

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI



AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

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

MUDr. Thomas Karvunidis

Plzeň 2014

Dizertační práce byla vypracována v rámci kombinované formy doktorského studijního programu v oboru vnitřní nemoci na jednotce intenzivní péče I. interní kliniky Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice Plzeň.

Školitel:

Prof. MUDr. Martin Matějovič, PhD., přednosta I. interní kliniky FN Plzeň a LF v Plzni

Autor:

MUDr. Thomas Karvunidis, jednotka intenzivní péče, I. interní klinika FN Plzeň a LF v Plzni

Oponenti:

Doc. MUDr. Miroslav Průcha, PhD.

Alergologie a klinická imunologie, Nemocnice Na Homolce, Praha

Doc. MUDr. Jozef Firment, PhD.

přednosta I. kliniky anesteziologie a intenzivní medicíny Univerzitní nemocnice Louise Pasteura a Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košicích, Slovenská republika

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba dizertační práce před komisí pro obhajobu dizertačních prací studijního programu vnitřní nemoci se koná dne:

Místo obhajoby: LF v Plzni, Šafránkův pavilon, alej Svobody 31, Plzeň

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

Prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.

předseda komise pro obhajobu dizertačních prací v oboru vnitřní nemoci

OBSAH

SOUHRN.....	3
SUMMARY	4
1. ÚVOD A SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	5
1.1. Patofyziologie sepse a MODS.....	5
1.2. Neutrofilů v patofyziologii sepse a MODS.....	6
1.3. Trombocyty v patofyziologii sepse a MODS.....	7
1.4. Endoteliální dysfunkce v sepsi a MODS.....	9
1.5. Alterace mikrocirkulace v sepsi a MODS.....	9
2. PŮVODNÍ PRÁCE	11
2.1. Patofyziologie sepse – imunitní odpověď a její komponenty.....	11
2.2. Proteomika v intenzivní péči.....	11
3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	12
4. STUDIE I: SEPTICKÝ ŠOK A NEUTROPENIE/CYTOPENIE - VLIV NA MIKROCIRKULACI.....	13
4.1. Design studie a soubor nemocných.....	13
4.2. Protokol studie.....	13
4.3. Demografická, (makro)hemodynamická a laboratorní data.....	13
4.4. Metody vyšetřování a analýzy mikrocirkulace.....	13
4.5. Statistická analýza	14
4.6. Výsledky a diskuze	14
5. STUDIE II: ÚLOHA TROMBOCYTŮ V SEPTICKÉM ŠOKU	16
5.1. Design studie a soubor nemocných.....	16
5.2. Protokol studie.....	16
5.3. Demografická, (makro)hemodynamická a laboratorní data.....	16
5.4. Metody analýzy trombocytů průtokovou cytometrií	17
5.5. Agregometrická analýza trombocytů	17
5.6. Proteomická analýza.....	17
5.7. Statistická analýza	18
5.8. Výsledky a diskuze	18
6. STUDIE III: ZMĚNY PLAZMATICKÉHO PROTEOMU V ČASNÉ FÁZI EXPERIMENTÁLNÍHO SEPTICKÉHO ŠOKU.....	20
6.1. Design studie a soubor subjektů	20
6.2. Protokol studie	20
6.3. (Makro)hemodynamická a laboratorní data	20
6.4. Proteomická analýza.....	20
7. STUDIE IV: PROTEOMICKÁ ANALÝZA SPEKTRA BÍLKOVIN ADSORBOVANÝCH NA MEMBRÁNE MIMOTĚLNÍHO SYSTÉMU NÁHRADY FUNKCE JATER.....	22
7.1. Design studie	22
7.2. Protokol studie.....	22
7.3. Proteomická analýza.....	22
7.4. Statistická analýza	22
7.5. Výsledky a diskuze	23
8. ZÁVĚR.....	24
9. LITERATURA	25
PUBLIKACE	30

SOUHRN

Sepse a septický šok se syndromem multiorgánové dysfunkce (MODS) 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 popsat vybrané celulární imunitní mechanismy v patofyziologii sepse, septického šoku a MODS 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. 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 neutrofilové nejsou těmi determinujícími celulárními elementy v tomto patofyziologickém procesu. Dosud nepublikovaným a překvapujícím zjištěním bylo zaznamenáno 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 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 nevyklučuje extranukleární cesty syntézy nových funkčních proteinů s následnými změnami fenotypu trombocytů v sepsi.

Další práce - experimentální studie na velkých savcích (selatech) - literárně poprvé identifikuje pomocí srovnávací proteomické analýzy množství unikátních plazmatických proteinů a popisuje dynamiku změn jejich koncentrací v časně fázi septického šoku.

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

Klíčová slova

Sepse – orgánová dysfunkce - patofyziologie – neutrofilové – trombocyty – mikrocirkulace - proteomika.

SUMMARY

Sepsis and septic shock with multiple organ dysfunction syndrome (MODS) 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 MODS 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. 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) identified a number of unique peptides and described the dynamics of their plasmatic concentrations during an early phase of septic shock. 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.

Keywords

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

1. ÚVOD A SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Sepsis je jedním z nejstarších a nejméně objasněných syndromů v humánní medicíně. Sepsis obecně označujeme život ohrožující stav, který vzniká, pokud odezva organismu na infekci poškozuje vlastní tkáně a orgány [1]. Těžká sepsis je charakterizována přítomností (multi)orgánové dysfunkce (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), septický šok navíc ještě hypotenzi refrakterní k tekutinové resuscitaci a/nebo hyperlaktatemií [2,3]. Kontinuum sepsis – těžká sepsis – septický šok může být důsledkem komunitní či nozokomiální infekce a je desátou nejčastější příčinou smrti všeobecně a nejčastější příčinou smrti na nekoronárních jednotkách intenzivní péče. Incidence sepsis je 50-95 případů na 100000 obyvatel a zvyšuje se přibližně o 10% ročně [4,5].

1.1. Patofyziologie sepsis a MODS

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 exhauci [6]. 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 [7,8]. 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, nozokomiálními infekcemi a v řadě případů až k úmrtí nemocných.

K zachování integrity a homeostázy lidského organismu je nezbytné zabránit invazi patogenů do jeho tkání a orgánů a následnému rozšíření do celého organismu. K tomuto účelu slouží bariérový a imunitní systém organismu. Zahrnují veškeré epiteliální bariéry a komponenty vrozené i získané imunitní odpovědi hostitele [9]. Povrchové struktury všech patogenů obsahují limitovaný počet unikátních a u vyšších živočichů se nevyskytujících molekul – tzv. patogen-associated molecular patterns (PAMP). Rozpoznáním těchto specifických antigenních domén pomocí specifických receptorů (pattern recognition receptor, PRR) je zahájena divergentní kaskáda intra- a intercelulární signalizace vedoucí k produkci prozánětlivých a protizánětlivých působků, adhezivních molekul, strukturálních molekul aj. – v rámci komplexní zánětlivé odpovědi organismu [10,11]. Obdobnými „alarmními“ aktivujícími imunitní systém jsou skupiny „endogenních“

specifických molekul uvolňovaných při tkáňovém poškození – tzv. damage-associated molecular patterns (DAMP). Uvolnění významného množství DAMP do cirkulace vede k zánětlivé odpovědi klinicky neodlišitelné od reakce na infekční agens [12]. 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 [13]. Alterace prozánětlivých a protizánětlivých mechanismů cestou indukované genové exprese je simultánní již v samotném úvodu systémové infekce. Rozdíly v aktivacích těchto genů mezi přeživšími a nepřeživšími nemocnými jsou kvantitativní, nikoliv kvalitativní. Spontánní úprava, 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 [8,14]. Detekce změn genových expresí umožňuje časné odlišení sepse od neinfekčního SIRS [8,15,16,17]. Tato možnost včasného rozpoznání infekční etiologie není samoučelná, jelikož smrtnost sepse je v porovnání s neinfekčním systémovým zánětem téměř dvojnásobná [18].

1.2. Neutrofilů v patofyziologii sepse a MODS

Nedílnou součástí imunitní odpovědi organismu jsou neutrofilní granulocyty. Jejich počet bývá v průběhu systémové infekce zpravidla 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 spojována s vyšší incidencí infekčních komplikací, komplikovaným a protrahovaným průběhem stonání a horší prognózou [19,20,21]. 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 [22].

Podstatným jevem v kontrole infekce je kumulace imunokompetentních buněk v místě zánětu. Vazba neutrofilů k vaskulárnímu endotelu je zprostředkována a kontrolována sekvenční aktivitou adhezivních molekul, které jsou v excesivní míře exprimovány na jejich povrchu po jejich aktivaci prozánětlivými signály. Tyto adhezivní molekuly interagují se svými specifickými protějšky – ligandy – na povrchu endoteliálních buněk, umožňují intercelulární signalizaci a aktivaci endoteliálních buněk. V plicní vaskulatuře mohou neutrofilů 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 adhezi neutrofilů nepřímě poškození okolních tkání („collateral damage“) okluzí mikrovaskulatury s hypoperfuzí/hypoxií příslušné oblasti a současně indukují 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-reperfuční dysfunkce mikrocirkulace a poškození tkání dokládá řada studií [23,24,25]. 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 [26,27].

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 studie, která je součástí této dizertační práce [Karvunidis et al., Intensive Care Med 2012].

1.3. Trombocyty v patofyziologii sepse a MODS

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 neutrofilie a/nebo monocyty/makrofágy, destičky exprimují PRR pro PAMP a DAMP, jsou schopny ingesce a destrukce invadujících patogenů, produkují a secernují celou řadu působků umožňující intercelulární signalizaci. Funkční povrchové PRR umožňují vazbu trombocytů na invadující patogeny, jejich části či produkty [28]. Aktivované trombocyty také exprimují na svém povrchu řadu adhezivních molekul sloužících k mezibuněčnému kontaktu a signalizaci. Jednou z nich je i P-selektin (CD62p), který hraje esenciální roli v interakci trombocytů s leukocyty a endotelem. Tímto mechanismem je zprostředkována přímá vazba destiček s dalšími imunokompetentními elementy a jejich imobilizace a akumulace na povrchu endotelu v místě invaze patogenů či porušení cévní stěny [29].

Aktivované neutrofilie navázané na trombocyty uvolňují do cirkulace řadu biologicky aktivních molekul a navíc i DNA a dohromady vytváří tzv. neutrofilní extracelulární pasti (neutrophil extracellular trap, NET) [30,31]. Tato vazba neutrofilů/NET a destiček, propojující procesy inflamace a trombózy/hemostázy se je velmi důležitá k efektivní fagocytóze, destrukci a eliminaci patogenů [32,33,34]. 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.

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) [28,35].

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 [36].

Odmyslíme-li si slabinu většiny klinických studií septických nemocných, kterou je extrémní heterogenita souboru nemocných daná samotnou povahou kontinua systémová 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 kompartmentu 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 [37,38,39,40].

Se snahou o detailnější pohled na nehemostatické funkce trombocytů a popis jejich dynamických změn v časné 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*].

1.4. Endoteliální dysfunkce v sepsi a MODS

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

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 [41,42].

V sepsi dochází k morfologickým změnám v endoteliální vrstvě – rozvolnění pevného spojení endotelu s bazální membránou a subendoteliálnímu prosáknutí/edému [41,42,43]. Současně dochází k apoptóze endoteliálních buněk cestou aktivace kaspáz [44]. Všechny tyto změny vedoucí k porušení integrity souvislé vrstvy glykokalyxu a endotelu umožňují průnik imunokompetentních buněk, zánětlivých cytokinů a plazmy do intersticia již v prvních šesti hodinách po iniciálním inzultu [45].

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 [46].

1.5. Alterace mikrocirkulace v sepsi a MODS

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.

Porucha mikrocirkulace, jež je spolu s endoteliální dysfunkcí a deregulací celulárních i humorálních imunitních funkcí součástí bludného kruhu, je jedním z centrálních patofyziologických mechanismů sepse [47,48,49,50]. Typickým nálezem v sepsi je heterogenita perfúze cév na úrovni mikrocirkulace. Existence míst s poruchou krevního průtoku díky heterogenitě krevního průtoku a tedy i zásobením O_2 - tkáňová dysoxie - s navazující mitochondriální dysfunkcí a poruchou extrakce O_2 [51,52] ústí v poškození tkání. Dochází k němu i navzdory zvýšenému srdečnímu výdeji a DO_2 , které zpravidla ve většině případů provází sepsi/septický šok [49,53].

Heterogenní krevní perfúze způsobuje mnohem významnější alteraci tkáňové oxygenace než homogenně/globálně snížená [54].

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 [55,56].

2. PŮVODNÍ PRÁCE

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

2.1. 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, kap. 4.).

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, kap. 5.).

2.2. 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, kap. 6.)

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, kap. 6.)

3. 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.

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

4.1. 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.

4.2. 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).

4.3. 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.

4.4. 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). 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 a získány stabilní videosekvence k hodnocení mikrocirkulace. Kvantitativní analýza spočívala ve stanovení celkové hustoty cév na dané ploše (total vessel density – TVD). 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: $100 \times (\text{celkový počet cév} - [\text{cévy bez perfúze} + \text{cévy s intermitentním průtokem}]) / \text{celkový počet cév}$. 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) [57,58,59]. Parametry TVD, PPV, PVD a MFI byly vypočteny ve všech pěti lokalitách u každého jedince a následně průměrovány.

4.5. Statistická analýza

Získaná data byla softwarově statisticky zpracována. Všechna data jsou prezentována jako mediány s interkvartilovým rozpětím (interquartile range, IQR) pokud není uvedeno jinak. 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 $p < 0,05$.

4.6. Výsledky a diskuze

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. 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).

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 sekvestrovaných v mikrocirkulaci. Svoji roli jistě mohou sehrávat i další imunokompetentní elementy jako NK-buňky a/nebo dendritické buňky a samozřejmě i trombocyty [29, 60,61]. Nezanedbatelný vliv může mít také poškození endotelu chemoterapií [62,63].

Zajímavá a opět překvapující data přinesla i analýza období reparace změn mikrocirkulace. Zlepšení perfúze bylo signifikantně lepší ve skupině NSS než u septických nemocných s normálním počtem neutrofilů. Zde 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. 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 vypořádat.

I přes menší počet jedinců ve studovaných vzorcích populace tato studie prokazuje, že ani těžká postchemoterapeutická cytopenie nemodifikuje poruchu mikrocirkulace v septickém šoku. Obecné mechanismy a klinický význam postižení mikrovaskulatury v souvislosti s myeloablativní terapií nejsou zjevné a vybízejí k navazujícímu výzkumu.

5. STUDIE II: ÚLOHA TROMBOCYTŮ V SEPTICKÉM ŠOKU

5.1. 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) [64].

5.2. 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 iniciální 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. 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).

5.3. 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). Doplňujícími byly informace o užití a dávce vazoaktivních a inotropních léků a analgesedace.

5.4. 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), 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. Ke stanovení byly použity komerční kity reagentů 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).

5.5. Agregometrická analýza trombocytů

Dynamickým funkčním testem použitým v této studii bylo vyšetření agregace trombocytů – agregometrie. Vzorky plné krve odebrané v TP1 a TP2 odběrovým systémem s hirudinem byly bezprostředně po odběru vyšetřeny metodou impedanční agregometrie (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).

5.6. Proteomická analýza

Vlastní proteomická analýza použitá v této studii se skládala z několika kroků [65,66,67]. 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 koncentráту trombocytů, již bylo dosaženo další centrifugací a ošetřením chladem a etanolem. Získané purifikované precipitované destičkové proteiny byly následně separovány dvourozměrnou elektroforézou (2-DE) a vybrané proteiny (rozdílná exprese v septickém šoku a po rezoluci systémové infekce) poté z gelu mobilizovány (in-gel tryptic digestion) [66]. 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.

5.7. Statistická analýza

Dosud získaná data byla softwarově statisticky zpracována. Všechna data jsou prezentována jako mediány s interkvartilovým rozpětím (interquartile range, IQR) pokud není uvedeno jinak. 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 $p < 0,05$.

5.8. Výsledky a diskuze

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). Data získaná flowcytometrickou analýzou povrchových/membránových markerů aktivace trombocytů ukazují a potvrzují přítomnost aktivovaných destiček v iniciální fázi septického šoku (TP 1) napříč všemi třemi studijními podskupinami. 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. Sekreční schopnost trombocytů charakterizovaná plazmatickými hladinami růstových faktorů VEGF a PDGF je v septickém stavu obdobně jako výše diskutovaná agregační schopnost významně snížena.

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. Právě tyto změny ve složení proteinů mohou být identifikovány v současné době probíhající proteomickou analýzou studovaných dvou funkčních stavů trombocytů.

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. 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

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

6.1. Design studie a soubor subjektů

Tato experimentální studie byla provedena jako monocentrická prospektivní na zavedeném klinicky relevantním zvířecím modelu septického šoku selete [68,69,70].

6.2. 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 autogenní 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 usmrcením zvířat intravenózní aplikací koncentrovaného roztoku KCl za hluboké celkové anestezie.

6.3. (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.

6.4. 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/>) [71,72].

6.5. 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 $p < 0,05$.

6.6. Výsledky a diskuze

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. 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. 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. 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.

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

7.1. 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.

7.2. Protokol studie

Pacient byl léčen pomocí přístroje pro mimosétní náhradu funkce jater (Fractioned Plasma Separation, Adsorption and Dialysis - Prometheus™, FPSA, 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). 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.

7.3. Proteomická analýza

Eluáty obou kolon (P1 a P2) byly purifikovány a dialyzovány, rozděleny do tří alikvot a obsažené proteiny následně separovány 2D elektroforézou. 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. 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. Byly srovnávány relativní hustoty 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. Získaná hrubá data byla shromážděna a analyzována softwarově. Z nich byla provedena identifikace proteinů porovnáním s databází humánních bílkovin (Swiss-Prot protein database, release 54.6, 4.12.2007).

7.4. Statistická analýza

Data byla softwarově zpracována 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. Hladina statistické významnosti byla stanovena na hodnotu $p < 0,05$.

7.5. Výsledky a diskuze

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). 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. Třicet unikátních proteinů bylo výsledkem MS analýzy 113 a následně identifikovaných 93 bílkovin.

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.

8. 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 postižení 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.

9. LITERATURA

1. Vincent JL, et al. Sepsis definitions: time for change. *Lancet*. 2013;381(9868):774–775
2. 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
3. Angus D, et al. Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2013;369(9):840-851
4. 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
5. Annane D, et al. Septic shock. *Lancet*. 2005;365(9453):63-78
6. 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
7. Monneret G, et al. Persisting low monocyte human leukocyte-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006;32(8):1175-1183
8. Xiao W, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med*. 2011;208(13):2581-2590
9. Littman DR, et al. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*. 2010;140(9):845-858
10. Netea MG, et al. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N Engl J Med*. 2011;364(1):60-70
11. Larosa SP, et al. Immune aspects of sepsis and hope for new therapeutics. *Curr Infect Dis Rep*. 2012;14(5):474-483
12. Cinel I, et al. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med*. 2009;37(1):291-304
13. 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
14. Calvano SE, et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*. 2005;437(7061):1032-1037
15. Prucha M, et al. Expression profiling: toward an application in sepsis diagnostics. *Shock*. 2004;22(1):29-33

16. Johnson SB, et al. Gene expression profiles differentiate between sterile SIRS and early sepsis. *Ann Surg.* 2007;245(4):611-621
17. Tang BM, et al. Gene-expression profiling of peripheral blood mononuclear cells in sepsis. *Crit Care Med.* 2009;37(3):882-888
18. 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
19. 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
20. Kuderer NM, et al. Mortality, morbidity, and cost associated with febrile neutropenia in adult cancer patients. *Cancer.* 2006;106(10):2258-2266
21. Ramzi J, et al. Predictive factors of septic shock and mortality in neutropenic patients. *Hematology.* 2007;12(6):543-548
22. 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
23. Fondevila C, et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Exp Mol Pathol.* 2003;74(2):86-93
24. Buras JA, et al., Endothelial-neutrophil interactions during ischemia and reperfusion injury: basic mechanisms of hyperbaric oxygen. *Neurol Res.* 2007;29(2):127-131
25. Yilmaz G, et al. Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. *Neuromolecular Med.* 2010;12(2):193-204
26. 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
27. Hoesel LM, et al. Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock.* 2005;24(1):40-47
28. Semple JW, et al. Platelets and the immune continuum. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(4):264-274

29. Zarbock A, et al. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Rev.* 2007;21(2):99-111
30. Brinkmann V, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535
31. Ma AC et al. Platelets, neutrophils, and neutrophil extracellular traps (NETs) in sepsis. *J Thromb Haemost.* 2008;6(3):415-420
32. Manfredi AA, et al. Dangerous connections: neutrophils and the phagocytic clearance of activated platelets. *Curr Opin Hematol.* 2010;17(1):3-8
33. 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
34. Fuchs TA, et al. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1777-1783
35. Garraud O, et al., Pathogen sensing, subsequent signalling, and signalosome in human platelets. *Thromb Res.* 2011;127(4):283-286
36. Yaguchi A, et al., Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost.* 2004;2(12):2096-2102
37. Maguire J, et al. Platelet proteomics. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1593-1601
38. Maguire PB, et al. Application of proteomics to the study of platelet regulatory mechanisms. *Trends Cardiovas.* 2004;14(6):207-220
39. Gnatenko DV, et al. Proteomic approaches to dissect platelet function: Half the story. *Blood.* 2006;108(13):3983-3991
40. Garcia A, et al. Applying proteomics technology to platelet research. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24(6):918-930
41. 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
42. Lee WL, et al. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections. *Curr Opin Hematol.* 2011;18(3):191-196
43. 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

44. Hu H, et al. Calpain-1 induces apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells under septic conditions. *Microvasc Res.* 2009;78(1):33-39
45. 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
46. Shapiro NI, et al. The Association of endothelial cell signalling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Crit Care.* 2010;14(5):R182
47. 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
48. 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
49. Spronk PE, et al. Bench-to-bedside review: sepsis a disease of the microcirculation. *Crit Care.* 2004;8(6):462-468
50. Ince C, et al. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care.* 2005;9(4):S13-19
51. Fink M, et al. Cytopathic hypoxia in sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 1997;110:87-95
52. Ince C, et al. Microcirculation in distress: a new resuscitation end point? *Crit Care Med.* 2000;32(9):1963-1964
53. Donati A, et al. From macrohemodynamic to the microcirculation. *Crit Care Res Pract.* 2013;2013:892710
54. 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
55. 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
56. 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
57. 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
58. De Backer D, et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care.* 2007;11(5):R101

59. Trzeciak S, et al. Early microcirculatory perfusion derangement in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med.* 2007; 49(1):88-98
60. Leung B, et al. NKT cells in sepsis. *Clin Dev Immunol.* 2010;ID414650
61. Karvunidis T, et al. Trombocyt v sepsi. *Anest Intenziv Med.* 2013; 24(64):250-263
62. 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
63. Senkus E, et al. Cardiovascular effects of systemic cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(4):300-311
64. 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
65. Zellner M, et al. Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis.* 2005;26(12):2481-2489
66. Shevchenko A, et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protocols.* 2006;1(6):2856-2860
67. 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
68. Chvojka J, et al. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. *Crit Care.* 2008;12(6):R164
69. Sýkora R, et al. High versus standard-volume haemofiltration in hyperdynamic porcine peritonitis: effects beyond haemodynamics? *Intensive Care Med.* 2009;35(2):371-380
70. Benes J, et al. Searching for mechanisms that matter in early septic acute kidney injury: an experimental study. *Crit Care.* 2011;15(5)R256
71. Karp PD, et al. Pathway databases: a case study in computational symbolic theories. *Science.* 2001;293(5537):2040-2044
72. Karp PD, et al. The Pathway Tools software. *Bioinformatics.* 2002;18(Suppl. 1):S225-232

PUBLIKACE

Originální práce v časopisech s IF, které jsou součástí dizertační práce

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

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

Recent progress of proteomics in critical illness.

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

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

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

Práce v recenzovaných časopisech bez IF, které jsou součástí dizertační práce

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

Trombocyty v sepsi.

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

Originální 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, Sykora 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, Raděj 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.

Vnitř 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.

Vnitř 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.

Vnitř 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