods

Patient and Treatment. A 37 year-old man who suffered acute on chronic liver failure due to alcohol abuse was treated with a 6-h session of Fractionated Plasma Separation, Adsorption and Dialysis (Prometheus; Fresenius Medical Care, Homburg, Germany) under citrate anticoagulation. Before the procedure, a plasma sample was drawn for blood tests and proteomic analysis. At the end of the procedure, the system was flushed with 500 mL of replacement solution (Plasmalyte, Baxter, Deerfield, IL) and disconnected from the patient. The study protocol has been approved by the local ethics committee.

The Prometheus circuit included two adsorber cartridges, each of which had a filling volume of 90 mL. These cartridges contained adsorbing beads (styrenedivinyl benzene copolymer), one composed of neutral resin (Prometh 1), whereas the other one had anion exchanger properties (Prometh 2). Both units were emptied and flushed three times with 500 mL of PBS (pH 7.4). The protein concentration in the last flush was assessed with Bradford's dye-binding assay (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA).

Protein Elution and Sample Preparation. To elute the adsorbed proteins, Prometh 1 was filled with 90 mL of 10% SDS (SDS for electrophoresis, Sigma, Steinheim, Germany) and Prometh 2 was filled with 90 mL of 40% acetic acid (p.a., Sigma). After 30-min incubation at 24 °C, both capsules were drained. The eluates are henceforth referred to as P1 (from Prometh 1) and P2 (from Prometh 2). The eluates (10 mL) were precipitated with 40 mL of acetone (Sigma), incubated at -20 °C for 30 min and spinned down (4500g, 30 min, 4 °C). The protein pellets were washed once with 8 mL of a mixture of acetone-methanol-water-acetic acid (80:10:9.9:0.1), centrifuged as above, air-dried, and dissolved in 2 mL of lysis buffer (7 M urea, 4% CHAPS, 40 mM Tris base, 2 M Thiourea, 2% IPG buffer pH 3-10, and 120 mM DTT). To minimize salt contamination, P1 and P2 eluates were dialyzed against ultrahigh quality water using a semipermeable membrane with a MW cutoff at 7 kDa (Serva-Electrophoresis; Heidelberg, Germany) using five exchanges. P1 and P2 samples were then concentrated in a SpeedVac and proteins were resuspended in the lysis

buffer (same as above). Blood sample (4 mL) was processed by centrifugation only (10 min, 4 °C, 4000g) to separate plasma (supernatant).

Two-Dimensional Electrophoresis (2-DE). All reagents were supplied by Sigma; IPG buffer (ZOOM carrier Ampholytes 3-10) was purchased from Invitrogen (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). P1, P2, and plasma samples (all in triplicate) were diluted with rehydration buffer (7 M urea, 4% CHAPS, 40 mM Tris base, 2 M Thiourea, 2% IPG buffer pH 3-10, 120 mM DTT, and a trace of bromophenol blue) to the final protein concentration of 200 μ g in 140 μ L. Samples were applied on IPG strips (7.7 cm, pH 3-10 nonlinear; Invitrogen) and focused in a MiniProtean cell (Bio-Rad). Isoelectric focusing (IEF) was performed as follows: IPG strips were rehydrated passively for 1 h and actively for 10 h at 30 V followed by stepwise of 200-750 V until 10 000 Vh was reached. After IEF, the IPG strips were equilibrated in equilibration buffer I (112 mM Tris-base, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 130 mM DTT, and a trace of bromophenol blue) for 30 min, and subsequently alkylated in buffer II (112 mM Tris-base, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 4% (w/v) SDS, 135 mM IAA, and a trace of bromophenol blue) for 30 min. Each equilibrated IPG strip was placed on top of a 13% polyacrylamide gel (9 \times 7 cm) and covered with 0.5% agarose. The second-dimension separation was carried out at 65 mA/gel at 20 °C until the bromophenol blue dye front reached the bottom of the gel. At the end of each run, the 2-D gels were stained with Simply Blue (Invitrogen) and scanned using an Epson Perfection 4990 Photo scanner.

2-D Spot Pattern Analysis. Computer-aided analysis of 2-D gel images was carried out using PDQuest 2-D software version 8.1 (Bio-Rad). A synthetic image was constructed from all triplicate gels processed from each sample, using only spots constantly present in all three gels. The protein quantity was determined relative to integrated spot density. Quantitative differences were considered significant when showing at least 2-fold intensity variation. The statistical analysis was carried out using SigmaPlot/SigmaStat data analysis software (Version 12.0, SPSS, Inc., Chicago, IL). Mann-Whitney rank sum test was used to compare continuous variables, Spearman rank order correlation coefficients were calculated to estimate association between different variables.

In-Gel Tryptic Digestion. Visualized protein spots were excised manually and washed with water and water/acetonitrile (ACN). SimplyBlue stain was removed by washing with 50 mM NH_4HCO_3 and ACN. Proteins in gel were reduced with 10 mM DTT/50 mM NH_4HCO_3 (45 min, 56 °C) and alkylated with 55 mM IAA/50 mM NH_4HCO_3 (30 min, in the dark at room temperature). Gel spots were washed with 50 mM NH_4HCO_3 and ACN and dried in SpeedVac. Dried gel particles were rehydrated with digestion buffer containing 12.5 ng/ μ L sequencing grade trypsin (Roche, Basel, Switzerland) in 50 mM NH_4HCO_3 at 4 °C. After 45 min, the remaining solution was removed and replaced by 0.1 M NH_4HCO_3 . Tryptic digestion was performed overnight at 37 °C.

After digestion, proteolytic peptides were subsequently extracted with 25 mM NH_4HCO_3 , ACN, and 5% formic acid. The three extracts were pooled and 10 mM DTT solution in 50 mM NH_4HCO_3 was added. The mixture was then dried in SpeedVac, and the resulting tryptic peptides were dissolved in 5% formic acid solution and desalted using ZipTip μ C18 (Millipore; Bedford, MA) following manufacturer's instructions.

Mass Spectrometry (MS). The resulting proteolytic peptides were mixed with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)

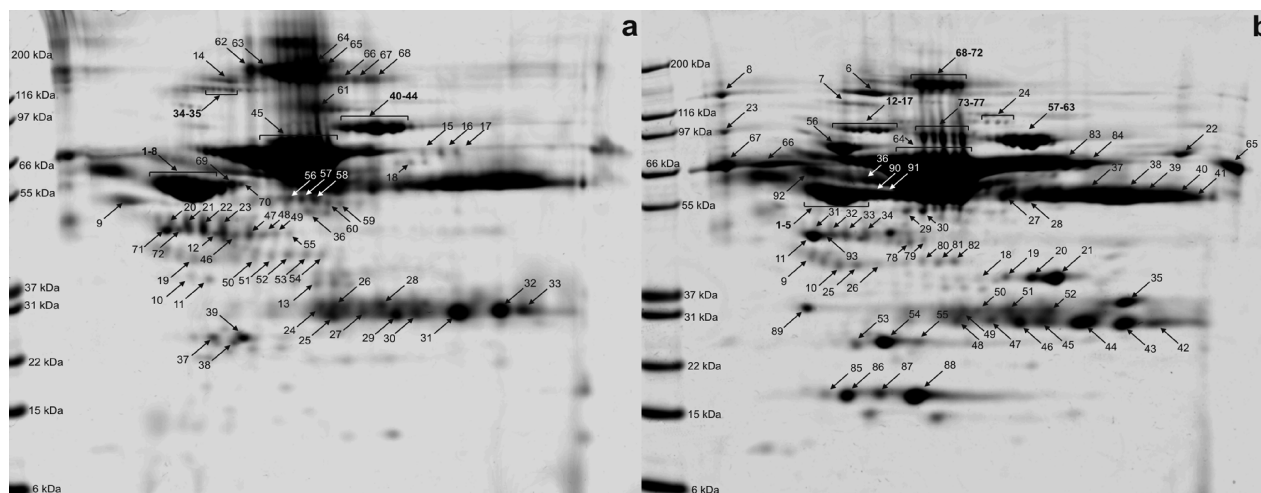


Figure 1. Representative 2-D gel images of Prometh 1 eluate (P1) (a) and Prometh 2 eluate (P2) (b). Spots labeled with numbers were successfully identified by MALDI-TOF/TOF analyses (see Tables 1 and 2). MALDI TOF/TOF = matrix assisted laser desorption and ionization time-of-flight tandem mass spectrometry.

matrix solution (5 mg/mL CHCA in 0.1% TFA/50% ACN 1:1 (v/v)) in 1:1 ratio and 0.8 μ L of this mixture was spotted onto MALDI target plate. All mass spectra were acquired using a reflectron mode of 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems; Framingham, MA). A total of 2000 and 3000 laser shots were acquired and averaged to MS and MS/MS spectra, respectively. The MS/MS analyses were performed using collision energy of 1 kV and a collision gas pressure of 1.3×10^{-6} Torr. MS peaks with an S/N above 15 were listed and the 15 strongest precursors with an S/N above 50 among the MS peaks were automatically selected for MS/MS acquisition. A mass filter was used to exclude autolytic peptides of trypsin.

Resulting data were analyzed with GPS Explorer 3.6 (Applied Biosystems) software. The proteins were identified by searching against human subset of the Swiss-Prot protein database (release 54.6; Dec. 4, 2007) using the MASCOT 2.1.0 search algorithm (Matrix Science; London, U.K.). The general parameters for peptide mass fingerprinting (PMF) were as follows: a maximum of one missed cleavage, a peptide mass tolerance of ± 50 ppm, variable oxidation of methionine residue, and fixed carbamidomethylation of cysteine residue. A peptide charge state of +1 and fragment mass tolerance of ± 0.25 Da were used for the MS/MS ion search. Probability-based MOWSE scores were estimated by comparison of search results against estimated random match population and were reported as $-10 \times \log_{10}(p)$ where p is the absolute probability.¹¹ MOWSE scores greater than 55 were considered as significant hits ($p < 0.05$) for PMF. Individual MS/MS ions scores >28 indicated identity or extensive homology ($p < 0.05$) for MS/MS ion search.

Results

The baseline plasma levels were as follows: bilirubin 475 μ mol/L, aspartate aminotransferase (AST) 3.7 μ kat/L, alanine aminotransferase (ALT) 0.5 μ kat/L, ammonium 47 μ mol/L, and plasma prothrombin ratio 2.6. The final flush of Prometh 1 and Prometh 2 cartridges with PBS yielded 81 mg (0.17 mg/mL) and 177 mg (0.36 mg/mL) of the washed proteins, whereas the eluates using SDS (P1) and acetic acid (P2) contained 4113 mg (47.2 mg/mL) and 8280 mg (97.2 mg/mL), respectively.

Representative 2-D gel images of proteins derived from P1 and P2 are shown in Figure 1, panels a and b. Using 200 μ g of

total protein and Simply Blue stain, there were 148 protein spots detected in all 3 replicate gels of P1 and 163 protein spots detected in all triplicate gels of P2. In both eluates, protein spots were distributed from MW of 12–194 kDa and their pI (isoelectric points) ranged from 3.5 to 9.0 (Figure 2, panels a and b). However, the majority (95%) of protein spots and their intensities were found mainly in the interval of MW of 30–150 kDa and pI of 4.8–8.6. Spot patterns in both eluates differed significantly from each other (in 64 spots intensity levels significantly differed between the two groups; $p < 0.05$). Concurrently, intensity levels of 38 spots in P1 and 45 spots in P2 significantly differed ($p < 0.05$) from those of plasma protein spots.

To evaluate potential selectivity of Prometheus system in protein adsorption, we compared spot distribution and intensity levels of P1 and P2 with the pattern of basal plasma proteins collected from the same patient. In gels from P1, 33 spots had E/P (intensity level in eluate per intensity level in plasma) > 2.0 , whereas other 53 spots had E/P < 0.5 . In P2 gels, 32 spots had E/P > 2.0 , whereas 71 spots had E/P < 0.5 .

Concerning MW and pI , P1 proteins with E/P > 2.0 had greater MW as compared to the P1 proteins with E/P < 0.5 (74 ± 11 vs 52 ± 8 kDa; $p < 0.05$), whereas pI values between these two subgroups of P1 were comparable (Figure 3, panels a and b). In contrast, P2 proteins with E/P > 2.0 had significantly less pI values compared to P2 proteins with E/P < 0.5 (4.8 ± 0.09 vs 5.4 ± 0.12 ; $p < 0.01$), whereas MW values between these two subgroups of P2 were comparable (Figure 3, panels a and b). Spearman correlation tests were performed and the results showed that there were significant correlations between MW and E/P values of P1 ($r = 0.2$; $p = 0.01$) and between pI and E/P values of P2 ($r = -0.32$; $p = 0.002$) (Figure 4). These data implicate that Prometh 1 preferably removed high-MW proteins, whereas Prometh 2 preferentially removed acidic proteins.

Spots that reached a relative intensity of 1000 ppm (of the total quantity of all valid spots) or greater were subjected to in-gel tryptic digestion and MS identification. Out of 109 spots excised from P1 gels, 72 were successfully identified providing 18 unique proteins (Table 1), while 113 spots were cut from P2 gels giving 93 positive identifications of 30 unique proteins (Table 2). The identification was verified by comparison of

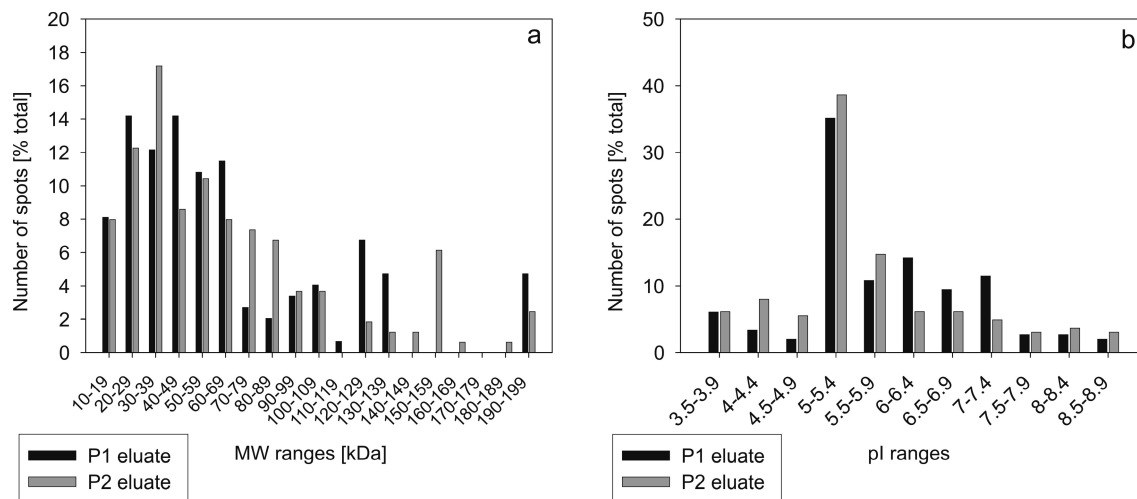


Figure 2. Molecular weight (a) and pI (b) distributions in Prometh 1 eluate (P1) and Prometh 2 eluate (P2). Percentage per category of total spot number is given. MW = molecular weight.

measured and theoretical pI and MW, and the confirmed spots are marked with an asterisk in Tables 1 and 2. By comparing the measured and theoretical values, 36 spots identified from P1 and 41 from P2 had difference in pI (ΔpI) > 1 or difference in MW (ΔMW) > 10%. These differences were most likely due to fragmentation or multimerization of these identified proteins.

Relative intensities of high-abundance proteins (i.e., transferrin, haptoglobin, alpha-1-antitrypsin, immunoglobulin light and heavy chains) in both eluates were comparable to those in plasma (E/P ratios were in between the range of 0.5–2.0), except for albumin which had a borderline E/P = 0.48 in P1 and E/P = 2.7 in P2. However, a greater degree of differences were detected in several low-abundance proteins, which had average E/P ranging from 0.16 (spot nos. 29, 30 in Figure 5a,d) for fibrinogen gamma to 37.0 (spot nos. 85–88 in Figure 5b,e) in case of transthyretin.

Discussion

There are a limited number of previous proteomic studies analyzing compositions of proteins adsorbed to artificial surface of devices exposed to human plasma. These studies mostly examined the proteins bound to hemodialysers during renal replacement therapy,^{12,13} whereas the analysis of molecules removed in this way during liver support therapy is lacking. To the best of our knowledge, this is the first study analyzing compositions of a large number of proteins eliminated by adsorption inside an extracorporeal liver support system during therapy in a patient with liver failure. For protein elution, we adjusted the algorithm described in a paper published by Ishikawa et al.¹³ As there are two adsorbers with different properties in the Prometheus system, one neutral (Prometh 1) and the other with anion exchanging property (Prometh 2), it seemed relevant to employ two elution solvents. With respect to their characteristics, we eluted P1 with 10% SDS and P2 with 40% acetic acid. The amount of total protein obtained from both adsorbers in our present study was in accordance with the amount of protein loss from this treatment as reported previously.³ Prior to the elution, we carefully washed the plasma remnants out of the cartridges. There were huge differences in the protein concentrations of plasma remnants compared to the eluates (several orders of magnitude) obtained from both cartridges. In addition, there were significant differences in the

proteome profiles and spot intensity levels of the eluate proteins (P1 and P2) compared to those of plasma proteins. Therefore, the data reported in our study were specific for the adsorbed proteins.

The membrane used in the Prometheus system to separate plasma had a sieving coefficient of 0.9 for proteins with MW 40 kDa and of 0.1 for 300-kDa proteins. We could therefore expect to see free filtration of proteins up to the size of albumin, while only a small proportion of plasma fibrinogen and virtually no IgM could be exposed and adsorbed to Prometh 1 and 2.¹⁰ Our proteomic data were consistent with this assumption as we found a majority of proteins had MW below 100 kDa even though some proteins with MW up to 200 kDa were also detectable. For instance, only a few faint protein spots were identified as fibrinogen. Furthermore, we also expected to observe both selective and unselective protein binding during the contact of plasma and adsorbers' surface. To assess this issue, we compared spot intensity distributions between P1 and P2 mutually, and between both eluates and plasma. In this way, we demonstrated substantial differences, which however could be attributed not only to preferential adsorption, but also to diverse elution methods.

We anticipated that selective adsorption should be explained in part by physical properties of the adsorbers and the bound proteins, mainly by their charges (should be dramatic in P2, as Prometh 2 had positively charged sites) and by their molecular sizes (should be obvious in P1, because of the excess of small molecules due to filtration threshold). To evaluate these possibilities, we tested correlations between E/P ratios of intensity levels and pI, as well as MW. We confirmed the preferential adsorption of acidic (negatively charged) proteins to the Prometh 2 cartridge. However, it was rather surprising that larger molecules were surplus in P1. This unexpected finding was hard to explain by means of the available data. However, we could speculate that the proposed effect of filter cutoff was not dramatic as gradient gels allowed separation of molecules up to 200 kDa (still had a sieving coefficient of 0.2). At the same time, neutral resin contained in Prometh 1 adsorber probably had an affinity for hydrophobic proteins, which generally had a limited detectability by 2-DE.

With the use of MS analysis, we were able to identify in eluates several high- and low-abundance plasma proteins. All

Table 1. Proteins Identified in Prometh 1 Eluate (P1)^a

spot no.	protein name	Swiss-Prot entry	PMF score/ sequence coverage	MS/MS peptide no./ total ion score	E/P
1*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	182/44%	NA	2.12
2*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	179/42%	10/745	1.66
3*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	128/25%	11/992	1.68
4*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	128/25%	10/700	1.84
5*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	112/34%	7/543	1.45
6*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	242/58%	11/1178	1.67
7*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	105/26%	8/669	1.20
8*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	136/36%	11/618	1.34
9	Alpha-1-antitrypsin	P01009	NA	1/37	0.66
10*	AMBP protein	P02760	NA	2/39	0.92
11*	AMBP protein	P02760	NA	2/46	0.97
12*	Apolipoprotein A-IV	P06727	NA	3/44	1.17
13*	Apolipoprotein E	P02649	65/35%	7/130	1.92
14*	Ceruloplasmin	P00450	NA	4/61	0.82
15*	Complement C3 beta chain	P01024	65/19%	4/50	0.44
16*	Complement C3 beta chain	P01024	82/18%	5/141	1.10
17*	Complement C3 beta chain	P02768	NA	4/128	0.82
18	Complement factor B	P00751	NA	2/37	0.98
19	Complement factor B	P00751	NA	3/112	1.51
20*	Haptoglobin	P00738	NA	3/62	0.21
21*	Haptoglobin	P00738	NA	5/195	0.79
22*	Haptoglobin	P00738	61/16%	4/222	0.63
23*	Haptoglobin	P00738	NA	3/53	1.34
24	Ig kappa chain C region	P01834	NA	2/165	3.12
25	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/95	1.63
	Ig lambda chain C regions	P01842	NA	2/45	
26	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/235	0.32
	Ig lambda chain C regions	P01842	NA	2/145	
27	Ig kappa chain C region	P01834	NA	2/66	1.32
28	Ig kappa chain C region	P01834	57/48%	3/256	4.07
29	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/131	3.51
30	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/86	1.57
	Ig lambda chain C regions	P01842	NA	2/48	
31	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/93	0.20
32	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/112	2.33
33	Ig lambda chain C regions	P01842	NA	3/110	0.36
34*	Interalpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Q14624	108/19%	6/121	0.46
35*	Interalpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	Q14624	NA	1/49	0.84
36*	Pigment epithelium-derived factor	P36955	NA	3/170	2.22
37*	Plasma retinol-binding protein	P02753	NA	5/219	0.82
38*	Plasma retinol-binding protein	P02753	NA	3/108	0.55
39*	Plasma retinol-binding protein	P02753	NA	2/55	6.50
40*	Serotransferrin	P02787	125/24%	11/395	0.34
41*	Serotransferrin	P02787	167/25%	11/546	1.14
42*	Serotransferrin	P02787	186/27%	12/442	0.71
43*	Serotransferrin	P02787	93/14%	8/455	2.07
44*	Serotransferrin	P02787	138/26%	8/456	0.25
45*	Serum albumin	P02768	116/44%	5/132	0.48
46	Serum albumin	P02768	118/30%	7/156	0.54
47	Serum albumin	P02768	NA	4/123	2.19
48	Serum albumin	P02768	81/18%	8/382	0.61
49	Serum albumin	P02768	105/26%	4/94	0.82
50	Serum albumin	P02768	NA	4/68	1.07
51	Serum albumin	P02768	92/18%	NA	0.65
52	Serum albumin	P02768	61/11%	3/140	1.19
53	Serum albumin	P02768	76/19%	5/205	4.77
54	Serum albumin	P02768	NA	3/117	1.84
55	Serum albumin	P02768	NA	4/125	2.07
56	Serum albumin	P02768	69/13%	4/169	2.18
57	Serum albumin	P02768	NA	7/141	0.95
58	Serum albumin	P02768	NA	7/215	0.88
59	Serum albumin	P02768	NA	3/137	1.36
60	Serum albumin	P02768	NA	6/180	0.87
61	Serum albumin	P02768	75/20%	6/139	0.57
62	Serum albumin	P02768	70/20%	4/85	0.87
63	Serum albumin	P02768	NA	3/62	1.95
64	Serum albumin	P02768	162/44%	6/136	2.49
65	Serum albumin	P02768	155/46%	NA	2.80
66	Serum albumin	P02768	149/49%	5/112	5.93
	Ig gamma-1 chain C region	P01857	NA	1/28	
67	Serum albumin	P02768	NA	5/128	5.61
	Ig gamma-1 chain C region	P01857	NA	2/82	
68	Serum albumin	P02768	159/44%	5/168	21.43
	Ig gamma-1 chain C region	P01857	NA	3/207	
69*	Vitamin D-binding protein	P02774	70/34%	5/288	1.13
70*	Vitamin D-binding protein	P02774	69/39%	5/271	1.57
71*	Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311	93/46%	3/69	3.71
72*	Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311	100/36%	3/101	1.45

^a PMF, peptide mass fingerprinting; MS/MS, tandem mass spectrometry; NA, not applicable (identification by MS or MS/MS was not done or was unsuccessful); E/P, eluate-to-plasma ratio of relative spot intensity. (*) Spots whose measured MW and pI were in agreement with their theoretical values.

Table 2. Proteins Identified in Prometh 2 Eluate (P2)^a

spot no.	protein name	Swiss-Prot entry	PMF score/ sequence coverage	MS/MS peptide no./ total ion score	E/P
1*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	193/50%	10/641	1.53
2*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	260/61%	12/1099	1.24
3*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	239/59%	11/1074	1.33
4*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	266/59%	12/1097	0.98
5*	Alpha-1-antitrypsin	P01009	200/55%	10/773	1.20
6*	Ceruloplasmin	P00450	114/16%	14/585	1.03
7*	Ceruloplasmin	P00450	96/19%	12/231	0.55
8	Ceruloplasmin	P00450	156/31%	8/112	1.57
9*	Clusterin	P10909	NA	3/66	2.72
10*	Clusterin	P10909	NA	2/64	2.93
11*	Complement C3	P01024	94/16%	10/143	3.47
12*	Complement C4-A (alpha chain)	P0C0L4	NA	10/497	2.07
13*	Complement C4-A (alpha chain)	P0C0L4	62/9%	12/588	1.52
14*	Complement C4-A (alpha chain)	P0C0L4	66/6%	6/219	2.43
15*	Complement C4-A (alpha chain)	P0C0L4	66/8%	9/240	1.90
16*	Complement C4-A (alpha chain)	P0C0L4	79/13%	13/525	3.21
17*	Complement C4-A (alpha chain)	P0C0L4	69/11%	10/526	1.39
18*	Complement C4-A (gamma chain)	P0C0L4	NA	4/116	3.06
19*	Complement C4-A (gamma chain)	P0C0L4	NA	5/102	6.19
20*	Complement C4-A (gamma chain)	P0C0L4	NA	7/187	8.23
21*	Complement C4-A (gamma chain)	P0C0L4	NA	9/275	2.88
22	Complement C4-A	P0C0L4	122/15%	12/364	1.28
23	Complement C4-A	P0C0L5	NA	9/180	0.33
24*	Complement factor B	P0C0L5	NA	1/45	0.34
25	Complement factor B	P00751	NA	4/118	3.42
26	Complement factor B	P00751	NA	3/80	1.43
27*	Fibrinogen beta chain	P02675	NA	3/81	0.36
28*	Fibrinogen beta chain	P02675	NA	2/60	0.39
29*	Fibrinogen gamma chain	P02679	94/47%	3/37	0.16
30*	Fibrinogen gamma chain	P02679	104/49%	7/145	0.20
31*	Haptoglobin	P00738	NA	7/70	0.63
32*	Haptoglobin	P00738	56/29%	9/166	1.10
33*	Haptoglobin	P00738	NA	2/43	0.63
34*	Haptoglobin	P00738	NA	2/41	0.52
35*	Hyaluronan-binding protein 2	Q14520	NA	8/460	13.7
36	Ig alpha-1 chain C region	P01876	83/32%	9/548	0.35
37	Ig gamma-1 chain C region	P01857	NA	4/325	0.37
	Ig gamma-2 chain C region	P01859	NA	3/89	
38	Ig gamma-1 chain C region	P01857	NA	5/384	0.51
	Ig gamma-2 chain C region	P01859	NA	5/143	
39	Ig gamma-1 chain C region	P01857	NA	5/364	0.78
	Ig gamma-2 chain C region	P01859	NA	4/81	
40	Ig gamma-1 chain C region	P01857	104/54%	7/498	0.84
	Ig gamma-2 chain C region	P01859	NA	4/100	
41	Ig gamma-1 chain C region	P01857	84/42%	8/513	1.36
	Ig gamma-2 chain C region	P01859	NA	5/173	
42	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/175	1.26
43	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/172	0.81
44	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/162	1.20
45	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/246	2.43
46	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/305	1.24
47	Ig kappa chain C region	P01834	NA	3/231	5.48
48	Ig kappa chain C region	P01834	66/88%	3/277	4.45
49	Ig lambda chain C regions	P01842	NA	1/32	1.97
50	Ig lambda chain C regions	P01842	NA	3/68	0.72
51	Ig lambda chain C regions	P01842	NA	3/178	1.16
52	Ig lambda chain C regions	P01842	NA	3/227	0.45
53*	Plasma retinol-binding protein	P02753	62/37%	7/96	10.57
54*	Plasma retinol-binding protein	P02753	NA	5/63	4.70
55*	Plasma retinol-binding protein	P02753	57/48%	6/370	7.78
56*	Prothrombin	P00734	217/47%	14/630	22.9
57*	Serotransferrin	P02787	73/12%	6/242	1.80
58*	Serotransferrin	P02787	251/42%	15/620	1.74
59*	Serotransferrin	P02787	210/43	13/508	1.62
60*	Serotransferrin	P02787	218/37%	14/641	1.41
61*	Serotransferrin	P02787	180/33%	14/798	1.28
62*	Serotransferrin	P02787	201/46%	15/856	2.25
63*	Serotransferrin	P02787	113/28%	12/359	1.95
64*	Serum albumin	P02768	169/48%	12/710	2.74
65	Serum albumin	P02768	NA	1/33	3.27
66	Serum albumin	P02768	NA	5/95	1.24
67	Serum albumin	P02768	292/57%	15/679	436.97
68	Serum albumin	P02768	56/28%	5/287	0.90
69	Serum albumin	P02768	149/39%	13/792	5.78
70	Serum albumin	P02768	76/17%	8/169	1.09
71	Serum albumin	P02768	94/31%	13/521	1.35
72	Serum albumin	P02768	124/36%	14/651	1.70
73	Serum albumin	P02768	212/49%	14/853	10.07
74	Serum albumin	P02768	178/43	10/182	10.86
75	Serum albumin	P02768	234/55	14/404	9.61
76	Serum albumin	P02768	173/42	8/49	9.50

Table 2. Continued

spot no.	protein name	Swiss-Prot entry	PMF score/ sequence coverage	MS/MS peptide no./ total ion score	E/P
77	Serum albumin	P02768	80/17	8/191	14.75
78	Serum albumin	P02768	NA	8/196	1.01
79	Serum albumin	P02768	NA	11/433	1.58
80	Serum albumin	P02768	NA	11/533	1.78
81	Serum albumin	P02768	NA	11/638	1.99
82	Serum albumin	P02768	NA	4/65	0.87
83	Serum albumin	P02768	NA	4/70	1.40
84	Serum albumin	P02768	NA	2/74	0.77
85*	Transthyretin	P02766n	68/50%	6/229	73.24
86*	Transthyretin	P02766	120/69%	8/538	33.39
87*	Transthyretin	P02766	110/54%	8/440	198.35
88*	Transthyretin	P02766	134/73%	9/821	13.65
89*	Trypsin-2	P07478	NA	5/258	28.68
90*	Vitamin D-binding protein	P02774	57/30%	6/192	1.69
91*	Vitamin D-binding protein	P02774	65/31%	9/480	2.20
92*	Vitronectin	P04004	NA	4/277	3.48
93*	Zinc-alpha-2-glycoprotein	P25311	86/43%	NA	0.41

^aPMF, peptide mass fingerprinting; MS/MS, tandem mass spectrometry; NA, not applicable (identification by MS or MS/MS was not done or was unsuccessful); E/P, eluate-to-plasma ratio of relative spot intensity. (*) Spots whose measured MW and pI were in agreement with their theoretical values.

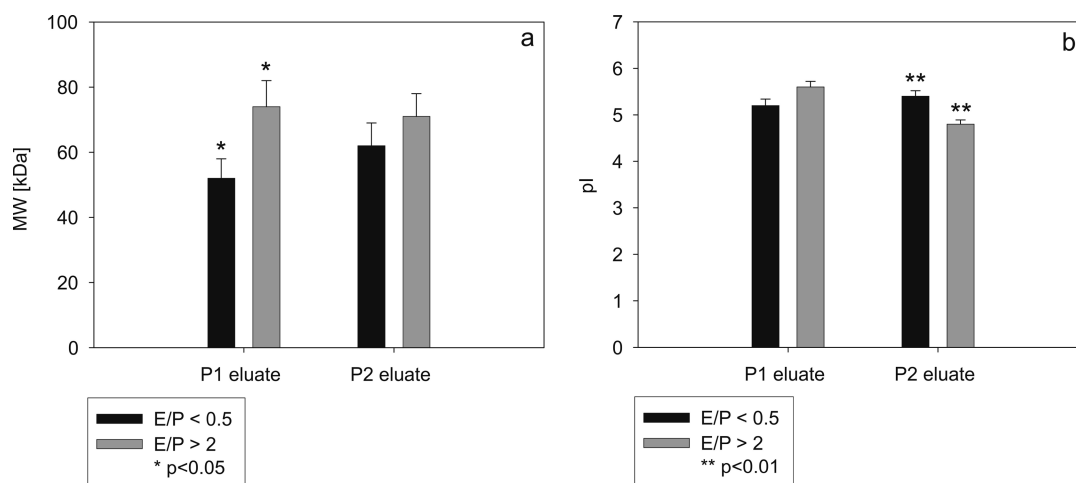


Figure 3. Molecular weight and pI differences between spots with eluate-to-plasma ratio greater than 2 and lower than 0.5. Data are given as means and standard errors, separately for Prometh 1 eluate (P1) and Prometh 2 eluate (P2). Statistical significance tested with rank sum test. MW = molecular weight, E/P = eluate-to-plasma ratio of spot intensity.

the identified proteins have been previously detected in human plasma and some of them have been also reported to bind to artificial materials in previously published articles (e.g., apolipoprotein A-IV and transthyretin in a study by Bonomini et al.;¹² complement C4, immunoglobulin light and heavy chains, and vitamin D-binding protein in a study by Kim, et al.,¹⁴ and albumin, transferrin, and alpha-1-antitrypsin in both of these two studies^{12,14}).

Positively identified proteins were then matched to corresponding spots found in gels derived from plasma samples to assess if there was any selectivity in adsorption of individual proteins. Taking into account that 2-DE allows only estimation of protein quantities and considering that reduced E/P ratio might be due to imperfect elution of some proteins, it could be delusive to draw a conclusion about adsorption profile of proteins with mild enhancement or even gross decrement of spot intensity. Very low eluate quantity of fibrinogen is almost certainly due to its large molecule, which should be hardly filtered from blood (sieving coefficient less than 0.1) and therefore did not get into contact with adsorbers. On the other hand, P2 eluate enrichment with albumin (bearing negative charge) is in accordance with anion-exchanging properties of Prometh 2 adsorber and the periprocedural drop of serum albumin reported by Evenepoel et al.³

In case of proteins with substantially high E/P ratios, an assumption of preferential adsorption is probably well-justified. The highest clearance was demonstrated in transthyretin (synonym prealbumin) (spot nos. 85–88 in Figure 5b,e; average E/P = 37, MW 16 kDa, pI 5.5), which is a tetrameric protein synthesized in liver and involved in transporting thyroid hormones. It is known to form complexes with retinol-binding protein whose E/P ratio was elevated as well (spot nos. 53–55, Figure 5b,e; average E/P = 8.7, MW 23 kDa, pI 5.8). Other proteins with strikingly high E/P ratios included anionic trypsin (spot no. 89, Figure 5b,e; E/P = 29, MW 26 kDa, pI 4.8), prothrombin (spot no. 56, Figure 5a,d; E/P = 23, MW 70 kDa, pI 5.6), and hyaluronan-binding protein 2 (HABP) light chain (spot no. 35, Figure 5c,f; E/P = 13, MW 27 kDa, pI 7.7). These three proteins belong to serine endopeptidase family (Peptidase S1), suggesting a possible affinity of P2 adsorber for this group of enzymes.

Since this is a single-patient study, it would be misleading to draw conclusions about clinical impact (beneficial or detrimental) of any specific protein's removal. Nevertheless, in several proteins, we can speculate about potential consequences of their elimination. Transthyretin serves as a reliable nutrition marker (both for protein and energy metabolism), and its level decreases during inflammation and liver dysfunction.¹⁵

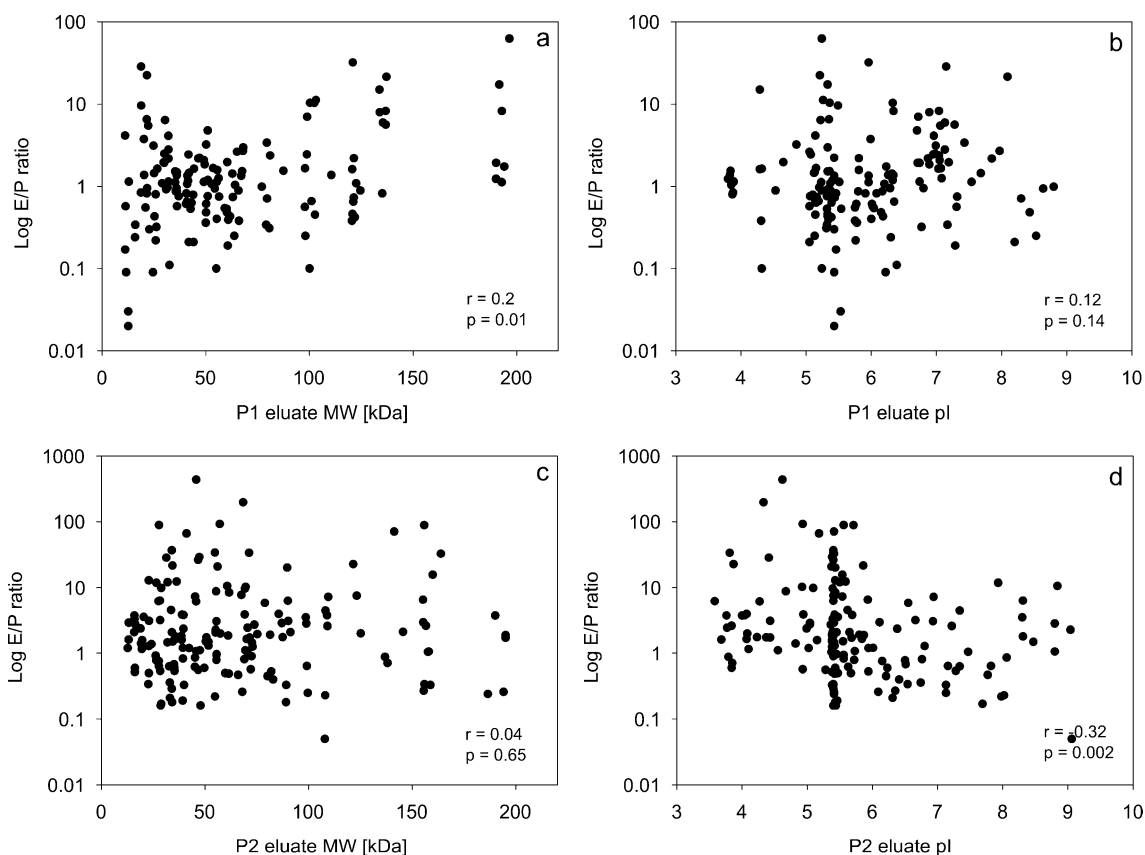


Figure 4. Scatter plot graphs of eluate-to-plasma ratio in relation to molecular weight (a and c) and pI (b and d) in Prometh 1 eluate (P1) (a and b) and Prometh 2 eluate (P2) (c and d). Correlation coefficients (*r*) were determined with Spearman rank order correlation (*p* = level of statistical significance). Logarithmic scale was used on Y-axis. E/P = eluate-to-plasma ratio of spot intensity, MW = molecular weight.

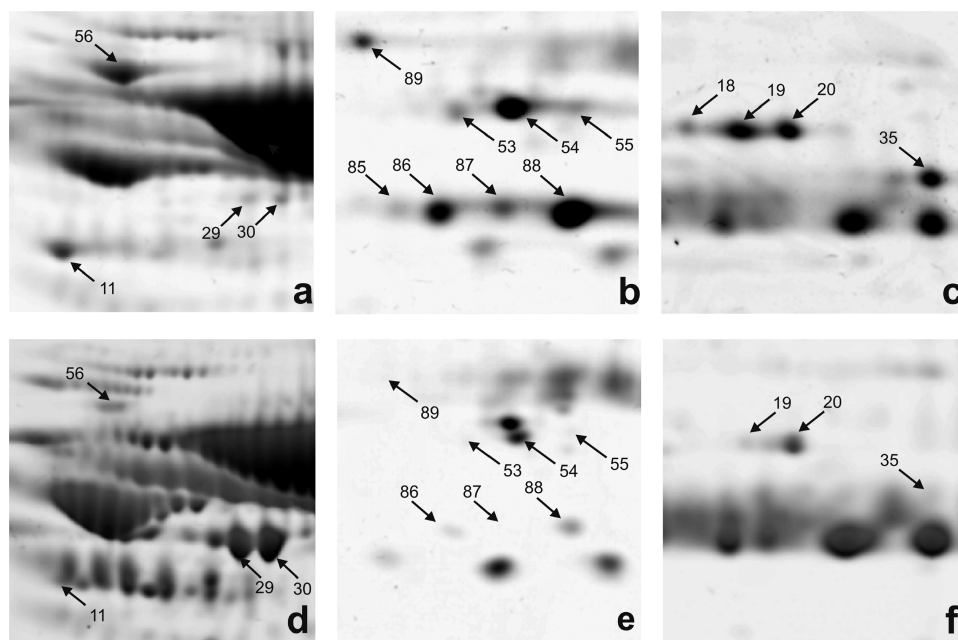


Figure 5. Illustration of marked differences in E/P relative quantities in low-abundance proteins in Prometh 2 eluate (P2) (a–c) compared to the plasma (d–f). E/P = eluate-to-plasma ratio of spot intensity.

Although its diagnostic value in liver failure is markedly limited, the depletion of prealbumin/retinol-binding protein complex might have clinical implication due to impaired thyroxine and retinol transport. Similarly, prothrombin deprivation may

further aggravate coagulation disorder invariably present in patients with severe liver dysfunction.

Activated (two-chain) form of HABP has been detected in P2 as evidenced by protein’s MW and amino acid sequence

covered by MS/MS. HAPB activation has been observed to occur upon liver injury, at least in animal model, thus, leading to cleavage of urokinase type plasminogen activator which in turn activates matrix metalloproteases and triggers extracellular matrix degradation.¹⁶ Therefore, it has been proposed that hepatic injury-specific activation of HAPB may act as an early factor in the cascade responsible for tissue remodeling following liver damage.¹⁶ Besides that, HAPB amino acid sequence is homologous to that of hepatocyte growth factor activator,¹⁷ and HAPB has been reported to exert antiangiogenic effect.¹⁸ Given these circumstances, it is conceivable that selective clearance of HAPB might have direct influence on liver regeneration.

In summary, we identified for the first time a large number of proteins eliminated by adsorption to the Prometheus extracorporeal liver support system. There were also some degrees of selectivity of proteins preferentially bound to two Prometheus adsorption units; Prometh 1 preferentially adsorbed high-MW proteins, whereas Prometh 2 preferentially adsorbed acidic proteins. Some of the proteins found in eluates could imply safety concerns; however, concluding on their clinical relevance is beyond the scope of this study. To address such challenge, a larger clinical trial would be necessary.

Abbreviations: ACN, acetonitrile; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; CHCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; 2-DE, 2-dimensional electrophoresis; DTT, dithiothreitol; E/P, eluate-to-plasma ratio (spot intensity); IAA, iodoacetamide; IEF, isoelectric focusing; IPG, immobilized pH gradient; IL, interleukin; MALDI, matrix-assisted laser desorption/ionization; MW, molecular weight; MS, mass spectrometry; MS/MS, tandem mass spectrometry; PBS, phosphate buffered saline; PMF, peptide mass fingerprinting; SDS, sodium dodecyl sulfate; TFA, trifluoroacetic acid; TNF, tumor necrosis factor; TOF, time-of-flight.

Acknowledgment. The study was supported by Research Project No. MSM0021620819 "Replacement of and support to some vital organs" awarded by the Ministry of Education, Youth, and Physical Training of the Czech Republic.

Supporting Information Available: MS/MS spectra of transthyretin, plasma retinol-binding protein, hyaluronan-binding protein, trypsin 2, prothrombin, vitronectin and clusterin detected in eluates: plasma 2D-gel scanned image together with spots' MW and pI distributions in plasma: Hyaluronan-binding protein 2 light chain sequence coverage by MS/MS. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Falkenhagen, D.; Strobl, W.; Vogt, G.; Schrefl, A.; Linsberger, I.; Gerner, F. J.; Schoenhofen, M. Fractionated plasma separation and adsorption system: a novel system for blood purification to remove albumin bound substances. *Artif. Organs* **1999**, *23* (1), 81–6.
- (2) Rifai, K.; Ernst, T.; Kretschmer, U.; Bahr, M. J.; Schneider, A.; Hafer, C.; Haller, H.; Manns, M. P.; Fliser, D. Prometheus--a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *J. Hepatol.* **2003**, *39* (6), 984–90.
- (3) Evenepoel, P.; Laleman, W.; Wilmer, A.; Claes, K.; Maes, B.; Kuypers, D.; Bammens, B.; Nevens, F.; Vanrenterghem, Y. Detoxifying capacity and kinetics of prometheus--a new extracorporeal system for the treatment of liver failure. *Blood Purif.* **2005**, *23* (5), 349–58.
- (4) Evenepoel, P.; Laleman, W.; Wilmer, A.; Claes, K.; Kuypers, D.; Bammens, B.; Nevens, F.; Vanrenterghem, Y. Prometheus versus molecular adsorbents recirculating system: comparison of efficiency in two different liver detoxification devices. *Artif. Organs* **2006**, *30* (4), 276–84.
- (5) Rifai, K.; Ernst, T.; Kretschmer, U.; Haller, H.; Manns, M. P.; Fliser, D. Removal selectivity of Prometheus: a new extracorporeal liver support device. *World J. Gastroenterol.* **2006**, *12* (6), 940–4.
- (6) Aoike, I. Clinical significance of protein adsorbable membranes--long-term clinical effects and analysis using a proteomic technique. *Nephrol., Dial., Transplant.* **2007**, *22 Suppl 5*, v13–9.
- (7) De Vriese, A. S.; Vanholder, R. C.; Pascual, M.; Lameire, N. H.; Colardyn, F. A. Can inflammatory cytokines be removed efficiently by continuous renal replacement therapies. *Intensive Care Med.* **1999**, *25* (9), 903–10.
- (8) Moachon, N.; Boullange, C.; Fraud, S.; Vial, E.; Thomas, M.; Quash, G. Influence of the charge of low molecular weight proteins on their efficacy of filtration and/or adsorption on dialysis membranes with different intrinsic properties. *Biomaterials* **2002**, *23* (3), 651–8.
- (9) Stadlbauer, V.; Krisper, P.; Aigner, R.; Haditsch, B.; Jung, A.; Lackner, C.; Stauber, R. E. Effect of extracorporeal liver support with MARS and Prometheus on serum cytokines in acute-on-chronic liver failure. *Crit. Care* **2006**, *10* (6), R169.
- (10) Vienken, J.; Christmann, H. How can liver toxins be removed? Filtration and adsorption with the Prometheus system. *Ther. Apheresis Dial.* **2006**, *10* (2), 125–31.
- (11) Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20* (18), 3551–67.
- (12) Bonomini, M.; Pavone, B.; Siroli, V.; Del Buono, F.; Di Cesare, M.; Del Boccio, P.; Amoroso, L.; Di Ilio, C.; Sacchetta, P.; Federici, G.; Urbani, A. Proteomics characterization of protein adsorption onto hemodialysis membranes. *J. Proteome Res.* **2006**, *5* (10), 2666–74.
- (13) Ishikawa, I.; Chikazawa, Y.; Sato, K.; Nakagawa, M.; Imamura, H.; Hayama, S.; Yamaya, H.; Asaka, M.; Tomosugi, N.; Yokoyama, H.; Matsumoto, K. Proteomic analysis of serum, outflow dialysate and adsorbed protein onto dialysis membranes (polysulfone and pmma) during hemodialysis treatment using SELDI-TOF-MS. *Am. J. Nephrol.* **2006**, *26* (4), 372–80.
- (14) Kim, J. K.; Scott, E. A.; Elbert, D. L. Proteomic analysis of protein adsorption: serum amyloid P adsorbs to materials and promotes leukocyte adhesion. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* **2005**, *75* (1), 199–209.
- (15) Smith, F. R.; Goodman, D. S. The effects of diseases of the liver, thyroid, and kidneys on the transport of vitamin A in human plasma. *J. Clin. Invest.* **1971**, *50* (11), 2426–36.
- (16) Choi-Miura, N. H.; Otsuyama, K.; Sano, Y.; Saito, K.; Takahashi, K.; Tomita, M. Hepatic injury-specific conversion of mouse plasma hyaluronan binding protein to the active hetero-dimer form. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24* (8), 892–6.
- (17) Choi-Miura, N. H. Novel human plasma proteins, IHRP (acute phase protein) and PHBP (serine protease), which bind to glycosaminoglycans. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents* **2004**, *2* (3), 239–48.
- (18) Jeon, J. W.; Song, H. S.; Moon, E. J.; Park, S. Y.; Son, M. J.; Jung, S. Y.; Kim, J. T.; Nam, D. H.; Choi-Miura, N. H.; Kim, K. W.; Kim, Y. J. Anti-angiogenic action of plasma hyaluronan binding protein in human umbilical vein endothelial cells. *Int. J. Oncol.* **2006**, *29* (1), 209–15.

PR800966W

IV. Altered plasma proteome during an early phase of peritonitis induced sepsis.

Thongboonkerd V, Chiangjong W, Mares J, Moravec J, Tuma Z, Karvunidis T, Sinchaikul S, Chen ST, Opatrny K, Matejovic M.

Clin Sci (Lond). 2009;116(9):721-730. IF 4,859

Citace:

Plasma protein characteristics of long-term hemodialysis survivors.

Lin YP, Yang CY, Liao CC, Yu WC, Chi CW, Lin CH.

PLoS One. 2012; 7(7):e40232. Epub 2012 Jul 6. IF 3,370



Altered plasma proteome during an early phase of peritonitis-induced sepsis

Visith THONGBOONKERD*, Wararat CHIANGJONG*, Jan MAREŠ†, Jiri MORAVEC†, Zdenek TUMA†, Thomas KARVUNIDIS†, Supachok SINCHAIKUL‡, Shui-Tein CHEN‡§, Karel OPATRŇY JR†¹ and Martin MATEJOVIC†

*Medical Proteomics Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand, †Proteomics Laboratory, Department of Internal Medicine I and Intensive Care Unit, Charles University School of Medicine in Plzeň, 304 60 Plzeň, Czech Republic, ‡Institute of Biological Chemistry and Genomic Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, and §Institute of Biochemical Sciences, College of Life Science, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

A B S T R A C T

Sepsis is a systemic response to infection commonly found in critically ill patients and is associated with multi-organ failure and high mortality rate. Its pathophysiology and molecular mechanisms are complicated and remain poorly understood. In the present study, we performed a proteomics investigation to characterize early host responses to sepsis as determined by an altered plasma proteome in a porcine model of peritonitis-induced sepsis, which simulated several clinical characteristics of human sepsis syndrome. Haemodynamics, oxygen exchange, inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress, and other laboratory parameters were closely monitored. Plasma samples were obtained from seven pigs before and 12 h after the induction of sepsis, and plasma proteins were resolved with two-dimensional gel electrophoresis ($n = 7$ gels/group; before being compared with during sepsis). The resolved proteins were stained with the SYPRO Ruby fluorescence dye and subjected to quantitative and comparative analyses. From approx. 1500 protein spots visualized in each gel, levels of 36 protein spots were significantly altered in the plasma of animals with sepsis (sepsis/basal ratios or degrees of change ranged from 0.07 to 21.24). Q-TOF (quadrupole–time-of-flight) MS and MS/MS (tandem MS) identified 30 protein forms representing 22 unique proteins whose plasma levels were increased, whereas six forms of five unique proteins were significantly decreased during sepsis. The proteomic results could be related to the clinical features of this animal model, as most of these altered proteins have important roles in inflammatory responses and some of them play roles in oxidative and nitrosative stress. In conclusion, these findings may lead to a better understanding of the pathophysiology and molecular mechanisms underlying the sepsis syndrome.

Key words: host response, infection, plasma, proteomics, sepsis, septicaemia.

Abbreviations: 2-D, two-dimensional; ACN, acetonitrile; BP, blood pressure; CO, cardiac output; CVP, central venous pressure; DO₂, oxygen delivery; DTT, dithiothreitol; *F*iO₂, fraction of inspired oxygen; IEF, isoelectric focusing; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; Q-TOF, quadrupole–time-of-flight; MS/MS, tandem MS; NCBI, National Center for Biotechnology Information; NO_x, nitrate/nitrite; PAOP, pulmonary artery occlusion pressure; *P*CO₂, partial pressure of carbon dioxide; PEEP, positive end-expiratory pressure; *P*O₂, partial pressure of oxygen; SVR, systemic vascular resistance; TBARS, thiobarbituric acid-reacting substances; TFA, trifluoroacetic acid; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; \dot{V} O₂, oxygen consumption.

¹ Deceased

Correspondence: Dr Visith Thongboonkerd (email thongboonkerd@dr.com or vthongbo@yahoo.com) or Dr Martin Matejovic (email matejovic@fnplzen.cz).

INTRODUCTION

Sepsis is defined as a systemic inflammatory response syndrome due to presumed or confirmed infection [1,2]. It is associated with multi-organ failure, which in turn serves as a marker for the high mortality rate of sepsis [2,3]. Even with treatments with the currently available regimens of antibiotics, fluid resuscitation, vasoactive compounds, corticosteroids etc. [4–6], the morbidity and mortality rates remain considerably high. Several attempts have been made to define new therapeutic targets, for example IL-12 (interleukin-12) [7], HMG (high-mobility group) box-1 isoforms [8], trypsin [9] and several others [10]; however, the molecular mechanisms underlying sepsis remain poorly understood. Searching for biomolecules that are involved in the pathophysiology of sepsis would be a significant advance and would facilitate defining new therapeutic targets for better treatment outcomes.

Over the last decade, proteomics has been emerging and used for the high-throughput analysis of proteins. It has been extensively applied to several subdisciplines of biomedical research, particularly for clinical applications, with the ultimate goals to understand normal physiology better, to explore the pathogenic mechanisms of diseases, and to search for novel biomarkers and therapeutic targets for improving treatment outcome [11–13]. In the present study, we applied a gel-based proteomics approach to characterize early responses to sepsis, as determined by changes in the plasma proteome during an early phase of sepsis. A porcine model of peritonitis-induced sepsis, which displays several clinical characteristics resembling those of sepsis syndrome in humans, was employed in our present study. Peritonitis-induced sepsis was initiated by intraperitoneal injection of autologous faeces with careful monitoring of haemodynamics, oxygen exchange, inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress, and other laboratory parameters. The plasma proteome at 12 h after the induction of sepsis was compared with the basal plasma proteome (before sepsis induction) using 2-D (two-dimensional) gel electrophoresis. Differential analysis revealed significant differences in levels of 36 protein spots, which were subsequently identified by Q-TOF (quadrupole-time-of-flight) MS and/or MS/MS (tandem MS). Potential roles of these altered proteins induced by sepsis are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Ethics

The present study was performed according to the National Institutes of Health Guidelines on the Use of Laboratory Animals, and the study protocol was

approved by the Ethical Committee at Charles University School of Medicine in Plzeň.

Experimental set up and the induction of sepsis

A total of seven pigs were included in the present study and all of them were closely monitored. After an induction of anaesthesia with intravenous atropine (0.5 mg), 2% (v/v) propofol (1–2 mg/kg of body weight) and ketamine (2 mg/kg of body weight), all of the animals were mechanically ventilated with an F_{iO_2} (fraction of inspired oxygen) of 0.4, PEEP (positive end-expiratory pressure) of 5–10 cmH₂O, and a tidal volume of 10 ml/kg of body weight. The respiratory rate was adjusted to maintain an arterial P_{CO_2} (partial pressure of carbon dioxide) between 4.0 and 5.0 kPa. Anaesthesia was maintained with continuous intravenous thiopental (10 mg · kg⁻¹ of body weight · h⁻¹) and fentanyl (10–15 µg · kg⁻¹ of body weight · h⁻¹) during surgery and then maintained with continuous intravenous thiopental (5 mg · kg⁻¹ of body weight · h⁻¹) and fentanyl (5 µg · kg⁻¹ of body weight · h⁻¹) thereafter until the end of the study. Muscle paralysis was achieved with pancuronium (0.2 mg · kg⁻¹ of body weight · h⁻¹). The intravenous fluid was Plasma Lyte[®] solution (Baxter Healthcare) with a rate of 15 ml · kg⁻¹ of body weight · h⁻¹ during surgery and then of 7 ml · kg⁻¹ of body weight · h⁻¹ as a maintenance fluid. Arterial blood glucose levels were maintained at 4.5–7.0 mmol/l using a 20% (w/v) glucose infusion.

A central venous catheter was inserted through the left jugular vein for administration of all of the drugs and fluids. A balloon-tipped thermodilution pulmonary artery catheter was placed via the right jugular vein. A femoral arterial catheter was placed for BP (blood pressure) monitoring and blood sampling. Two tubes were placed through the abdominal wall for the induction of peritonitis and ascites drainage. A cystostomy catheter for urine collection was placed percutaneously under ultrasound guidance.

After all measurements and sample collection at baseline, sepsis was initiated by the induction of peritonitis by inoculating 0.5 g of autologous faeces/kg of body weight suspended in 200 ml of saline into the abdominal cavity through the drainage tubes. A second set of measurements and sample collection were obtained 12 h after the induction of sepsis. In addition to the Plasma Lyte[®] solution, 6% (w/v) hydroxyethyl starch 130 kDa/0.4 (Voluven[®] 6%; Fresenius Kabi) at a rate of 10 ml · kg⁻¹ of body weight · h⁻¹ was infused to maintain a cardiac filling pressure \geq 12 mmHg [the rate was decreased to 7 ml · kg⁻¹ of body weight · h⁻¹ if the CVP (central venous pressure) or PAOP (pulmonary artery occlusion pressure) \geq 18 mmHg]. When the last set of data had been obtained, the animals were killed by KCl injection under deep anaesthesia.

Monitoring of haemodynamics, oxygen kinetics, inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress, and other laboratory parameters

Measurements for monitoring systemic haemodynamics included CO (cardiac output), SVR (systemic vascular resistance), intrathoracic blood volume and filling pressures of both ventricles (CVP and PAOP for right and left ventricles respectively). Arterial and mixed venous blood samples were analysed for pH, P_{O_2} (partial pressure of oxygen), P_{CO_2} and haemoglobin oxygen saturation. Systemic DO_2 (oxygen delivery) and systemic $\dot{V}O_2$ (oxygen consumption) were derived from the appropriate blood gases and flow measurements [14,15]. Arterial blood samples were obtained for the determination of TNF- α (tumour necrosis factor- α) and IL-6 by immunoassay [14,15]. Oxidative and nitrosative stress was evaluated by measuring concentrations of arterial TBARS (thiobarbituric acid-reacting substances) by spectrophotometry, and arterial NOx (nitrate/nitrite) by colorimetric assay [14,15]. To correct for dilutional effects resulting from volume resuscitation, the levels of NOx, TBARS, IL-6 and TNF- α were normalized to plasma protein content [14,15].

2-D Gel electrophoresis

Plasma samples were diluted 1:5 with deionized water, and protein concentrations in individual samples were measured using the Bradford method [16]. Protein solutions (each with 200 μ g of total protein) were then premixed with a rehydration buffer containing 7 mol/l urea, 2 mol/l thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 120 mmol/l DTT (dithiothreitol), 40 mmol/l Tris base, 2% ampholytes (pH 3–10) and a trace of Bromophenol Blue to make the final volume of 150 μ l/sample. The mixtures were rehydrated on to ImmobilineTM DryStrips (7 cm long IPG strips; linear pH gradient of 3–10 and of 4–7; GE Healthcare) at room temperature (25 °C) for 10–15 h. The first-dimensional separation or IEF (isoelectric focusing) was performed in the Ettan IPGphor II IEF System (GE Healthcare) at 20 °C, using a stepwise mode to reach 9083 Vh. After completion of the IEF, the strips were first equilibrated for 15 min in an equilibration buffer containing 6 mol/l urea, 130 mmol/l DTT, 112 mmol/l Tris base, 4% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol and 0.002% Bromophenol Blue, and then in another similar buffer, which replaced DTT with 135 mmol/l iodoacetamide, for a further 15 min. The second-dimensional separation was performed on a 12% (w/v) polyacrylamide gel using a SE260 mini-vertical electrophoresis unit (GE Healthcare) at 150 V for approx. 2 h. Separated proteins were visualized with SYPRO Ruby fluorescence staining (Invitrogen/Molecular Probes). Gel images were taken using a Typhoon laser scanner (GE Healthcare).

Matching and analysis of protein spots

Image Master 2D Platinum (GE Healthcare) software was used for matching and analysis of protein spots in 2-D gels. Parameters used for spot detection were (i) minimal area = 10 pixels; (ii) smooth factor = 2.0; and (iii) saliency = 2.0. A reference gel was created from an artificial gel combining all of the spots presenting in different gels into one image. The reference gel was then used for matching the corresponding protein spots between gels. Background subtraction was performed and the intensity volume of each spot was normalized with the total intensity volume (summation of the intensity volumes obtained from all spots within the same 2-D gel). Significant differences in intensity levels of protein spots were defined as changes with all of the followings: (i) sepsis/control ratios \geq 2-fold or \leq 0.5-fold; (ii) $P < 0.05$; and (iii) consistent presence (or absence) in all gels within the group.

In-gel tryptic digestion

The protein spots whose intensity levels significantly differed between groups were excised from the 2-D gels, washed twice with 200 μ l of 50% (v/v) ACN (acetonitrile)/25 mmol/l NH_4HCO_3 buffer (pH 8.0) at room temperature for 15 min, and then washed once with 200 μ l of 100% ACN. After washing, the solvent was removed, and the gel pieces were dried using a SpeedVac concentrator (Savant) and rehydrated with 10 μ l of 1% (w/v) trypsin (Promega) in 25 mmol/l NH_4HCO_3 (pH 8.0). After rehydration, the gel pieces were crushed with a siliconized blue stick and incubated at 37 °C for at least 16 h. Peptides were subsequently extracted twice with 50 μ l of 50% (v/v) ACN/5% (v/v) TFA (trifluoroacetic acid); the extracted solutions were then combined and dried with a SpeedVac concentrator. The peptide pellets were resuspended with 10 μ l of 0.1% TFA and purified using ZipTip_{C18} (Millipore). The peptide solution was drawn up and down in the ZipTip_{C18} ten times and then washed with 10 μ l of 0.1% formic acid by drawing up and expelling the washing solution for three times. The peptides were finally eluted with 5 μ l of 75% (v/v) ACN/0.1% formic acid.

Protein identification by MALDI (matrix-assisted laser-desorption ionization)–Q-TOF MS and MS/MS analyses

The proteolytic samples were premixed 1:1 with the matrix solution [5 mg/ml CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) in 50% (v/v) ACN, 0.1% (v/v) TFA and 2% (w/v) ammonium citrate] and spotted on to the 96-well sample stage. The samples were analysed using a Q-TOF UltimaTM mass spectrometer (Micromass), which was fully automated with a pre-defined probe motion pattern and the peak intensity threshold for switching over from MS survey scanning to MS/MS, and from one MS/MS to another. Within each sample well,

parent ions that met the pre-defined criteria (any peak within the m/z 800–3000 range with an intensity above 10 counts \pm include/exclude list) were selected for collision-induced dissociation MS/MS using argon as the collision gas and a mass dependent ± 5 V rolling collision energy until the end of the probe pattern was reached. The low-mass and high-mass resolution of the quadrupole were both set at ten to give a precursor selection window of approx. 4 Da wide. Manual acquisition and optimization for individual samples or peaks was also possible.

The instrument was externally calibrated to a < 5 p.p.m. accuracy over the mass range of m/z 800–3000 using sodium iodide and PEG [poly(ethylene glycol)] 200, 600, 1000 and 2000 mixtures and adjusted further with Glu-fibrinopeptide B as the near-point lock mass calibrant during data processing. At a laser firing rate of 10 Hz, individual spectra from a 5 s integration period acquired for each of the MS survey and MS/MS performed were combined, smoothed, de-isotoped (fast option) and centroided using the ProteinLynx™ GlobalSERVER 2.0 data processing software (Micromass). This entailed the identification of the monoisotopic carbon-12 peaks for MS data and deconvolution of multiply charged spectra to their singly charged equivalents for MS/MS data. MaxEnt 3™, a maximum-entropy-based technique, has been designed for this purpose and is an integral part of ProteinLynx™ GlobalSERVER 2.0 [17]. The combined MS and MS/MS ion meta data were searched in concert against the NCBI (National Center for Biotechnology Information) mammalian protein database using the ProteinLynx™ GlobalSERVER 2.0 workflow. The search algorithm employed a Hidden Markov Model that incorporates empirically determined fragmentation characteristics to increase the efficacy of the search. Additionally, the MS and MS/MS data were extracted and outputted as the searchable .txt and .pkl files respectively, for independent searches using the MASCOT search engine (<http://www.matrixscience.com>), assuming that peptides were monoisotopic. Fixed modification was carbamidomethylation at cysteine residues, whereas variable modification was oxidation at methionine residues. Only one missed trypsin cleavage was allowed, and peptide mass tolerances of 100 and 50 p.p.m. were allowed for the peptide mass fingerprinting and MS/MS ion search respectively.

Pathway analysis

Pathway analysis was performed using the Pathway Tools software version 12.5 (<http://bioinformatics.ai.sri.com/ptools/>). This bioinformatic tool is a comprehensive symbolic systems biology software that supports several applications in bioinformatics and systems biology [18,19]. Biological processes, molecular functions, subcellular localizations and MetaCyc pathways of the altered proteins were obtained by querying the protein or gene ID to the Pathway databases [18].

Table 1 Haemodynamic, metabolic and inflammatory changes at baseline and at 12 h after sepsis induction

Values are medians (interquartile range). * $P < 0.05$ compared with baseline. MAP, mean arterial pressure.

Parameter	At baseline	At 12 h after sepsis induction
CO (ml · kg ⁻¹ of body weight · min ⁻¹)	79 (63–85)	118 (101–141)*
SVR (dyne · s · cm ⁻⁵)	2774 (2718–2887)	1411 (1234–1809)*
MAP (mmHg)	103 (90–107)	93 (79–97)
CVP (mmHg)	11 (9–13)	13 (11–16)*
PAOP (mmHg)	10 (9–13)	14 (11–16)*
Do ₂ (ml · min ⁻¹ · kg ⁻¹ of body weight)	9 (8–11)	15 (14–18)*
Vo ₂ (ml · min ⁻¹ · kg ⁻¹ of body weight)	5 (4–6)	6 (5–6)
Arterial pH	7.49 (7.48–7.52)	7.44 (7.43–7.48)*
IL-6 (nmol/g of protein)	2 (1–3)	28 (8–30)*
TNF- α (nmol/g of protein)	1.4 (1.3–1.5)	5 (4.7–9.6)*
NOx (μ mol/g of protein)	0.7 (0.6–0.9)	1.5 (1.2–1.5)*
TBARS (nmol/g of protein)	19 (16–22)	40 (36–60)*

Statistical analysis

All values are shown as means \pm S.E.M., unless otherwise stated. Comparisons between groups (basal control compared with 12 h after the induction of sepsis) were performed using either a paired Student's *t* test or Wilcoxon signed rank test. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Clinical data

Haemodynamic and oxygen exchange parameters, inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress, and other laboratory parameters are shown in Table 1. All animals developed normotensive hyperdynamic circulation with reduced SVR. Adequate fluid resuscitation was ensured by monitoring cardiac filling pressures (both CVP and PAOP were monitored for right and left ventricles respectively), which were significantly increased over time. The increased CO resulted in a significant rise in systemic Do₂, whereas systemic Vo₂ remained unchanged. The peritonitis-induced sepsis caused a significant fall in arterial pH and a marked increase in plasma levels of TNF- α and IL-6. Overproduction of NO in this model was documented by a significant increase in arterial NOx levels. These changes were accompanied by a remarkable increase in TBARS levels, providing the evidence for oxidative stress.

Proteomic data

We initially resolved the plasma proteome using the broad-range IPG strips (with a linear pH gradient of

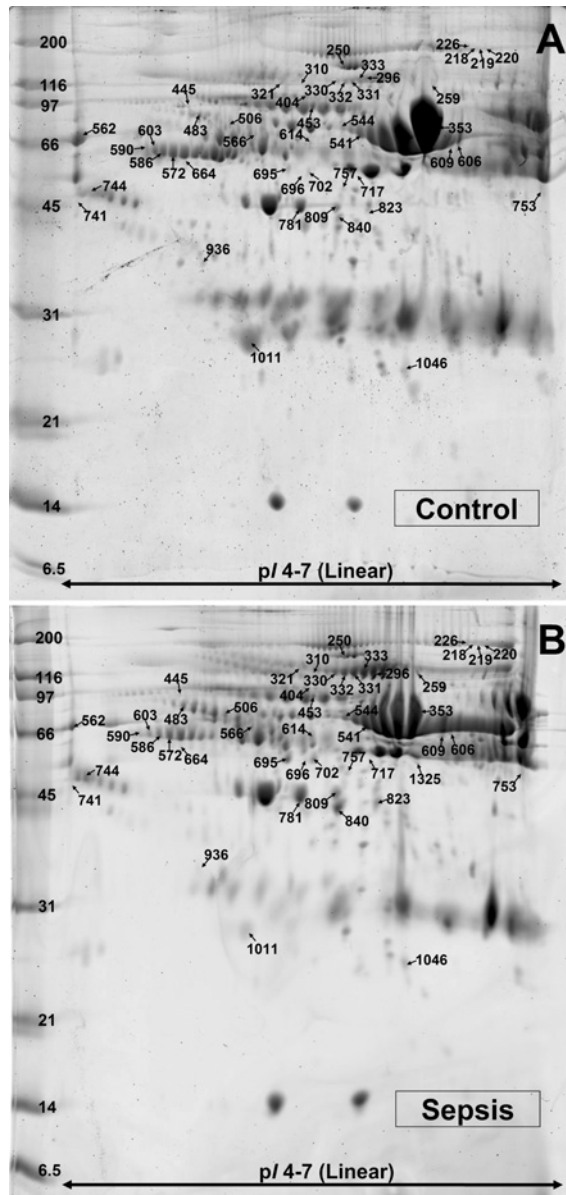


Figure 1 Proteome map of the altered plasma proteome during the early phase of sepsis in a porcine model

Gel images are derived from scans of representative gels from one animal in each group: (A) Control, and (B) Sepsis. Bands in the ladder at the left-hand side of each gel are molecular-mass markers. The significantly up- or down-regulated protein spots are marked with arrows and numbers, which correspond with those indicated in Table 2.

3–10) and observed that most of the porcine plasma proteins were resolved at a pH range of 4–7 (results not shown). We therefore used the narrow-range IPG strips (with a linear pH gradient of 4–7) for the differential proteomics study. Approx. 1500 protein spots were visualized in each 2-D gel (Figure 1). There were seven gels derived from basal plasma samples of seven animals, and another seven gels derived from these animals but at 12 h

after the induction of sepsis. Quantitative intensity analysis and statistics revealed significant differences in levels of 36 protein spots during sepsis (Figure 1 and Table 2). These differentially expressed protein spots included 30 spots with increased levels and six spots with decreased levels. All of these altered proteins were then successfully identified by Q-TOF MS and/or MS/MS analyses. Some of the altered proteins (e.g. albumin, haptoglobin and inter- α -trypsin inhibitor family heavy chain-related protein) were identified as multiple isoforms of the same proteins, most probably due to post-translational modifications. As a consequence, a total of 22 unique proteins were identified from the 30 up-regulated spots, whereas five unique proteins were identified from the six down-regulated spots. Identities, quantitative data, degrees of changes and other related information of all of the altered proteins are summarized in Table 2. Functional analysis using the Pathway Tools software revealed their biological processes, molecular functions, subcellular localizations and involved metabolic pathways, which are summarized in Supplementary Table S1 (see <http://www.ClinSci.org/cs/116/cs1160721add.htm>).

DISCUSSION

The pathophysiology of sepsis is considerably complex and understanding it could lead to identification of novel therapeutic targets with better treatment outcome. In the present study, we applied a proteomics approach to characterize changes in the plasma proteome during an early phase of sepsis in a porcine model of peritonitis-induced sepsis. Clinical features of this model simulated to a very large extent the clinical presentations of early sepsis syndrome in humans, including normotensive hyperdynamic circulation with reduced SVR, development of metabolic acidosis and increased plasma levels of inflammatory mediators (i.e. TNF- α and IL-6), accompanying nitrosative and oxidative stress.

The present study is the first to report the application of proteomics to the study of altered plasma proteome in a large animal model of sepsis, as previously available, but limited, findings had only been obtained from rodent models [20]. These small animal models are often criticized for their limited clinical relevance. Indeed, many emerging strategies, which have been found effective in these models, fail to show any benefit in large animal or human studies. This might be even more important in the context of proteomic analysis, as there are marked differences between species. The fundamental differences include different regulation of inflammation, cardiovascular response to endotoxin or bacteria etc. Rodents differ markedly from humans with respect to their tissue antioxidative capacity and susceptibility to oxidative stress [21–24]. In the present study, differential proteomics analysis revealed altered plasma levels of

Table 2 Plasma proteins whose levels were significantly altered during sepsis

Values for the intensity are means \pm S.E.M. *%Cov = % sequence coverage [(number of the matched residues/total number of residues in the entire sequence) \times 100%]; †DIV/0 = divided by zero. NA, not applicable; Ref. MW, reference molecular mass; Ref pI, reference pI.

(A) Proteins whose plasma levels were significantly increased during sepsis

Protein name	Spot no.	NCBI ID	Identified by	Identification scores (MS, MS/MS)	%Cov* (MS, MS/MS)	No. of matched peptides (MS, MS/MS)	Ref. pI	Ref. MW (kDa)	Intensity		Ratio (sepsis/control)	P values
									Control (basal)	Sepsis (12 h)		
Albumin	606	gi:164318	MS, MS/MS	130, 129	35, 6	15, 3	5.92	71.35	0.0040 \pm 0.0040	0.0199 \pm 0.0056	4.98	0.040
Albumin	717	gi:833798	MS	130, NA	29, NA	15, NA	5.92	71.36	0.0031 \pm 0.0031	0.0230 \pm 0.0033	7.42	0.001
Albumin	753	gi:833798	MS	75, NA	29, NA	11, NA	5.92	71.36	0.0155 \pm 0.0070	0.0698 \pm 0.0198	4.50	0.024
α_1 -Anti-chymotrypsin I	566	gi:9968809	MS/MS	NA, 130	NA, 11	NA, 2	5.22	24.78	0.0195 \pm 0.0078	0.0765 \pm 0.0154	3.92	0.006
CD14 antigen	702	gi:85816356	MS	67, NA	27, NA	6, NA	5.83	40.37	0.0256 \pm 0.0060	0.0874 \pm 0.0138	3.41	0.001
Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 41A	696	gi:170295838	MS	73, NA	16, NA	8, NA	7.08	58.32	0.0066 \pm 0.0047	0.0583 \pm 0.0177	8.83	0.015
Haptoglobin	695	gi:47522826	MS	72, NA	25, NA	8, NA	6.51	39.03	0.0668 \pm 0.0127	0.1338 \pm 0.0249	2.00	0.033
Haptoglobin	809	gi:47522826	MS, MS/MS	90, 88	31, 4	10, 1	6.51	39.03	0.0750 \pm 0.0327	0.2290 \pm 0.0301	3.05	0.005
Haptoglobin	823	gi:47522826	MS	92, NA	34, NA	9, NA	6.51	39.03	0.0066 \pm 0.0066	0.1402 \pm 0.0132	21.24	< 0.001
Haptoglobin	840	gi:47522826	MS/MS	NA, 51	NA, 5	NA, 1	6.51	39.03	0.1287 \pm 0.0362	0.3341 \pm 0.0615	2.60	0.014
Heavy chain immunoglobulin variable region	506	gi:1277045	MS	72, NA	43, NA	4, NA	9.36	10.07	0.0211 \pm 0.0069	0.0782 \pm 0.0194	3.71	0.017
Haemopexin	609	gi:47522736	MS/MS	NA, 64	NA, 3	NA, 1	6.59	52.07	0.0031 \pm 0.0031	0.0299 \pm 0.0079	9.65	0.008
Hypothetical protein LOC23078 isoform a	220	gi:57863271	MS	80, NA	13, NA	18, NA	7.01	215.72	0.0234 \pm 0.0034	0.0536 \pm 0.0106	2.29	0.019
Hypothetical protein LOC330361	296	gi:70608163	MS	80, NA	29, NA	12, NA	5.41	88.19	0.0678 \pm 0.0133	0.2229 \pm 0.0462	3.29	0.007
Inter- α -trypsin inhibitor family heavy chain-related protein	333	gi:48374067	MS	51, NA	18, NA	12, NA	6.42	102.25	0.1030 \pm 0.0150	0.2764 \pm 0.0513	2.68	0.007
Inter- α -trypsin inhibitor family heavy chain-related protein	331	gi:48374067	MS, MS/MS	189, 101	35, 5	26, 3	6.42	102.25	0.1039 \pm 0.0119	0.2631 \pm 0.0382	2.53	0.002
Inter- α -trypsin inhibitor family heavy chain-related protein	332	gi:48374067	MS	84, NA	19, NA	14, NA	6.42	102.25	0.0854 \pm 0.0137	0.1757 \pm 0.0225	2.06	0.005
mCG140308, isoform CRA_b	664	gi:148688748	MS	92, NA	39, NA	8, NA	9.17	23.88	0.0081 \pm 0.0041	0.0438 \pm 0.0136	5.41	0.028
Microfilament and actin filament cross-linker protein isoform 3	218	gi:114555665	MS	76, NA	7, NA	31, NA	5.28	850.70	0.0432 \pm 0.0072	0.1048 \pm 0.0207	2.43	0.016

Microfilament and actin filament cross-linker protein isoform 4	219	gi:114555661	MS	68, NA	7, NA	32, NA	5.27	855.07	0.0268 ± 0.0036	0.0731 ± 0.0163	2.73	0.017
N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein	321	gi:123241269	MS	63, NA	30, NA	6, NA	6.84	29.00	0.0201 ± 0.0104	0.0652 ± 0.0161	3.24	0.036
Pyruvate carboxylase	226	gi:28200301	MS	74, NA	16, NA	14, NA	6.32	130.47	0.0405 ± 0.0062	0.1205 ± 0.0266	2.98	0.013
Signal transducer and activator of transcription 1	1325	gi:118151390	MS	76, NA	20, NA	10, NA	6.10	83.48	0.0000 ± 0.0000	0.0315 ± 0.0140	DIW/0†	0.044
Similar to CG3493-PA isoform 2	483	gi:109116930	MS	67, NA	23, NA	15, NA	6.12	105.05	0.0472 ± 0.0099	0.1044 ± 0.0179	2.21	0.016
Similar to cytosolic purine 5'-nucleotidase (5-nucleotidase cytosolic II) isoform 8	936	gi:73998435	MS	77, NA	16, NA	8, NA	5.88	66.25	0.0147 ± 0.0071	0.0441 ± 0.0076	3.00	0.015
Similar to plectin 1 isoform 1	1046	gi:73974726	MS	77, NA	7, NA	24, NA	5.72	534.57	0.0457 ± 0.0231	0.1201 ± 0.0192	2.63	0.029
Similar to synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homologue	614	gi:73957362	MS	74, NA	27, NA	11, NA	6.15	58.11	0.0308 ± 0.0080	0.0865 ± 0.0085	2.81	< 0.001
Similar to tweety homologue 3	310	gi:149755366	MS	74, NA	28, NA	9, NA	6.06	49.90	0.0231 ± 0.0084	0.0584 ± 0.0111	2.53	0.026
Transformation/transcription domain-associated protein isoform 2	744	gi:109065980	MS	85, NA	10, NA	24, NA	8.45	438.01	0.1672 ± 0.0330	0.3384 ± 0.0312	2.02	0.003
Vitelliform macular dystrophy 2-like 3 isoform 1	259	gi:114645801	MS	86, NA	34, NA	9, NA	8.82	46.85	0.0432 ± 0.0104	0.0951 ± 0.0181	2.20	0.029

(B) Proteins whose plasma levels were significantly decreased during sepsis

Protein name	Spot no.	NCBI ID	Identified by	Identification scores (MS, MS/MS)	%Cov* (MS, MS/MS)	No. of matched peptides (MS, MS/MS)	Ref. p/	Ref. MW (kDa)	Intensity		Ratio (sepsis/control)	P values
									Control (basal)	Sepsis (12 h)		
Albumin	562	gi:164318	MS, MS/MS	158, 238	39, 9	17, 5	5.92	71.35	0.6597 ± 0.1326	0.2727 ± 0.1053	0.41	0.041
α ₂ -HS-glycoprotein precursor (fetuin-A)	603	gi:231467	MS	75, NA	31, NA	7, NA	5.50	39.20	0.2557 ± 0.0158	0.1022 ± 0.0213	0.40	< 0.001
Apolipoprotein A-I precursor (Apo-AI)	1011	gi:461519	MS	81, NA	35, NA	9, NA	5.48	30.31	1.4983 ± 0.1397	0.4730 ± 0.0481	0.32	< 0.001
Immunoglobulin heavy chain variable region	445	gi:91979054	MS	66, NA	59, NA	5, NA	8.73	10.80	0.0253 ± 0.0036	0.0118 ± 0.0023	0.47	0.008
Serum albumin precursor	741	gi:76363596	MS	73, NA	24, NA	11, NA	5.89	70.49	0.0576 ± 0.0177	0.0038 ± 0.0038	0.07	0.011
Vitronectin	590	gi:1754491	MS	92, NA	25, NA	8, NA	5.48	44.61	0.1714 ± 0.0427	0.0461 ± 0.0100	0.27	0.014

36 protein forms representing 27 unique proteins in our porcine sepsis model. The roles of some of these altered proteins are highlighted below.

CD14 is a receptor for bacterial LPS (lipopolysaccharide) that co-ordinates with TLR4 (Toll-like receptor 4) and MD-2 (myeloid differentiation-2) to mediate the innate immune response to bacterial LPS [25,26]. Activation of this upstream signalling pathway leads to the activation of the downstream factor NF- κ B (nuclear factor κ B), secretion of several inflammatory cytokines and, ultimately, inflammatory responses. Some bacterial infections use CD14 to enhance its invasion into hosts [27]. Moreover, monocyte CD14 and soluble CD14 can be used as markers for predicting mortality in patients with severe community-acquired infection [28]. In the present study, we identified an increased level of plasma CD14 in our porcine model of early sepsis, consistent with the findings published by Brunialti et al. [29], who reported an increased serum level of CD14 in patients with sepsis. These results indicate that CD14 is an important upstream molecule in the inflammatory cascade of sepsis.

Haptoglobin is one of the acute-phase reaction proteins [30,31] that also binds to haemoglobin with a potent affinity and thus can prevent renal iron loss and oxidative damage mediated by free haemoglobin [32–34]. Hence it serves not only as an acute-phase reactant, but is also involved in oxidative stress pathways. Several lines of evidence have demonstrated the increased level of haptoglobin as a scavenger system in a number of models of oxidative stress [35–37]. Another protein involved in oxidative stress is haemopexin, which binds to haem and transports it to the liver for its breakdown and iron recovery. As haem is highly toxic to cells due to pro-inflammatory and oxidative effects, haemopexin thus serves as an anti-inflammatory molecule and an oxidative scavenger [35,38]. Our present results are consistent with the findings in previous studies by Kalenka et al. [39] and Ren et al. [20], who reported increased plasma haptoglobin levels in patients with sepsis and increased plasma haemopexin in a murine model of sepsis respectively. The increased levels of both haptoglobin and haemopexin identified in our present study thus strengthen the important roles of these two molecules in mediating inflammatory processes and oxidative stress during an early phase of sepsis.

There were several altered proteins whose roles in sepsis remain unclear. For example, microfilament and actin filament cross-linker protein isoforms 3 and 4 (microtubule-actin cross-linking factor 1, isoforms 3 and 4) and plectin 1, which are involved in cytoskeletal assembly [40–44]. These proteins interlink intermediate filaments with microtubules and microfilaments, and also anchor intermediate filaments to desmosomes or hemidesmosomes [43–46]. The precise roles of these altered proteins in sepsis are somewhat interesting and deserve further investigation.

It should be noted that there are some limitations in our present study. First, 2-D gel electrophoresis is generally not a very sensitive technique to detect all components in the proteome. Therefore several low-abundance proteins and their subtle changes could not be detected. This fact was reflected in our present study as we did not find some of the proteins whose roles in sepsis and inflammatory responses have been established, for example CRP (C-reactive protein), serum amyloid A, fibrinogen and HSPs (heat-shock proteins). Secondly, we evaluated changes in the plasma proteome at only a single time point. Assessing dynamic changes over time would probably yield even more important results compared with the 'before–after' approach. This could serve as a platform or the starting point for our subsequent studies (i.e. sepsis compared with septic shock).

In summary, in the present study we have identified a set of plasma proteins with significantly altered levels during the early phase of sepsis in a porcine model of peritonitis-induced sepsis using a proteomics approach. The proteomics results could be related to the clinical features of this animal model, as most of these altered proteins have important roles in inflammatory responses and some of them play roles in oxidative and nitrosative stress. Some findings are considerably novel and exploring their roles in association with the pathophysiology of sepsis may lead to the identification of new therapeutic targets for better treatment outcome in sepsis. Additionally, some altered proteins may serve as potential markers for early sepsis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Core Facilities for Proteomics and Structural Biology Research, Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taiwan.

FUNDING

This work was supported by the Ministry of Education, Czech Republic [research project MSM 0021620819 (to M.M.)]; by The Thailand Research Fund, Commission on Higher Education, Mahidol University (to V.T.); the National Research Council of Thailand (Siriraj Grant for Research and Development; to V.T.); and by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (to V.T.).

REFERENCES

- 1 Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. and Sibbald, W. J. (1992) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* **101**, 1644–1655

- 2 O'Brien, Jr, J. M., Ali, N. A., Aberegg, S. K. and Abraham, E. (2007) Sepsis. *Am. J. Med.* **120**, 1012–1022
- 3 Marshall, J. C., Cook, D. J., Christou, N. V., Bernard, G. R., Sprung, C. L. and Sibbald, W. J. (1995) Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit. Care Med.* **23**, 1638–1652
- 4 Mackenzie, I. and Lever, A. (2007) Management of sepsis. *Br. Med. J.* **335**, 929–932
- 5 Claessens, Y. E. and Dhainaut, J. F. (2007) Diagnosis and treatment of severe sepsis. *Crit. Care* **11** (Suppl. 5), S2
- 6 Dellinger, R. P., Levy, M. M., Carlet, J. M., Bion, J., Parker, M. M., Jaeschke, R., Reinhart, K., Angus, D. C., Brun-Buisson, C., Beale, R. et al. (2008) Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* **36**, 296–327
- 7 Neurath, M. F. (2007) New therapies for sepsis: focus on the interleukin (IL)12 family member IL27. *Ann. Rheum. Dis.* **66** (Suppl. 3), iii29–iii31
- 8 Parrish, W. and Ulloa, L. (2007) High-mobility group box-1 isoforms as potential therapeutic targets in sepsis. *Methods Mol. Biol.* **361**, 145–162
- 9 Zhou, L. W., Wang, Y. L., Yan, X. T. and He, X. H. (2008) Urinary trypsin inhibitor treatment ameliorates acute lung and liver injury resulting from sepsis in a rat model. *Saudi Med. J.* **29**, 368–373
- 10 Cohen, J. (2003) Recent developments in the identification of novel therapeutic targets for the treatment of patients with sepsis and septic shock. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**, 690–696
- 11 Banks, R. E., Dunn, M. J., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C., Blackstock, W., Pappin, D. J. and Selby, P. J. (2000) Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *Lancet* **356**, 1749–1756
- 12 Colantonio, D. A. and Chan, D. W. (2005) The clinical application of proteomics. *Clin. Chim. Acta* **357**, 151–158
- 13 Tao, F. and Lazarev, A. (2007) Clinical proteomics: opportunities for diagnostics, pharmaceuticals and the clinical laboratory. *Expert Rev. Proteomics* **4**, 9–11
- 14 Matejovic, M., Krouzecky, A., Martinkova, V., Rokyta, Jr, R., Radej, J., Kralova, H., Treska, V., Radermacher, P. and Novak, I. (2005) Effects of tempol, a free radical scavenger, on long-term hyperdynamic porcine bacteremia. *Crit. Care Med.* **33**, 1057–1063
- 15 Matejovic, M., Krouzecky, A., Rokyta, Jr, R., Radej, J., Kralova, H., Treska, V., Radermacher, P. and Novak, I. (2007) Effects of combining inducible nitric oxide synthase inhibitor and radical scavenger during porcine bacteremia. *Shock* **27**, 61–68
- 16 Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- 17 O'Malley, R. (2002) Life's (more than) a BLAST. *The Biochemist* **24**, 21–23
- 18 Karp, P. D. (2001) Pathway databases: a case study in computational symbolic theories. *Science* **293**, 2040–2044
- 19 Karp, P. D., Paley, S. and Romero, P. (2002) The Pathway Tools software. *Bioinformatics* **18** (Suppl. 1), S225–S232
- 20 Ren, Y., Wang, J., Xia, J., Jiang, C., Zhao, K., Li, R., Xu, N., Xu, Y. and Liu, S. (2007) The alterations of mouse plasma proteins during septic development. *J. Proteome Res.* **6**, 2812–2821
- 21 Reade, M. C. and Young, J. D. (2003) Of mice and men (and rats): implications of species and stimulus differences for the interpretation of studies of nitric oxide in sepsis. *Br. J. Anaesth.* **90**, 115–118
- 22 Godin, D. V. and Garnett, M. E. (1992) Species-related variations in tissue antioxidant status I. Differences in antioxidant enzyme profiles. *Comp. Biochem. Physiol. B* **103**, 737–742
- 23 Godin, D. V. and Garnett, M. E. (1992) Species-related variations in tissue antioxidant status II. Differences in susceptibility to oxidative challenge. *Comp. Biochem. Physiol. B* **103**, 743–748
- 24 Bauer, M. and Reinhart, K. (2006) From mice and MOF: rodent models, immune modulation, and outcome in the critically ill. *Crit. Care Med.* **34**, 921–923
- 25 Panaro, M. A., Cianciulli, A., Gagliardi, N., Mitolo, C. I., Acquafredda, A., Cavallo, P. and Mitolo, V. (2008) CD14 major role during lipopolysaccharide-induced inflammation in chick embryo cardiomyocytes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **53**, 35–45
- 26 Frantz, S., Ertl, G. and Bauersachs, J. (2007) Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* **4**, 444–454
- 27 Dessing, M. C., Knapp, S., Florquin, S., de Vos, A. F. and van der, P. T. (2007) CD14 facilitates invasive respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **175**, 604–611
- 28 Aalto, H., Takala, A., Kautiainen, H., Siitonen, S. and Repo, H. (2007) Monocyte CD14 and soluble CD14 in predicting mortality of patients with severe community acquired infection. *Scand. J. Infect. Dis.* **39**, 596–603
- 29 Brunialti, M. K., Martins, P. S., Barbosa de Carvalho, H., Machado, F. R., Barbosa, L. M. and Salomao, R. (2006) TLR2, TLR4, CD14, CD11B, and CD11C expressions on monocytes surface and cytokine production in patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock* **25**, 351–357
- 30 O'Riordain, M. G., Ross, J. A., Fearon, K. C., Maingay, J., Farouk, M., Garden, O. J. and Carter, D. C. (1995) Insulin and counterregulatory hormones influence acute-phase protein production in human hepatocytes. *Am. J. Physiol.* **269**, E323–E330
- 31 Conner, J. G., Eckersall, P. D., Wiseman, A., Bain, R. K. and Douglas, T. A. (1989) Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. *Res. Vet. Sci.* **47**, 203–207
- 32 Fagoonee, S., Gburek, J., Hirsch, E., Marro, S., Moestrup, S. K., Laurberg, J. M., Christensen, E. I., Silengo, L., Altruda, F. and Tolosano, E. (2005) Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading. *Am. J. Pathol.* **166**, 973–983
- 33 Lim, Y. K., Jenner, A., Ali, A. B., Wang, Y., Hsu, S. I., Chong, S. M., Baumann, H., Halliwell, B. and Lim, S. K. (2000) Haptoglobin reduces renal oxidative DNA and tissue damage during phenylhydrazine-induced hemolysis. *Kidney Int.* **58**, 1033–1044
- 34 Bowman, B. H. and Kurosky, A. (1982) Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv. Hum. Genet.* **12**, 189–261
- 35 Van Campenhout, A., Van Campenhout, C., Lagrou, A. R., Abrams, P., Moorkens, G., Van Gaal, L. and Keenoy, B. (2006) Impact of diabetes mellitus on the relationships between iron-, inflammatory- and oxidative stress status. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **22**, 444–454
- 36 Salvatore, A., Cigliano, L., Bucci, E. M., Corpillo, D., Velasco, S., Carlucci, A., Pedone, C. and Abrescia, P. (2007) Haptoglobin binding to apolipoprotein A-I prevents damage from hydroxyl radicals on its stimulatory activity of the enzyme lecithin-cholesterol acyl-transferase. *Biochemistry* **46**, 11158–11168
- 37 Faye, A., Ramey, G., Foretz, M. and Vaulont, S. (2007) Haptoglobin is degraded by iron in C57BL/6 mice: a possible link with endoplasmic reticulum stress. *Blood Cells Mol. Dis.* **39**, 229–237
- 38 Hvidberg, V., Maniecki, M. B., Jacobsen, C., Hojrup, P., Moller, H. J. and Moestrup, S. K. (2005) Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* **106**, 2572–2579
- 39 Kalenka, A., Feldmann, Jr, R. E., Otero, K., Maurer, M. H., Waschke, K. F. and Fiedler, F. (2006) Changes in the serum proteome of patients with sepsis and septic shock. *Anesth. Analg.* **103**, 1522–1526
- 40 Sun, D., Leung, C. L. and Liem, R. K. (2001) Characterization of the microtubule binding domain of microtubule actin crosslinking factor (MACF): identification of a novel group of microtubule associated proteins. *J. Cell Sci.* **114**, 161–172
- 41 Lin, C. M., Chen, H. J., Leung, C. L., Parry, D. A. and Liem, R. K. (2005) Microtubule actin crosslinking factor 1b: a novel plakin that localizes to the Golgi complex. *J. Cell Sci.* **118**, 3727–3738

- 42 Head, B. P., Patel, H. H., Roth, D. M., Murray, F., Swaney, J. S., Niesman, I. R., Farquhar, M. G. and Insel, P. A. (2006) Microtubules and actin microfilaments regulate lipid raft/caveolae localization of adenylyl cyclase signaling components. *J. Biol. Chem.* **281**, 26391–26399
- 43 Abrahamsberg, C., Fuchs, P., Osmanagic-Myers, S., Fischer, I., Propst, F., Elbe-Burger, A. and Wiche, G. (2005) Targeted ablation of plectin isoform 1 uncovers role of cytolinker proteins in leukocyte recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 18449–18454
- 44 Sevcik, J., Urbanikova, L., Kost'an, J., Janda, L. and Wiche, G. (2004) Actin-binding domain of mouse plectin: crystal structure and binding to vimentin. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1873–1884
- 45 Tilney, L. G., Connelly, P. S., Vranich, K. A., Shaw, M. K. and Guild, G. M. (2000) Regulation of actin filament cross-linking and bundle shape in *Drosophila* bristles. *J. Cell Biol.* **148**, 87–100
- 46 Selden, S. C. and Pollard, T. D. (1986) Interaction of actin filaments with microtubules is mediated by microtubule-associated proteins and regulated by phosphorylation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **466**, 803–812

Received 17 September 2008/30 October 2008; accepted 13 November 2008
Published as Immediate Publication 13 November 2008, doi:10.1042/CS20080478

Altered plasma proteome during an early phase of peritonitis-induced sepsis

Visith THONGBOONKRD*, Wararat CHIANGJONG*, Jan MAREŠ†, Jiri MORAVEC†, Zdenek TUMA†, Thomas KARVUNIDIS†, Supachok SINCHAIKUL‡, Shui-Tein CHEN‡§, Karel OPATRŇY JR†¹ and Martin MATEJOVIC†

*Medical Proteomics Unit, Office for Research and Development, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok 10700, Thailand, †Proteomics Laboratory, Department of Internal Medicine I and Intensive Care Unit, Charles University School of Medicine in Plzeň, 304 60 Plzeň, Czech Republic, ‡Institute of Biological Chemistry and Genomic Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, and §Institute of Biochemical Sciences, College of Life Science, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

Table S1 Functional analysis of the altered plasma proteins using the Pathway Tools (see [18,19] in the main text)

*A large multiprotein complex that possesses histone acetyltransferase activity and is involved in regulation of transcription. I κ B, inhibitor of NF- κ B; JAK, Janus kinase; STAT, signal transducer and activator of transcription; NA, not available by the Pathway Tools.

Protein name	Biological process(es)	Molecular function(s)	Cellular component(s)	MetaCyc Pathway
Albumin	Transport and water homeostasis	Transporter activity and lipid binding	Extracellular space	NA
α_1 -Anti-chymotrypsin I	Acute-phase response	Endopeptidase inhibitor activity	NA	NA
α_2 -HS-glycoprotein precursor (fetuin-A)	Ossification and regulation of bone mineralization	Cysteine protease inhibitor activity	Extracellular space and soluble fraction	NA
Apolipoprotein A-I precursor (Apo-AI)	Lipid transport, blood circulation and cholesterol metabolic process	Structural molecule activity, lipid transporter activity, high-density lipoprotein binding and lipid binding	NA	NA
CD14 antigen	Phagocytosis, apoptosis, inflammatory response, immune response and cell-surface-receptor-linked signal transduction	Peptidoglycan receptor activity	Plasma membrane	NA
Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 41A	Multiple	Mono-oxygenase activity	Endoplasmic reticulum, microsome and membrane	Oxidative ethanol degradation II (MEOS) and nicotine degradation II and III
Haptoglobin	Proteolysis, defence response and acute-phase response	Haemoglobin binding	NA	NA
Haemopexin	Transport, cellular iron homeostasis and haem transport	Binding and haem transporter activity	Extracellular space	NA
Hypothetical protein LOC23078 isoform a	NA	NA	NA	NA
Hypothetical protein LOC330361	NA	NA	NA	NA
Immunoglobulin heavy chain variable region	NA	NA	NA	NA

¹ Deceased

Correspondence: Dr Visith Thongboonkerd (email thongboonkerd@dr.com or vthongbo@yahoo.com) or Dr Martin Matejovic (email matejovic@fnplzen.cz).

Table S1 cont.

Protein name	Biological process(es)	Molecular function(s)	Cellular component(s)	MetaCyc Pathway
Inter- α -trypsin inhibitor family heavy chain-related protein	Transport	Endopeptidase inhibitor activity, transporter activity and binding	NA	NA
mCG140308, isoform CRA_b	NA	NA	NA	NA
Microfilament and actin filament cross-linker protein isoform 3	NA	NA	NA	NA
N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein	Proteolysis and intracellular protein transport	Nucleotide binding, ATP-dependent peptidase activity, ATP binding and protein transporter activity	Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus	Hydrolases
Pyruvate carboxylase	Gluconeogenesis, biotin metabolic process and lipid biosynthetic process	Pyruvate carboxylase activity, ATP binding, biotin binding, ligase activity and manganese ion binding	Mitochondria	Aspartate biosynthesis II
Signal transducer and activator of transcription 1	Regulation of transcription (DNA-dependent), transcription from RNA polymerase II promoter, caspase activation, signal transduction, intracellular signalling cascade, I κ B kinase/NF- κ B cascade, JAK/STAT cascade, tyrosine phosphorylation of STAT protein, JAK-induced STAT protein dimerization, STAT protein nuclear translocation, response to other organisms and regulation of cell cycle	DNA binding, transcription factor activity, signal transducer activity, haematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor signal transducer activity and translation regulator activity	Nucleus and cytoplasm	NA
Similar to CG3493-PA isoform 2	NA	NA	NA	NA
Similar to cytosolic purine 5'-nucleotidase (5-nucleotidase cytosolic II) isoform 8	NA	5'-Nucleotidase activity and hydrolase activity	Cytosol	Phosphoric monoester hydrolase
Similar to plectin 1 isoform 1	Cytoskeletal anchoring at plasma membrane	Actin binding, structural constituent of cytoskeleton and structural constituent of muscle	Cytoskeleton, kinesis complex, intermediate filament and plasma membrane	NA
Similar to synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homologue	Cell growth	DNA binding, NADPH:quinone reductase activity, alcohol dehydrogenase activity (zinc-dependent), zinc ion binding and oxidoreductase activity	Nucleus, synaptic vesicle, integral to membrane and synapse	NA
Similar to tweety homologue 3	Iron transport	Iron ion transmembrane and membrane transporter activity	Integral to membrane	NA
Transformation/transcription domain-associated protein isoform 2	Signal transduction	Inositol or phosphatidylinositol kinase activity and copper ion binding	PCAF complex*	NA
Vitelliform macular dystrophy 2-like 3 isoform 1	Visual perception	NA	Membrane fraction and integral to membrane	NA
Vitronectin	Immune response and cell adhesion	Heparin binding	Extracellular space	NA

Received 17 September 2008/30 October 2008; accepted 13 November 2008
 Published as Immediate Publication 13 November 2008, doi:10.1042/CS20080478

V. Imunitní homeostáza (deregulace?) v sepsi a septickém šoku.

Karvunidis T, Lysák D, Chvojka J, Ledvinová L, Raděj J, Novák I, Matějovič M.

Anest Intenziv Med. 2013;24(4):250-263

PŮVODNÍ PRÁCE

Imunitní homeostáza (deregulace?) v sepsi a septickém šoku

Karvunidis Thomas¹, Lysák Daniel², Chvojka Jiří¹, Ledvinová Lenka¹, Raděj Jaroslav¹,
Novák Ivan¹, Matějovič Martin¹

¹JIP, I. interní klinika FN v Plzni a LF v Plzni, Univerzita Karlova v Praze

²Hematologicko-onkologické oddělení, Fakultní nemocnice v Plzni

Anest. intenziv. Med., 24, 2013, č. 4, s. 250–263

SOUHRN

Sepsis a septický šok představují celosvětově významný medicínský i socioekonomický problém. V současnosti je obecně přijímán dvoufázový koncept významného porušení imunitní homeostázy v sepsi s enormní aktivací imunitních mechanismů v jejím úvodu s následnou kompenzatorní reakcí, při níž je kompromitována většina funkcí na nejrůznějších úrovních vrozené i získané imunity. Aktuální poznatky však ukazují na simultánní aktivaci prozánětlivých a protizánětlivých pochodů již v samotném úvodu systémového zánětu. Tato sekundární alterace obranných mechanismů, vedoucí ke snížené

rezistenci k primárně málo virulentním nozokomiálním a oportunním patogenům a ke „chronické“ multiorganové dysfunkci, může být příčinou zvýšené morbidity a mortality kriticky nemocných. Tento přehledový článek se stručnou formou zabývá právě dysregulací imunitní odpovědi nemocných v sepsi/septickém šoku, jejími konsekvencemi, diagnostickými možnostmi a možnými terapeutickými intervencemi.

KLÍČOVÁ SLOVA

sepsis – imunitní odpověď – imunitní deregulace – průtoková cytometrie

ABSTRACT

Immune homeostasis (deregulation) in sepsis and septic shock

Sepsis and septic shock represent an important medical and socio-economic burden worldwide. The double-phased concept of significant immune homeostasis impairment in sepsis has generally been accepted. In this theory, the initial phase is characterized by enormous activation of immune system followed by the compensatory phase resulting in profound immunosuppression. However, this paradigm has recently been challenged and the concept of simultaneous pro-inflammatory, anti-inflammatory and adaptive immunity suppressing

response occurring early in sepsis has been introduced. These immune alterations leading to the failure to combat relatively avirulent, nosocomial and opportune pathogens, and prolonged multiorgan dysfunction seem to be a major cause of increased morbidity and mortality in critically ill patients. This review briefly summarizes the current concept of sepsis-induced immune deregulation and discusses diagnostic tools and emerging immune-based therapeutic interventions.

KEYWORDS

sepsis – immune response – immune deregulation – flow cytometry

ÚVODNÍ KAZUISTIKA

53letý hypertonik, diabetik na perorálních anti-diabetikách, po ischemické cévní mozkové příhodě, s permanentní fibrilací síní a chronickou antikoagulační léčbou antagonisty vitaminu K, pracující jako ošetřovatel prasat byl přijat na jednotku intenzivní péče fakultní nemocnice pro přibližně čtyřhodinovou anamnézu zimnic, třesavek, ortostatické hypoten-

ze a dušnosti. Již první vstupní klinické, grafické a laboratorní vyšetření svědčí pro plně rozvinutý hyperdynamický septický šok s akutním anurickým poškozením ledvin, akutní hepatopatií, koagulopatií, postupným rozvojem a progresí poruchy vědomí, výraznou laktátovou metabolickou acidózou. Během nezbytného úvodního zajištění nemocného bylo vyloučeno invazivní meningokokové onemocnění,

perforace trávicí trubice a/nebo ischemie nitrobřišních orgánů. Infekčním agens byl *Streptococcus suis* (významný patogen vepřů – zoonóza), který byl detekován v hemokulturách odebraných bezprostředně při přijetí na JIP. Zdrojem a vstupní branou infekce bylo (per exclusionem) nejspíše trauma měkkých tkání nártu levé dolní končetiny způsobené kopnutím prasete s následnou bakteriemií. Komplexní resuscitace a léčba septického šoku s adekvátní antibiotickou (ATB) terapií vedla k rezoluci infekce a šoku v následujících pěti dnech. V dalším průběhu persistovala renální dysfunkce, koagulopatie, mírná encefalopatie, polyneuromuskulopatie kriticky nemocných a potřeba umělé plicní ventilace.

Osmý den hospitalizace se náhle objevují febrilie, oběhová nestabilita, objevuje se výrazná produkce makroskopicky zánětlivého sputa. Byla provedena empirická změna ATB. Stav nemocného v dalších dvou dnech progredoval do recidivy septického šoku, opět s plně vyjádřeným multiorganovým selháním. Kultivačně byl z bronchoalveolární laváže izolován nozokomiální multirezistentní kmen *Acinetobacter baumannii* a současně byla prokázána endogenní reaktivace cytomegaloviru (CMV) se signifikantní virémií (RQ-PCR). Objevuje se významné krvácení do GIT při koagulopatii a trombocytopenii. I přes další, již cílenou změnu ATB strategie, virostatickou léčbu a extenzivní podpůrnou léčbu včetně náhrad funkcí orgánů stav nemocného dále progredoval. Pacient zemřel pod obrazem refrakterního hypodynamického septického šoku dvanáctý den hospitalizace.

ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Sepse a septický šok jsou desátou nejčastější příčinou smrti všeobecně a nejčastější příčinou smrti na nekoronárních jednotkách intenzivní péče. Incidence sepse je 50–95 případů na 100 000 obyvatel a zvyšuje se cca o 10 % ročně [1, 2]. I přes značné pokroky v diagnostice a léčbě, dodržování všeobecně akceptovaných terapeutických algoritmů a doporučení a téměř dvacetiletý výzkum na poli sepse a protizánětlivých působků je mortalita těchto stavů víceméně stacionární (30–50%) a koreluje s počtem dysfunkčních orgánů/systémů a s délkou trvání těchto stavů [1, 2]. Absence efektu těchto opatření na zmírnění devastujícího průběhu systémového zánětu s multiorganovým postižením vede k zamyšlení nad správností hypotéz týkajících se patofyziologie těchto stavů, zejména na subcelulární úrovni. Vzhledem k mimořádné heterogenitě, charakteristické pro populaci septických nemocných, může snaha o uniformní léčbu těchto nemocných jako jednodité skupiny vysvětlit tyto terapeutické neúspěchy. Ilustrativním příkladem je selhání drtivé většiny protizánětlivých

agens a strategií [3, 4], jejichž užití bylo založeno na předpokladu „pouhé“ přehnané imunitní reakce organismu v odpovědi na invazivní infekci. Zjevně nelze očekávat terapeutický úspěch při snaze o izolované ovlivnění jediného mediátoru a/nebo funkce v celé řadě deregulovaných a dysfunkčních patofyziologických dějů a mechanismů. V současné době lze tedy spíše uvažovat o „imunitní deregulaci“ jako o velmi heterogenním stavu, který vede k progresi a udržování systémového zánětu, orgánovému poškození (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), nozokomiálním infekcím a v řadě případů až k úmrtí nemocných.

Tento přehledový článek předkládá aktuální a velmi diskutovaný pohled na imunopatogenezi sepse. Zabývá se zejména jejím vývojem v čase a změnami ve smyslu imunitní deregulace v průběhu systémového zánětu. Stručně jsou diskutovány metody vhodné k detekci imunoalterace a analýzám imunologického profilu nemocných. Okrajově zmiňujeme rovněž možné nové perspektivy v imunomodulační léčbě sepse/septického šoku.

IMUNOLOGICKÉ ASPEKTY SEPSE: STARONOVÉ KONCEPTY A NOVÉ POZNATKY

K zachování integrity a homeostázy lidského organismu je nezbytné zabránit invazi patogenů do jeho tkání a orgánů a následnému rozšíření do celého organismu. Základním prostředkem bránícím průniku mikrobů jsou neporušené fyziologické epiteliální bariéry. Při jejich narušení slouží složky vrozeného imunitního systému (tab. 1.) jako druhá linie obrany [5]. Tato vrozená imunitní odpověď je společná všem vícebuněčným organismům. Je víceméně bezprostřední, nespecifická a je primárně určena k rychlé eradikaci patogenů a prevenci poškození tkání. Aktivace imunitní odpovědi se děje cestou tzv. motivy rozpoznávajících receptorů (pattern-recognition receptors, PRRs) – tabulka 2. Vzhledem ke komplexnosti a relativní dlouhověkosti savců včetně člověka je však potřeba další obranné linie organismu s imunologickou pamětí, mimořádnou specificitou a účinností a vývoj získané (adaptivní) imunity byl tedy logickým evolučním krokem umožňujícím přežití a vývoj vyšších živočišných forem. Její plné aktivace a funkce je dosaženo až po několika desítkách hodin až dnů. Systém získané imunity zahrnuje komponenty buněčné imunitní odpovědi (T-lymfocyty), primárně určené k reakci na intracelulární patogeny, a součásti humorální (protilátkové) imunitní odpovědi (B-lymfocyty a imunoglobuliny), primárně cílené na extracelulární mikroorganismy a toxiny. K interakcím T-lymfocytů s ostatními složkami imunitního systému a patogeny slouží tzv. T-buněčný receptor (T-cell receptor, TCR) exprimovaný na jejich povrchu. B-lymfocyty k těmto úče-

INTENZIVNÍ MEDICÍNA

lům užívají monoklonální imunoglobuliny vázané v buněčné membráně (B-cell receptor, BCR) – viz tab. 1. Povrchové struktury všech patogenů obsahují limitovaný počet unikátních a u vyšších živočichů se nevyskytujících molekul – tzv. patogen-associated molecular patterns (PAMPs) (viz tab. 2). Tyto struktury jsou rozpoznávány specifickými receptory buněčných elementů vrozené imunity (antigen-prezentující buňky, antigen-presenting cells, APC) a jinými buňkami (některé populace lymfocytů, endoteliální a epiteliální buňky) pomocí již zmíněných tzv. motivy-rozpoznávajících receptorů (pattern recognition receptors, PRR) [6, 7, 8, 9]. V současné době je popsáno celkem pět základních skupin PRR. Jejich stručný přehled s odpovídajícími ligandy (vazebnými protějšky) jsou zmíněny v tabulce 2 [6,7,9,10].

Obdobnými „alarmními“ aktivujícími imunitní systém jsou skupiny „endogenních“ specifických molekul uvolňovaných při tkáňovém poškození – tzv. damage-associated molecular patterns (DAMP) – viz tabulka 2. Uvolnění významného množství DAMP do cirkulace vede k zánětlivé odpovědi klinicky neodlišitelné od reakce na infekční agens [6]. DAMP jsou zřejmě také schopny udržovat systémovou zánětlivou odpověď a tedy i MODS i v době, kdy již došlo k úplné eliminaci primárního infekčního agens [11].

Mechanismy vedoucí k úmrtí nemocných v septickém šoku se v průběhu vlastního onemocnění liší. Od refrakterního cirkulačního šoku v důsledku extenzivní aktivity imunitního systému s masivním uvolněním prozánětlivých mediátorů v úvodní časné fázi – systémová zánět-

Tab. 1 Přehled vybraných základních elementů imunitní odpovědi, jejich základní charakteristika funkce v sepsi

Buněčné elementy	Charakteristika	Funkce v sepsi
Přirozený imunitní systém		
Monocyty/makrofágy	fagocyty a APCs exprese MHC II - HLADR, CD14, TLRs, CD80/86	důležitý zdroj cytokinů, chemokinů, TFkonverze na DCs ve tkáních - APCs
Dendritické buňky (DCs)	primární APCs exprese CD14, TLRs, CD80/86, MHC II	klíčové propojení přirozené a získané imunity APCs pro CD4+ T-lymfocyty, produkce cytokinů
Myeloidní supresorové buňky Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)	exprese Gr1+ CD11b obsahují RNS	produkce IL-10, suprese expanze CD4+ lymfocytů a jejich produkce cytokinůcestou produkce velkého množství NO
Neutrofilý	primární fagocyty exprese CD14, CD11/CD18, CD64, TLRs, PSGL-1	eliminace a destrukce patogenů proteázami, ROS, RNS poškození tkání proteázami, ROS, RNS
NK-buňky/lymfocyty	absence TCR, CD3-CD56+ lymfocyty exprese KIRs, CD16/FcγRIII	přímá cytotoxicita, produkci cytokinů iniciují zánětlivou odpověď, produkce TNF, IL-10 atd.
NK-T-buňky/lymfocyty	exprese $\alpha\beta$ TCR	cytotoxicita a modulace imunitní odpovědi, zejména při mykobakteriální či mykotické infekci
$\gamma\delta$ T-lymfocyty	preferenčně lokalizovány v mukózách exprese $\gamma\delta$ TCR, CD3; absence $\alpha\beta$ TCR	součást mukózní bariéry, potenciace inflamace produkcí IFN γ a TNF α , přímá cytotoxicita (perforin/granzym), imunomodulace produkcí IL-10
Adaptivní imunitní systém		
CD4+ lymfocyty Th1 (T-lymfocyty)	exprese $\alpha\beta$ TCR, CD3+CD4+ imunostimulační funkce, Th1 cytokiny: TNF, IFN γ , IL-2 buňkami zprostředkovaná imunita	imunostimulační funkce, Th1 cytokiny: TNF, IFN γ , IL-2 klíčová role u toxického šoku, podléhají apoptóze
CD4+ lymfocyty Th2 (T-lymfocyty)	exprese $\alpha\beta$ TCR, CD3 + CD4 + imunosupresivní funkce, Th2 cytokiny: IL-4, IL-10, IL-13 buňkami zprostředkovaná imunita	imunosupresivní funkce, Th2 cytokiny: IL-4, IL-10, IL-13
CD4+ lymfocyty Th17 (T-lymfocyty)	preferenčně lokalizovány v mukózách	eliminace patogenů, zpomalení hojení ran, produkce IL-17, IL-22
CD8+ lymfocyty (T-lymfocyty)	exprese $\alpha\beta$ TCR, CD3+CD8+přímá cytotoxicita, eliminace patogenů buňkami zprostředkovaná imunita	přímá cytotoxicita, eliminace patogenů produkce TNF a IFN γ
Treg lymfocyty (T-lymfocyty)	exprese CD4+CD25+, Fox3	imunomodulace, kontrola a suprese imunitní odpovědi a fibrogenese produkce IL-10, TGF β
B-lymfocyty	exprese BCR, CD19, CD20, CD80/86, MHC II homorální imunita	produkce protilátek, APCs, imunologická paměť

APCs – antigen presenting cells, MHC – major histocompatibility antigen, TF – tkáňový faktor, TCR – T-cell receptor, BCR – B-cell receptor, NK – natural killer cell, IL – interleukin, IFN – interferon, TNF – tumor necrosis factor, TGF – tissue growth factor, KIR – killer immunoglobulin receptor, RNS – reactive nitrogen species, ROS – reactive oxygen species, TLR – toll-like receptors, CD – cluster of differentiation/designation

Tab. 2 PAMP, DAMP a jejich PRR

Motiv/molekuly	Zdroj	PRRs
Bakteriální PAMPs		
Lipopolysacharid	G- bakterie	CD14, MD-2/TLR4
Lipoteichoová kyselina	G+ bakterie	CD14, TLR2/TLR6
Peptidoglykan	G+/G- bakterie	CD14, TLR2, NOD2, NOD1
Triacyllipopeptidy	G+/G- bakterie	TLR1/TLR2
Diacylpeptidy	Mycoplasma spp.	TLR2/TLR6
Poriny, OMPs	Neisseria spp.	TLR2
Flagelin	bičíkaté bakterie	TLR5
Nemetylovaná CpG DNA	bakterie, některé viry	TLR9
dsDNA	Francisella tularensis	AIM2
Virové PAMPs		
Virové genomy	RNA viry	RLH
dsDNA	DNA viry	AIM2
dsRNA	dsRNA viry	TLR3
ssRNA	ssRNA viry	TLR7/TLR8
Viry exprimované proteiny	RNA a DNA viry	TLR2/TLR4
Mykotické PAMPs		
Fosfolipomannan	Candida albicans	TLR2
Mannan	Candida spp., Aspergillus spp.	TLR4, CLR (dectin-2/FcRγ)
Mannosylové rezidua	Candida albicans	TLR4, CLR
β-glukany	Candida spp., Aspergillus spp.	TLR2, CLR (dectin-1)
DAMPs		
S100a protein	vlastní tkáně hostitele	TLR4, RAGE
HMGB1	vlastní tkáně hostitele	TLR2/TLR4, RAGE
HSPs	vlastní tkáně hostitele	TLR4
Fibrinogen, fibronektin	vlastní tkáně hostitele	TLR4
Hyaluronan	vlastní tkáně hostitele	TLR4
Hem	vlastní tkáně hostitele	TLR4

PRRs – pattern recognition receptors, PAMPs – pathogen-associated molecular patterns, DAMPs – danger-associated molecular patterns, OMPs – outer membrane protein, CpG – cytosine-phosphate-guanine, HMGB1 – high mobility group box 1, HSP – heat shock proteins, TLR – toll-like receptor, NOD – nucleotide-binding oligomerization domain leucine-rich-repeat containing receptors, CLR – C-type lectin receptor, RAGE – receptor for advanced glycation end products, RLH – retinoic acid-inducible gene-1-helicase, AIM2 – absent in melanoma protein

livá odpověď (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS), až po MODS, „syndrom přetrvávajícího zánětu, imunosuprese a katabolismu“ (Persistent Inflammation Immunosuppression and Catabolism Syndrome, PICS) a komplikující nozokomiální či oportunní/endogenní infekce při zapojení kompenzatorních imunitních mechanismů (negativní feedback), které mohou (i přes primárně protektivní efekt) paradoxně směřovat až k imunoparalýze/imunokompromitaci (compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS), ve fázi pozdní [12]. Z klinické praxe však víme, že většina nepřeživších (> 80 %) umírá až mnohem později po iniciální resuscitaci a léčbě primárního septického šoku s charakteristickými znaky imunosuprese (jak ilustruje i kazuistika v úvodu), zatímco skupina přeživších je zřejmě tvořena jedinci, kteří byli schopni spontánně upravit a balancovat imunitní funkce bez specifické imunomodulační léčby [13, 14].

Iniciální imunitní odpověď organismu na mikrobiální infekci, ale i na sterilní stimuly (trauma, popáleniny, hemoragický šok) je fenotypicky vysoce stereotypní a uniformní a v rámci zmíněných stavů navzájem v podstatě klinicky neodlišitelná. Studie genových expresí a transkripčních profilů cirkulujících leukocytů nemocných s tupými traumaty, popáleninami a infekcí (respektive zdravých dobrovolníků po aplikaci malé dávky endotoxinu – lipopolysacharidu, LPS – PAMP) dokládají globální změny v intracelulárních funkcích a signalizacích zaujímajících > 80 % genů [9, 14, 15]. Detekce těchto změn genových expresí umožňuje časné odlišení sepse od neinfekčního SIRS [14, 16, 17, 18]. Tato možnost včasného rozpoznání infekční etiologie není samoúčelná, jelikož smrtelnost sepse je v porovnání s neinfekčním systémovým zánětem téměř dvojnásobná [19]. Dosavadní paradigma dvoufázového průběhu zánětlivé odpovědi organismu striktně časově oddělující iniciální prozánětlivou fázi (SIRS)

INTENZIVNÍ MEDICÍNA

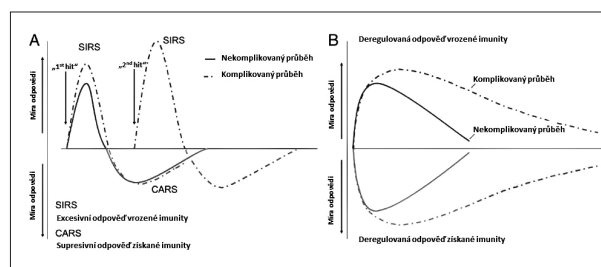
a následující kompenzační protizánětlivou fází (CARS) [20] lze na základě těchto poznatků chápat odlišně [14]. Uvedené práce ukazují, že alterace prozánětlivých a protizánětlivých genů je simultánní již v samotném úvodu onemocnění a že rozdíly v expresích genů mezi přeživšími a nepřeživšími nemocnými jsou kvantitativní, nikoliv kvalitativní. Právě míra a délka změny exprese příslušných genů, odpovídající imunitní deregulaci, zřejmě sehrává roli při morbiditě a mortalitě v akutní fázi systémového zánětu, ale i v rozvoji sekundárních komplikací, jakými jsou nozokomiální infekce či protražované orgánové postižení [14, 21] – obrázek 1. Uvedené ukazuje, že nejen vlastní spontánní úprava, jak je zmíněno výše, ale také včasnost a rychlost normalizace adaptivní genové exprese v odpovědi na zánětlivé stimuly („genomic storm“) a tedy funkce imunitního systému jsou důležité pro nekomplikovaný průběh sepsy.

MOŽNOSTI ANALÝZY STAVU A FUNKCE IMUNITNÍHO SYSTÉMU A JEHO ODPOVĚDI

Imunologická odpověď v sepsi je komplexním a velmi dynamickým procesem zahrnujícím celou řadu vzájemně interagujících buněčných elementů s extrémně komplikovanou sítí cytokinů. Právě složitost systému a rychlé změny v čase znesnadňují samotná vyšetření jednotlivých komponent a zejména interpretaci výsledků. I přesto by žádná z dalších studií zabývajících se prohlubováním znalostí a poznatků patofyziologie sepsy neměla proběhnout bez alespoň bazální znalosti imunologického stavu a dynamiky změn jeho jednotlivých subjektů.

Molekulární genetika, proteomika, transkriptomika

Ucelený obraz změn při systémovém zánětu může podat posouzení exprese jednotlivých genů v cirkulujících leukocytech analýzou mRNA pomocí čipových metodik (gene-chip analysis, micro-arrays, transkriptomika) [14, 22, 23]. Další úrovní exprese genů je jejich translace do proteinů. Vzhledem k tomu, že v tomto procesu dochází k množství změn podstatných pro konečnou funkci proteinů – potranslačních modifikací, může stanovení skutečně produkovaných bílkovin a jejich funkce poskytnout přesnější obraz změn v odpovědi na systémovou infekci. Strukturální i funkční analýzou proteinů v konkrétním kompartmentu (plazma, leukocyty atd.) se zabývá proteomika [22, 24]. Přes velký potenciál a robustnost uvedených metod, jsou tyto vyhrazeny pouze experimentálním či univerzitním pracovištím a také interpretace a klinické použití velkého objemu dat, které produkují, jsou problematické a široce diskutované.



Obr. 1 Imunitní homeostáza v sepsi – klasické vs. inovativní pojetí

A – klasický dvoufázový koncept imunitní odpovědi; B – nové pojetí imunitní reakce a deregulace v sepsi. SIRS – syndrom systémové zánětlivé odpovědi; CARS – syndrom kompenzační protizánětlivé odpovědi (podle Xiao, W. J. Exp. Med., 2011 [14])

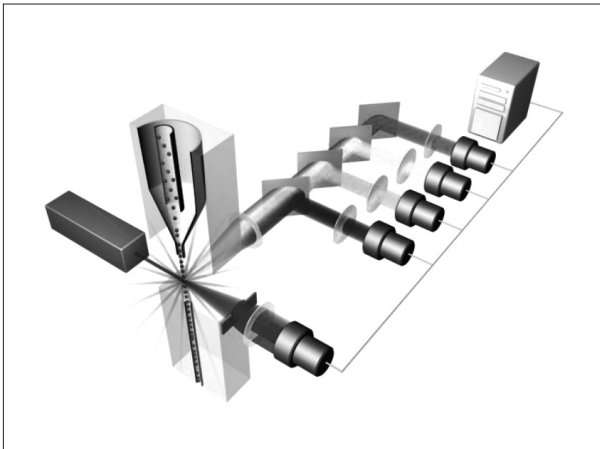
Analýza cirkulujících mediátorů imunitní odpovědi

Mnohem dostupnější jsou v dnešní době metody ke stanovení jednotlivých cytokinů či jiných molekul účastnících se procesu zánětu (např. tumor-necrosis factor, interleukiny, interferony, proliferací faktory atd.). Jejich hladiny lze stanovit jednotlivě/izolovaně, např. cestou ELISA metod (enzyme-linked immunosorbent assay) či chemiluminiscence, nebo pomocí multiplexových analýz jako např. luminex, tzv. protein arrays či metodou CBA (cytometric bead array – detekce solubilních mediátorů vazbou na částice s následnou analýzou průtokovou cytometrií). Velmi často jsou uvedené vyšetření prováděna formou komerčně dodávaných kitů. Zde však stejně jako v celé problematice imunitní odpovědi organismu v sepsi platí, že jedna izolovaná hodnota koncentrace konkrétního cytokinu není ani pro pochopení patofyziologie procesu, ani pro diagnostické či terapeutické rozvahy užitečná.

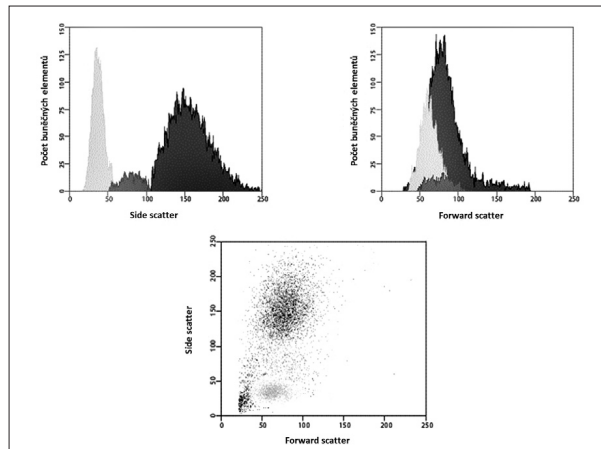
Analýza buněčných elementů imunitního systému

Všechny buněčné elementy jsou a mohou být charakterizovány, stejně jako jejich změny v čase, analýzou exprimovaných membránových či intracelulárních antigenů/molekul. S ohledem na logistiku vyšetření, flexibilitu, časovou náročnost a reprodukovatelnost je k tomuto účelu jednoznačně nejvhodnější metodou průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM). Tato analytická modalita je pro rutinní klinickou praxi intenzivisty často velkou neznámou. Má však velký potenciál v časně diagnostice infekce a posouzení imunitního stavu, proto se o ní krátce zmíníme.

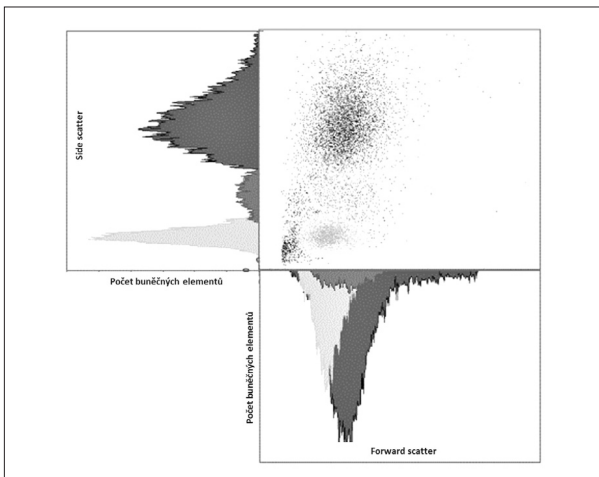
Obecně je FCM nedílnou součástí diagnostiky a vyšetřování pacientů v hematologii, onkologii i imunologii. Technologie FCM umožňuje velmi snadno kvantifikovat jednotlivé základní (nejen)



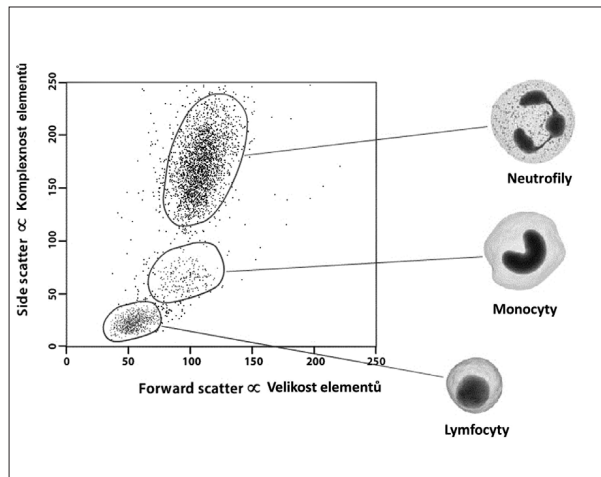
Obr. 2 Schematický princip průtokové cytometrie



Obr. 3 Ilustrativní ukázka dvoudimenzionální kvantitativní FCM analýzy – „cell sorting“



Obr. 4 Ilustrativní ukázka dvoudimenzionální kvantitativní FCM analýzy – „cell sorting“



Obr. 5 Ilustrativní ukázka dvoudimenzionální kvantitativní FCM analýzy – „cell sorting“

buněčné elementy analyzovaného vzorku (cell counting, cell sorting) na základě jejich velikosti (forward scatter) a komplexnosti povrchové a vnitřní struktury (side scatter) – obrázky 2, 3, 4 a 5. Nejrůznější antigeny sledovaných buněk (receptory, adhezivní molekuly, strukturální proteiny atd.) mohou být zpravidla označeny monoklonálními protilátkami konjugovanými s různými fluorochromy, které jsou excitovány laserem a jejichž emisní signály jsou snímány a následně digitálně zpracovány. Jedná se o rychlou a přesnou metodu umožňující současné měření několika parametrů až na 10 000 buňkách za sekundu. Umožňuje identifikaci různých buněčných typů uvnitř smíšené populace i analýzu jednotlivých subpopulací v rámci jedné definované buněčné po-

pulace. Na druhou stranu je nezbytné uvést i některé důvody a nevýhody FCM, které dosud bránily širšímu a rutinnímu užití FCM (nejen) v intenzivní péči. FCM je otevřená metoda umožňující užití nepřehledného množství „homemade“ protokolů s nedostatečnou mírou mezilaboratorní standardizace, z čehož pramení v řadě případů diskutabilní reprodukovatelnost výsledků. V současné době je tato modalita ve většině případů rezervována pro užití specialisty v hematologii či imunologii. S ohledem na extrémně narůstající počet objevených a popsáných antigenů (cluster of differentiation, CD), „biomarkerů“ a s nimi souvisejících imunologických pochodů, je bez adekvátní interpretace výsledků jen obtížně uchopitelná a pro praxi/léčbu použitelná. Další omezení plyne z toho,

INTENZIVNÍ MEDICÍNA

že průtoková cytometrie není většinou, a to ani ve specializovaných centrech, metodou aplikovatelnou 24 hodin denně/7dní v týdnu. I přes všechny uvedené limitace nabízí FCM za určitých okolností (dostupnost, reprodukovatelnost, interpretovatelnost a interpretovanost) velký potenciál v dalším pokroku poznání patofyziologie, rutinní praxi včetně léčby kontinua sepse – septický šok a převážná většina poznatků diskutovaných dále u jednotlivých buněčných elementů čerpá právě s jejich FCM analýz.

BUNĚČNÉ KOMPONENTY IMUNITNÍ ODPOVĚDI

Časná fáze sepse je charakterizována zejména uvolněním prozánětlivých cytokinů buňkami vrozené imunity jako makrofágy, granulocyty a NK-buňkami (natural-killer cells, NKC) [25]. Tato iniciální fáze je však provázena rychlou indukcí apoptózy imunitních buněk vrozené i adaptivní imunity cestou cysteinových proteáz (kaspáz) a poklesem jejich absolutních počtů [26, 27, 28, 29] – tabulka 3. Současně se objevuje porucha prezentace antigenů monocytů a dalšími antigen-prezentujícími buňkami [13, 30, 31]. Dále také dochází ke zvýšení počtu supresorových elementů, jako jsou Th2 subpopulace T-lymfocytů, regulační T-lymfocyty (Tregs), supresorové buňky myeloidního původu (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) a populace granulocytů se supresorickým fenotypem [31]. Dysfunkce a apoptóza dendritických buněk (DC) se podle recentních poznatků také významnou měrou podílí na imunoparalýze v průběhu sepse [31, 32, 33, 34]. Všechny tyto buněčné elementy jsou součástí kontrolních mechanismů k udržení imunitní homeostázy a zabránění excesivní aktivity imunitního systému a následného poškození vzdálených orgánů (MODS) [9, 31, 34].

Neutrofilní granulocyty

Neutrofilie jsou důležitými elementy vrozené imunity. Tradičně jsou považovány za esenciální komponenty rozvoje a progresu systémového zá-

nětu. Jsou významným zdrojem prozánětlivých cytokinů, působí jako potentní fagocyty s přímou destrukcí patogenů a ve formě neutrofilních extracelulárních pastí (neutrophil extracellular traps, NET) usnadňují lokalizaci, izolaci, destrukci a eliminaci infekčních agens [35]. NET jsou intravaskulární komplexní struktury tvořené nukleárním chromatinem, histony, cytoplazmatickými proteiny neutrofilů a samotnými neutrofilii [36, 37]. Neutrofilní granulocyty jsou schopny migrace do místa infekce, adheze a aktivace endotelu s následnou endoteliální dysfunkcí, iniciací a modulací lokální a systémové zánětlivé odpovědi, poruchou mikrocirkulace a tkáňovým/orgánovým poškozením. Na druhé straně ani významné snížení počtu granulocytů nevede k alteraci mikrocirkulace [38]. Probíhající systémový zánět vede k poruše funkce neutrofilů na mnoha úrovních a v důsledku toho k výrazné alteraci vrozené imunity a její interakce s mechanismy adaptivní imunitní odpovědi [37].

Antigen prezentující buňky

Antigen prezentující buňky (antigen-presenting cells, APC) jsou všechny buňky schopné pomocí PRR rozpoznat antigeny invadujících patogenů (PAMP) či endogenní „alarminy“ (DAMP) a předložit jejich epitopy (antigenní determinanty = klíčové antigen-specifické rozpoznávací znaky) v kombinaci s hostitelovými MHC antigeny II. třídy a dalšími kostimulačními molekulami efektorovým buňkám (T-lymfocyty, neutrofilie aj.). Klasicky jsou APC rozdělovány na profesionální APC (dendritické buňky, makrofágy/monocyty a B-lymfocyty) a neprofesionální APC (fibroblasty, epiteliální a endoteliální buňky).

Dendritické buňky

Dendritické buňky (dendritic cells, DC) jsou kritickými elementy v indukcii adaptivní imunitní odpovědi, tolerance a propojení imunity vrozené a získané. Zahrnují značně heterogenní buněčnou populaci vycházející z CD34 + kmenových buněk a jsou přítomny v řadě orgánů.

Tab. 3 Srovnání absolutních počtů lymfocytů zdravých dobrovolníků a septických nemocných

Populace T-lymfocytů	Septičtí nemocní (počet buněk/ml)	Zdraví dobrovolníci (počet buněk/ml)
Lymfocyty celkem	1239 ± 237	3113 ± 739
CD3+ T-lymfocyty	626 ± 58	1352 ± 86
CD4+ T-lymfocyty	428 ± 74	863 ± 49
CD4+CD25+ TCs (Tregs)	168 ± 32	173 ± 13
CD4+CD25- TCs	260 ± 44	663 ± 41
γδ T-lymfocyty	16 ± 4	56 ± 9
Další lymfocyty (CD8+ TCs, NKC, BCs)	613	1761

Adaptováno z Monneret G. Mol Med 2008 [84]

Data, prezentována jako průměr ± směrodatná odchylka, jsou získána z plné krve zdravých dobrovolníků a nemocných v septickém šoku mezi 3-5 dnem onemocnění.

Rozlišují se dvě základní subpopulace - nezralé a zralé DC. Právě maturace DC je klíčovým procesem propojujícím vrozenou a získanou imunitu [39, 40]. Nezralé cirkulující DC jsou schopny receptorovými (TLR) a nereceptorovými mechanismy rozpoznávat PAMP/DAMP, následně maturovat ve zralé DC, produkovat unikátní profil cytokinů a receptorů a stimulovat nativní T-lymfocyty (T-helper) [41]. Zralé DC pak ztrácejí schopnost fagocytózy, zpracování a prezentace antigenů a shromažďují se v sekundárních lymfatických orgánech (slezina, lymfatické uzliny). V závislosti na specifickém PAMP/DAMP vyžívají DC do několika odlišných klonů s následnou specifickou aktivací odlišných klonů T-helper lymfocytů (Th1 vs. Th2 vs. Tregs - viz dále) [39, 41, 42]. Pokles počtu cirkulujících (tj. nezralých) DC, jakožto potentních iniciátorů a modulátorů systémového zánětu, byl popsán již v časně fázi u nemocných se septickým šokem [32]. Recentní práce navíc prokazují, že setrvalý pokles DC může být spojený s vyšší incidencí nozokomiálních infekcí [43], což poukazuje na důležitou roli DC v postinfekční imun-surveillanci.

Monocyty

Monocyty jsou potentními profesionálními APC a významnými producenty cytokinů. V průběhu sepse jsou charakterizovány sníženou reaktivitou na aktivacími stimuly i poruchou prezentace antigenů pravděpodobně v důsledku snížení exprese antigenů MHC (major histocompatibility complex) II. třídy. MHC antigen II. třídy, respektive HLA-DR, je spolu s CD86 klíčovou molekulou při prezentaci antigenů APC, jak již bylo diskutováno výše. Řada studií demonstrovala asociaci snížené exprese HLA-DR na monocyttech (mHLA-DR) s jejich dysfunkcí. Tyto monocyty produkují menší množství prozánětlivých cytokinů jako TNF α a IL-1 v odpovědi na stimulaci bakteriálními PAMP [44]. Obdobně je prokazována snížená proliferace lymfocytů a produkce IFN γ u septických jedinců se snížením mHLA-DR jako konsekvence porušené prezentace antigenů [45, 46]. Snížená exprese mHLA-DR (< 40 % HLA-DR+ monocytů; norma > 90 %) je některými studii označována za relativně spolehlivý marker monocytární dysfunkce, odvozeně i imunoprese/immunokompromitace kriticky nemocných a jejich morbidity a mortality [13, 30, 47, 48]. Při přesné kvantitativní detekci počtu molekul HLA-DR na monocyttech pomocí FCM však bylo zjištěno, že ačkoliv jsou mediány denzit HLA-DR významně odlišné ve skupině přeživších a nepřeživších nemocných, nemusí být korelace s tíží, průběhem onemocnění a mortalitou zcela spolehlivá díky významné variabilitě těchto hodnot a lze obtížně stanovit hraniční (cut-off) hodnoty [49].

Dalším mechanismem vedoucím v průběhu sepse k imunopresi může být zvýšená exprese negativně kostimulační molekuly PD-1 („programmed death“) na monocyttech [50, 51, 52]. Monocyty s tímto fenotypem produkují klíčový protizánětlivý cytokin - IL-10 s následnou inhibicí proliferace T-lymfocytů a indukci jejich apoptózy.

T-LYMFOCYTY A JEJICH SUBPOPULACE

T-lymfocyty

T-lymfocyty (T-cells, TC) představují další klíčovou úroveň imunitní odpovědi organismu, sehrávají jak roli efektorovou (CD3+CD8+ TC, cytotoxické TC), tak i regulační (CD3+CD4+ TC, helper TC) [53, 54, 55]. Aktivace a maturace TC probíhá cestou interakcí povrchových receptorů (TCR/CD3 komplex, kostimulační CD 28) přímo s PAMP/DAMP či APC. Aktivované TC vykazují několik uniformních profilů v produkci cytokinů (základní: prozánětlivý vs. protizánětlivý) [56]. Vedle funkčních změn (maturace, aktivace) dochází v průběhu sepse a po těžkém traumatu i ke snížení počtu cirkulujících TC [57, 58, 59] - tab. 3, a tíže této lymfocytopenie koreluje s rozvojem nozokomiálních infekcí [58]. Zvýšená ingesce apoptotických lymfocytů vede k přímé inaktivaci makrofágů a k zhoršení eliminace patogenů [59, 60]. Charakteristickým rysem imunitní deregulace je posun směrem k Th2 imunitní odpovědi s elevací plazmatických hladin Th2 cytokinů (zejména IL-4) a snížená produkce cytokinů Th1 odpovědi (TNF α , IFN γ , IL-2) [59, 61]. Dalším fenotypovým klonem helper TC jsou vedle Th1 a Th2 také Th17 lymfocyty [62, 63]. Produkci IL-17 stimulují nepřímo neutrofilní granulocyty k eliminaci infekčních agens, a zajišťují tak pozitivní/potencující zpětnou vazbu imunity získané s mechanismy imunity vrozené [5, 59].

Dalším charakteristickým rysem T-lymfocytární dysfunkce v sepsi je vzestup počtu subpopulace cirkulujících elementů s regulačními funkcemi. Tyto CD4+CD25+ regulační TC (Tregs) jsou potentními elementy kontrolujícími vrozenou i získanou imunitní odpověď organismu [5, 59, 64]. Zvýšení počtu je dáno zřejmě jejich sníženou senzitivitou k apoptotickým signálům, je popisováno již bezprostředně při diagnóze sepse. Mechanismy imunopresivního působení Tregs nejsou zcela známy. Existují důkazy o přímém inhibičním vlivu na cytotoxické TC, NK-buňky i DC [5, 65]. Exprese ektonukleotidáz (CD39 a CD73) v membráně Tregs vede ke konverzi extracelulárně vysoce inflamatorní molekuly ATP na adenosin. Adenosin způsobuje vazbou na specifické receptory na lymfoidních a myeloidních buňkách jejich inaktivaci [66].

INTENZIVNÍ MEDICÍNA

NK-buňky

NK-buňky (natural-killer cells, NKC) jsou subpopulací TC reprezentující 4–15% cirkulujících lymfocytů. Průtokovou cytometrií mohou být charakterizovány jako CD3-CD56+ lymfocyty [67,68]. Jako součást vrozené imunity se podílí na setrvalém imunologickém dohledu nad invazí patogenů a nádorovým bujením [67]. NKC jsou aktivovány cestou PRR (TLR a NOD) rozpoznávajících široké spektrum PAMP/DAMP, v aktivovaném stavu se stávají významným zdrojem IFN γ – klíčového prozánětlivého mediátoru a podílí se na přímé destrukci a eliminaci patogenů/cílových buněk [67, 69]. NKC úzce interagují s ostatními klíčovými elementy vrozené i adaptivní imunity, zejména DC, monocyty/makrofágy a neutrofilů. Tyto interakce jsou zprostředkovány řadou cytokinů (IL-2, IL-12, IL-15 a IL-18).

NKC jsou ideálním příkladem toho, jak je pro nekomplikovaný průběh systémového zánětu nezbytná správná regulace imunitní odpovědi. Podle celé řady studií dochází v průběhu systémového zánětu/sepse k poklesu celkového počtu NKC [70, 71]. Mechanismy této deplece nejsou v současnosti zcela jasné, ale zřejmě se na ní podílí migrace do místa infekce a dalších (sekundárně) poškozených orgánů [72, 73, 74] a také apoptóza [71]. Nadměrný časný úbytek aktivovaných NKC může vést k nedostatečné eliminaci infekčního agens [70, 71]. Na druhou stranu, zvýšený počet aktivovaných NKC (respektive snížená deplece) může být spojován s významnějším orgánovým poškozením, komplikovaným průběhem sepse a vyšší mortalitou [75, 76, 77].

Detailní poznání funkcí NKC v sepsi zůstává stále relativně otevřenou otázkou. Pozitivní roli sehrávají v iniciaci a modulaci/potenciaci odpovědi vrozeného imunitního systému. Negativním rysem je jejich podíl na poškození tkání [67].

Gama-delta ($\gamma\delta$) T-lymfocyty

Gama-delta ($\gamma\delta$) T-lymfocyty jsou minoritní subpopulací TC exprimující T-lymfocytární receptor (T-cell receptor, TCR) sestávající se z γ a δ řetězců (v porovnání s TCR jiných TC, která je tvořena řetězci α a β). Jsou preferenčně lokalizovány (homing) v mukózách, slezině (5 % buněčnosti) a tvoří 1–10 % cirkulujících lymfocytů. Vzhledem k jejich preferenční epiteliální lokalizaci hrají rovněž nezastupitelnou roli v první linii obrany vůči invadujícím patogenům. Gama-delta T-lymfocyty jsou schopny časné iniciace zánětu prostřednictvím interakcí s dalšími centrálními buněčnými elementy imunitní odpovědi (dendritické buňky) cestou produkce IL-17 [78, 79]. Navíc jsou také potentními APC [79, 80] a vykazují přímou cytotoxickou aktivitu. Přesné mechanismy, postavení, role a možnosti terapeutických manipulací $\gamma\delta$ T-lymfocytů v procesu systémového zánětu jsou předmětem součas-

ných studií. Také popisovaný pokles počtu těchto elementů v průběhu sepse je v současnosti spíše prostou deskripcí stavu s odvozovanými následky v podobě potenciálního stavu imunodeprese. Problematická je již samotná relevance stanovení množství cirkulujících $\gamma\delta$ T-lymfocytů jako aproximace skutečného počtu těchto preferenčně extravaskulárně lokalizovaných elementů.

DALŠÍ KLÍČOVÉ BUNĚČNÉ ELEMENTY HRAJÍCÍ VÝZNAMNOU ROLI V IMUNITNÍ ODPOVĚDI ORGANISMU

Supresorové buňky myeloidního původu

Supresorové buňky myeloidního původu (myeloid-derived suppressor cells, MDSC) jsou heterogenní populací expandující při systémovém zánětu s infekcí, mající významnou schopnost potlačovat funkci TC a modulovat produkci cytokinů makrofágy [81, 82]. Tvoří přibližně 0,5 % periferních cirkulujících mononukleárních a jsou charakterizovány expresí společného myeloidního znaku CD33, Gr1 a CD11b [83, 84]. Prozánětlivé cytokiny (INF γ , IL-13, IL-4, ligandy pro TLR) aktivují MDSC, které cestou produkce ROx, NOx, peroxinitritu a přímou indukcí Tregs vedou k imunoparalýze [82, 84, 85]. Výsledky některých experimentálních studií naznačují protektivní roli MDSCs u subjektů v septickém šoku [86].

Endoteliální a epiteliální buňky

Endoteliální buňky sehrávají důležitou úlohu v propagaci zánětu. Exprimují celou škálu adhezivních molekul, které umožňují a usnadňují adhezi imunokompetentních buněk a rozšíření zánětu. Fenomén endoteliální dysfunkce je považován za jeden z klíčových mechanismů průběhu systémového zánětu a geneze MODS [2].

V průběhu sepse dochází k poškození a zvýšené apoptóze endoteliálních a epiteliálních buněk. Do cirkulace se tak dostává množství DAMP (viz níže), které dále potencují a udržují systémový zánět [11, 87]. DAMP, jako například mitochondriální DNA (mtDNA), mohou být detekovány v plazmě i po kompletní eradikaci infekčního agens a charakterizují přetrvávající tkáňové poškození. Detekce mtDNA a bakteriální DNA (bDNA) může za určitých okolností sloužit k odlišení infekční a neinfekční etiologie systémového zánětu [11].

CIRKULUJÍCÍ MEDIÁTORY

Nepřeberné množství experimentálních i humanitních studií se již zabývalo stanovením hladin, významem a možnostmi využití nejrozličnějších inflamatorních mediátorů k popisu patofyziolo-

gie, diagnostice a/nebo léčbě nemocných v sepsi/septickém šoku. Vzhledem k jejich množství, komplexnosti jejich vzájemných interakcí, interakcí s imunokompetentními elementy a významně proměnlivým hladinám a biologickým poločasům nebylo a stále není možné jejich význam správně uchopit a využít [88]. Kontinuální studium systémového zánětu vede k identifikaci řady nových cytokinů, z nichž některé vykazují zajímavé a potenciálně terapeuticky využitelné funkce.

Interleukin 7 (IL-7) je jedním z klíčových mediátorů udržujících homeostázu a přežívání TC (anti-apoptotický efekt). Sekundárně vede k udržení či zvýšení produkce IFN γ a tedy k udržení či akcentaci zánětlivé odpovědi [89, 90]. Z těchto poznatků by mohl vyplývat potenciální terapeutický efekt aplikace IL-7 ve fázi imunodeprese. Efekt však není, i přes některé pozitivně vyznívající práce [86], zcela přímočarý a závisí na jedné straně na expresi a stavu receptoru pro IL-7 na lymfocytech (IL-7R/CD127), na další sekundární intra- a intercelulární signalizaci a na straně druhé na početním a funkčním stavu elementů imunitního systému.

Subpopulace regulačních TC – Th17 sehrává klíčovou roli v obraně hostitele před mikrobiální invazí [91]. Jako významná součást adaptivní imunity cestou produkce **interleukinů 17, 21 a 22** moduluje a adaptuje odpověď složek vrozené imunitní odpovědi [91, 92, 93]. Pozornost současného výzkumu se soustřeďuje zejména na IL-17, který mimo jiné atrahuje neutrofile do dýchacích cest/plic v odpovědi na infekční podněty. Recentní práce navíc popisují i vliv genetických variací IL-17 v primární citlivosti jedinců ke grampozitivním patogenům a poukazují na možnou asociaci s mortalitou [93].

Dalším z relativně nově identifikovaných a popsaných chemokinů je **interleukin 33 (IL-33)** patřící do „cytokinové rodiny IL-1“. Sehrává důležitou úlohu v aktivaci vrozené imunity cestou stimulace DCs a makrofágů a tedy v antigenní prezentaci, propojení s adaptivní imunitní odpovědí a primární eliminaci patogenů. Významný vliv má také na indukcii zánětu dýchacích cest s potenciací funkce eozinofilů při alergických postiženích a v neposlední řadě se účastní procesů mukózních (neinfekčních) zánětů (ulcerózní kolitida, Crohnova nemoc). Významná je úloha IL-33 i v indukcii Th2 imunitní odpovědi, jakožto kontrolního a protektivního mechanismu v sepsi [94, 95, 96]. Souhrnně lze tedy IL-33 označit za homeostatický faktor, který stimuluje eliminaci patogenů, reparaci tkání a současně kontrolu rozsahu imunitní odpovědi a poškození tkání.

Zvláštní pozornost si zaslouží i klíčový DAMP a pozdní mediátor sepse **high mobility group box 1 (HMGB-1)**. Tento nukleární protein je pasivně uvolňován při ztrátě integrity membrán nekrotických buněk. HMGB-1 stimuluje zánětlivou

odpověď aktivací DC, atrahuje imunokompetentní elementy a podílí se na tkáňové regeneraci indukci proliferace a diferenciaci kmenových buněk [97]. Koncentrace HMGB-1 zůstává zvýšena i v době, kdy se hladiny jiných (TNF α , IL-6) již normalizovaly [97, 98] a zdá se nezbytná pro správnou maturaci DCs a následnou aktivací Th1 imunitní odpovědi.

Dalšími ubikvitárními potentními mediátory zánětlivé odpovědi ze skupiny DAMP jsou **heat shock proteiny (HSP)**. Při tkáňovém poškození jsou HSP aktivně secernovány a cestou TLR indukují zánětlivou odpověď organismu [99]. Také **proteiny skupiny S100** jsou schopny indukovat specifický zánět endotelu se zvýšenou vaskulární permeabilitou a protrombotickým stavem. Současně přímo aktivují buňky imunitního systému cestou jejich PRR (TLR, RAGE) [99].

ZÁVĚR A PERSPEKTIVY

I přes enormní pokroky posledních let jsou naše znalosti patofyziologie sepse značně nekompletní. Tato skutečnost a neznalost aktuálního imunologického profilu studovaných jedinců mohla stát za selháním většiny klinických studií s cílem ovlivnit prozánětlivé reakce organismu. Nadále zůstává řada nezodpovězených otázek: Známe opravdu dobře mechanismy vedoucí k sepsi indukované imunoparalýze? Podílí se i naše vlastní léčba na indukcii a/nebo potenciaci této imunodeprese? Jsou to katecholaminy, sedativa, inzulin, antibiotika? Jakou roli má buněčná energetika/mitochondriální dysfunkce v imunitní homeostáze? Jakou roli mají neuroendokrinní mechanismy v imunitní odpovědi?

Jakkoliv významné se mohou zdát naše současné pokroky v porozumění systémovému zánětu a identifikaci nových mediátorů, nelze naše diagnostické a terapeutické úvahy opírat o izolovanou analýzu jakéhokoliv z nich, jelikož poskytují pouze částečný a relativně dost omezený pohled na aktuální stav imunitní homeostázy konkrétního subjektu. Přínosnější alternativou může být užití celého panelu markerů (solubilních i celulárních) k definování aktuálního individuálního imunitního profilu. V čase opakovaná (funkční) analýza imunologického profilu nemocných v iniciální fázi závažného systémového zánětu (septický šok) teoreticky umožňuje jejich „imunologickou stratifikaci“ a predikci rozvoje komplikací a/nebo mortality a také možné odpovědi na případnou imunointervenční terapii. Podstatnou limitaci však představuje schopnost naší interpretace a klinického využití těchto dat v současnosti.

Ve světle současných poznatků lze systémový zánět v přítomnosti infekčního agens považovat za přísně individuální a patogen a hostitel-speci-

INTENZIVNÍ MEDICÍNA

fický proces imunitní deregulace. Nejen v blokádě prozánětlivé odpovědi, nýbrž i ve stimulaci imunitní odpovědi se může nacházet slibná léčebná strategie. Příkladem může být:

1. blokáda protizánětlivých mediátorů,
2. obnova funkcí APC,
3. obnova funkcí TC,
4. blokáda apoptózy imunitních elementů.

Abychom se současně vyhnuli chybám předchozích studií, je potřeba mít na paměti, že cílení léčby na jediný patofyziologický pochod může být a zřejmě také i bude nedostatečné.

Imunomodulační/imunostimulační terapie představují možnou strategii v léčbě sepse/septického šoku, jejichž cílem by mělo být zlepšení eliminace patogenů, prevence rozvoje nozokomiálních infekcí a reaktivace dormantních virů. I přes slibné předběžné výsledky některých studií (IFN γ , GM-CSF, anti-IL-10) je aplikace těchto poznatků do klinické praxe ještě velmi vzdálena. Ke všem v textu výše uvedeným elementům zánětlivé odpovědi lze dokladovat řadu prací se snahou o pozitivní ovlivnění daného patofyziologického pochodu stimulací či inhibicí. Jejich výčet a komentování je však zcela nad rámec tohoto pojednání [9, 100].

Primárním a determinujícím cílem by mělo být klinicky aplikovatelné bližší porozumění patofyziologii imunitní regulace a odpovědi při systémové infekci a schopnost rychlého rutinního zhodnocení (v čase) imunologického stavu nemocných a identifikace jednotlivců, kteří by z výše zmíněných imunomodulačních/immunostimulačních terapií profitovali.

Seznam zkratk

APC	– antigen prezentující buňky (antigen-presenting cells)
ATB	– antibiotika
BC	– B-lymfocyty (B-cells)
BCR	– B-lymfocytární/buněčný receptor (B-cell receptor)
b-DNA	– bakteriální DNA
CARS	– syndrom kompenzační protizánětlivé odpovědi (compensatory antiinflammatory response syndrome)
CMV	– cytomegalovirus
DAMP	– molekulární motivy hostitele, endogenní alarminy (danger-associated molecular pattern)
DC	– dendritické buňky (dendritic cells)
FCM	– průtoková cytometrie (flow cytometry)
GIT	– gastrointestinální trakt
GM-CSF	– granulocytární a makrofágové kolonie stimulující faktor (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
HMGB1	– high-mobility group box 1
HSP	– heat shock protein
IL	– interleukin
INF	– interferon
JIP	– jednotka intenzivní péče

MODS	– syndrom dysfunkce/selhání více orgánů (multiple organ dysfunction syndrome)
mt-DNA	– mitochondriální DNA
PAMP	– molekulární motivy patogenů, exogenní alarminy (pathogen-associated molecular patterns)
PICS	– syndrom přetrvávajícího zánětu, imunosuprese a katabolismu (persistent inflammation, immunosuppression and catabolism)
PRR	– motivy-rozpoznávající receptory (pattern recognition receptors)
RQ-PCR	– kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time quantitative polymerase chain reaction)
SIRS	– syndrom systémové zánětlivé odpovědi (systemic inflammatory response syndrome)
TC	– T-lymfocyty (T-cells)
TCR	– T-lymfocytární/buněčný receptor (T-cell receptor)
Th	– pomocné T-lymfocyty (helper T-cells)
TLR	– toll-like receptor
TNF	– nádor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
Tregs	– regulační T-lymfocyty

Literatura

1. Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348, p. 1546–1554.
2. Annane, D., Bellissant, E., Cavaillon, J. M. Septic shock. *Lancet*, 2005, 365, p. 63–78.
3. Riedemann, N. C., Guo, R. F., Ward, P. A. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat. Med.*, 2003, 9, p. 517–524.
4. Boomer, J. S., To, K., Chang, K. C. et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA*, 2011, 306, p. 2594–2605.
5. Littman, D. R., Rudensky, A. Y. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, 2010, 140, p. 845–858.
6. Cinel, I., Opal, S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit. Care Med.*, 2009, 37, p. 291–304.
7. Netea, M. G., van der Meer, J. W. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N. Engl. J. Med.*, 2011, 364, p. 60–70.
8. Opal, S. M. New perspectives on immunomodulatory therapy for bacteraemia and sepsis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2010, 36 Suppl 2, p. S70–S73.
9. Larosa, S. P., Opal, S. M. Immune aspects of sepsis and hope for new therapeutics. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 2012, 14, p. 474–483.
10. Van der, P. T., Opal, S. M. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect. Dis.*, 2008, 8, p. 32–43.
11. Sursal, T., Stearns-Kurosawa, D. J., Itagaki, K. et al. Plasma bacterial and mitochondrial DNA distinguish bacterial sepsis from sterile systemic inflammatory response syndrome and quantify inflammatory tissue injury in nonhuman primates. *Shock*, 2013, 39, p. 55–62.
12. Gentile, L. F., Cuenca, A. G., Efron, P. A. et al. Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J. Trauma Acute. Care Surg.*, 2012, 72, p. 1491–1501.

- 13. Monneret, G., Lepape, A., Voirin, N. et al.** Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.*, 2006, 32, p. 1175-1183.
- 14. Xiao, W., Mindrinos, M. N., Seok, J. et al.** A genomic storm in critically injured humans. *J. Exp. Med.*, 2011, 208, p. 2581-2590.
- 15. Calvano, S. E., Xiao, W., Richards, D. R. et al.** A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*, 2005, 437, p. 1032-1037.
- 16. Prucha, M., Ruryk, A., Boriss, H. et al.** Expression profiling: toward an application in sepsis. *Shock*, 2004, 22, p. 29-33.
- 17. Johnson, S. B., Lissauer, M., Bochicchio, G. V. et al.** Gene expression profiles differentiate between sterile SIRS and early sepsis. *Ann. Surg.*, 2007, 245, p. 611-621.
- 18. Tang, B. M., McLean, A. S., Dawes, I. W. et al.** Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis. *Crit. Care Med.*, 2009, 37, p. 882-888.
- 19. Sprung, C. L., Sakr, Y., Vincent, J. L. et al.** An evaluation of systemic inflammatory response syndrome signs in the Sepsis Occurrence in Acutely ill Patients (SOAP) study. *Intensive Care Med.*, 2006, 32, p. 421-427.
- 20. Hotchkiss, R. S., Karl, I. E.** The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348, p. 138-150.
- 21. Gentile, L. F., Moldawer, L. L.** DAMPs, PAMPs, and the Origins of SIRS in Bacterial Sepsis. *Shock*, 2013, 39, p. 113-114.
- 22. Bauer, M., Reinhart, K.** Molecular diagnostics of sepsis--where are we today? *Int. J. Med. Microbiol.*, 2010, 300, p. 411-413.
- 23. Wong, H. R.** Clinical review: sepsis and septic shock - the potential of gene arrays. *Crit. Care*, 2012, 16, p. 204.
- 24. Karvunidis, T., Mares, J., Thongboonkerd, V. et al.** Recent progress of proteomics in critical illness. *Shock*, 2009, 31, p. 545-552.
- 25. Cohen, J.** The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 2002, 420, p. 885-891.
- 26. Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Freeman, B. D. et al.** Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.*, 1999, 27, p. 1230-1251.
- 27. Hotchkiss, R. S., Chang, K. C., Swanson, P. E. et al.** Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat. Immunol.*, 2000, 1, p. 496-501.
- 28. Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E. et al.** Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J. Immunol.*, 2001, 166, p. 6952-6963.
- 29. Hotchkiss, R. S., Tinsley, K. W., Swanson, P. E. et al.** Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J. Immunol.*, 2002, 168, p. 2493-2500.
- 30. Nolan, A., Kobayashi, H., Naveed, B. et al.** Differential role for CD80 and CD86 in the regulation of the innate immune response in murine polymicrobial sepsis. *PLoS. One.*, 2009, 4, p. e6600.
- 31. Hotchkiss, R. S., Opal, S.** Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe. *N. Engl. J. Med.*, 2010, 363, p. 87-89.
- 32. Guisset, O., Dilhuydy, M. S., Thiebaut, R. et al.** Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.*, 2007, 33, p. 148-152.
- 33. Faivre, V., Lukaszewicz, A. C., Alves, A. et al.** Accelerated in vitro differentiation of blood monocytes into dendritic cells in human sepsis. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, 147, p. 426-439.
- 34. Nathan, C., Ding, A.** Nonresolving inflammation. *Cell*, 2010, 140, p. 871-882.
- 35. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. et al.** Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, 11, p. 519-531.
- 36. Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M. et al.** Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS. Pathog.*, 2009, 5, p. e1000639.
- 37. Kovach, M. A., Standiford, T. J.** The function of neutrophils in sepsis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2012, 25, p. 321-327.
- 38. Karvunidis, T., Chvojka, J., Lysak, D. et al.** Septic shock and chemotherapy - induced cytopenia: effects on microcirculation. *Intensive Care Med.*, 2012, 38, p. 1336-1344.
- 39. Lipscomb, M. F., Masten, B. J.** Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol. Rev.*, 2002, 82, p. 97-130.
- 40. Zitvogel, L.** Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J. Exp. Med.*, 2002, 195, p. F9-14.
- 41. Pene, F., Mira, J. P., Chiche, J. D.** Nobel Prize laureates pave the way for therapeutic advances in sepsis. *Intensive Care Med.*, 2012, 38, p. 183-185.
- 42. Patterson, S.** Flexibility and cooperation among dendritic cells. *Nat. Immunol.*, 2000, 1, p. 273-274.
- 43. Grimaldi, D., Louis, S., Pene, F. et al.** Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.*, 2011, 37, p. 1438-1446.
- 44. Astiz, M., Saha, D., Lustbader, D. et al.** Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J. Lab. Clin. Med.*, 1996, 128, p. 594-600.
- 45. Manjuck, J., Saha, D. C., Astiz, M. et al.** Decreased response to recall antigens is associated with depressed costimulatory receptor expression in septic critically ill patients. *J. Lab. Clin. Med.*, 2000, 135, p. 153-160.
- 46. Wolk, K., Docke, W. D., Von, B., V. et al.** Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*, 2000, 96, p. 218-223.
- 47. Fumeaux, T., Pugin, J.** Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients with sepsis? *Intensive Care Med.*, 2006, 32, p. 1106-1108.
- 48. Tschoeke, S. K., Moldawer, L. L.** Human leukocyte antigen expression in sepsis: what have we learned? *Crit. Care Med.*, 2005, 33, p. 236-237.
- 49. Trimmel, H., Luschin, U., Kohrer, K. et al.** Clinical outcome of critically ill patients cannot be defined by cutoff values of monocyte human leukocyte antigen-DR expression. *Shock*, 2012, 37, p. 140-144.
- 50. Okazaki, T., Honjo, T.** The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.*, 2006, 27, p. 195-201.
- 51. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. et al.** PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2008, 26, p. 677-704.
- 52. Huang, X., Venet, F., Wang, Y. L. et al.** PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, 106, p. 6303-6308.

INTENZIVNÍ MEDICÍNA

53. Holub, M., Kluckova, Z., Beneda, B. et al. Changes in lymphocyte subpopulations and CD3+/DR+ expression in sepsis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2000, 6, p. 657–660.
54. Holub, M., Kluckova, Z., Helcl, M. et al. Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2003, 9, p. 202–211.
55. Ochoa, J. B., Makarenkova, V. T lymphocytes. *Crit. Care Med.*, 2005, 33, p. S510–S513.
56. Curfs, J. H., Meis, J. F., Hoogkamp-Korstanje, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1997, 10, p. 742–780.
57. Hotchkiss, R. S., Osmon, S. B., Chang, K. C. et al. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J. Immunol.*, 2005, 174, p. 5110–5118.
58. Felmet, K. A., Hall, M. W., Clark, R. S. et al. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J. Immunol.*, 2005, 174, p. 3765–3772.
59. Kasten, K. R., Tschop, J., Adediran, S. G. et al. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. *Shock*, 2010, 34, p. 327–336.
60. Swan, R., Chung, C. S., Albina, J. et al. Polymicrobial sepsis enhances clearance of apoptotic immune cells by splenic macrophages. *Surgery*, 2007, 142, p. 253–261.
61. Pachot, A., Monneret, G., Voirin, N. et al. Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock. *Clin. Immunol.*, 2005, 114, p. 61–69.
62. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. et al. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, 27, p. 485–517.
63. Zhu, J., Paul, W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.*, 2010, 20, p. 4–12.
64. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, 22, p. 531–562.
65. Feuerer, M., Shen, Y., Littman, D. R. et al. How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity*, 2009, 31, p. 654–664.
66. Sitkovsky, M. V. T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response. *Trends Immunol.*, 2009, 30, p. 102–108.
67. Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Dib-Conquy, M., Cavillon, J. M. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol. Med.*, 2012, 18, p. 270–285.
68. Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 2011, 331, p. 44–49.
69. Forel, J. M., Chiche, L., Thomas, G. et al. Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PLoS One.*, 2012, 7, p. e50446.
70. Boomer, J. S., Shuherk-Shaffer, J., Hotchkiss, R. S. et al. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit. Care*, 2012, 16, p. R112.
71. McDunn, J. E., Hotchkiss, R. S. Leukocyte phenotyping to stratify septic shock patients. *Crit Care*, 2009, 13, p. 127.
72. Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C. et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev.*, 2007, 220, p. 169–182.
73. Etogo, A. O., Nunez, J., Lin, C. Y. et al. NK but not CD1-restricted NKT cells facilitate systemic inflammation during polymicrobial intra-abdominal sepsis. *J. Immunol.*, 2008, 180, p. 6334–6345.
74. Herzig, D. S., Driver, B. R., Fang, G. et al. Regulation of lymphocyte trafficking by CXC chemokine receptor 3 during septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2012, 185, p. 291–300.
75. Monserrat, J., de, P. R., Reyes, E. et al. Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. *Crit Care*, 2009, 13, p. R26.
76. Andaluz-Ojeda, D., Iglesias, V., Bobillo, F. et al. Early natural killer cell counts in blood predict mortality in severe sepsis. *Crit. Care*, 2011, 15, p. R243.
77. de Pablo, R., Monserrat, J., Torrijos, C. et al. The predictive role of early activation of natural killer cells in septic shock. *Crit Care*, 2012, 16, p. 413.
78. Roark, C. L., French, J. D., Taylor, M. A. et al. Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells. *J. Immunol.*, 2007, 179, p. 5576–5583.
79. Han, G., Geng, S., Li, Y. et al. gammadeltaT-cell function in sepsis is modulated by C5a receptor signalling. *Immunology*, 2011, 133, p. 340–349.
80. Cheng, L., Cui, Y., Shao, H. et al. Mouse gammadelta T cells are capable of expressing MHC class II molecules, and of functioning as antigen-presenting cells. *J. Neuroimmunol.*, 2008, 203, p. 3–11.
81. Sinha, P., Clements, V. K., Bunt, S. K. et al. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J. Immunol.*, 2007, 179, p. 977–983.
82. Gabrilovich, D. I., Nagaraj, S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, 9, p. 162–174.
83. Ochoa, A. C., Zea, A. H., Hernandez, C. et al. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13, p. 721s–726s.
84. Cuenca, A. G., Moldawer, L. L. Myeloid-derived suppressor cells in sepsis: friend or foe? *Intensive Care Med.*, 2012, 38, p. 928–930.
85. Brudecki, L., Ferguson, D. A., McCall, C. E. et al. Myeloid-derived suppressor cells evolve during sepsis and can enhance or attenuate the systemic inflammatory response. *Infect. Immun.*, 2012, 80, p. 2026–2034.
86. Derive, M., Bouazza, Y., Alauzet, C. et al. Myeloid-derived suppressor cells control microbial sepsis. *Intensive Care Med.*, 2012, 38, p. 1040–1049.
87. Sansonetti, P. J. The innate signaling of dangers and the dangers of innate signaling. *Nat. Immunol.*, 2006, 7, p. 1237–1242.
88. Monneret, G., Venet, F., Pachot, A. et al. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol. Med.*, 2008, 14, p. 64–78.
89. Carrette, F., Surh, C. D. IL-7 signaling and CD127 receptor regulation in the control of T cell homeostasis. *Semin. Immunol.*, 2012, 24, p. 209–217.
90. Kasten, K. R., Tschop, J., Goetzman, H. S. et al. T-cell activation differentially mediates the host response to sepsis. *Shock*, 2010, 34, p. 377–383.
91. Rendon, J. L., Choudhry, M. A. Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J. Leukoc. Biol.*, 2012, 92, p. 529–538.

92. Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S. et al. Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity*, 2011, 34, p. 149–162.

93. Nakada, T. A., Russell, J. A., Boyd, J. H. et al. IL17A genetic variation is associated with altered susceptibility to Gram-positive infection and mortality of severe sepsis. *Crit. Care*, 2011, 15, p. R254.

94. Oboki, K., Ohno, T., Kajiwara, N. et al. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, 107, p. 18581–18586.

95. ves-Filho, J. C., Sonogo, F., Souto, F. O. et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat. Med.*, 2010, 16, p. 708–712.

96. Mirchandani, A. S., Salmond, R. J., Liew, F. Y. Interleukin-33 and the function of innate lymphoid cells. *Trends Immunol.*, 2012, 33, p. 389–396.

97. Bianchi, M. E., Manfredi, A. A. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol. Rev.*, 2007, 220, p. 35–46.

98. Sunden-Cullberg, J., Norrby-Teglund, A., Rouhiainen, A. et al. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein

(HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.*, 2005, 33, p. 564–573.

99. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, 81, p. 1–5.

100. Hotchkiss, R. S. Immunotherapy for Sepsis — A New Approach against an Ancient Foe. *N. Engl. J. Med.*, 2010, 363, p. 87–89

Podpořeno projektem Ministerstva zdravotnictví koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00669806 - FN Plzeň.

Do redakce došlo dne 11. 2. 2013.

Do tisku přijato dne 15. 5. 2013.

Adresa pro korespondenci:

Prof. MUDr. Martin Matějovič, PhD.

LF UK a FN Plzeň

Alej svobody 80

30406 Plzeň

e-mail: matejovic@fnplzen.cz

ECHODIDAKTIKA

Ultrazvuk v zobrazení a kanylaci centrálního žilního systému

Michálek Pavel

Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní péče 1. LF UK a VFN Praha

Anest. intenziv. Med., 24, 2013, č. 4, s. 263–267

ÚVOD

První kanylace centrálního žilního systému byla provedena německým chirurgem Wernerem Forsmannem v roce 1929, který zavedl tenký močový katétr z loketní jamky až do pravé síně srdeční. Perkutánní přístup do podklíčkové žíly byl popsán Aubaniacem v roce 1952 [1]. Tento přístup se potom na dlouhá léta stal nejužívanějším pro kanylaci centrální žíly v anestezii i intenzivní péči. Pro potenciální riziko komplikací, především pneumotoraxu, byly vyvíjeny nové přístupy a metodiky, které měly jeho výskyt minimalizovat. Jednou z těchto metodik je použití ultrazvukové kontroly a nebo navigace v reálném čase k zobrazení žíly,

její punkci a zavedení katétru. Peters v roce 1982 poprvé publikoval své zkušenosti s použitím dopplerovského ultrazvuku při infraklavikulárním přístupu do podklíčkové žíly [2].

ZOBRAZENÍ JEDNOTLIVÝCH CENTRÁLNÍCH ŽIL

Pro základní orientaci jsou centrální žíly většinou zobrazovány v příčném (transverzálním) obrazu. U většiny pacientů používáme lineární sondy s frekvencí obvykle 6–13 MHz. V oblastech, které jsou používány pro kanylaci, žíla doprovází příslušnou tepnu. Na krku je zobrazena vena ju-

VI. Trombocyty v sepsi.

Karvunidis T, Chvojka J, Lysák D, Kroužecký A, Raděj J, Novák I, Matějovič M.

Anest Intenziv Med. 2010; 21(6):342-350.

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

Trombocyty v sepsi

Karvunidis Thomas¹, Chvojka Jiří¹, Lysák Daniel², Kroužecký Aleš¹, Raděj Jaroslav¹, Novák Ivan¹, Matějovič Martin¹

¹1. interní klinika, Jednotka intenzivní péče, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň

²Hematologicko-onkologické oddělení, Fakultní nemocnice Plzeň

Souhrn

Sepsa a septický šok jsou jednou z nejčastějších příčin smrti na jednotkách intenzivní péče. Trombocytopenie a/nebo porucha funkce krevních destiček jsou poměrně častou součástí syndromu multiorgánové dysfunkce, přičemž trombocyty nemusí hrát v patofyziologii těchto stavů pouze pasivní roli. Krevní destičky plní primárně hemostatickou funkci při porušení integrity endotelu, zastávají, obdobně jako leukocyty, důležitou funkci v primárních obranných mechanismech hostitele. Tyto buněčné fragmenty na svém povrchu exprimují a secernují řadu adhezivních a prozánětlivých molekul, které slouží k iniciaci a modulaci primární imunitní odpovědi. Tyto hemostatické a zejména nehemostatické funkce trombocytů a jejich úloha v patogenetických mechanismech při systémovém zánětu budou autory shrnuty a autoři o nich budou diskutovat v tomto přehledovém článku.

Klíčová slova: trombocyty – sepsa – přirozená imunita – intercelulární interakce

Abstract

Thrombocytes in sepsis

Sepsis and septic shock are the most frequent causes of death in intensive care units. Thrombocytopenia and/or platelet function impairment are common parts of the multiple organ dysfunction syndrome. However, thrombocytes are not mere bystanders as documented in the present literature. Platelets, primary actors in haemostasis and thrombin generation during endothelial integrity disruption, similarly to leukocytes, maintain important functions of innate defense mechanisms of the host. These cellular fragments express and secrete numbers of adhesive and pro-inflammatory molecules that serve to initiate and modulate the primary immune response. Such haemostatic and especially non-haemostatic functions of platelets and their role in the pathogenesis of systemic inflammation will be discussed in this review.

Keywords: platelets – sepsis – innate immunity – intercellular interaction

Anest. intenziv. Med., 21, 2010, č. 6, s. 342–350

Úvod

Sepsa a septický šok jsou desátou nejčastější příčinou smrti všeobecně a nejčastější příčinou smrti na nekoronárních jednotkách intenzivní péče. Incidence sepsy je 50–95 případů na 100 000 obyvatel a zvyšuje se cca o 9 % ročně. I přes značné pokroky v diagnostice a léčbě je mortalita těchto stavů 30–90% a koreluje s počtem dysfunkčních orgánů/systémů a s délkou trvání těchto stavů [1, 2].

Trombocyty jsou bezjaderné a nejmenší krevní elementy (3,6 x 7,0 μm; povrch 8 μm²; objem 7 fl) vzniklé odštěpením z megakaryocytů v kostní dřeni. Proliferace a diferenciaci megakaryocytů a následná produkce krevních destiček je pod kontrolou trombopoetinu (a v menší míře i jiných cytokinů: IL-3, IL-6, IL-11, G-CSF atd.). Trombopoetin (TPO) je produkován konstantní rychlostí v játrech a ledvinách a následně z cirkulace vychytáván vazbou se specifickým receptorem (c-Mpl) na povrchu trombocytů a megakaryo-

cytů. Destičky slouží i jako zásobárna TPO a po jejich aktivaci dochází v procesu degranulace k jeho zpětnému uvolnění do cirkulace [3, 4]. Trombopoetin je eliminován/metabolizován výhradně cirkulujícími trombocyty. Pokles počtu cirkulujících destiček tudíž vede ke zvýšení hladiny trombopoetinu a naopak [5]. Trombocyty sehrávají centrální úlohu v procesu hemostázy a trombózy. Navíc jsou i specializovanými buňkami přirozené imunity, modulátory zánětlivé odpovědi hostitele; jsou zavzaty do procesů hojení ran a hematogenních metastáz [6]. Jsou významným zdrojem velkého množství bioaktivních mediátorů, které produkují, skladují a secernují [7]. Za normálních okolností, průměrně 1 x 10¹² destiček, cirkuluje v krevním řečišti podél endotelu cév o ploše až 1000 m², aniž by docházelo k jejich aktivaci, adhezi, agregaci a degranulaci. Při jakémkoliv porušení integrity cévní stěny dochází k nastartování procesu vzájemných interakcí cirkulujících trombocytů, endoteliálních buněk a subendoteliálních struktur v procesu hemostázy [8].

Trombocytopenie v sepsi

Trombocytopenie, arbitrárně definovaná jako počet trombocytů $< 150 \times 10^9/l$, je častým jevem v sepsi či septickém šoku. Její incidence je přibližně 35–44 %. U 20–25 % těchto nemocných zjišťujeme počet destiček $< 100 \times 10^9/l$ a 12–15 % pacientů má těžkou trombocytopenii ($< 50 \times 10^9/l$) [9, 10, 11, 12]. Počet destiček typicky klesá v prvních čtyřech dnech pobytu na JIP [13]. Mechanismus vzniku trombocytopenie v sepsi/septickém šoku není v současnosti zcela jasný (tab. 1). Vysvětlení sníženou produkcí trombocytů v kostní dřeni je v logickém rozporu s vysokými hladinami produkce destiček stimulujícími prozánětlivými cytokiny (TNF- α , IL-6 atd.) a trombopoetinu u nemocných v sepsi [3, 4]. Jednou z možných příčin může být nekontrolovaná fagocytóza krevních elementů a jejich prekurzorů v procesu systémového zánětu aktivovanými makrofágy. Tyto tzv. hemofagocytární syndromy (HPS) tvoří vzácnou skupinu vrozených a získaných onemocnění, pro která je společná neadekvátní buněčná imunitní odpověď u nemocných s defektem cytotoxické aktivity T-lymfocytů a NK-buněk. Hemofagocytóza se může podílet na jinak nevysvětlené trombocytopenii u některých pacientů v sepsi/septickém šoku. Za těchto klinických situací může být tento proces relativně častý [14, 15]. Kromě trombocytů jsou častým cílem hemofagocytózy i erytrocyty a jejich jaderné prekurzory v kostní dřeni. Právě erytrofagocytóza je potentním stimulem pro zvýšení exprese hemoxxygenázy-1 (HO-1), proteinu, jenž má svůj podíl v protektivních mechanismech v sepsi/septickém šoku [16]. HO-1 je enzym účastnící se degradace hemu. Jeho zvýšená aktivita je spojená s protizánětlivými, antiapoptotickými a antioxidativními efekty. Tyto nejsou zprostředkovány enzymem samotným, ale právě degradačními produkty hemu – bilirubinem, oxidem uhelnatým (CO) a ferritinem [17]. Jako řadu jiných patofyziologických mechanismů v sepsi nelze ani hemofagocytózu, i přes její dopad na počty cirkulujících krevních elementů, z výše uvedených důvodů považovat za jednoznačně negativní proces.

Imunitní (autoprotílátkami zprostředkovaná) trombocytopenie může být příčinou sníženého počtu krevních destiček u kriticky nemocných v daleko větší míře, než jak je na ni pomýšleno. Nespecifické autoprotílátky proti trombocytům mohou být dekekovány až u 30 % těchto jedinců [18]. Většina IgG autoprotílátek se váže samostatně na bakteriální komponenty nacházející se na povrchu aktivovaných destiček nebo ve formě imunokomplexů. Pouze u menší části nemocných (30 % [18]) nacházíme specifické autoprotílátky namířené na membránové glykoproteiny (GPIIb/IIIa, GPIb/IX). Takto vyvolaná trombocytopenie tak pravděpodobně sdílí řadu patofyziologických mechanismů popsaných u imunitní (idiopatické) trombocytopenické purpury (ITP). Pacienti s trombocytopenií a detekovatelnými autoprotílátkami mají menší pravděpodobnost normalizace počtu destiček než jedinci

bez těchto protílátek, nicméně nevyžadují větší substituci krevními deriváty (trombokonzentráty) [18]. Dalším patologickým stavem charakterizovaným často těžkou trombocytopenií s přítomností autoprotílátek je heparinem-indukovaná trombocytopenie (HIT). Tyto protílátky třídy IgG jsou namířeny proti komplexu destičkový faktor 4 a heparin (PF4/heparin, HIT-IgG) [19]. Incidence je odhadována na 1–3 % všech nemocných léčených nefrakcionovaným heparinem (UFH), až 0,8 % při aplikaci nízkomolekulárních heparinů (LMWH) [20, 21] a typicky se rozvíjí po více než 5 dnech léčby. I přes často závažnou trombocytopenii je HIT stavem jednoznačně prokoagulačním, díky uvolnění velkého množství prokoagulačních substancí (serotonin, histamin, ADP) při degranulaci trombocytů stimulované navázáním multimerů PF4/HIT/HIT-IgG na jejich Fc RIIa receptory [19]. Při suspekci na HIT je nezbytné neprodleně ukončit léčbu heparinem, stejně jako odstranit všechny heparin obsahující intravaskulární katétry a jiné zařízení, přerušit extrakorporální očišťovací (CRRT) a podpůrné (ECMO) metody užívající jako antikoagulans heparin. Pouhé vysazení heparinu však není adekvátní léčbou HIT. U 30–50 % nemocných, kteří v době HIT neměli HIT-asociovanou trombózu, se do jednoho měsíce rozvine trombembolická příhoda, pokud nejsou léčeni alternativním antikoagulantem (přímé inhibitory trombinu) [22]. Mnohem častější než výše popsaná autoprotílátkami zprostředkovaná HIT je neimunitní HIT (nonimmune-HIT, N-HIT, dříve HIT type I). Mechanismem je nejspíše přímá vazba heparinu na trombocyty [23]. Taková trombocytopenie je většinou pouze mírná a rezultuje i bez přerušování léčby heparinem.

Relativně vzácnější příčinou trombocytopenie u kriticky nemocných včetně těch v sepsi/septickém šoku může být tzv. etylendiamintetraacetát-dependenční pseudotrombocytopenie (EDTA-PTCP). Literatura udává incidenci 0,1% [24, 25]. Jedná se o *in vitro*

Tabulka 1. Základní příčiny trombocytopenie nemocných v intenzivní péči

Snížená produkce	Poléková trombocytopenie Primární onemocnění kostní dřeni/hematologické malignity Hemofagocytóza Infekce Nutriční deficit (vitamin B ₁₂ , železo atd.)
Zvýšená eliminace/konzumpce	Krevní ztráty Koagulopatie Infekce Poléková trombocytopenie Hypersplenismus Imunitně podmíněné trombocytopenie (ITP, TTP-HUS, HELLP)
Pseudotrombocytopenie	EDTA-asociovaná aglutinace Hemodiluce

(upraveno podle [10])

fenomén agregace destiček v přítomnosti EDTA a autoprotiátok proti trombocytům (tříd IgG, IgM i IgA; ligand: GPIIb/IIIa) [26]. Automatické analyzátoři nebyvají schopni přítomnost shluků krevních destiček vyhodnotit a výsledkem bývá nesprávně udaný nízký počet trombocytů. Tento fenomén by měl být vždy zvážen v diferenciální diagnostice trombocytopenie (nejen kriticky nemocných) a skutečný počet destiček ověřen analýzou z krevního vzorku odebraného do odběrových souprav s Na-citrátem jako antikoagulans.

Konzumpce trombocytů hraje také důležitou roli v rozvoji trombocytopenie v sepsi, a to v důsledku vysoké produkce trombinu, který je nejvíce potentním aktivátorem destiček *in vivo*. Trombocyty mohou být také aktivovány přímo endotoxinem a dalšími prozátnělivými mediátory (PAF atd.) [15, 16].

Primárním důsledkem trombocytopenie u kriticky nemocných je zvýšení rizika krvácení. U pacientů s těžkou trombocytopenií (< 50 x 10⁹/l) je toto riziko čtyřikrát až pětkrát vyšší [11, 12] a obecně se zvyšuje při systémovém zánětu [17]. Riziko intracerebrálního krvácení nemocných přijatých na JIP je relativně nízké (0,3–0,5 %), ale až 88 % těchto nemocných má současně počet krevních destiček < 100 x 10⁹/l [18]. Bez ohledu na příčinu je trombocytopenie nezávislým prediktorem mortality na JIP s relativním rizikem 1,9–4,2 podle multivariantních analýz [11, 12]. Trombocytopenie perzistující déle než 4 dny po přijetí na JIP či pokles počtu krevních destiček o > 50 % výchozích hodnot v průběhu pobytu na JIP jsou spojeny se čtyřnásobným až šestnásobným zvýšením mortality [11, 13]. Počet trombocytů se ukazuje být silnějším nezávislým ukazatelem mortality na JIP než některé skórovací systémy (APACHE II, MODS). Sepse je jasným nezávislým rizikovým faktorem pro rozvoj trombocytopenie a současně tíže sepse/septického šoku koreluje i s její závažností [11, 12, 19]. Trombocytopenie může být důsledkem i jiných stavů nesouvisejících se sepsí/septickým šokem (tab. 2).

Tabulka 2. Diferenciální diagnóza trombocytopenie v intenzivní péči

Sepse/infekce
Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC)
Masivní krevní ztráty
Trombotická mikroangiopatie
Heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT)
Imunitní trombocytopenie
Léky indukovaná trombocytopenie (DIT)

(upraveno podle [17])

Funkce trombocytů v sepsi

Trombocyty jsou vysoce diferencované buňky sehrávající esenciální úlohu v procesu primární zástavy krvácení a současně i v přirozených obranných mechanismech hostitele. Tvorbou trombu zajišťují hemostázu a brání krevním ztrátám při porušení cévních

stěny, produkcí cytokinů, expresí adhezivních molekul s následnou přímou intercelulární interakcí a signalizací (trombocyt-endoteliální buňka, trombocyt-neutrofil) iniciují a modulují imunitní odpověď [7, 10, 20, 21, 22, 23, 24]. Nelze pominout ani vliv vazoaktivních látek secernovaných trombocyty na tonus cév při systémovém zánětu (tab. 3). Funkce destiček může být primárně rozdělena do čtyř fází: adheze, aktivace, agregace a sekrece.

Tabulka 3. Vazoaktivní substance secernované aktivovanými trombocyty

Vazokonstrikční efekt	Serotonin Tromboxan A2 Adrenalin Noradrenalin Fibrinopeptidy Trombin
Vazodilatační efekt	Prostacyklin Prostaglandin E2 Histamin Bradykinin Fibrin-degradační produkty Trombin

(upraveno podle [10])

Všechny zmíněné funkce a interakce trombocytů jsou podmíněny intaktní kaskádou změn, kterými procházejí v průběhu jejich aktivace. Při porušení integrity cévní stěny dochází k odhalení subendoteliálního kolagenu. Na ten se vážou cirkulující multimery von Willebrandova faktoru (vWF), které se dále vážou na membránový receptorový komplex trombocytů – glykoprotein Ib/V/IX (GP Ib/V/IX). Dochází k aktivaci a změně tvaru destiček. Diskoidní tvar s homogenní distribucí granul trombocytů v klidovém stavu se mění s charakteristickou excesivní tvorbou pseudopodií za aktivní účasti cytoskeletu [25], fuzí granul s membránou v procesu exocytózy a sekrecí jejich obsahu (tab. 4). Adheze destiček je možná i přímou interakcí membránového komplexu GP Ia/IIa (eventuálně i GP VI či CD36) s kolagenem jako jeho ligandem. Aktivace je provázena expresí a konfirmační změnou integrinu α IIb β 3 – receptorového komplexu GPIIb/IIIa (CD41/CD61). Následuje vzájemná agregace trombocytů pomocí tohoto receptoru a cirkulujícího fibrinogenu jako ligandu pro tento receptor. Lipoproteiny s nízkou denzitou (low-density lipoproteins, LDL) jsou rovněž ligandem GPIIb/IIIa a modulátorem destičkových funkcí. Uvádí se vztah vysoké hladiny LDL a hyperreaktivní trombocytů [26]. Možný vztah mezi LDL a protrombotickým stavem může vysvětlovat vyšší výskyt kardiovaskulárních komplikací po vysazení statinů (inhibitorů HMG-CoA reductázy). Další konsekvencí aktivace destiček je sekrece obsahu granul – degranulace. Dochází k uvolnění několika agonistů destiček, koagulačních faktorů, heparin-binding proteinů, růstových faktorů, vazoaktivních látek a k expresi membránových receptorů zprostředkávajících interakce s leukocyty či endoteliálními buňkami. Řada

Tabulka 4. Obsah jednotlivých typů granul trombocytů

Denzní granula	Nukleotidy Aminy RANTES Bivalentní kationty	Adenin: ADP, ATP Guanin: GDP, GTP Serotonin Histamin
alfa-granula	adhezní molekuly mitogenní faktory koagulační faktory inhibitory proteáz imunoglobuliny albumin	P-selektin (CD62p) platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) GPIIb/IIIa ($\alpha\beta$ 3 integrin, CD41/CD601) von Willebrandův faktor (vWF) thrombospondin-1 (TSP-1) vitronectin fibronectin platelet-derived growth factor (PDGF) vascular endothelial growth factor (VEGF) endothelial cell growth factor (ECGF) epidermal growth factor (EGF) platelet factor-4 (PF-4) insulin-like growth factor-1 (IGF-1) transforming growth factor- β (TGF- β) fibrinogen, plasminogen, protein S, kininogeny koagulační faktory V, VII, XI, XIII C1 inhibitor plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) α 2-plasmin inhibitor (α 2- PI) tissue factor pathway inhibitor (TFPI)
Lysozomy	glykosidázy proteázy kationické proteiny	

(upraveno podle [22])

z takto uvolněných molekul (ADP, serotonin atd.) potencují stimulaci a aktivaci dalších trombocytů a atrahují je do místa poškození cévní stěny či infekce (tab. 4).

Jen několik málo kvalitních studií se dosud zabývalo problematikou alterace funkce destiček v sepsi. Práce Yaguchiho et al. za použití flowcytometrie, agregometrie a imunoanalýzy prokazuje snížení agregability kontrastující se zachováním exprese adhezivních molekul, intaktní sekrecí obsahu α -granul a zvýšení uvolňování některých růstových faktorů (VEGF) trombocytů jedinců v sepsi v porovnání se zdravými kontrolami [27].

Produkce bioaktivních mediátorů trombocytů

Krevní destičky nejsou jen pasivní zásobárnou bioaktivních látek. V průběhu jejich aktivace je řadou enzymatických pochodů produkováno množství lipidových derivátů – eikosanoidů, jako tromboxan A2 (TXA2) a prostaglandiny. Současně v transcelulárním metabolismu produkují prozánětlivé i protizánětlivé cytokiny. Trombocyty mají navíc několik jedinečných extranukleárních cest translace mRNA na proteiny tzv. signál-dependentním mechanismem, na jejichž konci je sekrece mimo jiné i IL-1 β či TF a tedy i propojení hemostázy a zánětu [28].

Vascular endothelial growth factor (VEGF) je klíčová molekula v kontrole cévní permeability. Její působení je zprostředkováno vazbou s povrchovým VEGF-receptor-2 v membráně endoteliálních buněk. Kromě toho má významnou roli v angiogenezi a hojení ran. VEGF je produkován řadou buněk, mimo jiné monocyty periferní krve a trombocyty. Množství stimulů asociovaných se zánětem/sepsí (jako LPS, TNF- α) a hypoxií (cestou hypoxia-inducible factor 1a transcription factor) zvyšuje produkci a sekreci VEGF [29]. Řada studií prokazuje asociaci mezi zvýšenou plasmatickou hladinou VEGF a sepsí [29, 30]. Navíc některá data ukazují na možnou souvislost mezi plasmatickou hladinou VEGF a tíží sepse/orgánové dysfunkce a mortalitou [29]. Platelet-derived growth factor (PDGF) lze použít jako jeden z laboratorních markerů degranulace trombocytů [27].

Trombocyty a přirozená imunita

Přirozená imunita je tvořena fyzikálními, chemickými a buněčnými komponentami, které dohromady tvoří první obrannou linii organismu před invází mikroorganismů. Zapojení těchto antigen-nespecifických mechanismů je bezprostřední (v několika sekundách) po rozpoznání infekčního agens. Kaskáda imunitní odpovědi organismu a propojení přirozené a adaptivní imu-

nity cestou rozpoznání specifických molekulárních charakteristik konkrétních patogenů (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), jejich zpracování a prezentace antigen-prezentujícími buňkami (APCs) v asociaci s HLA molekulami s následnou aktivací (efektorových) buněk a mechanismů specifické/získané imunity jsou popsány v řadě studií a přehledných článků [31, 32, 33].

Trombocyty jsou schopny aktivně a účinně propojit primární imunitní reakce se specifickými získanými mechanismy. Na svém povrchu exprimují imunostimulační molekuly, jako např. CD40L (CD154), a touto cestou mohou např. stimulovat specifické antivirové CD8+ T-lymfocyty [34].

Invadující patogeny jsou rozpoznávány Toll-like receptory (TLRs) na profesionálních fagocytech. TLRs vážou řadu molekulárních struktur a jsou klíčové v procesu stimulace imunitního systému [35, 36, 37]. TLRs jsou exprimovány na nejrůznějších imunitních buňkách a recentní literatura dokumentuje přítomnost některých subtypů TLRs (TLR 1, 2, 4 a 9) i na neaktivovaných trombocytech [38, 39]. Jejich aktivace vazbou specifických PAMPs spouští kaskádu dobře popsaných dějů, které vedou k aktivaci destiček, produkci pro- i protizánětlivých mediátorů, sekvestraci trombocytů v mikrocirkulaci, zejména plic a jater (TLR-dependentní trombocytopenie), a aktivaci imunitního systému cestou prezentace PAMPs klasickým buňkám imunitního systému [23, 40–43]. TLRs jsou přítomny rovněž na megakaryocytech v kostní dřeni [4] a existuje řada důkazů experimentálních studií o jejich roli v trombopoéze [44]. Nicméně, logicky odvozeno, aktivované destičky (včetně aktivace cestou TLRs) secernují TPO a další cytokiny stimulující jejich produkci, jak již bylo zmíněno výše [3, 4].

Jedním z mnoha mechanismů přirozené imunity je i fagocytóza zprostředkovaná granulocyty a monocyty/makrofágy, podílející se na izolaci, destrukci a prezentaci antigenů invadujících agens. Trombocyty jsou rovněž schopny internalizace mikroorganismů či jejich částí v procesu pseudofagocytózy („engulfment“) [24]. Ačkoliv byla dokumentována parciální digesce bakterií v destičkových lysozomech [45], trombocyty nejsou v těchto kompartmentech schopny generovat baktericidní pH vzhledem ke komunikaci těchto intracelulárních prostor s okolním prostředím kanalikulárním systémem [46].

Intercelulární interakce trombocytů

Aktivované trombocyty exprimují na svém povrchu řadu adhezivních molekul sloužících k mezibuněčnému kontaktu a signalizaci (tab. 5 a 6). Jednou z nich je i P-selektin (CD62p), integrální membránový glykoprotein patřící do rodiny selektivních adhezivních receptorů. Nachází

Tabulka 5. Vybrané membránové receptory při intercelulárních interakcích trombocytů

Povrchové molekuly	Ligandy
P-selectin (CD62p)	PSGL-1 na neutrofilech, monocytech, Th1-lymfocytech
ICAM-1	LFA-1 na neutrofilech a monocytech
GPIb	vWF
vWF	GPIb
CD32	obligatorní koreceptor GPVI
GPIIb/IIIa	fibrinogen, fibronectin, vitronectin, vWF a trombospondin
GPVI	kolagen
CD40L	CD40 na monocytech a endoteliálních buňkách

(upraveno podle [22])

se na povrchu nejen destiček, ale i makrofágů/monocytů a aktivovaných endoteliálních buněk. Dalšími selektiny jsou E-selektin exprimovaný na membráně aktivovaných endoteliálních buněk a L-selektin na povrchu leukocytů. P-selektin hraje esenciální roli v interakci trombocytů s leukocyty. Jeho vazebným protějškem s velkou afinitou je tzv. P-selektin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1), který se nachází na povrchu leukocytů i samotných destiček. Vazba P-selektin – PSGL-1 (eventuálně současně GP Ib/V/IX – vWF či GP Ia/IIa – kolagen při porušení integrity endotelu) a následná silná vazba komplexu GPIIb/IIIa v membráně trombocytů přes fibrinogenový můstek na intercelulární adhezi molekule-1 (ICAM-1) na povrchu endotelu umožňuje adhezi destiček v místě invaze patogenů či porušení cévní stěny. Současně dochází obdobnými mechanismy (selektin, ICAM-1) na stejném místě i k adhezi leukocytů (polymorfonukleárů, monocytů/makrofágů). Nicméně, k zachycení, adhezi a aktivaci leukocytů může dojít i mechanismem tzv. second capture, kdy k endotelu pevně adherující trombocyty zachytávají cirkulující („resting“) leukocyty, dochází k interakci trombocyt-leukocyt (polymorfonukleáry, PMN), aktivaci PMN a následně k „rollingu“ těchto PMN po vrstvě destiček a postupnému průniku přes cévní stěnu [22]. Stabilní kontakt trombocytu s PMN může být zprostředkován i vazbou ICAM-2 (trombocyt) s lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, CD11a/CD18, PMN) [47].

Sepse je provázána signifikantní aktivací neutrofilů. PAMPs jako lipopolysacharid (LPS) spouští kaskádu změn vedoucí k strukturálním změnám neutrofilů, zvýšení jejich rigidity, expresi adhezivních molekul, jejich cílenou migraci („homing“) do mikrocirkulace plic

Tabulka 6. Receptory a jejich ligandy při interakcích trombocyt-endoteliální buňka-neutrofil

Endoteliální buňky	↔ trombocyty	↔ neutrofil
CD40	↔ CD40L	↔ CD40
Fibrinogen, fibronectin	↔ GPIIb/IIIa	↔ makrofágy antigen-1 (Mac-1)
P-selektin, vWF	↔ GPIb	↔ Mac-1, ICAM-1
	↔ ICAM-2	↔ LFA-1
Neznámý, suspektně GPIIb	↔ P-selektin	↔ PGSL-1, L-selektin

(upraveno podle [22])

a jater, což může být jedním z mechanismů následné dysfunkce těchto orgánů. Na druhou stranu může být migrace neutrofilů do plic i aktivním mechanismem imunitního systému v průběhu systémového zánětu. Sekvestraci PMN do těchto orgánů záhy následuje i akumulace trombocytů v takto postižené mikrocirkulaci. Úloha neutrofilů se v tomto procesu jeví jako esenciální, jak dokumentují některé experimentální práce [39]. Patofyziologické pochody tohoto fenoménu nejsou zcela objasněny. Existuje několik možností: přímá interakce trombocytů s imobilizovanými PMN a aktivovanými ECs v cílové oblasti, atrakce destiček jejich agonisty (ADP, trombin) secernovanými v těchto cílových tkáních aktivovanými PMN a ECs [22, 48], zvýšená vazba trombocytů exponovaných LPS na imobilizované neutrofile [49]. Aktivované neutrofile navázané na trombocyty uvolňují do cirkulace řadu biologicky aktivních molekul a navíc i DNA a dohromady vytvářejí tzv. neutrophil extracellular traps (NETs), které hrají roli v zachytávání a likvidaci bakterií v cévním řečišti [50, 51].

Další cestou intercelulární komunikace trombocytů s buňkami přirozené imunity je interakce receptoru CD40 a jeho ligandu CD40L. Expres transmembránového proteinu CD40L (CD154) na povrchu destiček se zvyšuje po jejich aktivaci [52]. Vazba na již zmíněný CD40 na povrchu endoteliálních buněk, monocytů, dendritických buněk, B-lymfocytů a trombocytů vede ke zvýšení exprese adhezivních molekul (ICAM-1, VCAM-1), produkci cytokinů a tím další aktivaci imunitního systému [52, 53, 54, 55]. Trombocyty interakcí CD40L-CD40 indukují maturaci dendritických buněk, což je centrálním mechanismem v rozvoji získané imunity proti invadujícím patogenům [56]. Dendritické buňky jsou rovněž velmi potentními APCs, a mohou tak sehrát roli i v imunitně podmíněné trombocytopenii. Stejným mechanismem mohou destičky indukovat změnu izotypů B-lymfocytů a augmentaci odpovědi CD8+ T-lymfocytů, což vede k lepší obraně proti virovým infekcím [56]. CD40L se z membrány trombocytů uvolňuje do cirkulace jako 18-kDa solubilní CD40L (sCD40L). Tento již není schopen aktivovat endoteliální buňky [52, 57], ale stále si zachovává potenciál stimulovat destičky přes jejich receptor CD40 s již výše diskutovanou konsekvencí. Několik studií poukazuje na možnost významného podílu vyplavení sCD40L z trombocytů (eventuálně po jejich aktivaci *via* TLRs) na patogenezi transfuzí indukovaného postižení plic (transfusion-related acute lung injury, TRALI). T lymfocyty s exprimovanými CD40L jsou schopny aktivovat trombocyty k uvolnění RANTES, které zpětnově stimuluje a aktivuje další T lymfocyty, a potencují tak specifickou imunitní odpověď organismu hostitele [55].

Trombocyty a infekční agens

Interakce bakterií s krevními destičkami je možná třemi mechanismy. Tím prvním je nepřímé působení cestou aktivace trombocytů zvýšením hladiny prozánětlivých cytokinů v odpovědi imunitního systému na přítomnost invadujících bakterií. Dále mohou destičky

reagovat na látky secernované (toxiny; toxiny syndromu toxického šoku, enterotoxiny aj.) či uvolněné (komponenty buněčných stěn bakterií; LPS *E. coli* O157) ze samotných mikroorganismů. V neposlední řadě může dojít k vazbě samotných bakterií s trombocyty. Tato vazba může být přímá či zprostředkovaná společným ligandem (většinou plasmatický protein). Všechny zmíněné interakce mohou při dostatečné intenzitě spouštět již výše diskutovanou kaskádu změn vedoucí k aktivaci destiček [58, 59, 60]. Rovněž bakteriální fenotyp hraje významnou roli v intenzitě a rychlosti odpovědi trombocytů na tuto stimulaci [58]. I přes značnou variabilitu mechanismů přímé interakce bakterií s trombocyty vede zablokování destičkového receptoru pro Fc fragment IgG (Fc RIIa) k prevenci aktivace a agregace trombocytů v přítomnosti bakterií [61].

Trombocytopenie je častým jevem při systémových virových infekcích. Podle okolností a závažnosti může vyústit až do formy idiopatické trombocytopenické purpury (ITP) [58]. Trombocyty hrají důležitou roli v obraně organismu proti invazi a/nebo progresi virových infekcí. Detailní mechanismy však nejsou dosud známy.

Testování funkce trombocytů

Kromě obligatorního stanovení počtu krevních destiček je k testování jejich stavu a funkcí, eventuálně i k funkci hemostatického systému jako celku, možno využít řadu etablovaných metod, jejichž podrobný popis je nad rámec tohoto sdělení. Jejich stručný seznam a popis je uveden v tabulce 7.

Naopak relativně novou a výkonnou metodou s potencionálním širokým uplatněním je proteomická analýza. Proteomika analyzuje proteiny, jako komplementární složky ke genům, které je kódují. Umožňuje tedy identifikaci, kvantifikaci a analýzu funkcí proteinů [62]. Zejména v oblasti intenzivní péče může být – a také již je – proteomika metodou, jež detailně odhaluje mechanismy patologických stavů, protože právě proteiny a peptidy, jako konečné produkty transkripce a translace genů aktivovaných v kaskádě systémové zánětlivé odpovědi a multiorgánového selhání, jsou efektorovými molekulami. Jejich identifikace, znalost funkce a vzájemných interakcí může vést k nalezení nových biomarkerů a terapeutických cílů [63].

Vzhledem k absenci buněčného jádra a jen malému obsahu mRNA, jsou trombocyty výborným cílem pro proteomické studie. Existuje řada prací popisujících proteom destiček v různých stavech aktivace. Množství proteomických technik (2-DE či chromatografie následovaná různými variantami hmotnostní spektrometrie) umožňujících charakterizaci různých skupin proteinů trombocytů – proteiny cytoskeletu, proteiny uplatňující se v přenosu signálů, proteiny syntetizované destičkami v neaktivním stavu a proteiny syntetizovanými a secernovanými aktivovanými trombocyty. Technologie a metodika proteomické analýzy trombocytů je shrnuta v přehledné práci Angela Garcíi [64].

Tabulka 7. Vybrané funkční testy trombocytů

Funkční test trombocytů	Testované parametry	Výhody	Nevýhody
Test krvácivosti	in vivo screeningový test	fyzilogický	nesenzitivní, invazivní, vysoká interoperátorová variabilita
Tromboelastografie (TEG)	globální hemostáza	predikuje krvácení	analyzuje pouze vlastnosti krevní sraženiny, nesenzitivní na ASA
Tromboelastometrie (ROTEM)	globální hemostáza	predikuje krvácení	nesenzitivní na ASA
Průtoková cytometrie (flow cytometry, FCM)	membránové glykoproteiny, adhezní molekuly, markery aktivace, trombocyt-neutrofil agregáty	testování z plné krve, flexibilní, reprodučibilní, velká šíře možných testů	nákladné vybavení i provoz (kity), nezbytný zkušený operátor
Impedanční agregometrie	reakce trombocytů na panel jejich agonistů	testování z plné krve, flexibilní, reprodučibilní, velká šíře možných testů	málo senzitivní
Turbidimetrická agregometrie	reakce trombocytů na panel jejich agonistů	diagnostická metoda	nefyzilogické, náročná laboratorní práce
Platelet function analyser (PFA-100)	„high shear“ adheze a agregace	rychlý a jednoduchý screening, in vitro test krvácivosti	málo flexibilní
Proteomická analýza	identifikace proteinů jednotlivých kompartmentů trombocytů	detailní	nákladné vybavení i provoz, nezbytný zkušený operátor, náročná laboratorní práce

Trombocyty jako cíl léčebných intervencí v sepsi

Ačkoliv je normální počet krevních destiček 150 až 350 . 10⁹/l, pouze malá část z tohoto počtu (< 10 . 10⁹/l) je za normálních okolností skutečně třeba k prevenci běžných krvácení. K hemostáze při větších poraněních a běžných chirurgických výkonech je zpravidla trombocytů potřeba více (40–50 . 10⁹/l), podle závažnosti stavu, rozsahu poranění a výkonu [58, 65]. Také od tohoto poznání by se měla odvíjet i strategie v jejich substituci. Excesivní převody trombocytárních koncentrátů mohou zvyšovat „klasická“ rizika spojená s převodem krevních derivátů/trombocytů, ale při znalostech výše diskutovaných nehemostatických funkcí destiček mohou vést i k potenciaci a zhoršení systémové inflamace a MODS.

Recentní literatura dokumentuje minimálně asociaci ALI/ARDS s transfuzemi krevních produktů bohatých na plasmu (plasma-rich blood derivatives; čerstvá zmrazená plasmata, trombokoncentráty), a to zejména u kriticky nemocných v sepsi/septickém šoku a/nebo s pneumonií či po aspiraci žaludečního obsahu [78]. Trombocyty včetně těch transfundovaných se také mohou podílet na poškození, ale na druhé straně i na regeneraci jater po jejich primárním postižení [79].

Spolu s rostoucí incidencí závažných onemocnění vyvolaných polyrezistentními mikroorganismy se stává léčba těchto infekcí čím dál tím náročnější a komplikovanější. Nahlížíme-li na trombocyty jako na velmi potentní iniciátory a modulátory imunitní odpovědi hostitele, jeví se cílení našich léčebných či případně preventivních snah na tyto elementy jako racionální. Například antagonizace/blokáda destičkového receptoru FcγRIIa může zabránit či zmírnit aktivaci trombocytů a tím neadekvátní odpovědi imunitního systému, jež může vést k septickému šoku a MODS

[61]. Inhibice Fc RIla neovlivňuje reakce trombocytů na jiné agonisty, a tedy ani např. jejich hemostatické funkce [61].

V neposlední řadě může být rezoluce trombocytopenie v sepsi/septickém šoku považována za jednu ze známek správně zvolené léčebné strategie a příznivého ovlivnění základního onemocnění [11, 12, 13].

Závěr

Trombocyty tvoří nedílnou součást hemostatického systému nezbytného k udržení homeostázy organismu. Nicméně, jak ukazuje současný výzkum a literatura, jejich funkce zasahují daleko a intenzivně do vrozené i adaptivní imunity a velkou měrou se podílejí na imunitní odpovědi organismu hostitele při invazi patogenů. I když je řada patofyziologických mechanismů, kterými mohou trombocyty iniciovat a modulovat zánětlivou odpověď, známa, je třeba dalšího výzkumu k podrobnému odhalení jejich funkcí a případnému nalezení nových biomarkerů a terapeutických cílů.

Použité zkratky:

JIP	– jednotka intenzivní péče
APACHE II	– acute physiology and chronic health evaluation score
MODS	– multiple organ dysfunction syndrome/score
EC(s)	– endotelální buňka (buňky)
DC(s)	– dendritická buňka (buňky)
PMN	– polymorfonukleáry
APC(s)	– antigen prezentující buňka (buňky)
NET(s)	– neutrophil extracellular trap(s)

PAMP(s)	– pathogen-associated molecular pattern(s)	12. Strauss, R., Wehler, M., Mehler, K. et al. Thrombocytopenia in patients in the medical intensive care unit: bleeding prevalence, transfusion requirements, and outcome. <i>Crit. Care Med.</i> , 2002, 30, p. 1765–1771.
TLR	– Toll-like receptor	13. Akca, S., Haji-Michael, P., de, M. A. et al. Time course of platelet counts in critically ill patients. <i>Crit. Care Med.</i> , 2002, 30, p. 753–756.
TPO	– trombopoetin	14. Francois, B., Trimoreau, F., Vignon, P. et al. Thrombocytopenia in the sepsis syndrome: role of hemophagocytosis and macrophage colony-stimulating factor. <i>Am. J. Med.</i> , 1997, 103, p. 114–120.
EPO	– erythropoetin	15. Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Prescott, S. M. et al. The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. <i>Crit. Care Med.</i> , 2002, 30, p. S294–S301.
G-CSF	– granulocyte-colony stimulating factor	16. Weyrich, A. S., Zimmerman, G. A. Platelets: signaling cells in the immune continuum. <i>Trends Immunol.</i> , 2004, 25, p. 489–495.
M-CSF	– macrophage/monocyte-colony stimulating factor	17. Levi, M., Lowenberg, E. C. Thrombocytopenia in critically ill patients. <i>Semin. Thromb. Hemost.</i> , 2008, 34, p. 417–424.
HLA	– human leukocyte antigen	18. Oppenheim-Eden, A., Glantz, L., Eidelman, L. A. et al. Spontaneous intracerebral hemorrhage in critically ill patients: incidence over six years and associated factors. <i>Intensive Care Med.</i> , 1999, 25, p. 63–67.
IL-1 β	– interleukin-1 β	19. Russwurm, S., Vickers, J., Meier-Hellmann, A. et al. Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. <i>Shock</i> , 2002, 17, p. 263–268.
IL-3	– interleukin-3	20. Levi, M. Platelets in sepsis. <i>Hematology.</i> , 2005, 10 Suppl 1, p. 129–131.
IL-6	– interleukin-6	21. Levi, M. Platelets. <i>Crit. Care Med.</i> , 2005, 33, p. S523–S525.
IL-11	– interleukin-11	22. Zarbock, A., Polanowska-Grabowska, R. K., Ley, K. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. <i>Blood Rev.</i> , 2007, 21, p. 99–111.
TNF- α	– tumor necrosis factor α	23. von, H. P., Weber, C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. <i>Circ. Res.</i> , 2007, 100, p. 27–40.
PAF	– platelet activating factor	24. Semple, J. W., Freedman, J. Platelets and innate immunity. <i>Cell Mol. Life Sci.</i> , 2010, 67, p. 499–511.
VEGF	– vascular endothelial growth factor	25. Fox, J. E. The platelet cytoskeleton. <i>Thromb. Haemost.</i> , 1993, 70, p. 884–893.
PDGF	– platelet-derived growth factor	26. Puccetti, L., Pasqui, A. L., Pastorelli, M. et al. Platelet hyperactivity after statin treatment discontinuation. <i>Thromb. Haemost.</i> , 2003, 90, p. 476–482.
GP	– glykoprotein	27. Yaguchi, A., Lobo, F. L., Vincent, J. L. et al. Platelet function in sepsis. <i>J. Thromb. Haemost.</i> , 2004, 2, p. 2096–2102.
PSGL-1	– P-selectin glycoprotein ligand-1	28. Weyrich, A. S., Schwartz, H., Kraiss, L. W. et al. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. <i>J. Thromb. Haemost.</i> , 2009, 7, p. 241–246.
RANTES	– regulated on activation normal T-cell expressed and secreted	29. van der, F. M., van Leeuwen, H. J., van Kessel, K. P. et al. Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. <i>Shock</i> , 2005, 23, p. 35–38.
vWF	– von Willebrandův faktor	30. Yano, K., Liaw, P. C., Mullington, J. M. et al. Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. <i>J. Exp. Med.</i> , 2006, 203, p. 1447–1458.
LDL	– low-density lipoprotein	31. Annane, D., Bellissant, E., Cavillon, J. M. Septic shock. <i>Lancet</i> , 2005, 365, p. 63–78.
ADP	– adenindifosfát	32. Tsiotou, A. G., Sakorafas, G. H., Anagnostopoulos, G. et al. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. <i>Med. Sci. Monit.</i> , 2005, 11, p. RA76–RA85.
TXA2	– tromboxan A2	33. Brown, K. A., Brain, S. D., Pearson, J. D. et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. <i>Lancet</i> , 2006, 368, p. 157–169.
TF	– tissue factor	34. Elzey, B. D., Tian, J., Jensen, R. J. et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. <i>Immunity</i> , 2003, 19, p. 9–19.
LPS	– lipopolysacharid	35. Annane, D., Bellissant, E., Cavillon, J. M. Septic shock. <i>Lancet</i> , 2005, 365, p. 63–78.
ICAM-1	– intercellular adhesion molekule-1	36. Matsuda, N., Hattori, Y. Systemic inflammatory response
ICAM-2	– intercellular adhesion molekule-2	
VCAM-1	– vascular-cell adhesion molekule-1	
LFA-1	– lymfocyte function-associated antigen-1	
2-DE	– dvojdimenzionální elektroforéza	

Literatura

- Martin, G. S., Mannino, D. M., Eaton, S. et al.** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348, p. 1546–1554.
- Annane, D., Bellissant, E., Cavillon, J. M.** Septic shock. *Lancet*, 2005, 365, p. 63–78.
- Folman, C. C., Linthorst, G. E., van, M. J. et al.** Platelets release thrombopoietin (Tpo) upon activation: another regulatory loop in thrombocytopoiesis? *Thromb. Haemost.*, 2000, 83, p. 923–930.
- Stohlawetz, P., Folman, C. C., von dem Borne, A. E. et al.** Effects of endotoxemia on thrombopoiesis in men. *Thromb. Haemost.*, 1999, 81, p. 613–617.
- Kaushansky, K.** Thrombopoietin. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339, p. 746–754.
- Jurk, K., Kehrel, B. E.** Platelets: physiology and biochemistry. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2005, 31, p. 381–392.
- Smyth, S. S., McEver, R. P., Weyrich, A. S. et al.** Platelet functions beyond hemostasis. *J. Thromb. Haemost.*, 2009, 7, p. 1759–1766.
- Levi, M.** Platelets. *Crit. Care Med.*, 2005, 33, p. S523–S525.
- Levi, M.** Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J. Thromb. Haemost.*, 2004, 2, p. 2094–2095.
- Vincent, J. L., Yaguchi, A., Pradier, O.** Platelet function in sepsis. *Crit. Care Med.*, 2002, 30, p. S313–S317.
- Vanderschueren, S., De, W. A., Malbrain, M. et al.** Thrombocytopenia and prognosis in intensive care. *Crit. Care Med.*, 2000, 28, p. 1871–1876.

- syndrome (SIRS): molecular pathophysiology and gene therapy. *J. Pharmacol. Sci.*, 2006, 101, p. 189–198.
37. **McGettrick, A. F., O'Neill, L. A.** Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *Br. J. Haematol.*, 2007, 139, p. 185–193.
 38. **Shiraki, R., Inoue, N., Kawasaki, S. et al.** Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thromb. Res.*, 2004, 113, p. 379–385.
 39. **Andonegui, G., Kerfoot, S. M., McNagny, K. et al.** Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood*, 2005, 106, p. 2417–2423.
 40. **Beaulieu, L. M., Freedman, J. E.** The role of inflammation in regulating platelet production and function: Toll-like receptors in platelets and megakaryocytes. *Thromb. Res.*, 2010, 125, p. 205–209.
 41. **Ishii, K. J., Akira, S.** Toll-like Receptors and Sepsis. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 2004, 6, p. 361–366.
 42. **Aslam, R., Speck, E. R., Kim, M. et al.** Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood*, 2006, 107, p. 637–641.
 43. **Alves-Filho, J. C.** Toll-like receptors on platelets: the key for disseminated intravascular coagulation in sepsis? *Thromb. Res.*, 2005, 115, p. 537–538.
 44. **Jayachandran, M., Brunn, G. J., Karnicki, K. et al.** In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. *J. Appl. Physiol.*, 2007, 102, p. 429–433.
 45. **Lewis, J. C., Maldonado, J. E., Mann, K. G.** Phagocytosis in human platelets: localization of acid phosphatase-positive phagosomes following latex uptake. *Blood*, 1976, 47, p. 833–840.
 46. **White, J. G.** Platelets are covercytes, not phagocytes: uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. *Platelets.*, 2005, 16, p. 121–131.
 47. **Diacovo, T. G., deFougerolles, A. R., Bainton, D. F. et al.** A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J. Clin. Invest.*, 1994, 94, p. 1243–1251.
 48. **Peters, M. J., Heyderman, R. S., Hatch, D. J. et al.** Investigation of platelet-neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 1997, 209, p. 125–135.
 49. **Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A. et al.** Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.*, 2007, 13, p. 463–469.
 50. **Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C. et al.** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, 303, p. 1532–1535.
 51. **Ma, A. C., Kubes, P.** Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J. Thromb. Haemost.*, 2008, 6, p. 415–420.
 52. **Inwald, D. P., McDowall, A., Peters, M. J. et al.** CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ. Res.*, 2003, 92, p. 1041–1048.
 53. **Henn, V., Slupsky, J. R., Grafe, M. et al.** CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 1998, 391, p. 591–594.
 54. **Pignatelli, P., Sanguigni, V., Lenti, L. et al.** gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation*, 2004, 110, p. 1326–1329.
 55. **Danese, S., de la, M. C., Reyes, B. M. et al.** Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J. Immunol.*, 2004, 172, p. 2011–2015.
 56. **Elzey, B. D., Tian, J., Jensen, R. J. et al.** Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity.*, 2003, 19, p. 9–19.
 57. **Henn, V., Steinbach, S., Buchner, K. et al.** The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*, 2001, 98, p. 1047–1054.
 58. **Clemetson, K. J.** Platelets and pathogens. *Cell Mol. Life Sci.*, 2010, 67, p. 495–498.
 59. **Yeaman, M. R.** Platelets in defense against bacterial pathogens. *Cell Mol. Life Sci.*, 2010, 67, p. 525–544.
 60. **Yeaman, M. R.** Bacterial-platelet interactions: virulence meets host defense. *Future Microbiol.*, 2010, 5, p. 471–506.
 61. **Kerrigan, S. W., Cox, D.** Platelet-bacterial interactions. *Cell Mol. Life Sci.*, 2010, 67, p. 513–523.
 62. **Peng, J., Gygi, S. P.** Proteomics: the move to mixtures. *J. Mass Spectrom.*, 2001, 36, p. 1083–1091.
 63. **Karvunidis, T., Mares, J., Thongboonkerd, V. et al.** Recent progress of proteomics in critical illness. *Shock*, 2009, 31, p. 545–552.
 64. **Garcia, A., Watson, S. P., Dwek, R. A. et al.** Applying proteomics technology to platelet research. *Mass Spectrom. Rev.*, 2005, 24, p. 918–930.
 65. **Kor, D. J., Gajic, O.** Blood product transfusion in the critical care setting. *Curr. Opin. Crit. Care*, 2010, 16, p. 309–316.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem “MSM 0021620819 Náhrada a podpora funkce některých životně důležitých orgánů“.

Došlo dne 3. 8. 2010

Přijato dne 21. 9. 2010.

Adresy pro korespondenci:
 Prof. MUDr. Martin Matějovič, PhD.
 I. interní klinika FN Plzeň
 Alej Svobody 80
 304 60 Plzeň
 e-mail: matejovic@fnplzen.cz

MUDr. Thomas Karvunidis
 JIP, I. Interní klinika
 Fakultní nemocnice Plzeň
 Alej Svobody 80
 304 60 Plzeň
 e-mail: karvunidist@fnplzen.cz