

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

AKUTNÍ POŠKOZENÍ LEDVIN U KRITICKY NEMOCNÝCH:  
EXPERIMENTÁLNÍ A KLINICKÉ PŘÍSTUPY

Dizertační práce

Lenka Valešová



Plzeň 2016

## ABSTRAKT

Akutní poškození ledvin (AKI) je syndromem zatíženým vysokou morbiditou a mortalitou, postihujícím více než třetinu pacientů na jednotkách intenzivní péče, a jeho incidence nadále stoupá. Až polovina případů je zapříčiněna sepsí. I přes narůstající poznatky o patofyziologických mechanismech rozvoje renální dysfunkce v sepsi nedosahuje naše současné porozumění úrovně, ze které bychom se odrazili k definování a zavedení úspěšné cílené prevence a léčby AKI v sepsi. Prvním cílem naší práce tak bylo rozšířit tyto poznatky s využitím klinicky relevantního velkého zvířecího modelu a moderních metod molekulární biologie - genomiky a proteomiky.

Acidóza představuje obvyklou poruchu acidobazické rovnováhy u kriticky nemocných. Její role je ale kontroverzní. Dosud není známo, zda je markerem tíže základního onemocnění nebo sama o sobě přitěžujícím patofyziologickým mechanismem. Množí se také poznatky poukazující na možný protektivní vliv acidózy ve stresových podmínkách utlumením buněčné energetiky a snížením nároků tkání na kyslík. Vytyčili jsme si za cíl zkoumat účinky různých typů acidózy na mnoha fyziologických úrovních zdravého zvířecího organismu s důrazem na komplexní výzkum jejich vlivu na ledviny v rámci pátrání po nových ochranných a léčebných modalitách AKI, z nichž jednu by permissivní acidóza teoreticky mohla představovat.

**Klíčová slova:** Akutní poškození ledvin - sepsis – acidóza – mitochondrie

## ABSTRACT

Acute kidney injury (AKI) complicates more than one third of intensive care unit admissions and is burdened by high morbidity and mortality of affected patients, with incidence steadily rising. Sepsis is the leading cause of AKI in critically ill. Despite growing insights into the pathogenesis of sepsis-induced AKI, we are so far not able to define successful AKI prevention and treatment. We aimed at assessing molecular mechanisms of sepsis-induced AKI using clinically relevant large animal model of sepsis and implementing new techniques of molecular biology- genomics and proteomics.

Although acidosis is a common acid base disorder in critically ill, its role remains controversial. It is unknown whether acidosis is a marker of disease severity or is directly implicated in pathogenesis of acute organ dysfunction states. Its protective role is discussed with growing evidence of acidosis induced cellular energetics downregulation and reduced oxygen demand in stress conditions. We aimed to evaluate physiological effects of different types of acidosis on healthy organism on systemic and regional level, including a complex research of its effects on kidney to search for new AKI preventive and treatment modalities, which permissive acidosis could represent.

**Key words:** Acute kidney injury – sepsis – acidosis - mitochondria

Prohlašuji, že svojí dizertační práci jsem vypracovala samostatně. Literaturu a další prameny, z nichž jsem při přípravě čerpala, řádně cituji a dále uvádím v seznamu literatury. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím se zapůjčováním této práce.

Lenka Valešová

Datum:

Podpis: Lenka Valešová

## Použité zkratky

<b>ABR</b>	acidobazická rovnováha
<b>AGTR2</b>	angiotenzin II receptor type 2, receptor pro angiotenzin II typu 2
<b>AKI</b>	acute kidney injury, akutní poškození ledvin
<b>ALI</b>	acute lung injury, akutní poškození plic
<b>ATP</b>	adenosin trifosfát
<b>CASP3</b>	caspase 3, kaspáza 3
<b>Cl<sup>-</sup></b>	chloridový iont
<b>CO<sub>2</sub></b>	oxid uhličitý
<b>DAMPs</b>	danger - associated molecular patterns, alarminy, molekulární motivy spojené s poškozením tkání
<b>eNOS</b>	endothel derived NO synthasis, endotelová NO syntáza
<b>GFR</b>	glomerular filtration rate, glomerulární filtrace
<b>HCA</b>	hyperkapnická acidóza
<b>ICAM-1</b>	Intercellular Adhesion Molecule 1, mezibuněčná adhezní molekula 1
<b>IL-1- β</b>	interleukin 1 beta
<b>IL-6</b>	interleukin 6
<b>IL-8</b>	interleukin 8
<b>iNOS</b>	inducible NO synthasis, inducibilní NO syntáza
<b>JIP</b>	jednotka intenzivní péče
<b>K<sup>+</sup></b>	draslíkový iont
<b>LPS</b>	lipopolysacharid
<b>MAC</b>	metabolická acidóza
<b>MAP</b>	mean arterial pressure, střední arteriální tlak
<b>MODS</b>	multiple organ dysfunction syndrome, syndrom multiorgánové dysfunkce
<b>Na<sup>+</sup></b>	sodíkový iont
<b>NADH</b>	nikotinamid adenin dinukleotid
<b>NF-κB</b>	nukleární faktor kappa B
<b>NHE-RF3</b>	regulační kofaktor Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> výměníku

<b>NO</b>	nitric oxide, oxid dusnatý
<b>NOD-like receptor</b>	nucleotide- binding oligomerization domain-like receptor, cytoplazmatický receptor PAMPs a DAMPs
<b>PAMPs</b>	patogen - associated molecular patterns, molekulární motivy patogenů
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	peroxisome proliferator- activated receptor gamma, Coactivator 1 alpha
<b>PGHS -2</b>	cyklooxygenaza 2
<b>pO<sub>2</sub></b>	parciální tlak kyslíku
<b>PRRs</b>	pattern recognition receptors, receptory rozpoznávající molekulární motivy patogenů
<b>RBF</b>	renal blood flow, průtok krve renální tepnou
<b>RIG-1-like receptor</b>	retinoic acid inducible gene 1-like receptor, cytoplazmatický receptor PAMPs a DAMPs
<b>RVR</b>	renal vascular resistance, renální cévní rezistence
<b>S-AKI</b>	sepsis-induced AKI, septické akutní poškození ledvin
<b>TLR</b>	Toll – like receptor, membránový receptor PAMPs a DAMPs
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor alfa

## OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	PŮVODNÍ PRÁCE.....	9
	2.1 Původní vědecké práce.....	9
	2.2 Původní přehledové práce.....	9
	2.3 Práce přímo navazující na danou problematiku.....	10
3	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....	11
	3.1 Akutní poškození ledvin u kriticky nemocných.....	11
	3.1.1. Patofyziologie AKI v sepsi.....	12
	3.2. Role acidózy u kriticky nemocných.....	17
4	LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY STUDIÍ.....	20
5	CÍLE PRÁCE.....	21
6	METODIKA.....	21
	6.1 Protokol studií sepsí indukovaného akutního poškození ledvin.....	22
	6.2 Potokol studie o vlivu acidózy na zdravý zvířecí organismus.....	23
7	SOUHRN VÝSLEDKŮ STUDIÍ A DISKUZE.....	24
	7.1 Proteom ledvin v průběhu sepse a operačního výkonu (studie I).....	24
	7.2 Genová exprese ledvin v sepsi – kdo vyvine S-AKI? (studie II).....	26
	7.3 Kardiovaskulární efekt akutní acidózy v organismu (studie III).....	28
	7.4 Vliv akutní acidózy na hemodynamiku a tkáňovou energetiku ledvin (studie IV).....	29
8	ZÁVĚR.....	30
9	PODPORA.....	31
10	PODĚKOVÁNÍ.....	31
11	POUŽITÁ LITERATURA.....	32
12	PŘÍLOHY – PUBLIKOVANÉ PRÁCE.....	42

## 1 ÚVOD

Ledviny kriticky nemocných jsou orgánem značně citlivým, v podmínkách intenzivní péče se stávají obětí rozličných a často závažných inzultů. Akutní poškození ledvin (AKI, acute kidney injury) postihuje až 36% pacientů přijatých na jednotku intenzivní péče (JIP) (Osterman et al., 2007). Jeho incidence stoupá se vzrůstajícím věkem, závažnými komorbiditami a pravděpodobně i genetickou predispozicí pacientů kriticky nemocných. Již minimální vzestup sérové hladiny kreatininu je asociován se zvýšením morbidity a mortality (Coca et al., 2007, Mehta et al 2007) nezávisle na základním onemocnění. Syndrom AKI se tak dlouhodobě řadí do popředí zájmu intenzivistů. Až recentně byla ale do klinické praxe zavedena jednotná klasifikace renální dysfunkce AKIN (Acute Kidney Injury Network, expertní pracovní skupina nefrologů a intenzivistů), která na základě vzestupu sérového kreatininu a/nebo poklesu diurézy přesně definuje 3 stadia AKI a tak konečně přinesla možnost kvalitních epidemiologických studií v populaci kriticky nemocných.

AKI u kriticky nemocných je velmi často multifaktoriální etiologie. Roli hrají faktory typu kardiogenního šoku, hypovolemie, nefrotoxicých farmak či velké (kardio)chirurgické výkony, známa je interakce s dalšími životně důležitými orgány, jejichž dysfunkce může způsobit poruchu funkce ledvin (syndrom hepato-renální, kardio-renální, difuzní alveolární poškození může vyvolat AKI). Sepse a septický šok je ale zdaleka nejčastější příčinou AKI na JIP (až 50% případů) (Schrier et al. 2004, Parmar et al. 2009). Incidence AKI s tíží sepse roste, postihuje 19% pacientů v sepsi, 23% pacientů v těžké sepsi, 51- 64% pacientů v septickém šoku. Ukazuje se navíc, že nejen sepsa je příčinou AKI, ale i AKI predisponuje k rozvoji sepse. AKI samo o sobě je závažným prediktorem morbidity a mortality, AKI asociované se sepsí má prognózu ještě nepříznivější (Matějovič et al. 2011).

Sepsa představuje celosvětově významný medicínský a socioekonomický problém, je v současnosti 10. nejčastější příčinou úmrtí a její incidence trvale narůstá. Je charakterizována deregulovanou systémovou odpovědí na infekční inzult iniciovanou interakcí bakteriálních faktorů s imunokompetentními buňkami organismu. Aktivují se prozánětlivé a protizánětlivé mechanismy ústící v nadprodukcii širokého spektra cytokinů, mediátorů a kyslíkových a dusíkatých radikálů působících na úrovni systémové a regionální cirkulace až po mikrocirkulaci, ovlivňujících cévní endotel a koagulační systém. Na úrovni celulární a molekulární tyto působky interferují s apoptózou a buněčnou energetikou, potažmo tedy s funkcí mitochondrie. Výsledkem je dysfunkce orgánů nezávisle na lokalizaci primárního infekčního fokusu. Klinicky pak hovoříme o syndromu multiorgánové dysfunkce (MODS, multiple organ dysfunction syndrome), kdy incidence dysfunkce jednoho, dvou, tří a čtyř orgánů u septických pacientů osciluje okolo 74 %, 21 %, 5 % a 1 % s průměrně vzrůstající mortalitou 21 %, 44 %, 65 % a 76 % (Vincent et al. 2006). V jeho rámci se AKI rozvíjí a obvykle se manifestuje jako první z orgánových dysfunkcí (Tran et al. 1993). Pro klinika je zásadní rozpoznat sepsi jako příčinu AKI,

protože patofyziologicky se zřejmě významně liší od dalších jeho typů, je zatíženo rozdílnou mortalitou a odpovědí na léčebné postupy (Uchino et al. 2005).

AKI v sepsi představuje závažné úskalí z hlediska preventivního i léčebného. Dosud totiž nejsme schopni definovat kauzální léčbu AKI, přestože se naše znalosti o patofyziologických mechanismech podílejících se na jeho vzniku rozšiřují. Poměrně detailně lze popsat změny systémové i regionální hemodynamiky v sepsi a septickém šoku, prohlubují se také poznatky o charakteru mikrocirkulace v těchto podmínkách. Nezbytné je ale ozřejmit patofyziologii dysfunkce jednotlivých buněk s využitím metod molekulární biologie. Není navíc zdaleka jasné, jaké faktory stojí za rozdílnou náchylností nemocných k působení sepse, kdy jen část z nich AKI vyvine. První část dizertační práce jsme proto věnovali modelování AKI v sepsi a pokusili se zkoumat jeho patobiologii pomocí nových metod molekulární biologie, genomiky a proteomiky.

Jedním z důvodů současného neúspěchu ve vývoji léčebných modalit AKI může být fakt, že většina našich poznatků se opírá o zvířecí studie. Mnoho z nich nelze považovat za klinicky relevantní a klinická aplikace jejich výsledků je proto omezená. Studovány jsou heterogenní modely jak z hlediska užitých zvířecích druhů s jejich specifickou odpovědí na infekční inzult, tak z hlediska způsobu indukce sepse či orgánové dysfunkce, léčebných intervencí nebo délky pokusu. Je tedy třeba využívat modely co nejvěrněji napodobující klinickou situaci na zvířatech geneticky a fyziologicky co nejpodobnějších člověku. Ukazuje se, že z hlediska genomiky a translační proteomiky je prase jedním z nejvhodnějších kandidátů. V kontextu našich předchozích poznatků o chování tohoto zvířecího druhu v sepsi a z hlediska fyziognomie a relativně dobré přístupnosti k extenzivnímu pozorování patofyziologických dějů na mnoha úrovních organismu je proto v našem experimentu využíváme.

Druhá část dizertační práce se pak věnuje potenciálnímu protektivnímu vlivu acidózy, obligátnímu fenoménu doprovázející kritické onemocnění, na ledviny. Vycházeli jsme přitom z hypotézy formulované francouzským profesorem Xavierem Levervem o možném tlumivém vlivu acidózy na buněčnou energetiku a tím snížení nároku tkání na kyslík, jež by mohlo být výhodné v kritickém onemocnění, a uvažovali jsme tedy o acidóze ne jako o přitěžujícím patofyziologickém mechanismu, nýbrž jako o fyziologické adaptaci na závažný inzult.



## 2 PŮVODNÍ PRÁCE

Tato dizertační práce je koncipována jako komentovaný soubor níže uvedených původních experimentálních prací a souhrnných článků, které jsou v dalším textu označeny příslušnými římskými číslicemi.

### 2.1 Původní vědecké práce

- I. Matejovic M, Tuma Z, Moravec J, Valesova L, Sykora R, Chvojka J, Benes J, Mares J: Renal proteomic responses to severe sepsis and surgical trauma: dynamic analysis of porcine tissue biopsies. *Shock* 2016. [Epub ahead of print]. IF 3.045
- II. Matejovic M, Ledvinova L, Benes J, Sykora R, Hrstka R, Chvojka J: Molecular differences in susceptibility of the kidney to sepsis- induced kidney injury. *BMC Nephrol* 201m. *Manuscript submitted*. IF 1.690
- III. Stengl M\*, Ledvinova L\*, Chvojka J, Benes J, Jarkovska D, Holas J, Soukup P, Svirglerova J, Matejovic M: Effects of clinically relevant acute hypercapnic and metabolic acidosis on the cardiovascular system: an experimental porcine study. *Crit Care* 2013. 17:R303. IF 4.476

\*Equal contributors.

- IV. Valešová L, Chvojka J, Beneš J, Sýkora R, Matějovič M: Kidney in acidosis – a complex experimental study. *Manuskript v přípravě*.

### 2.2 Původní přehledové práce

- V. Matejovic M, Chvojka J, Radej J, Ledvinova L, Karvunidis T, Krouzecky A, Novak I: Dying "of" or "with" AKI: sepsis and acute kidney injury are bidirectional. *Contributions to Nephrology* 2011, 174:78-88. IF 1.487
- VI. Matejovic M, Ledvinova L, Danihel V: Kidney attack in sepsis: The role of hemodynamics. *Sepsis Management* 2013, 13(4).
- VII. Danihel V, Ledvinová L, Matějovič M: Akutní selhání ledvin a kardiovaskulární komplikace, *Kardiol Rev* 2012, 14(4): 251-253.
- VIII. Ledvinová L, Danihel M, Matějovič M: Perspektivní přístupy v léčbě sepse založené na principu nových patogenetických poznatků, *Vnitř Lék* 2013, 60(1): 68-72.
- IX. Valešová L, Matějovič M: Role acidózy u kriticky nemocných. *Manuskript před odesláním*.

### **2.3 Práce přímo navazující na danou problematiku**

- X. Jarkovska D, Valesova L, Chvojka J, Benes J, Svirglerova J, Florova B, Nalos L, Matejovic M, Stengl M: Heart rate variability in porcine progressive peritonitis-induced sepsis. *Front. Physiol.* 2016, 6:412. IF 3.534

## 3 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

### 3.1 Akutní poškození ledvin u kriticky nemocných

Etiologie akutního poškození ledvin je klasicky dělena do tří skupin, prerenální, renální a postrenální. U kriticky nemocných je postrenální příčina snadno vylučitelná a okrajová, nejčastější je etiologie multifaktoriální kombinující mechanismy vyvolané systémovou zánětlivou odpovědí, hypovolemií, hypotenzí, toxickými inzulty a rhabdomyolýzou. Nelze opominout ani široké interakce mezi jednotlivými životně důležitými orgány, kdy dysfunkce jednoho z nich může vést k poruše funkce jiného. Známa je interakce kardio-renální, pulmo- renální, hepato- renální, renální dysfunkce ovlivní i nervový a imunitní systém a potencuje systémovou zánětlivou odpověď v sepsi (Li et al. 2009). Interakci ledvin a kardiovaskulárního systému jsme detailně rozebrali v práci Akutní selhání ledvin a kardiovaskulární komplikace (VII), problematice obousměrného vztahu AKI a sepse jsme se věnovali v souhrnném článku Dying "of" or "with" AKI: sepsis and acute kidney injury are bidirectional (V).

Kriticky nemocný na jednotce intenzivní péče je často zatížen rizikovými faktory pro rozvoj AKI. Je pokročilého věku, trpí arteriální hypertenzí, diabetem, chronickou renální dysfunkcí, chronickým srdečním selháním, generalizovanou aterosklerózou, je léčen medikamenty interferujícími s intrarenální vazoregulací typu inhibitoru angiotenzin konvertujícího enzymu nebo blokátoru receptoru pro angiotenzin II či nesteroidními antiflogistiky. Za těchto podmínek může vyvinout AKI i v terénu „normotenze“, nejčastěji ale trpí hemodynamickou nestabilitou s hypoperfúzí a hypovolemií. V souvislosti s rozvojem AKI nelze opomíjet také vliv renálního žilního tlaku. Ten spolu se středním tlakem arteriálním určuje efektivní perfúzní tlak ledvin a je ovlivněn faktory typu žilní kongesce, např. při pravostranném srdečním selhání, nebo nitrobřišní hypertenzí.

Nefrotoxická léčiva přispívají až ke čtvrtině AKI na JIP (Uchino et al. 2005, Mehta et al. 2004) a zhruba pětina ze sta na JIP nejčastěji užívaných léčiv je potenciálně nefrotoxická (Taber et al. 2009). Nelze podceňovat ani škodlivost některých substitučních roztoků, všeobecně dnes akceptujeme renální rizika spojená s podáním koloidních roztoků septickým pacientům, stejně tak velkoobjemová substituce 0,9% chloridem sodným s navazující hyperchloremií představuje riziko rozvoje AKI (Yunos et al. 2012).

Vzhledem k množství příčin nelze patofyziologii AKI definovat jednotně. Patofyziologickým podkladem prerenálního AKI je především ztráta renální autoregulace, tedy schopnosti aferentní a eferentní arterioly glomerulu svou vazodilatací a vazokonstrikcí zajistit konstantní průtok glomerulem a filtrační tlak, ústící v pokles glomerulární filtrace. Akutní poškození ledvin je procesem dynamickým, zahrnuje celé spektrum poruch funkce ledvin od mírného funkčního postižení po letální poškození buněk. Obecně lze říci, že čím déle inzult působí, tím horší poškození nastane. Přetrvávající hypoperfúze ledvin s hypoxií anebo perzistující expozice nefrotoxinům vyvolá buněčnou nekrózu, nejcitlivější jsou (z důvodu své vysoké metabolické aktivity a charakteru intrarenální distribuce perfúze) tubulární buňky v zevní dřeni. Rozvoj nekrózy pak aktivuje inflamatorní kaskádu

s produkcí množství cytokinů, kyslíkových a dusíkových radikálů, aktivací endotelu, koagulace, epitelálních buněk s nadprodukcí adhezních molekul ústící v dysfunkci mikrocirkulace a tkáňovému rekrutmentu aktivovaných zánětlivých buněk, které svou cytokinovou produkcí dále potencují systémovou zánětlivou odpověď i dysfunkci mikrocirkulace, mikrovaskulární trombózu a tkáňovou hypoxii (Amaral et al. 2004). Velmi komplikovanou a dosud nekompletně objasněnou patofyziologií se vyznačuje AKI v sepsi (S-AKI, sepsis associated acute kidney injury). Vzhledem k tomu, že náš výzkum zaměřujeme především směrem S-AKI, diskutujeme jeho problematiku v následující kapitole.

Prevence a léčba AKI se opírá o normalizaci intravaskulárního objemu a perfúzního tlaku, diagnostiku a léčbu příčiny AKI, optimalizaci vnitřního prostředí (v indikovaných případech s využitím náhrady funkce ledvin), a odstranění nefrotoxických inzultů. Hypotenzi a hypovolemii je třeba bezprostředně léčebně postihnout. V tomto kontextu je třeba také uvažovat individuální hemodynamické cíle pro pacienty s rizikovými faktory rozvoje AKI k dosažení efektivního renálního perfúzního tlaku. Kontrolovaná tekutinová resuscitace balancovanými krystaloidními roztoky je indikovaná v časných fázích inzultu, později se ale tekutinové přetížení může stát rizikovým faktorem renální dysfunkce a je asociováno s vyšší mortalitou (Payen et al. 2008). Při indikaci potenciálně nefrotoxických léčiv je třeba zvážit poměr rizika a užitku z jejich podání a zohlednit změněnou farmakokinetiku (adsorpci, distribuci, metabolismus i clearance) plynoucí z orgánových dysfunkcí a náležitě přizpůsobit dávkování. Preventivními a léčebnými opatřeními rozvoje AKI v sepsi je vedle výše uvedeného včasná a adekvátní antibiotická léčba se sanací zdroje infekce. Budoucností léčby sepse jsme se zabývali v souhrnném článku Perspektivní přístupy v léčbě sepse založené na principu nových patogenetických poznatků (VIII).

### *3.1.1 Patofyziologie AKI v sepsi*

Většina současných poznatků o patofyziologii AKI vychází z modelů zvířecích, obvykle časně letálních, hypodynamických či nefrotoxických s akutní tubulární nekrózou jako morfologickým podkladem (Heyman et al. 2002) a nelze je tedy spojovat se sepsí indukovaným AKI v humánní medicíně. Ukazuje se totiž, že histologicky je S-AKI reprezentováno poměrně diskrétními změnami – okrskovým, heterogenním poškozením tubulárních buněk s apikální vakuolizací bez známek tubulární nekrózy nebo extenzivní apoptózy (Rosen et al. 2001). Tyto morfologické změny se vyvíjí při absenci redukce globálního renálního průtoku (Di Giantomasso et al. 2003, Wan et al. 2006) a klinicky jsou charakterizovány poklesem glomerulární filtrace a vzestupem kreatininu. Funkčním podkladem S-AKI je pravděpodobně bioenergetický stres tubulárních epitelálních buněk. Na jeho rozvoji se podílí následující faktory: inflamace (Wang et al. 2012) a oxidační stres, difúzní změny průtoku mikrocirkulací (De Backer et al. 2002) a adaptivní odpověď buněčné energetiky na inzult (Singer et al. 2004). Jejich interakce teoreticky vede ke vzájemné potenciaci. Ústředním orgánem této potenciace je pravděpodobně peritubulární renální mikrocirkulace, jejíž dysfunkce generuje a amplifikuje inflamatorní signál směřující k tubulárním buňkám (Gomez et al. 2015, Zarbock et al. 2014).

## Renální cirkulace v sepsi

Renální hemodynamice při S-AKI jsme se věnovali v práci *Kidney attack in sepsis: The role of hemodynamics (VI)*.

Pokles globálního renálního průtoku (RBF, renal blood flow) jako výhradního strůjce S-AKI dnes již nelze akceptovat absolutně. AKI se v sepsi vyvine za stavů se sníženým, normálním, ale i zvýšeným globálním průtokem ledvinou (Di Giantomaso et al. 2003, Chvojka et al. 2008). Neúspěch vazodilatační léčby u pacientů se S-AKI (Kellum 2011) proto může tkvět právě ve variabilitě RBF. RBF má omezenou prediktivní hodnotu rozvoje AKI a jeho úloha není zřejmě při rozvoji S-AKI dominantní. Experimentální studie na velkém zvířecím modelu realizovaná naší skupinou (Beneš et al. 2011) ukázala, že 1) změny renální cirkulace jsou odlišné v sepsi samotné a sepsi komplikované rozvojem AKI; 2) renální hemodynamiku nelze spolehlivě predikovat z charakteru hemodynamiky systémové; 3) S-AKI může být doprovázeno disociací mezi renální (RVR, renal vascular resistance) a systémovou vaskulární rezistencí, tedy že pravděpodobně existuje fenomén selektivní renální vazokonstrikce i při adekvátně resuscitované sepsi. Je ale třeba zmínit, že při S-AKI byla přítomna velká interindividuální variabilita RVR od vysoce zvýšené přes konstantní až po lehce sníženou. Změny RVR a RBF se navíc pravděpodobně liší v závislosti na délce trvání sepse a pokročilosti AKI. Klinická práce Prowleho et al. (2012), která hodnotila RBF deseti pacientů s rozvinutým S-AKI, ukázala konzistentní pokles RBF a zvýšenou RVR v porovnání se zdravými dobrovolníky. Lze tak v současnosti definovat dva fenotypy renální hemodynamiky v sepsi asociované s poruchou intraglomerulární cirkulace a poklesem glomerulární filtrace (GFR, glomerular filtration rate): 1) koncept renální vazokonstrikce a tkáňové ischemie v terénu septické systémové vazodilatace; 2) teorie renální hyperemie při renální vazodilataci v rámci systémové vazodilatace. Renální vazokonstrikce a zvýšená RVR převládá u plně vyjádřeného AKI (Langenberg et al. 2007, Beneš et al. 2011, Prowle et al. 2012).

Glomerulární hemodynamika v sepsi není dosud spolehlivě definována (Schrier et al. 2004, May et al. 2012). Za poklesem GFR při S-AKI stojí pokles glomerulárního filtračního tlaku. Byly popsány dva typy chování glomerulárních arterií: 1) vazokonstrikce aferentní arterioly v sepsi zodpovědná za pokles filtračního tlaku a GFR (Lugon et al. 1989, Schrier et al. 2004); 2) pokles glomerulární vaskulární rezistence aferentní i eferentní arterioly s dominantní dilatací arterioly eferentní zodpovědný za pokles GFR (Langenberg et al. 2006, May et al. 2012). Novou a neověřenou teorií je také možná existence glomerulárního shuntingu – tedy otevření cévních spojek mezi vas afferens a efferens zodpovědné za pokles filtračního tlaku.

Ukazuje se, že klíčovou úlohu v rozvoji a progresi AKI hraje dysfunkce peritubulární mikrocirkulace. Ta trpí již velmi časně podobnými změnami jako jiné lokality v sepsi (Holthoff et al. 2012). Zánětlivými mediátory aktivované destičky, fibrin, hůře deformabilní erytrocyty a leukocyty spolu s dysfunkcí endotelu a poškozením glykokalyxu způsobí okluzi kapilár (De Backer et al. 2011) a lokální hypoxii. Zvýšená permeabilita

endotelu způsobuje intersticiální edém a roste tak difuzní vzdálenost pro kyslík k cílovým buňkám (Hollenberg et al. 2004). Dochází k poklesu funkční kapilární denzity a vzestupu heterogenity průtoku (De Backer et al. 2002, Verdant et al. 2009). Ukázalo se, že po plném funkčním zotavení ledvin z AKI se funkční kapilární denzita upraví pouze parciálně a může představovat predispozici pro rozvoj chronické renální insuficience (Hörbelt et al. 2007).

Porucha perfúze peritubulárních kapilár ale není jednotná ve všech oblastech ledviny. Je přítomna především v renálním kortexu, a to okrskovitě. Tyto okrsky obleněného průtoku a hypoxie pravděpodobně generují a posilují lokální inflamaci a oxidační stres. Za ložiskovým poškozením mikrocirkulace může stát nehomogenní lokální koncentrace oxidu dusnatého (NO) v ledvinné tkáni (Trzeciak et al. 2008). Ačkoli je globální produkce NO v sepsi zvýšena, exprese inducibilní NO syntázy (iNOS) je heterogenní (Cunha et al. 1994). Sepse způsobuje i na iNOS závislý pokles aktivity endotelové NO syntázy (eNOS), který také může narušit mikrovaskulární homeostázu (Chauhan et al. 2003, Heemskerk et al. 2009). Zvýšená koncentrace NO navíc vede ke tvorbě dusíkatých radikálů a tím k tubulárnímu poškození rovněž přispívá.

### **Inflamace na úrovni ledvin**

Inflamatorní mediátory, které iniciují a řídí odpověď imunitního systému na infekci, zprostředkovávají také odpověď dalších buněk napadeného organismu. Ukázalo se totiž, že působky patogenů a aktivovaných imunitních buněk (např. lipopolysacharid - LPS, a cytokiny, patřící do skupiny danger/patogen - associated molecular patterns - DAMPs/PAMPs) jsou rozeznávány nejen imunitními buňkami, ale také epiteliálními a parenchymovými buňkami ledvin prostřednictvím PRR receptorů (receptory rozpoznávající motivy patogenů) typu membránových toll- like receptorů (TLR, membránové receptory PAMPs a DAMPs) nebo cytoplazmatických NOD- like receptorů (nucleotide- binding oligomerization domain-like receptors) a RIG-I-like receptorů (retinoic acid inducible gene 1-like receptors) (Fry et al. 2012). Ledviny jsou působení DAMPs a PAMPs mimořádně exponovány, uvážíme-li, že 20% srdečního výdeje je distribuováno do jejich oběhu a DAMPs a PAMPs tak působí na úrovni endotelu peritubulární mikrocirkulace. Navíc jsou se 140 litry glomerulárního filtrátu denně masivně filtrovány do tubulů, kde jsou rozeznány tubulárními buňkami s receptory TLR-2 a TLR-4 (Kruger et al. 2009, Mudaliar et al. 2013, Lin et al. 2012). Taktó aktivované endoteliální a tubulární epiteliální buňky pak spouští vlastní lokální inflamatorní odpověď a tak amplifikují odpověď systémovou.

Aktivované endoteliální buňky nejen že uvolňují další zánětlivé mediátory, ale zvýší i expresi adhezních molekul. Ukazuje se, že hlavně při rozvinutém AKI hraje roli rekrutment neutrofilů do ledvin (Herter et al. 2014). Adherované a infiltrované neutrofilové uvolňují působky poškozující tkáň, mimo jiné elastázy, proteázy, myeloperoxidázy a reaktivní kyslíkové radikály zvyšující vaskulární permeabilitu a další expresi adhezních molekul. Navíc se dostávají infiltrované leukocyty do těsné blízkosti tubulárních buněk a

mohou je přímo aktivovat. Tubulární buňky pak endokrinní a parakrinní cestou aktivují tubulární buňky distálnějších segmentů nefronu (Kalakeche et al. 2011). Těmito mechanismy dochází k dalšímu posílení a propagaci lokální inflamace. Nejmohtnější jsou uvedenými změnami postiženy okrsky tubulárních buněk, které anatomicky korespondují s oblastmi peritubulární mikrovaskulární dysfunkce. Tyto dysfunkční „nefrovaskulární jednotky“ jsou zřejmě hlavním patogenetickým substrátem S-AKI (Matějovič et al. 2016).

### **Adaptivní odpověď tubulárních buněk na inflamaci a změny mikrocirkulace**

Tubulární buňky ledvin zemřelých se S-AKI vykazují apikální vakuolizaci, kterou lze přisoudit oxidačnímu stresu (Wu et al. 2007). Ten je také spojen s tubulární dysfunkcí (Good et al. 2009). *In vitro*, tubulární buňky a podocyty kultivované s bakteriálními složkami nebo plazmou těžce popálených pacientů a S-AKI produkují reaktivní kyslíkové radikály nebo spustí apoptózu (Biancone et al. 1997). Vzhledem k tomu, že apoptóza tubulárních buněk při S-AKI není rozsáhlá (Takasu et al. 2013), nabízí se, že tubulární buňky vystavené hypoxii a inflamaci aktivují procesy, které apoptóze a nekróze zabrání. Adaptivně utlumí metabolismus, upraví priority energetického výdeje, spustí procesy kontroly kvality buněčných organel (autophagie a mitophagie) a zastaví svůj buněčný cyklus (Singer et al. 2004, Brealey et al. 2004). Centrální úlohu v této adaptaci hrají mitochondrie.

Úprava priorit energetického výdeje spočívá v redistribuci omezeně produkovaného ATP k procesům, jež jsou zásadní pro přežití buněk (Atkinson 1977, Buttgerit et al. 1995, Carre et al. 2008). Nejdříve klesá syntéza makromolekul (proteinů) nebo transportních systémů typu  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  kotransportu, nejpozději jsou poklesem dodávky ATP postiženy systémy udržující membránový potenciál a integritu buňky. Funkce orgánu je tak obětována přežití jednotlivých buněk.

Autophagie je buněčný mechanismus řízení kvality, kterým eukariotní buňky odstraňují a zpracovávají poškozené organely z cytoplasmy. V případě mitochondrií se tento proces nazývá mitophagie (Vanhorebeek et al. 2012, Green et al. 2011). V sepsi jsou spouštěči mitophagie inflamace řízená aktivací TLR-4 (Waltz et al. 2011), oxidační stres (Frank et al. 2012, Wang et al. 2012) a změny v elektron-transportním systému, rozpřažení respirace a produkce ATP a depolarizace mitochondriální membrány (Green et al. 2011). Toto časné rozpřažení respirace a fosforilace ústí v dočasné zvýšení spotřeby kyslíku, aktivace mitophagie je adaptivní odpovědí a spotřeba kyslíku pak klesá a energie se uchovává. Mitophagie je časnou adaptací renálních buněk na infekční inzult, její pokles v dalším průběhu byl spojen s proximální tubulární dysfunkcí s poklesem transportu sodíku a clearance kreatininu (Hsiao et al. 2012). Porucha aktivace mitophagie byla spojena s horším výstupem kriticky nemocných a mohla by tedy přispívat k buněčné a orgánové dysfunkci (Schumacker et al. 1993). Stimulace mitophagie se navíc ukázala být protektivní v rozvoji AKI. Odstraněním dysfunkční mitochondrie se také sníží produkce kyslíkových a dusíkových radikálů, které by způsobily další buněčné poškození a aktivaci apoptózy.

Mitochondrie se pravděpodobně podílí i na řízení buněčného cyklu (Green et al. 2011). Buněčný cyklus je soubor dějů, které buňka podstupuje v přípravě k mitóze. Mezi jednotlivými jeho částmi (G0, G1, S, G2, M) je několik kontrolních bodů, kde se rozhoduje o dalším pokračování nebo přerušení cyklu. V souvislosti s tubulárním poškozením v sepsi a roli mitochondrie je výzkum zaměřen na kontrolní bod G1-S, kde mitochondrie vytvářejí specifickou jednotnou tubulární síť a jednotně se chovají, s elektrickým spřažením a neobvyklou hyperpolarizací (Mitra et al. 2009). Spotřeba kyslíku a produkce energie v této fázi značně roste. Neschopnost buňky získat takové množství energie pak způsobí přerušení buněčného cyklu s cílem zabránit letálnímu energetickému vyčerpání (Finkel et al. 2009). Obnovení buněčného cyklu pak souvisí s reparací renálních funkcí (Yang et al. 2009).

### **Klinické implikace**

Uvedené adaptační změny renálních buněk v časných fázích S-AKI tedy teoreticky mohou představovat ochranu před letálním poškozením mechanismem dočasného utlumení funkce. Částečně je tak možné vysvětlit diskrepanci mezi diskrétním morfologickým postižením ledvin při S-AKI a klinicky patrnou renální dysfunkcí a také možnost poměrně rychlé reparace ledvin ze S-AKI. Spojnici mezi klinicky manifestním poklesem glomerulární filtrace a uvedenou tubulární dysfunkcí by pak mohla představovat protektivní aktivace tubuloglomerulární zpětné vazby (Gomez et al. 2014). Macula densa registruje zvýšenou koncentraci NaCl při porušené reabsorpci sodíku  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  kotransporterem v proximálním tubulu (Singh et al. 2011) a tubuloglomerulární zpětnou vazbou sníží hydrostatický tlak v glomerulu a tím GFR. Pokles GFR pak omezí množství PAMPs a DAMPs filtrovaných do tubulů a sníží energetické nároky tubulárních buněk na reabsorbční děje.

Akutní poškození ledvin v sepsi je tedy nepochybně složitým a dosud jednoznačně neobjasněným souborem mnoha dynamicky interagujících mechanismů a není zapříčiněno jedním faktorem. V klinickém výzkumu AKI u kriticky nemocných by bylo třeba kontinuální a víceúrovňové monitorace od globálního průtoku ledvinou po mikrocirkulaci, markerů inflamace, oxidačního stresu a buněčné energetiky, a především sérií biopsií ledvin, jejichž odběr je u kriticky nemocných ze zřejmých důvodů neproveditelný. Možnosti humánního výzkumu AKI na úrovni molekulárních dějů jsou tak minimální. Je proto třeba komplexních zvířecích studií (Doi et al. 2009) a využití nových dostupných metod molekulární biologie – genomiky a proteomiky - v dynamickém tkánově a buněčně (tubulární buňky) specifickém výzkumu, který by mohl objasnit nové, relevantní mechanismy rozvoje S- AKI. Proto jsme tyto technologie implementovali do vlastního experimentálního výzkumu a využili v předkládaných pracích (I a II).



### 3.2 Role acidózy u kriticky nemocných

Akutně vzniklá porucha acidobazické rovnováhy velmi často doprovází kritické onemocnění. Přesná incidence a prevalence není ale známa, v případě metabolické acidózy to lze zčásti přičíst i nejednotným definicím užívaným k jejímu popisu. Není jasné, zda existuje příčinný vztah mezi acidózou a klinickým výstupem pacientů, ačkoli je acidóza silně asociována se špatnou prognózou kriticky nemocných (Hickling et al. 1994, Stacpoole et al. 1994).

Zřejmý rozdíl mezi prognózou nemocných s respirační (HCA, hypercapnic acidosis) a metabolickou acidózou (MAC, metabolic acidosis) (Li et al. 2005, Kellum et al. 2002) také naznačuje, že spíše než acidóza *per se* je její příčina určující pro prognózu pacienta. Také různé typy MAC definované dominantním anionem mají v organismu rozdílný efekt (Kellum et al. 2004) a jsou asociovány s různou mortalitou. Například ve srovnání s hyperchloremickou byla acidóza laktátová nebo acidóza s vysokou diferencí silných iontů spojena s mnohem vyšší mortalitou, stejně tak hodnota anorganického fosfátu byla nezávislým prediktorem mortality (Gunnerson et al. 2006).

Léčba základního onemocnění vyústí v úpravu acidózy alepší klinický výstup, naopak není pravděpodobné, že bychom úpravou acidózy ovlivnili základní onemocnění alepší prognózu. Za špatnou prognózou stojí neschopnost potlačit základní onemocnění (ať už hypoxii, ischemii, mitochondriální dysfunkci či jiné). Otázkou zůstává, zda je acidóza sama o sobě vůbec škodlivá. Podrobně jsme se hodnocením, patogenezi, molekulárními a klinickými konsekvencemi acidózy a její léčbou zabývali v přehledovém článku Role acidózy u kriticky nemocných (IX), níže proto předkládáme pouze krátké shrnutí.

#### Klinické důsledky připisované acidóze

Nemalá část současných poznatků o účincích acidózy v organismu vychází jak z experimentálních studií, jejichž klinická relevance mnohdy naráží na extrémní hodnoty pH v nich užitých či se opírá o výzkum izolovaných buněčných kultur, a ne vždy lze odlišit důsledky acidózy od působení základní choroby.

##### *Vliv na hemodynamiku*

Na úrovni systémového oběhu interferuje acidóza s komplexními mechanismy jeho regulace. Klasicky je acidóze připisována tepenná vazodilatace vedoucí k hypotenzi (Kellum et al. 2004). Bylo popsáno, že jak v HCA, tak v MAC díky poklesu systémové vaskulární rezistence vzroste srdeční výdej (Andersen et Mouritzen 1966). U člověka bylo dokumentováno i zvýšení tepového objemu vyvolané HCA (Cullen et Eger 1974). V MAC je ale často popisován také pokles srdečního výdeje. Acidóza vyvolaná infuzí kyseliny mléčné u zdravých zvířat buď neměla vliv na srdeční výdej (Arieff et al. 1983), nebo snížila kontraktilitu a rezultovala v pokles tepového objemu a hypotenzi (Teplinsky et al. 1990). Recentní studie ale ukazují, že laktát sám zřejmě hraje důležitou roli pro funkci

myokardu jako energetický substrát pro kardiomyocyty (Nalos et al. 2014, Levy et al. 2007).

Efekt acidózy na plicní cirkulaci také není jednoznačný, bylo popsáno, že HCA zvyšuje plicní vaskulární rezistenci a střední tlak v plicnici (Balanos et al. 2003) a tak jsou kladeny vyšší nároky na výkonnost pravé komory srdeční. Hyperchloremické MAC byla připsána venokonstrikce se zvýšením preloadu pravostranných srdečních oddílů (Kellum et al. 2004).

Poznatky o vlivu acidózy na regionální perfúzi životně důležitých orgánů jsou omezené. Je znám účinek HCA ve smyslu zvýšení průtoku krve mozkiem (Pollock et al. 2009, Hare et al. 2003). Byly dokumentovány změny v intrarenální hemodynamice vyvolané hyperchloremií ve smyslu snížení perfúze kortexu (Chowdhury et al. 2012), údaje o změně průtoku renální tepnou jsou rozmanité – bylo pozorováno jeho zvýšení (Cardenas et al. 1996) i snížení (Fujii et al. 1985).

Na úrovni neurohumorální osy byla dokumentována aktivace sympatiku se zvýšeným uvolňováním katecholaminů (Brofman et al. 1990), na něž může být změněná odpověď tkání – snížená v myokardu (Kaplan et al. 1988), zvýšená v plicních cévách (Bronstein et Porcelli 1988).

Současné poznatky o vlivu klinicky relevantní tíže akutní acidózy na hemodynamiku jsou tedy značně rozporuplné, realizovali jsme proto experimentální studii, jejímž cílem bylo ozřejmit efekt akutní MAC a HCA ve zdravém organismu (III).

#### *Alterace funkce dalších orgánů*

Práce na zdravých potkanech naznačují, že hyperchloremická acidóza se může podílet na snížení bariérové funkce střeva (Salzman et al. 1994, Menconi et al. 1997) a jeho dalším poškození zvýšením produkce oxidu dusnatého (NO). Příčinou je zvýšená exprese inducibilní NO syntázy a zvýšená produkce superoxidových radikálů a aktivita myeloperoxidázy (Pedoto et al. 2001), která má zřejmě důležitou úlohu i v poškození plic v obdobném experimentálním modelu (Pedoto et al. 1999).

#### *Imunitní a zánětlivá odpověď*

*In vitro* má MAC značný vliv na imunitní efektorové buňky. Vliv na zvýšení produkce NO již byl zmíněn, dependence na pH se zdá zjevná i v produkci zánětlivých cytokinů (TNF $\alpha$ ), i když se liší mezi jednotlivými buňkami, různým pH i mezi typy acidózy. Bylo popsáno pro- i antiinflatorní působení MAC (Heming et al. 2001, Kellum et al. 2004).

Účinky HCA byly díky obecně akceptovanému užívání protektivní ventilace s permissivní hyperkapnií u ALI a ARDS extenzivně studovány na úrovni plicních imunokompetentních buněk *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. Produkce cytokinů, chemokinů, NO a kyslíkových radikálů alveolárními makrofágy *in vitro*, která pak aktivuje polymorfonukleáry (Puneet et al. 2005), byla s poklesem pH snížena, zřejmě na vrub snížení metabolické aktivity buněk.

Inhibice NF- $\kappa$ B v endoteliálních buňkách plicních tepen snižuje expresi ICAM-1 a IL-8 a snižuje adhezivní potenciál endotelu pro neutrofilů, tím redukuje zánětlivou odpověď v plicní tkáni (Takeshita et al. 2003). Na druhou stranu se ukázal škodlivým vliv hyperkapnické acidózy na reparaci alveolárního epitelu omezením buněčné migrace inhibicí NF- $\kappa$ B, transkripčního faktoru zodpovědného v alveolárních epiteliálních buňkách II. typu za syntézu adhezivních molekul (ICAM-1) a prozánětlivých cytokinů TNF $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-6 a IL-8 (Tak et al. 2001). V izolovaných zvířecích plicích hyperkapnická acidóza snížila mikrovaskulární permeabilitu, zřejmě inhibicí xantinoxidázy zodpovědné za vznik reaktivních kyslíkových radikálů (Shibata et al. 1998), a produkci dusíkatých radikálů (Broccard et al. 2001) a zmírňuje tak ischemicko-reperfúzní postižení plic. HCA snižuje produkci peroxynitritu, který oxiduje některé složky surfaktantu, a navíc potencuje uvolňování surfaktantu, přispívá tedy protektivně i na této úrovni proti rozvoji ARDS. *In vivo* byl ve zvířecích modelech prokázán benefit HCA u intratracheální instilace bakterií (Ni Chonghaile et al. 2008, Laffey et al. 2004), nikoli ale u sekundárního ALI vyvolaného endotoxiemií (Lang et al. 2005). U ischemicko-reperfúzního postižení plic experimentální modely potvrdily potenciál HCA snížit inflamatorní odpověď redukcí produkce TNF $\alpha$  a volných radikálů.

Z uvedeného vyplývá, že HCA redukuje tíži poškození plic snížením funkce neutrofilů, produkce zánětlivých radikálů a adhezivních molekul, tím ale i fagocytární a baktericidní potenciál nutný pro obranu proti patogenu (Swenson et al. 2004), aktivitu zásadní v kritickém onemocnění. Skutečně se ukázalo, že u protražované infekce plic bez antibiotické léčby HCA prohloubila poškození plic a zvýšila bakteriální nálož inhibicí fagocytózy neutrofilů. V přítomnosti antibiotické léčby už tento efekt prokázán nebyl (O’Croinin et al. 2008), stejně tak v jiných studiích s již pokročilou pneumonií a sepsí (No Chonghaile et al. 2008, Costello et al. 2009).

Protektivní efekt HCA v experimentálních studiích byl oslaben korekcí pH, nelze tedy vyloučit, že tento účinek není dán koncentrací CO<sub>2</sub> per se, ale hodnotou pH. Na druhou stranu je protektivní efekt HCA na rozvoj ALI větší než u metabolické acidózy (Laffey et al. 2000).

### **Acidóza jako fyziologický adaptační mechanismus na stres**

Zdravý člověk během těžké svalové námahy může vyvinout metabolickou laktátovou acidózu bez nepříznivých důsledků, naopak, nabízí se možný příznivý efekt v organismu. Acidóza posouvá disociační křivku kyslíku doprava (Bohrův efekt) a usnadňuje tak jeho uvolňování z hemoglobinu. Byl popsán také pozitivní vliv acidózy na rozsah ischemického postižení myokardu (Kitakaze et al. 1997), hypoxicko- ischemického poškození mozkové tkáně (Barth et al. 1998), u hepatocytů vystavených anoxii pak acidóza prodloužila dobu do aktivace apoptózy (Bonventre et al. 1985).

Acidóza u kriticky nemocných je velmi často asociována s hyperlaktatemií. Laktát, anion kyseliny mléčné, je součástí mnoha drah intermediárního metabolismu karbohydrátů a neesenciálních aminokyselin. Hyperlaktatemie je citlivým markerem poruchy energetické

homeostázy a reprezentuje adaptivní odpověď na akutní nerovnováhu mezi dodávkou a potřebou kyslíku, umožňuje organismu vyrovnat se se širokou škálou poruch metabolismu (excesivní svalová námaha, hypoxie, ischemie, těžká sepe, šok) (Leverve 2005). Laktát totiž může být odpadním produktem buňky jedné, zatímco se stává velmi důležitým substrátem buňky jiné. Je to oxidovatelný substrát, který putuje z oblasti s vysokou glykolytickou aktivitou do oblasti s vystupňovanou buněčnou respirací.

Metabolismus laktátu je spjat se třemi hlavními složkami energetického metabolismu: redoxním stavem cytosolu (NADH, H<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup>), přeměnou ATP (ADP<sub>x</sub> Pi/ATP) a acidobazickým stavem (pH) (Leverve 2005). Přeměna ATP je závislá na pH – bylo popsáno, že acidóza snižuje obrat ATP a nároky na kyslík, představuje tak buď adaptační mechanismus nebo škodlivý faktor, v závislosti na tíži, délce trvání a reverzibilitě inzultu (Kowalchuk et al. 1984).

Předpokládali jsme, že akutní acidóza, která je u kriticky nemocných vyvolaná poruchou energetické homeostázy, by mohla snížit nároky tkání na kyslík mechanismem útlumu funkce mitochondrií a tak být protektivní v rozvoji renální dysfunkce, a na podkladě této hypotézy koncipovali další experimentální projekt (IV).

#### 4 LEGÁLNÍ A ETICKÉ ASPEKTY STUDIÍ

Předkládané experimentální práce byly podrobeny schvalovacímu řízení etické komise Lékařské fakulty UK v Plzni a naše metodika ctíla závazná doporučení pro práci s laboratorními zvířaty. Výzkum probíhal na experimentálním pracovišti I. interní kliniky při LF UK v Plzni.

## 5 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce na experimentálním klinicky relevantním velkém zvířecím modelu bylo:

1. S využitím moderních molekulárně biologických metod (proteomika, genomika) popsat dynamickou patobiologii septického akutního poškození ledvin a definovat hemodynamické a molekulárně- genetické rozdíly mezi zvířaty, která S-AKI vyvinou a těmi, jejichž renální funkce zůstanou v sepsi intaktní.
2. Posoudit vliv klinicky relevantní tíže akutní metabolické a hyperkapnické acidózy na zdravý organismus komplexně (systémová a regionální hemodynamika životně důležitých orgánů, jejich mikrocirkulace a kyslíkový a energetický metabolismus, oxidační stres) a především pak vyhodnotit případný protektivní efekt acidózy v rozvoji AKI mechanismem útlumu funkce mitochondrií s využitím metod molekulární fyziologie (vysokoučinná respirometrie).

## 6 METODIKA

Podrobně jsme metodiku experimentů popsali v příložených manuskriptech, a proto na ně s ohledem na přehlednost dizertační práce odkazujeme a v této kapitole uvádíme pouze základní fakta.

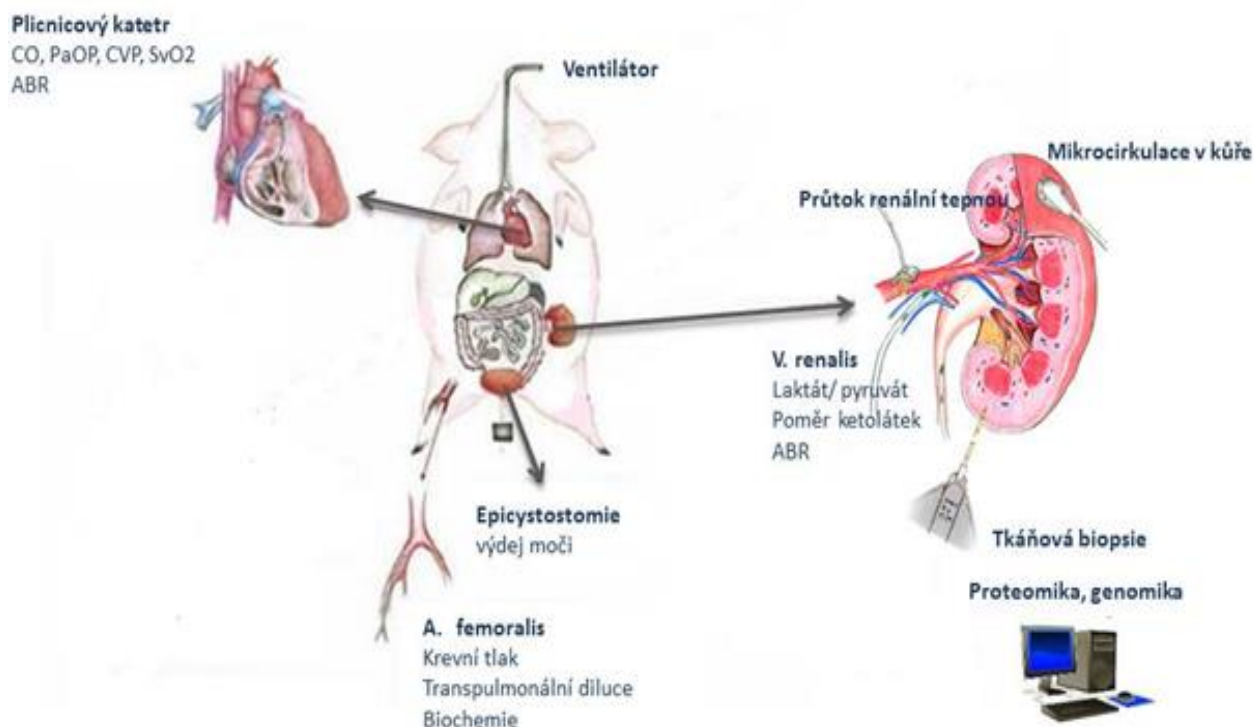
K experimentálnímu výzkumu využíváme sedovaná, uměle ventilovaná selata obou pohlaví a srovnatelné hmotnosti. Rozsáhlá chirurgická instrumentace (viz obrázek 1 a 2) nám umožňuje invazivně monitorovat parametry systémové a regionální hemodynamiky, mikrocirkulace kůry ledviny a sliznice ilea. Analýzou krevních vzorků jak tepenné, tak žilní krve jednotlivých životně důležitých orgánů a s využitím přímé tkáňové oxymetrie v ledvině pak získáváme obraz o metabolismu kyslíku, energetické situaci orgánů, inflamatorních mediátorech a oxidačním/ nitrosativním stresu. K perioperačnímu a postoperačnímu managementu přistupujeme v souladu se zásadami humánní medicíny a využíváme v ní platné postupy.

V předkládaných pracích jsme na experimentálním zvířeti modelovali dva typy postižení: 1) indukovali jsme septický šok a S-AKI, 2) indukovali jsme akutní metabolickou a hyperkapnickou acidózu.

## 6.1. Protokol studií sepsí indukovaného akutního poškození ledvin (studie I a II)

Pooperačně všechna zvířata podstoupila šestihodinovou periodu stabilizace, po níž byla randomizována do skupiny kontrolní a skupiny indikované k indukci septického šoku. Byl proveden základní sběr dat a vzorků. U určených zvířat pak byla indukována infekce buď ve smyslu fekální peritonitidy inokulací 0,5g/kg autologní stolice inkubované předtím 12 hodin ve 200ml fyziologického roztoku ve vodní lázni o teplotě 37°C, nebo kontinuální infúzí živých bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (kmen O1 izolovaný od pacienta s hnisavou otitidou, v koncentraci  $1 \times 10^9$ /ml bakterií) centrálním žilním vstupem. Rychlost bakteriální infúze byla upravována k dosažení středně těžké plicní hypertenze (střední tlak v plicnici 35-40 mm Hg). Vedle balancovaných krystaloidních roztoků byl k udržení normovolemie užíván 6% hydroxyethyl škrob 130 kD/0.4 dle hodnocení odpovědi plicních tlaků komor a měření ITBV. Kontinuální podání noradrenalinu bylo indikováno při poklesu středního arteriálního tlaku (MAP, mean arterial pressure) pod 65mm Hg, dávka pak titrována k udržení MAP nad 70mm Hg. Další sady dat a vzorků byly získány po 12, 18, a 22 hodinách od indukce sepse. Na konci experimentu byla zvířata utracena v hluboké analgesedaci chloridem draselným a neprodleně byly odebrány vzorky ledvinné tkáně k proteomické a genomické analýze.

Obrázek 1 - Experimentální model septického šoku

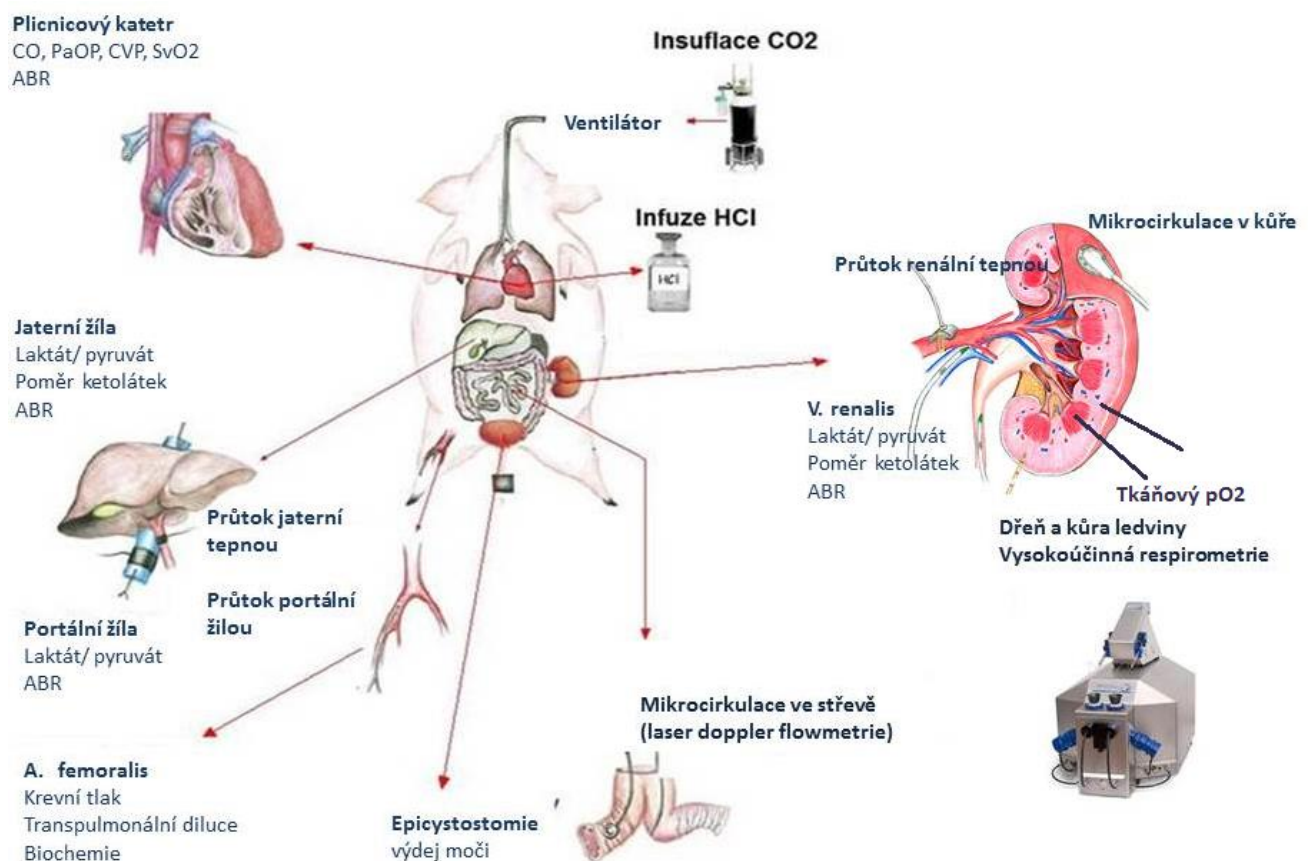


## 6.2. Protokol studie o vlivu acidózy na zdravý zvířecí organismus (studie III a IV)

Operativu následovala šestihodinová perioda stabilizace před získáním základní sady dat a vzorků. Poté byla prasata randomizována do tří skupin: a) skupiny s metabolickou acidózou (MAC, n=8), b) skupiny s hyperkapnickou acidózou (HCA, n=8), u nichž jsme indukovali acidózu kontinuální infúzí kyseliny chlorovodíkové v koncentraci 2 mol/l, respektive zvyšovali inspirační frakci oxidu uhličitého k dosažení arteriálního pH 7,25. Po 60 minutách stabilního stavu na této hladině pH jsme získali další sadu dat a krevních vzorků a pak zmíněnými prostředky dále titrovali pH k hodnotě 7,10 a po 60 minutách stabilního stavu odebrali poslední sadu vzorků a dat. Poslední skupina – c) kontrolní (n=8) – podstoupila obdobnou chirurgickou instrumentaci a protokol s výjimkou indukce acidózy.

Na konci experimentu byla zvířata utrácena v hluboké analgosedaci chloridem draselným. Bezprostředně po ukončení experimentu jsme provedli nefrektomii a tkáň předali k proteomické analýze a testování funkce mitochondrií.

Obrázek 2 - Experimentální model akutní acidózy



## 7 SOUHRN VÝSLEDKŮ STUDIÍ A DISKUZE

### 7.1 Proteom ledvin v průběhu sepse a operačního výkonu (studie I)

Cílem studie bylo popsat dynamické změny renálního proteomu v průběhu rozvoje S-AKI a jeho změny v důsledku chirurgického operačního výkonu. Studováno bylo 12 selat, u kterých jsme po zotavení z operace indukovali sepsi intravenózním podáním *Pseudomonas aeruginosa*, a 5 selat kontrolních, která podstoupila operační výkon a pooperační management bez indukce sepse. Proteomické analýze byly podrobeny biopsie kůry ledvin těchto zvířat získané ve třech časových bodech: po zotavení z operace a po 12 a 22 hodinách po indukci sepse.

#### Výsledky a diskuze

Všechna zvířata vystavená infúzi *Pseudomonas aeruginosa* vyvinula septický šok se S-AKI. Charakteristická byla normodynamická cirkulace, tedy konstantní srdeční výdej, s poklesem systémové vaskulární rezistence a potřebou podpory oběhu noradrenalinem. Významně u nich rostly parametry systémového zánětu TNF alfa a IL-6. Průtok renální tepnou v sepsi postupně klesal, byl patrný trend k nárůstu renální cévní rezistence, o 43% poklesla clearance kreatininu. V kontrolní skupině se žádný z uvedených parametrů v průběhu experimentu neměnil.

V kontrolní skupině bylo pomocí hmotnostní spektrometrie identifikováno 11 proteinů, jejichž exprese se v některém časovém bodě lišila od výchozího stavu, u septických zvířat bylo identifikováno 29 takových proteinů. Porovnání septických a kontrolních zvířat v jednotlivých timepointech pak ukázalo, že samotná sepse vyvolala změny 21 proteinů. Jednalo se o proteiny odpovídající stresové odpovědi a chaperony opravující proteiny, proteiny odrážející stres endoplazmatického retikula, scavengery volných radikálů, proteiny spojené s buněčným metabolismem a tvorbou ATP, transportéry, proteiny inflamatorní regulace a transdukce signálu, proteiny hemostázy a cytoskeletu.

Naše studie předkládá první dynamickou analýzu proteomu ledvin v klinicky relevantním velkém zvířecím modelu, kdy jsme využili série renálních biopsií jak u kontrolních – operovaných zvířat, tak v různých fázích S-AKI, a jejichž analýzu jsme mohli spojit s hodnocením konvenčních parametrů renální fyziologie. Za důležité považujeme zjištění, že samotné procedury typu iniciální chirurgické instrumentace a/nebo anestezie ovlivní renální proteom zkoumaných zvířat. Lze totiž očekávat širší zavedení obdobných modelů do základního výzkumu a tedy i nezbytnost určitých referenčních hodnot pro změny proteomu u kontrolních zvířat. Proteiny ovlivněné instrumentací lze řadit do drah signalizace imunitní a zánětlivé odpovědi, oxidativního stresu, stresu endoplazmatického retikula, mitochondriálního energetického metabolismu a tubulárního transportu. Tyto změny se v ledvinách vyvíjí i při absenci systémového vzestupu hladiny cytokinů a mohou vést k úvaze o existenci renálního stresu vyvolaném chirurgickým výkonem a o jeho možné souvislosti s rozvojem pooperačního AKI u predisponovaných pacientů.



Změny proteomu, které vyvolala sepse, korespondovaly se současným pohledem na patofyziologii S-AKI (viz kapitola 3). Zaznamenali jsme časnou elevaci markerů oxidačního stresu a multifunkčních proteinů tepelného šoku, které jsou považovány za DAMPs (Riddell et al. 2010, Tsan et al. 2009). DAMPs mohou aktivovat tubulární a endoteliální buňky ledvin. Tato časná (do 12 hodin) produkce DAMPs předcházela změnám renální hemodynamiky a poruše funkce ledvin a lze předpokládat, že je zodpovědná za lokální amplifikaci a propagaci inflamatorního signálu a přispívá k časnému poškození mikrovaskulatury a tubulů. Prolongovaný stres endoplazmatického retikula, na nějž naše výsledky také poukazují, přispívá k progresi mnoha patologických dějů zahrnujících sepsi a AKI a může souviset s poruchou funkce mitochondrie, inflamací, oxidačním stresem a buněčnou smrtí (Inagi et al. 2014, Khan et al. 2015). Důležitost mitochondrií v rozvoji S-AKI dokumentoval fakt, že téměř třetina sepsí ovlivněných proteinů je součástí drah buněčné energetiky. V časné fázi S-AKI jsme v souladu s jinými autory (Porta et al. 2006, May et al. 2012) zaznamenali zvýšenou expresi podjednotky alfa mitochondriální ATP-syntázy, důležité determinanty respirační funkce mitochondrie. Selhání buněčné energetiky v časné fázi S-AKI se tedy v tomto kontextu nezdá pravděpodobné. V patofyziologii S-AKI hrají roli také tubulární transportní systémy, jejichž snížená aktivita může být adaptačním mechanismem na bioenergetický stres tubulárních buněk. Snížená funkce transportérů pravděpodobně způsobí aktivaci tubuloglomerulární zpětné vazby, poklesne glomerulární filtrace a tím nároky na tubulární buňky ve smyslu výdeje energie na reabsorbční procesy (Girardi a Di Sole 2012, Schmidt et al. 2007, Morrell et al. 2014). Do tohoto obrazu dobře zapadá námi zjištěná časná upregulace NHE-RF3, regulačního kofaktoru Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> výměníku, který inhibuje expresi a aktivitu několika membránových transportérů a receptorů (Shenolikar a Weinman 2001) a kterou jsme pozorovali již před poklesem průtoku renální tepnou a poklesem glomerulární filtrace.

Design studie nám neumožnil přímo popsat příčinný vztah mezi stresovým fenotypem proteomu a AKI. Také hodnocení lyzátu celé ledviny může vnášet určité zkreslení, vzhledem k množství typů buněk v ledvinách zastoupených. Navíc je známa okrsková distribuce renálního poškození v S-AKI a bioptované oblasti tedy mohou vykazovat různou tíži buněčné dysfunkce. I přes tyto limitace se jedná o první práci popisující dynamické chování renálního proteomu při rozvoji S-AKI a lze na ni navazovat. Vzhledem k významu preexistujících komorbidit při rozvoji S-AKI u našich pacientů by jistě bylo relevantní také odhalení rozdílů v proteomické odpovědi ledvin zdravých a zatížených těmito komorbiditami.

## 7.2 Genová exprese ledvin v sepsi – kdo vyvine S-AKI? (studie II)

S-AKI postihuje 40-50% pacientů v sepsi. Dosud nejsou ozřejměny molekulární rozdíly mezi septickými pacienty s a bez S-AKI. Cílem studie proto bylo vedle konvenčních parametrů renální fyziologie porovnat renální genovou expresi kandidátních genů (se známou relevancí v rozvoji S-AKI) mezi zvířaty, která v sepsi S-AKI vyvinula a těmi, jejichž renální funkce zůstaly intaktní. Studovali jsme 15 selat. 5 zvířat bylo kontrolních, podstoupila chirurgickou instrumentaci a pooperační management, 10 selat pak navíc podstoupilo indukci sepse intravenózním podáním *Pseudomonas aeruginosa* nebo fekální peritonitidou, z nich 5 vyvinulo S-AKI. Hemodynamická data a krevní vzorky byly hodnoceny po zotavení z operace a 12, 18, a 22 hodin po indukci sepse. Po 22 hodinách byla zvířata utracena a tkáň ledvin byla postoupena analýze genové exprese.

### Výsledky a diskuze

Zvířata s a bez rozvoje S-AKI se nelišila v parametrech globální hemodynamiky. Vyvinula normo- či hyperdynamickou sepsi s poklesem systémové vaskulární rezistence. Systémová zánětlivá odpověď (IL-6 a TNF alfa) byla rovněž srovnatelná, i když byl patrný trend k jejímu časnějšímu a mohutnějšímu nástupu u skupiny se S-AKI. RBF a RVR se u zvířat bez AKI neměnila, zatímco při S-AKI RVR postupně narůstala a RBF klesal. Také renální kortikální mikrocirkulace byla ve skupině s S-AKI významně alterována. Exprese kandidátních genů 22 hodin po indukci sepse se nelišila mezi kontrolní skupinou a zvířaty bez AKI, zatímco S-AKI bylo spojeno se zvýšenou expresí genů ovlivňujících zánětlivou signalizaci (TLR-4), intrarenální vazoregulaci (PGHS-2, cyklooxygenáza-2) a apoptózu (CASP3, caspasa 3; AGTR-2, receptor pro angiotenzin II) a sníženou expresí genů pro mitochondriální metabolismus a biogenezi (PPARGC-1 $\alpha$ / PGC-1 $\alpha$  , peroxisome proliferator- activated receptor gamma, Coactivator 1 alpha).

Důležitým fenoménem naší práce je možnost porovnat nejen zvířata kontrolní s těmi se S-AKI, jak bylo typické pro předchozí studie na hlodavcích (El- Achkar et al. 2006, Zager et al. 2014), ale především zvířata septická s a bez S-AKI. Získaná data naznačují, že vnímavost ledvin k rozvoji AKI v sepsi je dána časnou a extenzivní systémovou zánětlivou odpovědí spojenou s rozdílným profilem tkáňové genové exprese v ledvinách týkající se inflamace, buněčného metabolismu a apoptózy. Rozvoj S-AKI je pak spojen se vzestupem RVR a časným poklesem průtoku korovou mikrocirkulací. Naše výsledky jsou v souladu s observačními klinickými studiemi, které poukázaly na souvislost zvýšené hladiny cytokinů s rozvojem S-AKI (Murugan et al. 2010, Payen et al. 2012).

Intrarenální exprese *TLR-4*, PRR receptoru konstitučně exprimovaného endoteliálními a epiteliálními tubulárními buňkami a aktivovaného PAMPs a DAMPs ke spuštění vrozených imunitních a inflamatorních mechanismů, byla v ledvinách se S-AKI oproti těm bez AKI významně zvýšena. Tento poznatek korespondoval s předchozí studií na hlodavcích El-Akchara et al. (2006) a podporuje hypotézu o TLR-4 dependentní propagaci mikrovaskulárního a tubulárního poškození (Gomez et al. 2014). Vazbu ligandu na TLR-4 lze tedy považovat za jeden ze slibných terapeutických cílů ke snížení poškození

endoteliálních a tubulárních buněk při S-AKI (Mudaliar et al. 2013, Molitoris 2014). Zvýšená exprese TLR-4 může být také zodpovědná za námi pozorovaný vzestup mRNA PGHS-2 (El Achkar et al. 2007) v ledvinách se S-AKI. PGHS-2 je enzym zodpovědný za tvorbu prostanoidů podílejících se na řízení intrarenální hemodynamiky, tubuloglomerulární zpětné vazby a dřevné exkrece solutů a vody a bylo popsáno, že ve studii na potkaních její inhibice zlepšila endotoxinem indukovanou renální dysfunkci (Höcherl et al. 2009).

Role apoptózy v S-AKI není dosud přesně definovaná. V našem modelu S-AKI ledviny zvýšeně exprimovaly proapoptotickou CASP-1. S-AKI bylo také spojeno se vzestupem exprese AGTR-2, který pravděpodobně hraje roli v zánětlivých procesech a apoptóze při AKI (Ruiz- Ortega et al. 2003).

V ledvinách se S-AKI jsme poprvé na velkém zvířecím modelu demonstrovali sníženou expresi *PGC-1 alfa*, hlavního faktoru mitochondriální biogeneze a metabolismu, která se ukázala být u hlodavců doprovázena morfologickými a biochemickými známkami mitochondriální dysfunkce (Tran et al. 2011). Navíc se zdá, že protrahovaná suprese *PGC-1 alfa* může hrát roli v přechodu z adaptivních změn energetického metabolismu tubulárních buněk do buněčného poškození (Tran et al. 2011).

Limitaci práce může představovat malý počet studovaných zvířat a nelze vyloučit vliv typu modelu (peritonitida versus i. v. bakteriémie) na genovou expresi. Design studie také neumožňuje najít přímé spojení mezi expresí genů a poškozením ledvin. Také nepostihujeme dynamiku rozvoje S-AKI, hodnotíme-li genovou expresi v jednom časovém bodě. Naše výsledky přesto podporují hypotézu, že na rozvoji S-AKI se podílí excesivní systémová inflamace, která je amplifikována v ledvinách, porucha intrarenální hemodynamiky a mikrocirkulace, mitochondriální dysfunkce a apoptóza. V souvislosti s nezměněnou expresí genů řídících odpověď buněk na hypoxii lze uvažovat o tom, že spíše než hypoxie řídí v časně fázi S-AKI genovou expresi inflamace.

### 7.3 Kardiovaskulární efekt akutní acidózy v organismu (studie III)

Cílem studie bylo posoudit vliv akutní metabolické a hyperkapnické acidózy na systémovou a regionální cirkulaci zdravého organismu. Studovali jsme 24 selat, která byla randomizována do tří skupin – skupiny s MAC (n=8), s HCA (n=8) a skupiny kontrolní, která podstoupila instrumentaci a pooperační management bez indukce acidózy. Data a krevní vzorky jsme hodnotili po zotavení z operace, po 60 minutách stabilního pH 7,25 a po 60 minutách stabilního pH 7,10. Pak byla zvířata utracena a vyjmutá srdce byla předána k *in vitro* testování síly kontrakce komorových trabekul.

#### Výsledky a diskuze

HCA významně ovlivnila systémovou i plicní cirkulaci. Poklesla SVR a MAP, vzrostla plicní vaskulární rezistence a střední tlak v plicnici. MAC měla oproti tomu vliv pouze na cirkulaci plicní, zvýšila plicní cévní rezistenci a střední tlak v plicnici. Oba typy acidózy způsobily pokles tepového objemu, který byl vyvážen vzestupem tepové frekvence a srdeční výdej zůstal v MAC zachován, v HCA dokonce vzrostl. HCA zvýšila nároky na minutovou práci obou komor srdečních, MAC na komoru pravou. MAC neovlivnila perfúzi životně důležitých orgánů, HCA způsobila redistribuci srdečního výdeje do povodí karotického a hepatosplanchniku, renální perfúze nebyla ovlivněna. Srdeční svalovina, která byla vystavena acidóze *in vivo*, nevykazovala pak *in vitro* změnu síly kontrakce ani trvání akčního potenciálu, vystavení kyselému prostředí opět *in vitro* způsobilo pokles síly kontrakce a neovlivnilo trvání akčního potenciálu.

V experimentu na velkém zvířeti jsme nepotvrdili předchozí pozorování především na myších modelech týkající se rozvoje hypotenze při nadprodukci oxidu dusnatého (Kellum et al. 2004). Lze však připustit negativně inotropní efekt MAC i HCA ve smyslu poklesu tepového objemu, který korespondoval s *in vitro* zjištěným poklesem síly kontrakce komorových trabekul v kyselém roztoku. Metabolická acidóza také nealterovala perfúzi jednotlivých životně důležitých orgánů, oproti tomu odpověď na HCA se jeví orgánově specifická. Absence změny renálního průtoku v acidóze dosud nebyla zaznamenána, předchozí studie popisovaly jeho zvýšení (Cardenas et al. 1996) nebo snížení (Fujii et al. 1985). Rozdílné účinky acidózy v plicní a systémové cirkulaci podporují hypotézu, že hlavním vazomotorickým stimulem v plicích by mohlo být pH, potažmo koncentrace  $H^+$  (Balanos et al. 2003, Barer et al. 1971), zatímco v systémové, hepatosplanchnické a mozkové cirkulaci molekula  $CO_2$ . Vzestup plicní vaskulární rezistence u obou typů acidózy kladl vyšší nároky na práci pravé komory srdeční. Tato pozorování by mohla omezit toleranci acidózy v podmínkách preexistující pravostranné kardiální dysfunkce nebo ischemické choroby srdeční. Tato fakta je třeba zvažovat i při užívání protektivní ventilace s permissivní hyperkapnií.

Mezi limitace studie je třeba řadit užití pouze krátkodobého působení acidózy v řádu hodin a zkoumání pouze jednoho z mnoha typů MAC (hyperchloremická acidóza), přičemž je známo jejich rozdílné působení v organismu. Uvedených účinků hyperkapnické acidózy

bylo také dosaženo za relativně významné hyperkapnie potřebné k dosažení cílového pH, nelze je tedy jednoznačně vztáhnout k permisivní hyperkapnii v klinické praxi.

#### **7.4 Vliv akutní acidózy na hemodynamiku a tkáňovou energetiku ledvin (studie IV)**

Cílem této podstudie bylo posoudit vliv akutní metabolické a hyperkapnické acidózy na ledviny na více fyziologických úrovních – globální renální hemodynamiku, mikrocirkulaci kůry a kyslíkový a energetický metabolismus kůry a dřene ledvin. Hodnotili jsme poměr laktátu/pyruvátu, ketolátek, navíc pak laser dopplerometricky mikrocirkulaci v kůře ledviny a tkáňovou koncentraci kyslíku v kůře a dřeni ledviny jehlovými sondami. Následně byla zvířata utrácena a ledviny byly předány k testování funkce mitochondrií metodou vysokoúčinné respirometrie.

#### **Výsledky a diskuze**

MAC neovlivnila globální ani mikrovaskulární perfúzi ledvin ani spotřebu kyslíku či cytosolový (vyjádřený poměrem laktátu k pyruvátu) a mitochondriální (poměr acetoacetátu k betahydroxybutyrátu) redoxní stav. HCA neovlivnila perfúzi ledvin, přesto vzrostl parciální tlak kyslíku v kůře i dřeni ledviny, ale vzrostla zde i jeho spotřeba. Poměr laktátu a pyruvátu v renální žíle se ani v HCA neměnil, poklesl ale poměr ketolátek. Ukázalo se, že renální mitochondrie, které byly vystaveny HCA, vykazují oproti intaktním vyšší spotřebu kyslíku – ve dřeni při aktivaci komplexu I, II a IV, v kůře pak komplexu II a IV. Vzestup spotřeby kyslíku ve stavu LEAK nevyklučuje podíl alterace efektivity respiračního řetězce na zvýšené spotřebě kyslíku mitochondriemi.

Spotřeba kyslíku v ledvinách vystavených MAC a HCA tedy nepoklesla. Vzestup parciálního tlaku kyslíku ( $pO_2$ ) v kůře v HCA by mohl korespondovat s dříve popsányi změnami v jiných orgánech vyvolányi hyperkapnií – tenkostěvná stěně a subkutánně (Ratnaraj et al. 2004). Mechanismus vzestupu korového  $pO_2$  při zachovaném průtoku renální tepnou a konstantním  $paO_2$  není jasný, je třeba zvažovat i limitace měření tkáňového  $pO_2$  punkční jehlovou sondou (Lübbbers et al. 1997). Pokles poměru ketolátek v renální žíle v HCA naznačuje alteraci buněčného (mitochondriálního) metabolismu ledviny. Hlubší vhléd do této problematiky nám pak umožnilo rozsáhlé zkoumání ledviny. U zvířat podstupivších indukci HCA jsme měli možnost studovat respirační funkci mitochondrií metodou vysokoúčinné oxygrafie. U mitochondrií ovlivněných hyperkapnickou acidózou byl zaznamenán vzestup spotřeby  $O_2$  ve stavu LEAK. To by mohlo naznačovat vyšší spotřebu kyslíku na stejnou produkci ATP, tedy zřejmě menší efektivitu respiračního řetězce způsobenou HCA.

Limitace studie lze spatřovat v užití pouze krátkodobého působení acidózy a jen jednoho z mnoha typů MAC (hyperchloremická acidóza), navíc v relativně významné hodnotě hyperkapnie potřebné k dosažení cílového pH. Přesto známky alterace mitochondriálního metabolismu v HCA opět směřují k možné limitaci tolerance hyperkapnie v klinické praxi.

## 8 ZÁVĚR

S využitím proteomických metod jsme se pokusili jako první definovat změny renálního proteomu, které nastanou v ledvinách zvířat podstoupivších anestezii a chirurgickou instrumentaci, a které nastávají v různých fázích S-AKI. Při rozvoji S-AKI byl patrný dynamický posun směrem ke stresové a adaptivní buněčné odpovědi. Chirurgický výkon překvapivě vyvolal v renálním proteomu změny charakteru akutní fáze i při absenci systémové inflamace.

Na velkém zvířecím modelu jsme na podkladě renální genové exprese byli schopni spolehlivě odlišit ledviny, které vyvinuly v sepsi S-AKI. Postižená renální tkáň totiž vykazovala zvýšenou expresi genů zodpovědných za amplifikaci lokální inflamace a apoptózu v ledvinách a pokles genové exprese v drahách buněčného metabolismu. Tyto změny genové exprese byly spojeny s významnou systémovou inflamací a odlišným renálním hemodynamickým fenotypem oproti septickým zvířatům bez AKI, nezávisle na charakteru systémové hemodynamiky. Geny a s nimi související biologické dráhy, na něž jsme poukázali, zasluhují další výzkum.

Přinesli jsme komplexní obraz působení klinicky relevantní tíže akutní acidózy ve zdravém organismu. Zvýšené nároky, jež klade HCA na srdeční práci, spolu s alterací buněčného (mitochondriálního) metabolismu ledvin by mohly limitovat její terapeutické využití. V našem modelu jsme nedokázali potvrdit protektivní efekt acidózy na regionální úrovni redukcí spotřeby kyslíku, HCA dokonce zvyšovala jeho spotřebu mitochondriemi.

## 9 PODPORA

Práce byla podpořena Národním programem udržitelnosti číslo LO1503 MŠMT ČR, projektem CZ.1.07/2.3.00/30.0061 kofinancovaným Evropským Sociálním Fondem a státním rozpočtem České republiky a Programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (projekt P36).

## 10 PODĚKOVÁNÍ

Veliký dík bych ráda vyjádřila svému školiteli prof. MUDr. Martinu Matějovičovi, PhD., jenž je od počátku mého působení v medicíně mým mentorem, ochotným rádcem a vzorem na poli vědeckém i klinickém, a který významnou měrou přispěl k tomu, že pro mě není zajímavějšího oboru, než je intenzivní medicína.

Děkuji svým přátelům a kolegům, MUDr. Jiřímu Chvojkovi, PhD., doc. MUDr. Janu Benešovi, PhD. a MUDr. Romanu Sýkorovi, PhD., kteří mě pro vědu získali, nakazili svým nadšením a často přispěchali s neocenitelnou radou.

Ze srdce děkuji svým rodičům a manželovi, kteří mě po celou dobu studia nezištně ve všech směrech podporovali.

## 11 POUŽITÁ LITERATURA

**Andersen MN**, Mouritzen C: Effect of acute respiratory and metabolic acidosis on cardiac output and peripheral resistance. *Ann Surg* 1966,163:161-168.

**Amaral A**, Opal SM, Vincent JL. Coagulation In Sepsis. *Intensive Care Med.* 2004, 30: 1032–1040.

**Atkinson**, D. Cellular Energy Metabolism and its Regulation. Atkinson, D., editor. New York: Academic Press; 1977. p. 218

**Arieff AI**, Gertz EW, Park R, Leach W, Lazarowitz VC. Lactic acidosis and the cardiovascular system in the dog. *Clin Sci (Lond)* 1983; 64: 573–80

**Balanos GM**, Talbot NP, Dorrington KL, Robbins PA. Human pulmonary vascular response to 4h hypercapnia and hypocapnia measured using Doppler echocardiography. *J Appl Physiol* 2003, 94:1543-1551.

**Barer GR**, Shaw JW: Pulmonary vasodilator and vasoconstrictor actions of carbon dioxide. *J Physiol* 1971. 213:633-645.

**Barth A**, Bauer R, Gedrange T, Walter B, Klinger W, Zwiener U: Influence of hypoxia and hypoxia/hypercapnia upon brain and blood peroxidative and glutathione status in normal weight and growth-restricted newborn piglets. *Exp Toxicol pathol* 1998, 50:402-410.

**Bendixen E**. Animal models for translational proteomics. *Proteomics Clin Appl.* 2014;8(10):637-9.

**Benes J**, Chvojka J, Sykora R, Radej J, Krouzecky A, Novak I, Matejovic M: Searching for mechanisms that matter in early septic acute kidney injury: An experimental study. *Crit Care* 2011.15:R256.

**Biancone L**, Conaldi PG, Toniolo A, Camussi G. Escherichia coli porin induces proinflammatory alterations in renal tubular cells. *Experimental nephrology.* 1997; 5:330–6. [PubMed: 9259188]

**Brealey D**, Karyampudi S, Jacques TS, et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2004; 286:R491–7.

**Broccard AF**, Hotchkiss JR, Vannay C, Markert M, Sauty A, Feihl F, Schaller MD: Protective effects of hypercapnic acidosis on ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164:802-806

**Brofman JD**, Leff AR, Munoz NM, Kirchoff C, White SR: Sympathetic secretory response to hypercapnic acidosis in swine. *J Appl Physiol* 1990, 69:710-717.

**Bronstein EH**, Porcelli RJ. Effect of hydrogen ion concentration on in vitro pulmonary vascular reactivity. *Exp Lung Res* 1988, 14:837-851.

**Bonventre JV**, Cheung JY: Effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia. *Am J Physiol* 1985,249: C149-C159.



**Buck** LT, Hochachka PW, Schon A, Gnaiger E. Microcalorimetric measurement of reversible metabolic suppression induced by anoxia in isolated hepatocytes. *The American journal of physiology*. Nov; 1993 265(5 Pt 2):R1014–R1019.

**Buttgereit** F, Brand MD. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *The Biochemical journal*. Nov 15; 1995 312(Pt 1):163–167.

**Cardenas** VJ Jr, Zwischenberger JB, Tao W, Nguyen PD, Schroeder T, Traber LD, Traber DL, Bidani A: Correction of blood pH attenuates changes in hemodynamics and organ blood flow during permissive hypercapnia. *Crit Care Med* 1996, 24:827-834

**Chauhan** SD, Seggara G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Apr; 2003 17(6):773–775.

**Chvojka** J, Sykora R, Krouzecky A, et al. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. *Critical care*. 2008; 12:R164. [PubMed: 19108740] on hospitalized patients: a systemic review and metaanalysis. *Am J Kidney Dis* 2007

**Chowdhury**, A.H., Cox, E.F., Francis, S.T., Lobo, D.N.. A randomized, controlled, double- blind crossover study on the effects of 2-L infusion of 0.9% saline and plasma-lyte 148 on renal blood flow velocity and renal cortical tissue perfusion in healthy volunteers. *Ann. Surg.*, 2012,256,p. 18 - 24.

**Coca** SG, Peixoto AJ, Garg AX, et al.: The prognostic importance of a small acute decrement in kidney function in hospitalized patients: a systemic review and metaanalysis. *Am J Kidney Dis* 2007; 50:712-720.

**Costello** J, Higgins B, Contreras M, Chonghaile MN, Hassett P, O’Toole D, Laffey JG: Hypercapnic acidosis attenuates shock and lung injury in early and prolonged systemic sepsis. *Crit Care Med* 2009, 37:2412-2420.

**Cullen** DJ, Eger EI. Cardiovascular effects of carbon dioxide in man. *Anesthesiology* 1974, 41:345-349).

**Cunha** FQ, Assreuy J, Moss DW, et al. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF-alpha and IL-1-beta. *Immunology*. Feb; 1994 81(2):211–215.

**De Backer** D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. Jul; 2002 166(1): 98–104

**De Backer** D, Donadello K, Taccone FS, et al. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. *Annals of intensive care*. 2011; 1:27. [PubMed: 21906380]

**Di Giantomasso** D, May CN, Bellomo R. Vital organ blood flow during hyperdynamic sepsis. *Chest*. 2003; 124:1053–9.

**Doi K**, et al. Animal model of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest*. 2009, 10, s. 2868-78.

**El-Achkar TM**, Huang X, Plotkin Z, et al: Sepsis induces changes in the expression and distribution of Toll-like Receptor 4 in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290: F1034-43

**El-Achkar TM**, Plotkin Z, Marcic B, et al: Sepsis induces an increase in thick ascending limb Cox-2 that is TLR4 dependent. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 293:F1187-96

**Frank M**, Duvezin-Caubet S, Koob S, et al. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochimica et biophysica acta*. Dec; 2012 1823(12): 2297–2310.

**Fry DE**. Sepsis, systemic inflammatory response, and multiple organ dysfunction: the mystery continues. *Am Surg*. Jan; 2012 78(1):1–8.

**Fujii H**, Zehr JE, Mitsuyama T, Takagi H, Nakashima Y, Sunada K, Kusukawa R: The influence of renal sympathetic nerves on renal hemodynamic and renin responses during hypercapnia in dogs. *Jpn Circ* 1985. Nov; 49(11): 1185-9.

**Girardi AC**, Di Sole F. Deciphering the mechanisms of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-3 regulation in organ dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Jun 1;302(11):C1569-87.

**Good DW**, George T, Watts BA 3rd. Lipopolysaccharide directly alters renal tubule transport through distinct TLR4-dependent pathways in basolateral and apical membranes. *Am J Physiol Renal Physiol*. Oct; 2009 297(4):F866–F874.

**Gomes L. C.**, Di Benedetto G. & Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol*. 13, 589–598 (2011).

**Gomez H**, Ince C, De Backer D, et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock*. 2014; 41:3–11.

**Green DR**, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science*. Aug 26; 2011 333(6046):1109–1112.

**Gunnerson KJ**, Saul M, He S, Kellum JA: Lactate versus non-lactate metabolic acidosis: a retrospective outcome evaluation of critically ill patients. *Crit Care* 2006, 10(1):R22.

**Hare GM**, Kavanagh BP, Mazer CD, Hum KM, Kim SY, Coackley C, Barr A, Baker AJ: Hypercapnia increases cerebral tissue oxygen tension in anesthetized rats. *Can J Anaesth* 2003, 50:1061-1068

**Heemskerk S**, Masereeuw R, Russel FG, Pickkers P. Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury. *Nature reviews. Nephrology*. Nov; 2009 5(11):629–640.

**Heyman SN**, Lieberthal W, Rogiers P, Bonventre JV. Animal models of acute tubular necrosis. *Curr Opin Crit Care*. 2002;8:526-34.

**Herter JM**, Rossaint J, Spieker T, Zarbock A. Adhesion Molecules Involved in Neutrophil Recruitment during Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Journal of innate immunity*. 2014

**Heming TA**, Dave SK, Tuazon DM, Chopra AK, Peterson JW, Bidani A: Effects of extracellular pH on tumour necrosis factor-alpha production by resident alveolar macrophages. *Clin Sci* 2001, 101:267-274.

**Hickling KG**, Walsh TJ, Henderson SJ, et al.: Low mortality rate in adult respiratory distress syndrome using low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia: a prospective study. *Crit Care Med* 1994, 22:1568–1578

**Hollenberg SM**, Ahrens TS, Annane D, et al. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. *Critical care medicine*. 2004; 32:1928–48.

**Holthoff JH**, Wang Z, Seely KA, et al. Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury. *Kidney international*. 2012; 81:370–8.

**Hörbelt M**, Lee SY, Mang HE, Knipe NL, Sado Y, Kribben A, Sutton TA: Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 293: F688–F695, 2007

**Höcherl K**, Schmidt C, Bucher M. COX-2 inhibition attenuates endotoxin-induced downregulation of organic anion transporters in the rat renal cortex. *Kidney Int* 2009;75:373-80

**Hsiao HW**, Tsai KL, Wang LF, et al. The decline of autophagy contributes to proximal tubular dysfunction during sepsis. *Shock*. Mar 2012; 37(3):289–296.

**Huang, Y. G.**, Wong, K. C., Yip, W. H., McJames, S. W. & Pace, N. L. Cardiovascular responses to graded doses of catecholamines during lactic and hydrochloric acidosis in dogs. *Br. J. Anaesth.* 74, 583–590 (1995).

**Inagi R**, Ishimoto Y, Nangaku M. Proteostasis in endoplasmic reticulum--new mechanisms in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2014 Jul;10(7):369-78.

**Kalakeche R**, Hato T, Rhodes G, et al. Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2011; 22:1505–16.

**Kaplan JA**, Guffin AV, Yin A. The effects of metabolic acidosis and alkalosis on the response to sympathomimetic drugs in dogs. *J Cardiothorac Anesth* 1988, 2:481-487.

**Kellum JA**: Impaired renal blood flow and the ‘spicy food’ hypothesis of acute kidney injury. *Crit Care Med* 39: 901–903, 2011

**Kellum JA**, Song M, Li J: Lactic and hydrochloric acids induce different patterns of inflammatory response in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004, 286:R686-R692.

**Kellum JA, Song MC, Li JY.** Extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiologic implications. *Crit. Care* 8, 331–336 (2004).

**Kellum JA, Song M, Subramanian S:** Acidemia: good, bad or inconsequential? In *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine*. Edited by Vincent JL. Berlin: Springer; 2002:510-516.

**Kellum JA, Song MC, Venkataraman R.** Effects of hyperchloremic acidosis on arterial pressure and circulating inflammatory molecules in experimental sepsis. *Chest* 125, 243–248 (2004).

**Kitakaze M, Takashima S, Funaya H, Minamino T, Node K, Shinozaki Y, Mori H, Hori M:** Temporary acidosis during reperfusion limits myocardial infarct size in dogs. *Am J Physiol* 1997, 272: H2071-H2078.

**Kowalchuk JM, Heigenhauser GJ, and Jones NL.** Effect of pH on metabolic and cardiorespiratory responses during progressive exercise. *J Appl Physiol* 57: 1558-1563, 1984

**Kruger B, Krick S, Dhillon N, et al.** Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106:3390–5. [PubMed: 19218437]

**Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, et al.** Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury. *Crit Care*. Feb 6.2013 17(1):R25.

**Khacho, M. et al.** Acidosis overrides oxygen deprivation to maintain mitochondrial function and cell survival. *Nat. Commun.* 5:3550 doi: 10.1038/ncomms4550 (2014).

**Khan MM, Yang WL, Wang P.** Endoplasmic Reticulum Stress in Sepsis. *Shock*. 2015 Jun 29. [Epub ahead of print]

**Laffey JG, Engelberts D, Kavanagh BP:** Buffering hypercapnic acidosis worsens acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, 161:141-146.

**Laffey JG, Honan D, Hopkins N, Hyvelin JM, Boylan JF, McLoughlin P:** Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 169:46-56.

**Langenberg C, Wan L, Egi M, May CN, Bellomo R:** Renal blood flow in experimental septic acute renal failure. *Kidney Int* 69: 1996–2002, 2006.

**Langenberg C, Wan L, Egi M, May CN, Bellomo R.** Renal blood flow and function during recovery from experimental septic acute kidney injury. *Intensive Care Med* 33:1614-8, 2007.

**Lang JD, Figueroa M, Sanders KD, Aslan M, Liu Y, Chumley P, Freeman BA:** Hypercapnia via reduced rate and tidal volume contributes to lipopolysaccharide-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 171:147-157.

**Leverve XM:** Lactate in the intensive care unit: pyromaniac, sentinel or fireman? *Crit Care* 2005, 9:622-623.

**Levy B, Mansart A, Montemont C, et al.** Myocardial lactate deprivation is associated with decreased cardiovascular performance, decreased myocardial energetics, and early death in endotoxic shock. *Intensive Care Med* 2007; 33: 495–502

- Li J**, Hoskote A, Hickey C, Stephens D, Bohn D, Holtby H, Van Arsdell G, Redington AN, Adata I: Effect of carbon dioxide on systemic oxygenation, oxygen consumption, and blood lactate levels after bidirectional superior cavopulmonary anastomosis. *Crit Care Med* 2005, 33:984-989.
- Li X**, Hassoun HT, Santora R, Rabb H. Organ crosstalk: the role of the kidney. *Curr Opin Crit Care* 2009; 15:481-487.
- Lin M**, Yiu WH, Wu HJ, et al. Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2012; 23:86–102.
- Lugon JR**, Boim MA, Ramos OL, Ajzen H, Schor N: Renal function and glomerular hemodynamics in male endotoxemic rats. *Kidney Int* 36: 570–575, 1989
- Lübbbers DW**, Baumgärtl H. Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO<sub>2</sub> distribution in the living tissue. *Kidney Int*. 1997 Feb;51(2):372-80.
- Matejovic M**, Chvojka J, Radej J, Ledvinova L, Karvunidis T, Krouzecky A, Novak I. Dying "of" or "with" AKI: sepsis and acute kidney injury are bidirectional. *Contributions to Nephrology*, Vol. 174, 2011.
- Matejovic M.**, et al. Renal Hemodynamics in AKI: In Search of New Treatment Targets. *J Am Soc Nephrol*. 2016, 27, s. 49-58.
- May CN**, Calzavacca P, Ishikawa K, Langenberg C, Wan L, Ramchandra R, Bellomo R: Novel targets for sepsis-induced kidney injury: The glomerular arterioles and the sympathetic nervous system. *Exp Physiol* 97: 1168–1177, 2012
- May CN** et al. Renal bioenergetics during early gram-negative mammalian sepsis and angiotensin II infusion. *Intensive Care Med*. 2012, 38, s. 886-893.
- Mehta RL**, Pascual MT, Soroko S et al.. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. *Kidney Int* 2004;66:1613-1621.
- Mehta, R**, et al. Acute Kidney Injury Network: Report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* .2007, 11, s. R31.
- Menconi MJ**, Salzman AL, Unno N, Ezzell RM, Casey DM, Brown DA, Tsuji Y, Fink MP: Acidosis induces hyperpermeability in Caco-2BBE cultured intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol* 1997, 72:G1007-G1021.
- Mitra K**, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 21; 2009 106(29):11960–11965.
- Molitoris BA**. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis. *J Clin Invest* 2014; 124: 2355-63
- Morrell ED**, Kellum JA, Hallows KR, Pastor-Soler NM. Epithelial transport during septic acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Jul;29(7):1312-9.

- Mudaliar** H, Pollock C, Komala MG, et al. The role of Toll-like receptor proteins (TLR) 2 and 4 in mediating inflammation in proximal tubules. *American journal of physiology Renal physiology*. 2013; 305:F143–54.
- Murugan** R, Karajala-Subramanyam V, Lee M, et al: Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival. *Kidney Int* 2010; 77: 527–535
- Nalos** M, Leverve XM, Huang SJ, Weisbrodt L, Parkin R, Seppelt IM, Ting I, Mclean AS: Half-molar sodium lactate infusion improves cardiac performance in acute heart failure: a pilot randomized controlled clinical trial. *Crit Care* 2014, 18:R48.
- Ni Chonghaile** M, Higgins BD, Costello J, Laffey JG: Hypercapnic acidosis attenuates lung injury induced by established bacterial pneumonia. *Anesthesiology* 2008, 109:837-848
- Ni Chonghaile** M, Higgins BD, Costello JF, Laffey JG: Hypercapnic acidosis attenuates severe acute bacterial pneumonia-induced lung injury by a neutrophil-independent mechanism. *Crit Care Med* 2008, 36:3135-3144.
- O’Croinin** DF, Nichol AD, Hopkins N, Boylan J, O’Brien S, O’Connor C, Laffey JG, McLoughlin P: Sustained hypercapnic acidosis during pulmonary infection increases bacterial load and worsens lung injury. *Crit Care Med* 2008, 36:2128-2135
- Ostermann** M, Chang RW: Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE. *Crit Care Med* 2007;35:1837-1843.
- Parmar** A, Langenberg C, Wan L, May CN, Bellomo R, Bagshaw SM: Epidemiology of septic acute kidney injury. *Curr Drug Targets* 2009;10:1169-1178.
- Payen** D, et al. A positive fluid balance is associated with a worse outcome in patients with acute renal failure. *Crit. Care*. 2008, 12, s. 74.
- Payen** D, Lukaszewicz AC, Legrand M, et al: A multicentre study of acute kidney injury in severe sepsis and septic shock: association with inflammatory phenotype and HLA genotype. *PLoS One* 2012; 7:e35838
- Pedoto** A, Caruso JE, Nandi J, Oler A, Hoffmann SP, Tassiopoulos AK, McGraw DJ, Camporesi EM, Hakim TS. Acidosis stimulates nitric oxide production and lung damage in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:397–402.
- Pedoto** A, Nandi J, Oler A, Camporesi EM, Hakim TS, Levine RA. Role of nitric oxide in acidosis-induced intestinal injury in anesthetized rats. *J Lab Clin Med* 2001;138:270–276.
- Pollock** JM, Deibler AR, Whitlow CT, Tan H, Kraft RA, Burdette JH, Maldjian JA: Hypercapnia-induced cerebral hyperperfusion: an underrecognized clinical entity. *AJNR Am J Neuroradiol* 2009, 30:378-385
- Porta**, F., et al. Effects of prolonged endotoxemia on liver, skeletal muscle and kidney mitochondrial function. *Crit Care*. 2006, 10, s. R118.

**Prowle JR, Molan MP, Hornsey E et al.** (2012) Measurement of renal blood flow by phase-contrast magnetic resonance imaging during septic acute kidney injury: a pilot investigation. *Crit Care Med*, 40(6):1768-76.

**Prowle JR, Kirwan CJ, Bellomo R.** Fluid management for the prevention and attenuation of acute kidney injury. *Nature reviews Nephrology*. 2014; 10:37–47.

**Puneet P, Moochhala S, Bhatia M:** Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, 288:L3-15.

**Rajendram R, Prowle JR.** Venous congestion: are we adding insult to kidney injury in sepsis? *Critical care*. 2014; 18:104. [PubMed: 24467922]

**Ratnaraj J, Kabon B, Talcott MR, Sessler DI, Kurz A.** Supplemental oxygen and carbon dioxide each increase subcutaneous and intestinal intramural oxygenation. *Anesth Analg*. 2004. 99(1):207-211.

**Riddell JR, Wang XY, Minderman H, Gollnick SO.** Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. *J Immunol*. 2010 Jan 15;184(2):1022-30.

**Rosen S, Heyman SN.** Difficulties in understanding human "acute tubular necrosis": limited data and flawed animal models. *Kidney international*. Oct; 2001 60(4):1220–1224.

**Ruiz-Ortega M, Esteban V, Suzuki Y, et al:** Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney Int Suppl* 2003; 86:S21-6.

**Salzman AL, Wang H, Wollert PS, Vandermeer TJ, Compton CC, Denenberg AG, Fink MP:** Endotoxin-induced ileal mucosal hyperpermeability in pigs: role of tissue acidosis. *Am J Physiol* 1994, 266:G633-G646.

**Schrier RW, Wang W:** Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 2004;351: 159–169.

**Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-Smith GP, Gao H, Hennessy L, Finnerty CC, López CM, Honari S, Moore EE, Minei JP, Cuschieri J, Bankey PE, Johnson JL, Sperry J, Nathens AB, Billiar TR, West MA, Jeschke MG, Klein MB, Gamelli RL, Gibran NS, Brownstein BH, Miller-Graziano C, Calvano SE, Mason PH, Cobb JP, Rahme LG, Lowry SF, Maier RV, Moldawer LL, Herndon DN, Davis RW, Xiao W, Tompkins RG; Inflammation and Host Response to Injury, Large Scale Collaborative Research Program.** Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 26;110(9):3507-12.

**Schmidt C, Höcherl K, Schweda F, Kurtz A, Bucher M.** Regulation of renal sodium transporters during severe inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Apr;18(4):1072-83

**Schmidt C, Höcherl K, Schweda F et al.** Proinflammatory cytokines cause down-regulation of renal chloride entry pathways during sepsis. *Crit Care Med* 2007; 35: 2110–2119

**Schumacker PT, Chandel N, Agusti AG.** Oxygen conformance of cellular respiration in hepatocytes. *The American journal of physiology*. Oct; 1993 265(4 Pt 1):L395–L402.

**Singer M**, De Santis V, Vitale D, Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*. 2004; 364:545–8.

**Shibata K**, Cregg N, Engelberts D, Takeuchi A, Fedorko L, Kavanagh BP: Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase. *Am J Respir Crit Care Med* 1998, 158:1578-1584.

**Singh P**, Okusa MD. The role of tubuloglomerular feedback in the pathogenesis of acute kidney injury. *Contrib Nephrol*. 2011; 174:12–21.

**Stacpoole PW**, Wright EC, Baumgartner TG, et al.: Natural history and course of acquired lactic acidosis in adults. DCA-Lactic Acidosis Study Group. *Am J Med* 1994, 97:47–54

**Stengl M**, Ledvinova L, Chvojka J, Benes J, Jarkovska D, Holas J, Soukup P, Svirglerová J, Matejovic M. Effects of clinically relevant acute hypercapnic and metabolic acidosis on the cardiovascular system: an experimental porcine study. *Crit Care* 2013, 17:R303

**Swenson ER**: Therapeutic hypercapnic acidosis: pushing the envelope. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 169:8-9. 59.

**Tak PP**, Firestein GS: NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001, 107:7-11.

**Takasu O**, Gaut JP, Watanabe E, et al. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. *Am J Resp Crit Care Med* 2013; 187:509–17.

**Takeshita K**, Suzuki Y, Nishio K, Takeuchi O, Toda K, Kudo H, Miyao N, Ishii M, Sato N, Naoki K, Aoki T, Suzuki K, Hiraoka R, Yamaguchi K: Hypercapnic acidosis attenuates endotoxin-induced nuclear factor-[kappa]B activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, 29:124-132.

**Teplinsky K**, O'Toole M, Olman M, Walley KR, Wood LD. Effect of lactic acidosis on canine hemodynamics and left ventricular function. *Am J Physiol* 1990; 258: H1193–9

**Tracey KJ**. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 2007. 117:289-296.

**Tran, D**, et al. Acute renal failure in patients with acute pancreatitis: prevalence, risk factors, and outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 1993, 8, s. 1079–84.

**Tsan MF**, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol*. 2009 Jun;85(6):905-10.

**Trzeciak S**, Cinel I, Phillip Dellinger R, 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*. May; 2008 15(5):399–413.

**Uchino S**, Kellum JA, Bellomo R et al.: Acute renal failure in critically ill patients: A multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005, 294, s. 813–818.

**Vanhorebeek I**, Gunst J, Derde S, et al. Mitochondrial fusion, fission, and biogenesis in prolonged critically ill patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. Jan; 2012 97(1):E59–E64.



**Verdant** CL, De Backer D, Bruhn A, et al. Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis. *Crit Care Med.* Nov; 2009 37(11):2875–2881.

**Vincent**, JL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006, 34, s. 344–353.

**Waltz** P, Carchman EH, Young AC, et al. Lipopolysaccharide induces autophagic signaling in macrophages via a TLR4, heme oxygenase-1 dependent pathway. *Autophagy.* Mar; 2011 7(3): 315–320.

**Wan** L, Bellomo R, May CN. The effect of normal saline resuscitation on vital organ blood flow in septic sheep. *Intensive Care Med.* Aug; 2006 32(8):1238–1242.

**Wang** Y, Nartiss Y, Steipe B, McQuibban GA, Kim PK. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy.* Oct; 2012 8(10):1462–1476.

**Wang** Z, Holthoff JH, Seely KA, et al. Development of oxidative stress in the peritubular capillary microenvironment mediates sepsis-induced renal microcirculatory failure and acute kidney injury. *The American journal of pathology.* Feb; 2012 180(2):505–516.

**Wu** L, Gokden N, Mayeux PR. Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN.* 2007; 18:1807–15. [PubMed: 17494883]

**Yang** QH, Liu DW, Long Y, Liu HZ, Chai WZ, Wang XT. Acute renal failure during sepsis: potential role of cell cycle regulation. *The Journal of infection.* Jun; 2009 58(6):459–464.

**Youle**, R. J. & van der Blik, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* 337, 1062–1065 (2012).

**Yunos** NM, Bellomo R et al. Association between a chloride-liberal vs chloride/restrictive intravenous fluid administration strategy and kidney injury in critically ill adults. *JAMA* Oct 2012; 308:1566-1572.

**Zager** RA, Johnson AC, Frostad KB. Acute hepatic ischemic-reperfusion injury induces a renal cortical "stress response," renal "cytoresistance," and an endotoxin hyperresponsive state. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307:F856-68

**Zarbock** A, Gomez H, Kellum JA. Sepsis-induced AKI revisited: pathophysiology, prevention and future therapies. *Curr Opin Crit Care.* 2014 December ; 20(6): 588–595.

## 12 PŘÍLOHY – DOSUD PUBLIKOVANÉ PRÁCE

- I. Matejovic M, Tuma Z, Moravec J, Valesova L, Sykora R, Chvojka J, Benes J, Mares J: Renal proteomic responses to severe sepsis and surgical trauma: dynamic analysis of porcine tissue biopsies. *Shock* 2016. [Epub ahead of print]. IF 3.045
- III. Stengl M, Ledvinova L, Chvojka J, Benes J, Jarkovska D, Holas J, Soukup P, Svirlerova J, Matejovic M: Effects of clinically relevant acute hypercapnic and metabolic acidosis on the cardiovascular system: an experimental porcine study. *Crit Care* 2013. 17:R303. IF 4.476
- V. Matejovic M, Chvojka J, Radej J, Ledvinova L, Karvunidis T, Krouzecky A, Novak I: Dying "of" or "with" AKI: sepsis and acute kidney injury are bidirectional. *Contributions to Nephrology* 2011, 174:78-88. IF 1.487
- VI. Matejovic M, Ledvinova L, Danihel V: Kidney attack in sepsis: The role of hemodynamics. *Sepsis Management* 2013, 13(4).
- VII. Danihel V, Ledvinová L, Matějovič M: Akutní selhání ledvin a kardiovaskulární komplikace, *Kardiol Rev* 2012, 14(4): 251-253.
- VIII. Ledvinová L, Danihel M, Matějovič M: Perspektivní přístupy v léčbě sepse založené na principu nových patogenetických poznatků, *Vnitř Lék* 2013, 60(1): 68-72.
- X. Jarkovska D, Valesova L, Chvojka J, Benes J, Svirlerova J, Florova B, Nalos L, Matejovic M, Stengl M: Heart rate variability in porcine progressive peritonitis-induced sepsis. *Front. Physiol.* 2016, 6:412. IF 3.534