

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**

**VLIV ANESTEZILOGICKÝCH TECHNIK
NA MIKROCIRKULACI ORGÁNŮ**

Disertační práce

MUDr. Zdeněk Turek

Hradec Králové 2012

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové
Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny

Doktorský studijní program
Chirurgie

Vliv anesteziologických technik na mikrocirkulaci orgánů

Anesthesia management and organ microcirculation

MUDr. Zdeněk Turek

Školitel: doc. MUDr. RNDr. Milan Kaška, Ph.D.

Školitel konzultant: prof. MUDr. Vladimír Černý, Ph.D., FCCM

Hradec Králové 2012

Obhajoba dne:

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, květen 2012

Poděkování

Děkuji prof. MUDr. Vladimíru Černému, Ph.D., FCCM za dlouhodobé a systematické odborné vedení a cenné rady, které jsem dostával nejen v průběhu svého doktorského studia.

Děkuji doc. MUDr. RNDr. Milanu Kaškovi, Ph.D. za odborné vedení a trpělivost při tvorbě této disertační práce. Také děkuji kolegyním doc. MUDr. Heleně Živné, CSc. a Lence Kriesfalusyové z Radioizotopových laboratoří a vivária Lékařské fakulty UK v Hradci Králové za vynikající spolupráci při realizaci experimentální části této práce.

Práce vznikla za podpory grantu Grantové agentury Univerzity Karlovy č. 135 809 – Vliv anesteziologických technik na mikrocirkulaci orgánů a Výzkumného záměru MZO 00179906.

OBSAH

Seznam použitých zkratek.....	7
1. Úvod do problematiky.....	9
1.1. Pokroky ve studiu mikrocirkulace.....	9
1.2. Patofyziologie mikrocirkulace s důrazem na hepatosplanchnickou oblast.....	11
1.3. Nové metody studia mikrocirkulace v experimentu a v klinické praxi.....	16
1.3.1. Orthogonal polarization spectral imaging (OPS).....	16
1.3.2. Sidestream dark-field imaging (SDF).....	17
1.3.2.1. Základní metodologie analýzy mikrocirkulace ve vybraných orgánových systémech.....	20
1.3.3. Laser Doppler flowmetrie (LDF).....	25
1.4. Studium mikrocirkulace a orgánové perfuze v perioperačním období.....	28
1.5. Vliv vybraných anesteziologických technik na mikrocirkulaci orgánů – stav současného poznání.....	30
1.5.1. Vliv perioperační tekutinové strategie na orgánovou perfuzi.....	31
1.5.2. Vliv anestetik na orgánovou perfuzi a mikrocirkulaci za fyziologických a patofyziologických okolností.....	33
1.5.2.1. Vliv intravenózních a inhalačních anestetik na mikrocirkulaci.....	33
1.5.2.2. Vliv epidurální anestézie na mikrocirkulaci.....	36
1.6. Specifika metodologie výzkumu anesteziologických technik a postupů, motivace k výzkumu.....	38
2. Cíle disertační práce.....	39
3. Materiál a metodika.....	40
3.1. Experimentální zvířata.....	40
3.2. Anestézie, monitorace a chirurgická příprava.....	40
3.3. Sidestream dark-field (SDF) imaging.....	43
3.4. „Off-line“ analýza.....	43
3.5. Protokol experimentu.....	47
3.6. Statistická analýza.....	48
4. Výsledky.....	50
4.1. Kardiovaskulární hodnoty.....	50
4.2. Mikrocirkulační parametry.....	50

4.3. Mikrocirkulační parametry na povrchu jater.....	53
4.4. Mikrocirkulační parametry na serózním povrchu ilea.....	57
4.3. Analýza krevních plynů, hematokritu a laktatémie.....	61
5. Diskuze.....	63
6. Závěry.....	68
7. Použitá literatura.....	69

Seznam použitých zkratek

A	arteriola
AVA	automatická vaskulární analýza
C	kontrolní skupina
CEUS	contrast enhanced ultrasound
cNOS	konstitutivní NO syntetáza
CO	oxid uhličitý
ETs	endoteliny
FCD	functional capillary density
FSD	functional sinusoidal density
HHD	hypervolemická hemodiluce
HO	hem-oxygenáza
HSC	hepatic stellate cell
Htc	hematokrit
iNOS	inducibilní NO syntetáza
IVM	intravitální mikroskopie
K	ketamin
LDF	laser Doppler flowmetry
LEDs	light-emitting diodes
M	midazolam
MAC	minimální alveolární koncentrace
MAP	mean arterial pressure
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
OPS	orthogonal polarization spectral imaging
P	propofol
PEEP	pozitivní endexpirační tlak
PSVD	postsinusoidal venular diameter
PSVV	postsinusoidal venular velocity
SD	sinusoidal diameter
SDF	sidestream dark-field imaging

Std Dev	standardní odchylka
T	thiopental
t	čas
TEA	thoracic epidural anesthesia
V	venula
VD	villus density

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1. Pokroky ve studiu mikrocirkulace

Mikrocirkulace má zásadní úlohu v interakcích mezi krví a cílovými tkáněmi, strukturální a funkční změny na úrovni mikrocirkulace jsou patofyziologickým mechanismem vývoje řady akutních závažných syndromů a onemocnění včetně sepse, syndromu multiorgánové dysfunkce a všech forem šokových stavů.¹⁻⁵ Progresivní rozvoj nových metod studia mikrocirkulace včetně výpočetních technologií a softwaru v posledních několika letech umožnil analýzu řady patofyziologických stavů na úrovni zobrazení mikrocirkulační sítě a to jak v experimentu, tak postupně v klinické praxi. Důležitým posunem ve studiu mikrocirkulace byl vynález Warrena Gronera v polovině devadesátých let minulého století, který vyvíjel optickou technologii Orthogonal polarization spectral (OPS) imaging původně ke stanovení počtu erytrocytů a leukocytů přímo u lůžka neinvazivní cestou. Bezprostředně poté se projevil obrovský potenciál metody OPS imaging s možností zobrazit pohybujeící se i stojící sloupec erytrocytů a tím i mikrocirkulační síť.⁶ Tato optická metoda (principy viz kap. 1.3.1) umožnila vizualizaci mikrocirkulace v reálném čase bez použití fototoxických fluorescenčních barviv, což přineslo obrovský posun v potenciálním využití této vyšetřovací metody, tímto byla nalezena alternativa k intravitální mikroskopii (IVM), která je zlatým standardem pro vyšetřování a výzkum mikrocirkulace, nicméně nutnost použití fluorescenčních barviv a velikost instrumentária omezuje použití IVM na experimentální výzkum. Groner dokázal inkorporovat technologii OPS do malé sondy s možností snadné manipulace a se sterilizovatelnou koncovou čočkou, byly vytvořeny první komerčně dostupné přístroje CYTOSCANTM A/R a CYTOSCANTM E II. Následným logickým krokem před zavedením metody OPS do experimentálního i klinického výzkumu byla série validačních experimentálních studií porovnávajících OPS zobrazení mikrocirkulační sítě jednotlivých orgánových systémů, kde technologie IVM byla považována za „zlatý“ standard pro stanovení základních mikrocirkulačních parametrů získaných oběma metodami. Nejčastějším modelem pro validaci nové optické metody bylo ischemicko-reperfusionní poškození tkání a orgánů. Metodou OPS a IVM byly získány a následně porovnány celkem čtyři základní mikrocirkulační parametry (FCD – funkční kapilární denzita, průměr arteriol a venul a rychlost pohybu erytrocytů ve venulách).^{7,8} S použitím Bland-Altman analýzy pro porovnání hodnot z obou metod byla postupně metoda OPS zobrazení úspěšně validována pro vyšetření mikrocirkulace v oblasti periferních tkání (kožní řasa, příčně pruhovaný sval) i vnitřních orgánů (tlusté a tenké střevo, játra, pankreas). V humánních studiích byla validace omezena

na snadno dostupné povrchové tkáni (nehtové lůžko) ev. sliznice. Metoda OPS při vyšetření nehtového lůžka byla srovnávána s konvenční kapilární mikroskopií před a po venosní okluzi u zdravých dobrovolníků. Výsledky validačních studií s OPS technologií potvrdily akceptovatelné odchylky v mikrocirkulačních parametrech v porovnání s IVM. Při respektování základních limitací se OPS metoda s použitím CYTOSCAN mikroskopu stala akceptovanou alternativou k intravitální mikroskopii. Tím byla zahájena před 10 lety nová éra výzkumu mikrocirkulace s možností vyšetřit mikrocirkulaci v reálném čase jak v experimentu na zvířeti, tak u lůžka nemocného či u nemocných v perioperačním období. Konkrétní výsledky validačních studií a jejich rozbor byly přehledně shrnuty v literatuře již dříve.^{9,10}

OPS technologie a CYTOSCAN mikroskopy byly postupně nahrazeny novou generací komerčně dostupných MicroscanTM videomikroskopů využívajících vylepšenou metodu známou jako Sidestream dark-field (SDF) imaging. SDF mikroskopie poskytuje větší rozlišení, kontrast a hlubší tkáňový průnik a to při zachování snadné ruční manipulace se sondou SDF videomikroskopu (principy viz kap. 1.3.2).¹¹ U člověka je použitelná na slizničních površích a na povrchu některých orgánů. Nejčastějším vyšetřením v humánních studiích je tedy mikrocirkulace sublinguální oblasti, v perioperačním období byla vyšetřována mikrocirkulace povrchu jater, slizniční mikrocirkulace tenkého i tlustého střeva, vyšetřován byl peroperačně i povrch mozku a kortex ledviny po dekapsulaci.

Prudký rozvoj nových neinvazivních optických technologií s možností bedside vyšetření mikrocirkulace však klade velké nároky na výpočetní techniku a softwarovou analýzu získaných morfologických obrazů mikrocirkulační sítě. Hlavním problémem v prvních letech SDF videomikroskopie byla značná časová a softwarová náročnost off-line analýzy získaných videosekvencí s dynamickou morfologií mikrocirkulace. Byly tedy získávány dynamické záznamy chování mikrocirkulační sítě v reálném čase, ale vyjma hrubých patologií je nebylo možné rychle popsat či interpretovat. Proto bylo v posledních letech věnováno obrovské úsilí ve vývoji automatické softwarové analýzy umožňující redukovat časovou náročnost a přiblížit se analýze v reálném čase, tedy dostupné bezprostředně po vyšetření. První off-line softwarové analýzy OPS zobrazování byly prováděny nejčastěji systémem CapImage (Zeintl, Heidelberg, Německo),¹² posléze byl vyvinut poněkud jednodušší systém automatické vaskulární analýzy AVA 1-3 (Automated Vascular Analysis, Microvision Medical, Amsterdam, Nizozemí).¹³ Intenzivní výzkum a vývoj softwarové technologie a principů on-line analýzy probíhá doposud, jeho cílem je vyvinout plně automatickou rychlou analýzu redukovající časovou náročnost hodnocení na

minimum a redukující vliv semikvantitativních ukazatelů mikrocirkulace s eliminací subjektivních prvků hodnocení mikrocirkulační sítě.¹⁴

V průběhu rychlého rozšíření nových optických technologií typu OPS a zjm. SDF videomikroskopie do experimentálního i klinického výzkumu se ukázal nový problém v podobě nejednotné analýzy mikrocirkulačních dat, velkého podílu semikvantitativních ukazatelů a rozdílného výběru hlavních analyzovaných parametrů. Největší výzvou ve výzkumu mikrocirkulace pak nadále zůstává správná interpretace získaných dat, systém řízení tkáňové perfuze na úrovni mikrocirkulace a možnosti jejího terapeutického ovlivnění. Velká pozornost byla a je dosud věnována sjednocení postupů při analýzách mikrocirkulační sítě tak, aby výsledky jednotlivých experimentálních i klinických studií s technologií OPS a SDF byly porovnatelné. Za tímto účelem vznikla prvotní doporučení pro charakteristiku průtoku v kapilárách dle Boermy, který klasifikoval průtok stupněm 3 pro kontinuální průtok, stupněm 2 pro obleněný tok, stupněm 1 pro intermitentní tok a stupněm 0 pro kapiláry se stop flow.^{15,16} Postupně se z pochopitelných důvodů ukázalo, že doporučení pro hodnocení mikrocirkulace v odlišných orgánových systémech musejí být modifikována z důvodu orgánově specifických vlastností mikrocirkulace. Detailně je propracována např. metodika popisu mikrocirkulace jednotlivých vrstev střeva včetně mukózy,¹⁷⁻¹⁹ neboť chování splachnické mikrocirkulace za tzv. „low-flow states“ nejrůznější etiologie je předmětem intenzivního klinického výzkumu. Selhání perfuze střeva a střevní bariéry je důležitým patofyziologickým mechanismem rozvoje syndromu multiorgánové dysfunkce.²⁰ Zatím nejobecnější a nejkompexnější doporučení pro hodnocení mikrocirkulace formulované na základě mezinárodní mezioborové konference²¹ bylo formulováno v roce 2007 a z tohoto vychází většina analýz mikrocirkulace ve studiích publikovaných v posledních letech s možností porovnání výsledků a přesnosti měření.

1.2. Patofyziologie mikrocirkulace s důrazem na hepatosplachnickou oblast

Komplexní funkce jater zajišťující hepatickou homeostázu jsou vysoce závislé na adekvátní funkci mikrocirkulace a její fyziologické regulaci. Klíčová role mikrocirkulační dysfunkce byla dokumentována u ischemicko/reperfusního poškození jater,²²⁻²⁴ u transplantací²⁵ a jaterních resekcí s rozšířenou hemihepatektomií²⁶ a také u syndromu multiorgánové dysfunkce septické etiologie.²⁷ Experimentální i klinické mikrocirkulační studie posledních let poukazují na výraznou diskrepanci mezi zachovalými parametry

systemové hemodynamiky s normálním transportem kyslíku a detekovatelnými změnami mikrocirkulace v raných fázích šokových stavů.^{18,28} Je jasně prokázáno, že úprava systemové hemodynamiky nemusí být provázena úpravou regionální mikrocirkulační dysfunkce a tkáňové hypoxie ve splachnické oblasti.²⁹

Ačkoli regulační mechanismy jaterního průtoku na úrovni sinusoid nejsou doposud dostatečně exaktně popsány, předchozí experimentální studie jasně ukázaly, že obnova efektivní mikrovaskulární perfuze je limitním faktorem zotavení jaterních funkcí bez ohledu na striktní normalizaci systemové hemodynamiky.³⁰ Základním klinickým problémem jsou zcela omezené možnosti přímého vyšetření jaterní perfuze na mikrovaskulární úrovni v běžné klinické praxi. Zcela unikátní možnosti k přímému studiu a vyšetření jaterní mikrocirkulace v klinice je peroperační období u nemocných podstupujících nitrobřišní výkony na jaterním parenchymu i mimo něj. V prvních zcela ojedinělých případech (jaterní resekce u žijících dárců a ortotopické transplantace s vyšetřením graftu) byly právě použity neinvazivní optické technologie typu OPS a SDF zobrazení, kdy byla zjištěna korelace mezi iniciálním mikrocirkulačním statutem a časnou funkcí graftu.^{25,26} Určitou alternativu představuje i laser Doppler flowmetrie, kde by podmínkou k perioperačnímu vyšetření nebyla ani laparotomie, vzhledem k velikostem dostupných laserových sond.

Za fyziologických podmínek přitéká krev do jater cestou a. hepatica (500ml/min) a cestou v. portae (1500ml/min). Mechanismy regulující hepatickou mikrocirkulaci s ohledem na duální charakter perfuze jater jsou velmi komplexní, základní v současné době známé principy byly velmi podrobně shrnuty v recentní světové písennictví.³¹ Ačkoli jaterní sinusoidy, stejně jako kapiláry ostatní mikrocirkulační sítě, neobsahují cévní hladké svalové buňky, je všeobecně akceptovaným faktem, že mohou podléhat aktivní konstriktci zprostředkované specializovanými kontraktilními pericyty (Itovy buňky, HSC - hepatic stellate cell).³²⁻³⁴ Regulace kapilárního průtoku se také uskutečňuje aktivními morfologickými změnami endotelií, tzv. buckling.³⁵⁻³⁷ Existuje unikátní vztah mezi portálním a arteriálním cévním systémem jater, uplatňuje se koncept specifické komunikace mezi oběma vaskulárními systémy.³⁸ Ukazuje se, že díky arteriolo-portálním anastomozám existují zkraty mezi oběma vaskulárními systémy jater. Bylo prokázáno, že tyto zkraty hrají klíčovou úlohu pro stabilitu dodávky kyslíku a živin v jaterním parenchymu.³⁹

Regulace mikrocirkulace jater může být ovlivněna účinkem potentních vazoaktivních substancí. Endoteliny (ETs), tromboxan A₂, angiotensin II a katecholaminy jsou potentními vazokonstriktory, opačně oxid dusnatý (NO), oxid uhelnatý (CO) a prostaglandiny jsou považovány za potentní vazodilatátory, které za fyziologických okolností vyvažují účinky

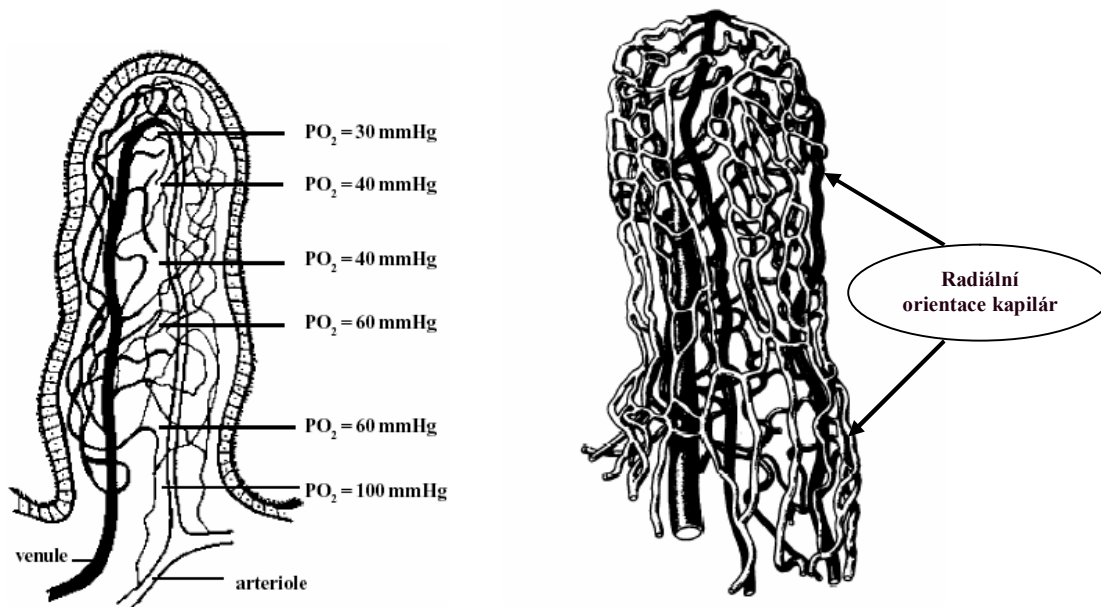
vazokonstrikčních látek. V posledních letech je věnováno velké úsilí výzkumu vlastností a vztahu mezi endoteliny s jejich receptory na straně jedné a enzymovými systémy uvolňující vazoaktivní gaseózní molekuly NO a CO na straně druhé (jedná se o syntetázu oxidu dusnatého a hem-oxygenázový systém).⁴⁰ Dílčí výzkumy posledních let ukazují možný podíl podávaných anestetik na ovlivnění rovnováhy mezi jednotlivými systémy kontrolujícími perfuzi hepato-splanchnické oblasti na úrovni mikrocirkulace.

V klidu protéká splanchnickou oblastí přibližně 30% minutového srdečního výdeje, z čehož připadá asi 700 ml/min na truncus coeliacus, 500 ml/min na horní a 300 ml/min na dolní mezenterickou tepnu.⁴¹ Průtok krve v kapilárách střevní mukózy se může při procesu trávení zvýšit o 70 až 100%. Jak již bylo řečeno, šokové stavy, trauma, sepse či velké chirurgické výkony mohou být příčinou rozvoje syndromu multiorgánové dysfunkce, kde jedním z patofyziologických mechanismů je redistribuce krevního průtoku vedoucí k regionální orgánové hypoperfuzi s obtížně predikovatelnými dopady. Tento nepříznivý stav může přetrvávat i přes normalizaci systémové dodávky kyslíku.⁴² Je řada velmi opodstatněných důvodů, proč je nutné se ve výzkumu, klinice i léčbě šokových stavů zaměřovat na perfuzi střeva a známky její dostatečnosti. Klidová tkáňová tenze kyslíku ve střevní mukóze (ptO₂) je i za normálních okolností nízká a činí 15-20 torr, což je způsobeno minimálně dvěma mechanismy. Jednak je to nízká hodnota efektivního hematokritu v kapilárách klků díky fenoménu „plasma-skimming - odstředění plasmy“⁴³, jednak je to zcela zvláštní mikrocirkulační architektura klku s protiproudovou výměnou kyslíku mezi přívodnou arterioulou a odvodnou venulou v dlouhé ose klku (Obr. 1A,B).^{44,45} Za normálních okolností tato zkratová difuze kyslíku není pro integritu klků nebezpečná a to i přesto, že v průběhu trávení klesá ptO₂ až na 5 torr. Střevní mukóza má schopnost velmi vysokého navýšení extrakce kyslíku, střevo je totiž orgánem s nejvyšší hodnotou kritické dodávky kyslíku (DO₂). To je taková hodnota dodávky kyslíku, kdy se již extrakční poměr pro kyslík nezvyšuje a extrakce kyslíku je tedy přímo závislá na jeho dodávce. Po dosažení hodnot kritické dodávky kyslíku může dojít k hypoxii vrcholových partií klku a desintegraci střevní bariéry s možností bakteriální translokace do oběhu.⁴⁶ Je však prokázáno, že metabolismus střevní mukózy může fungovat určitý čas za „low flow“ stavu a to bez nadprodukce laktátu.²⁰

Mechanismy regulující průtok krve jednotlivými vrstvami střevní stěny lze obecně rozdělit na intrinzické a extrinzické. Střevo má velmi bohaté zásobení nervovými vlákny sympatiku, což za stresových podmínek (krvácení, šokové stavy, trauma, velké chirurgické výkony) vede k excesivní vazokonstrikci s masivní redistribucí krevního průtoku ze splanchnické oblasti do vitálně důležitých orgánů. Specifickým faktorem ovlivňujícím průtok

krve střevními kapilárami jsou velké změny osmolarity vznikající při procesu trávení jednotlivých nutrientů. Regulační mechanismy střevní perfuze jsou shrnuty v Obr. 2A,B.

Obr. 1A,B: Protiproudová výměna kyslíku v klku – fyziologický shunt a mikrovaskulární struktura klku (podle de Figueireda⁴⁴ a Spannera⁴⁷)



Protiproudová výměna kyslíku mezi přívodnou arteriolou a odvodnou venulou s progresivním snižováním arteriolární tenze kyslíku (paO_2)

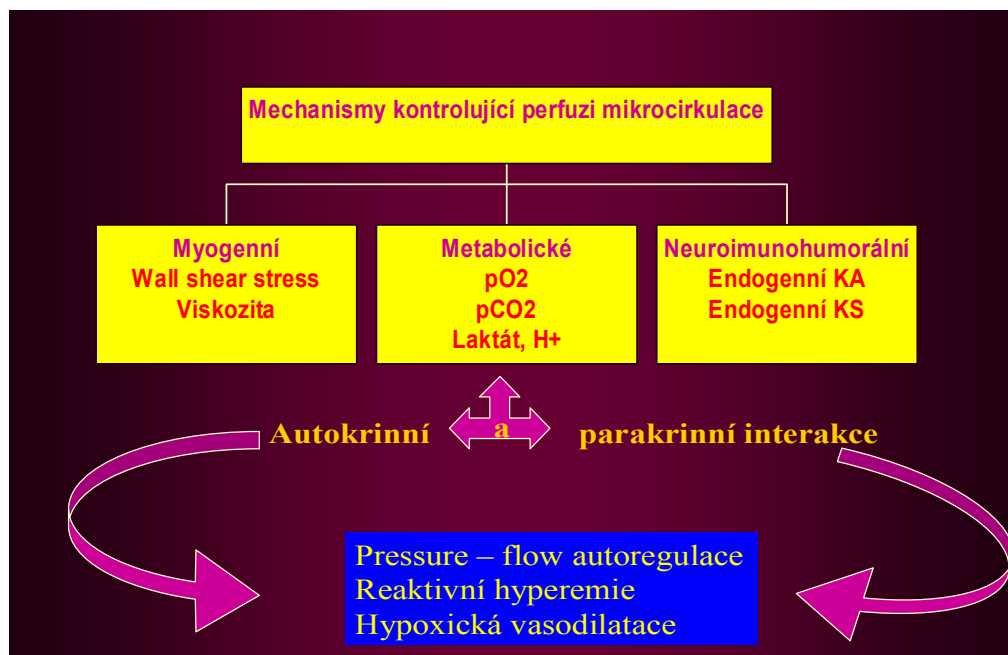
Vaskulární anatomie lidského klku s radiální orientací kapilár, tučně arterioly, bíle venuly

Mezi etiologické faktory mezenterální ischemie a střevní hypoperfuze patří arteriální embolizace, arteriální trombóza a žilní trombóza. Tyto mechanismy tvoří 70-80% příčin střevní ischemie. Ve 20-30% případů střevní hypoperfuze se však jedná o tzv. non-okluzivní mezenterální ischemii, ke které dochází v průběhu „low flow states“ v hepatosplanchnické oblasti a to z nejrůznějších příčin včetně hemoragie, sepse a ostatních forem šokových stavů. Tyto patofyziologické mechanismy jsou shrnuty v Obr. 3.

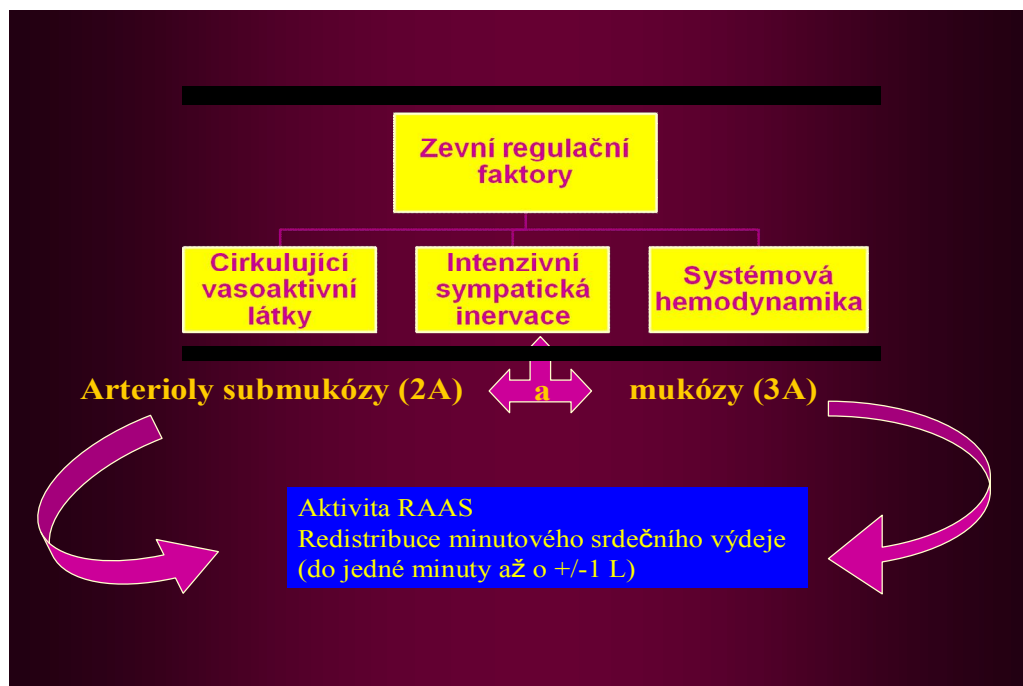
Výzkum moderních anestetik a anesteziologických technik přináší nové překvapivé poznatky v oblasti tzv. non-anestetických účinků anestetik včetně těch ovlivňujících orgánovou perfuzi a mikrocirkulaci.⁴⁸ Změny v mikrovaskulární reaktivitě, metabolismu NO a uvolňování cytokinů jsou hlavními předpokládanými mechanismy, jež ovlivňují řízení mikrocirkulace. Vzhledem k obligatornímu používání anestetik, hypnotik, opioidů či jiných anesteziologických technik v bezpočtu kritických stavů je velmi aktuální a oprávněnou otázkou vliv anestetik a přidružených anesteziologických technik na mikrocirkulaci orgánů,

zjm. pak v hepatosplanchnické oblasti. Výše uvedené mechanismy a jejich dopady jsou hlavním zaměřením této práce a jsou detailně probrány v kap. 1.5 a 5.

Obr. 2A: Intrinzické mechanismy regulující střevní perfuzi



Obr. 2B: Extrinzické mechanismy regulující střevní perfuzi



Obr. 3: Patofyziologické mechanismy střevní hypoperfuze



1.3 Nové metody studia mikrocirkulace v experimentu a v klinické praxi

1.3.1. Orthogonal polarization spectral imaging (OPS)

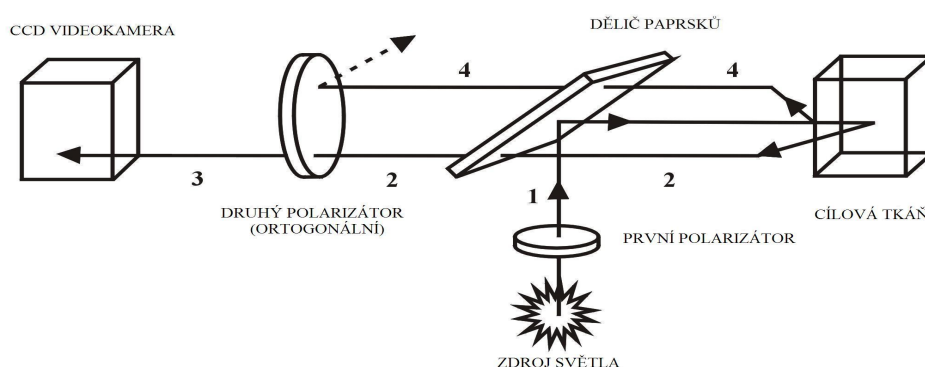
Technologie OPS imaging byla vyvinuta v Cytometrics, Inc. (Philadelphia, PA, USA) se záměrem vytvořit videomikroskop umožňující vytvořit vysoce kontrastní obraz mikrocirkulace v odraženém světle.⁴⁹ Zcela původním záměrem však byl vývoj přístroje, který by umožnil analýzu obrazů mikrocirkulace a poté na principu spektrofotometrie stanovení krevního obrazu bez nutnosti odběru krve.⁵⁰ Konvenční reflektivní zobrazování (CRI) neumožňuje vznik vysoce kontrastního obrazu v důsledku mnohočetného rozptylu světla na povrchu. Tento jev je eliminován technikou OPS, kdy lineárně polarizované světlo prochází přes dělič paprsků a dopadá na povrch tkáně. Většina odraženého světla zůstává polarizována a neprochází tak ortogonálně situovaným druhým polarizátorem – analyzátozem, tudíž se nepodílí na tvorbě obrazu. Světlo, které prochází do hloubky tkáně, kde dochází k vícečetnému rozptylu, je depolarizováno a může tedy projít druhým polarizátorem a vytvořit obraz na pozadí (Obr. 4). K dosažení optimálního obrazu mikrocirkulace byla zvolena vlnová délka emitovaného světla 548nm, při které je maximum absorpce rovnoměrně rozděleno mezi oxy- a deoxyhemoglobin. Dva fyzikální jevy se tak podílejí na vzniku obrazu v odraženém světle: absorpce nezbytná pro dostatečný kontrast a rozptyl nezbytný k formování obrazu na pozadí (iluminaci).⁶ Tak dochází přímo k vizualizaci

krevních cév mikrocirkulace metodou OPS imaging. Detailní popis technologie OPS imaging a jejích principů dle Gronera a její další technické aspekty byly publikovány již dříve.^{6,51}

1.3.2. Sidestream dark-field (SDF) imaging

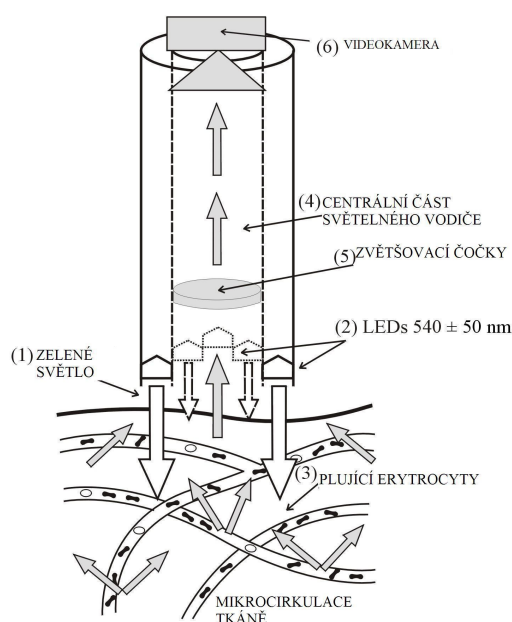
Mírně odlišný je princip další ještě citlivější optické metody – Sidestream dark-field (SDF) imaging. Diody (LEDs) emitující zelené světlo (540 ± 50 nm) jsou uspořádány do kruhu na konci optické sondy. Toto světlo přímo osvětluje tkáňovou mikrocirkulaci. Zdroj tohoto světla je opticky izolován od jádra optické sondy, kde prochází světlo emitované zpět tkání (Obr.5). Proto SDF technologie poskytuje zobrazení mikrocirkulace s větším rozlišením a kontrastem v porovnání s OPS technologií.⁵² Tak je možno zřetelně pozorovat pohybující se erythrocyty a obraz analytickým softwarem vyhodnotit. SDF sonda je kryta plastovou vyměnitelnou sterilní čočkou, se sondou je možno vyšetřovat přímo držením v ruce nebo lépe prostřednictvím nastavitelného fixátoru s flexibilním ramenem (Obr.6 A,B,C). Zavedení vyšetření SDF sondou do rutinního výzkumu mikrocirkulace jasně prokázalo klíčovou úlohu fixačního ramene s mikroposuvem při eliminaci artefaktů, tato zařízení jsou nadále zdokonalována.^{53,54} Principy SDF zobrazení a porovnání SDF a OPS technologie byly detailně studovány autory Incem a Goedhartem.⁵⁵

Obr. 4: Orthogonal polarization spectral (OPS) imaging, optické schéma



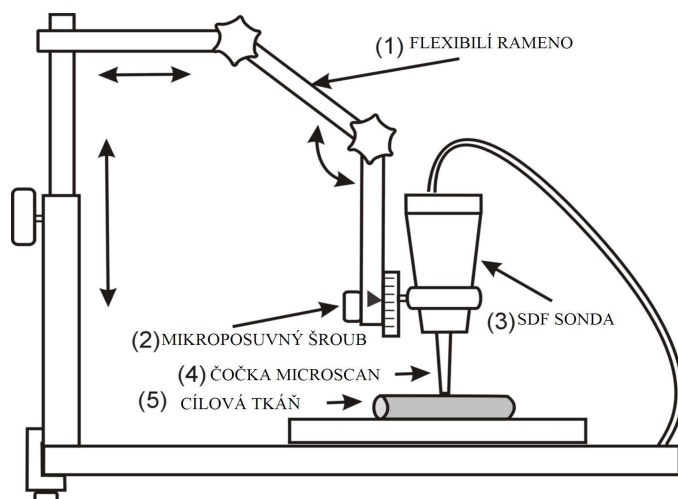
Výchozí polarizované světlo (1) je vysíláno k cílové tkáni prostřednictvím děliče paprsků (2). Depolarizované rozptýlené světlo prochází ortogonálním polarizátorem (analyzátozem) (3) a dopadá na CCD videokameru. Odražené polarizované světlo (4) je eliminováno ortogonálním polarizátorem.

Obr. 5: Sidestream dark-field imaging (SDF) - optické schéma



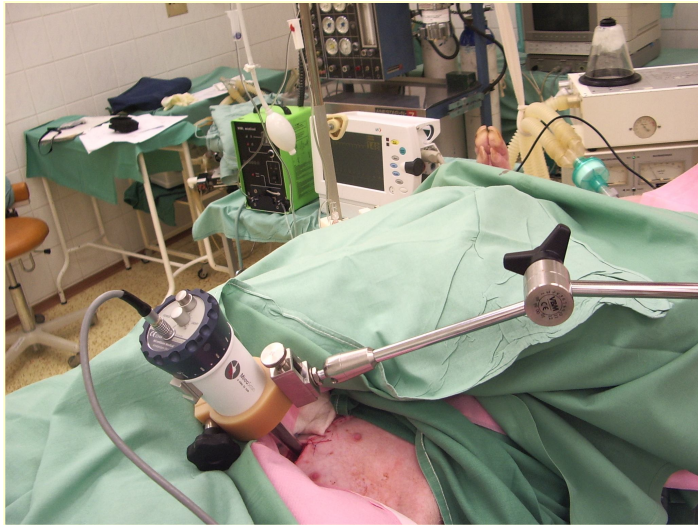
(1) Zelené světlo je emitováno směrem k cílové tkáni
 (2) periferními 540 ± 50 nm světlo emitujícími diodami / z angl. light-emitting diodes (LEDs) / uspořádanými do kruhu na konci světelného vodiče. Mikrocirkulace je přímo osvětlena a prosvícena ze strany zeleným světlem absorbovaným molekulami hemoglobinu v erythrocytech, jež pozorujeme jako (3) tmavé pohybující se buňky. Zobrazovací centrální část světlovodného kanálu (4) je opticky izolována od LEDs. Zvětšovací čočka (5) promítá obraz na kameru (6).

Obr. 6A: Schéma stabilizačního a fixačního ramene pro SDF sondu



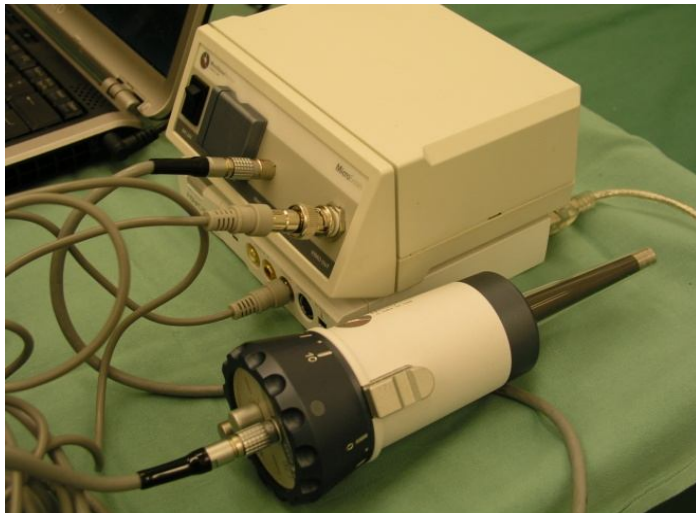
(1) Flexibilní rameno umožňující horizontální, vertikální rotační pohyby zakončené speciálním adaptérem s (2) mikroposuvným šroubem zajišťujícím pohyb SDF sondy (3) a MicroScan čočky (4) v rozmezí +/- 5 mm k cílové tkáni (5).

Obr. 6B: SDF sonda fixovaná v ileostomii



SDF sonda ve fixačním rameni umístěná v nástěnné ileostomii v experimentu na praseti. *Vlastní fotodokumentace*

Obr. 6C: SDF sonda se zdrojem zeleného světla



SDF sonda je propojena se zdrojem a s převodníkem, který odesílá signál do počítače, kde je videosekvence z mikrocirkulace ukládána a dále vyhodnocována. *Vlastní fotodokumentace*

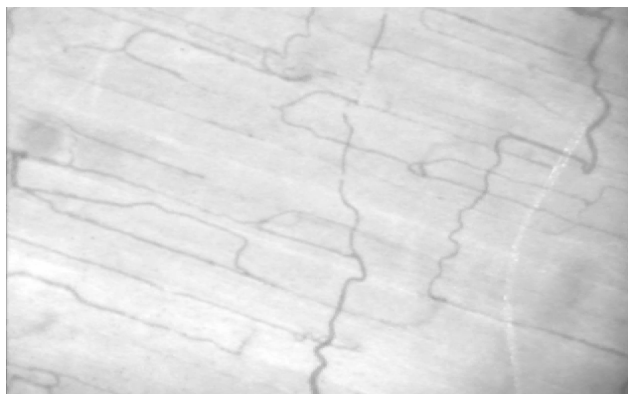
1.3.2.1. Základní metodologie analýzy mikrocirkulace ve vybraných orgánových systémech

Mikrocirkulační síť zobrazená metodou OPS a SDF zobrazení má orgánově specifickou strukturu, proto i analýza změn mikrocirkulace zohledňuje vedle obecných pravidel pro analýzu i specifickou morfolologii mikrocirkulace v jednotlivých orgánových systémech. Základním statickým parametrem hodnoceným při analýze mikrocirkulace je funkční kapilární denzita (FCD – Functional Capillary Density), parametr je definován jako délka kapilár perfundovaných erytrocyty vztažená na jednotku plochy, obvykle v jednotkách cm/cm^2 . Parametr FCD je tak přímým ukazatelem nutriční tkáňové perfuze a nepřímým ukazatel dodávky kyslíku do tkání na regionální úrovni. Tento fakt byl potvrzen studiem ischemicko-reperfuzního poškození na vysoce standardizovaném modelu mikrocirkulace kožního laloku a kosterního svalu u laboratorního křečka.⁵⁶⁻⁵⁷ Při analýze mikrocirkulace povrchu jater je obdobně měřen parametr funkční sinusoidální denzita (FSD – Functional Sinusoidal Density). Dalšími statickými parametry jsou kapilární průměr resp. sinusoidální průměr (SD – Sinusoidal Diameter), venulární průměr a průměr postsinusoidálních venul (PSVD – Postsinusoidal Venular Diameter). Podstatně složitější je analýza mikrocirkulace jednotlivých částí střevní stěny. Standardní analýzou je stanovena zvláště FCD v longitudinální a cirkulární svalové vrstvě střeva. Velká pozornost je věnována analýze mikrocirkulační sítě střevní mukózy a perfuzi střevních klků. Zatímco FCD longitudinální a cirkulární vrstvy střevní stěny lze vyšetřit OPS či SDF sondou ze serosního povrchu střeva, mikrocirkulace střevní mukózy se vyšetřuje cestou standardizované stomie provedené na antimezenterální straně střeva. Velmi vysoká hustota kapilární sítě střevní mukózy (přes $500 \text{ cm}/\text{cm}^2$) vyžaduje vysoké rozlišení zobrazovací metody a klade vysoké nároky na off-line analýzu, proto bylo vytvořeno a zkoumáno několik modelů analýzy mikrocirkulace střevní mukózy s ohledem na její význam při rozvoji syndromu multiorgánové dysfunkce, jak bylo uvedeno výše. Kromě měření FCD střevní mukózy bylo použito i semikvantitativní měření hustoty perfundovaných klků, tzv. villus density (VD), které zavedl Nakajima při porovnávání změn perfuze střevní mukózy v průběhu hemoragického a septického šoku. VD je dána poměrem počtu kontinuálně perfundovaných klků a celkovým počtem zobrazených klků v definované oblasti.¹⁸

Hodnocení dynamických parametrů mikrocirkulace (rychlosti krevního průtoku v kapilárách, arteriolách, venulách, charakter prodění) je doposud předmětem intenzivního

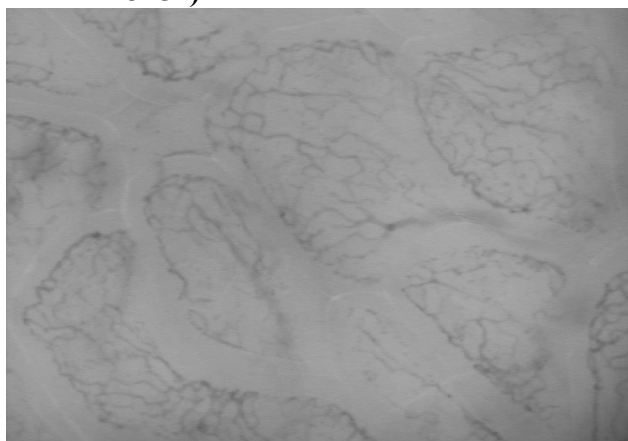
výzkumu jak v oblasti metodologie, tak v oblasti interpretace získaných dat.^{17,19} Jedním z prvních semikvantitativních dynamických parametrů, který byl použitelný i v klinickém vyšetření mikrocirkulace je microvaskular flow index (MFI) zavedený Boermou.¹⁵ Jedná se o parametr nabývající hodnot od 0 do 3. Vyšetřované pole mikrocirkulační sítě je rozděleno na 4 kvadranty, v každém kvadrantu je vybrána jedna kapilára, jejíž průtok je hodnocen indexem 3, je-li tok kontinuální, indexem 2 je-li zpomalený (obleněný), indexem 1, je-li tok intermitentní a indexem 0, je-li pozorován „stop flow.“ Výsledný index MFI je získán součtem indexů z jednotlivých kvadrantů děleným 4. Byť se jedná o semikvantitativní parametr zatížený jistou mírou subjektivity v hodnocení, je to nejpoužívanější hodnota při popisu dynamických změn mikrocirkulace v šokových stavech. V klinickém výzkumu je hodnota MFI vedle FCD hlavním vyhodnocovaným parametrem v oblasti dostupné sublinguální mikrocirkulace. Hodnocení dynamiky mikrocirkulace ve splanchnické oblasti je fokusováno na popis průtoku v mikrocirkulaci klků, zde se v experimentech analyzuje dle Sareliuse rychlost krve ve vrcholové arteriole a ve třech kapilárách a podstatné je, že v každém časovém bodě na časové ose experimentu se analyzuje mikrocirkulace ve třech různých oblastech vyšetřované tkáně.⁵⁸ Příklady zobrazení orgánové mikrocirkulace metodou SDF jsou uvedeny v Obr. 7A-F, základní metodika analýzy mikrocirkulace v programu AVA (Microvision Medical, Amsterdam, Nizozemí) je uvedena v Obr. 8 A,B.

Obr.7A: Mikrocirkulační síť kosterního svalu potkana (SDF, objektiv 5x, celkově 325x)



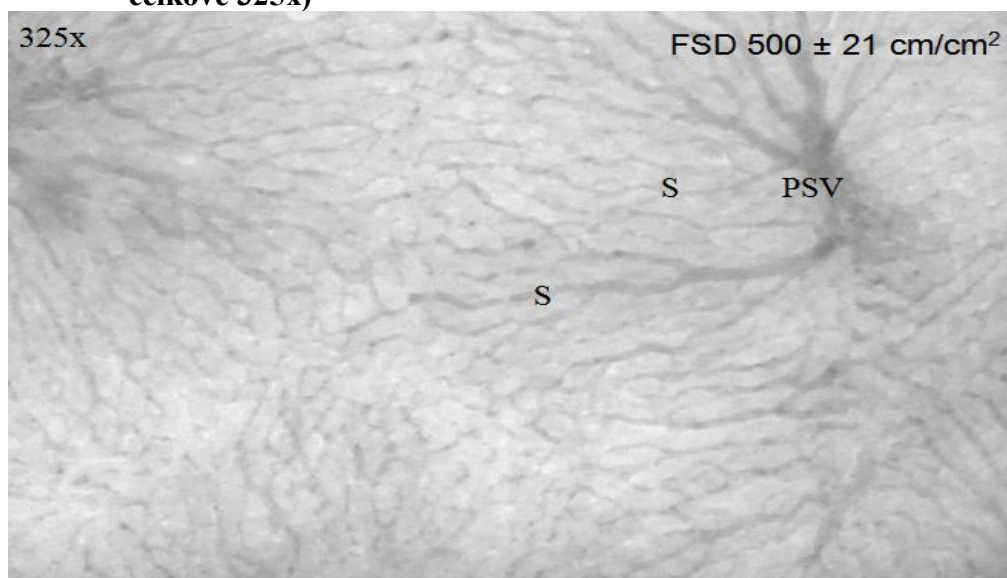
*Vlastní
dokumentace*

Obr.7B: Mikrocirkulační síť mukózy ilea (klky) u prasete (SDF, objektiv 5x, celkově 325x)



*Vlastní
dokumentace*

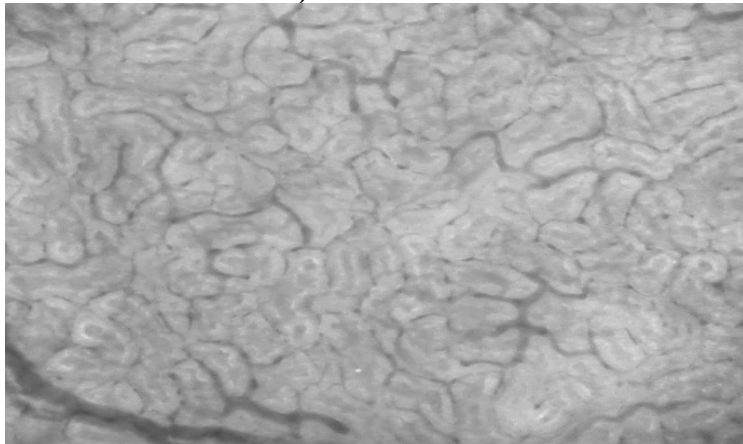
Obr.7C: Mikrocirkulační síť povrchu jater u ventilovaného potkana (SDF, objektiv 5x, celkově 325x)



*Vlastní
dokumentace*

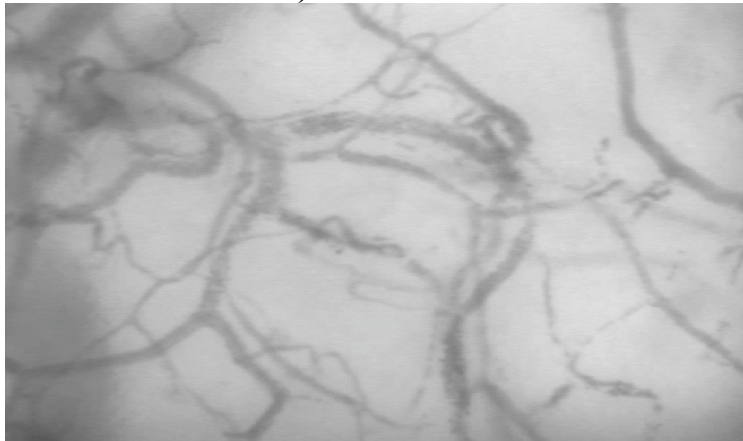
S – sinusoidy, PSV – postsinusoidální venula

Obr.7D: Mikrocirkulační síť na povrchu kortexu ledviny u potkana (SDF, objektiv 5x, celkově 325x)



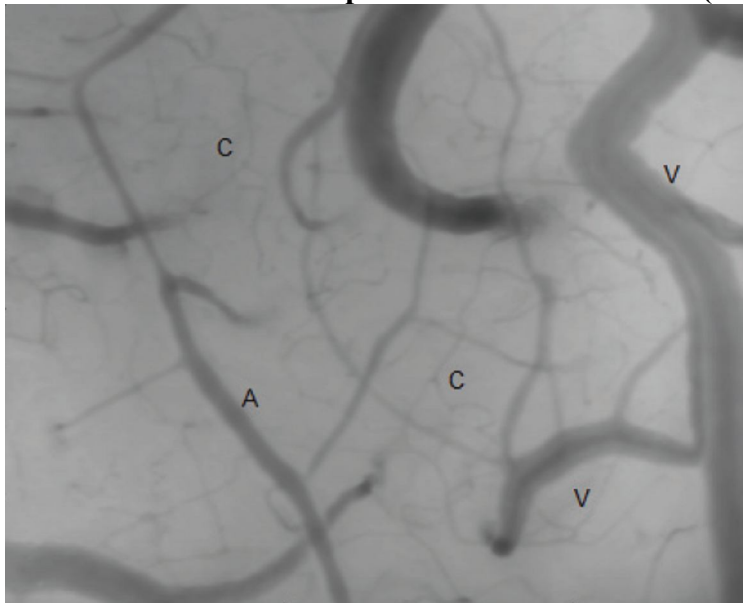
Vlastní dokumentace

Obr.7E: Sublinguální mikrocirkulace u člověka, zdravý dobrovolník (SDF, objektiv 5x, celkově 325x)



Vlastní dokumentace

Obr.7F: Mikrocirkulace povrchu mozku u králíka (SDF, objektiv 5x, celkově 325x)



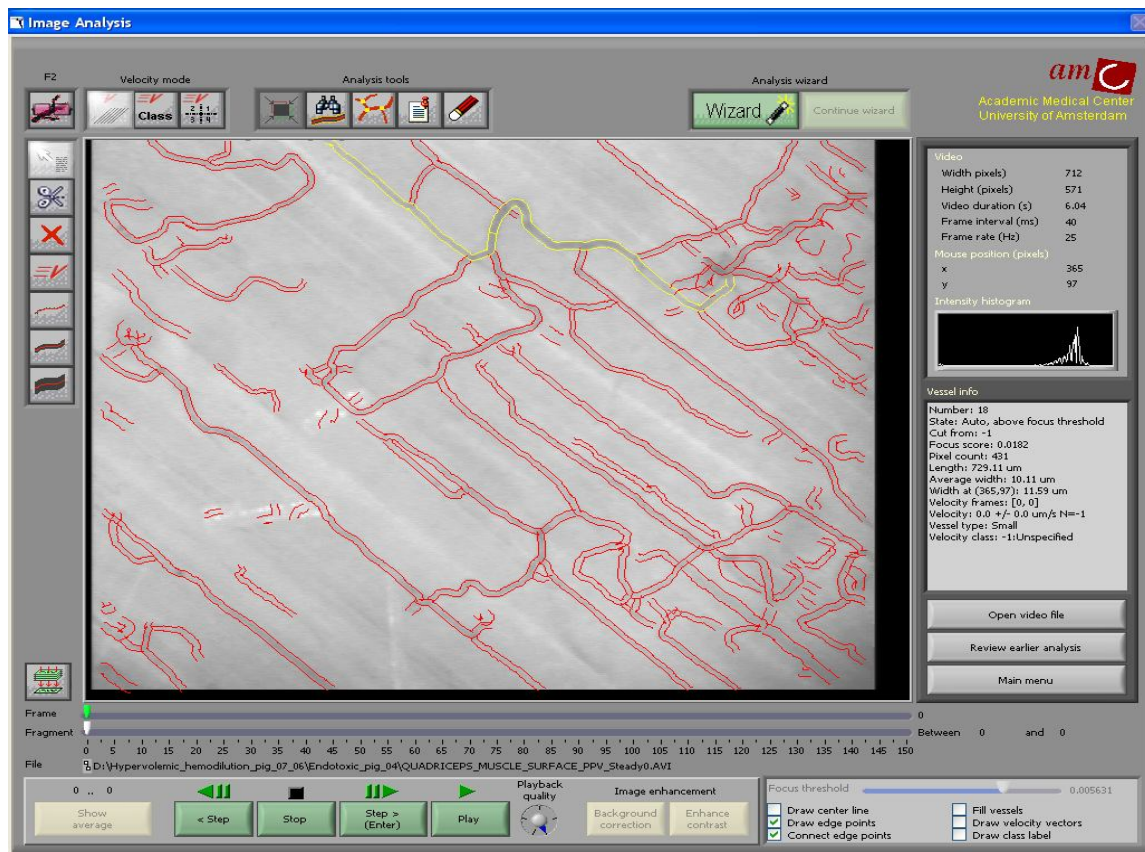
Vlastní dokumentace

C – kapiláry, A – arterioly, V – venuly

Obr.8A: Analýza sekvence mikrocirkulační sítě v programu AVA, importované video



Obr.8B: Princip analýzy a výpočtu FCD výpočtem dle stupní šedi

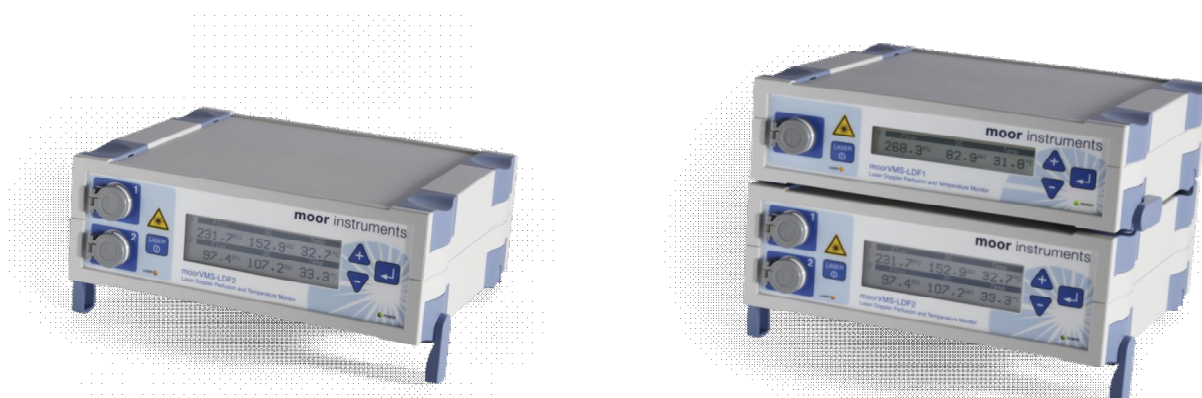


1.3.3. Laser Doppler Flowmetrie (LDF)

Laser Doppler flowmetrie je neinvazivní diagnostická metoda pro měření průtoku krve ve tkáních na úrovni mikrocirkulace. Je založená na principu Dopplerovského frekvenčního posunu laserového paprsku světla po interakci s pohybujícími se erytrocyty. Monochromatické světlo o vlnové délce 780nm je vysíláno optickými vlákny směrem ke tkáni, zde dochází k rozptylu světla, zpětně odražené světlo je vedeno jinými optickými vlákny směrem k fotodetektoru. Při interakci světla s pohybujícími se objekty (zde pohybující se erytrocyty) dochází k frekvenčnímu posunu světelného paprsku, jeho velikost je závislá na rychlosti pohybujících se objektů. Odraz světla od nepohybujících se předmětů frekvenční posun nezpůsobí. Výstupní signál je komponován z počtu pohybujících se erytrocytů a z jejich průměrné rychlosti v mikroobjemu tkáně, obvykle 0,3 – 1 mm².⁵⁹ Výsledkem jsou tedy arbitrární jednotky, tzv. perfusion units [PU]. LDF technologie tedy neměří absolutní hodnotu průtoku krve v definovaném objemu tkáně. Velmi podrobný popis metodologie, principů, technických omezení a nejnovějších pokroků v laser Doppler flowmetrii přináší práce Rajana a Varghese⁶⁰ a Humeaua.⁶¹

Zkušenosti s využitím LDF v klinické praxi jsou především u pacientů v sepsi, u nichž byl měřen průtok mikrocirkulací v kůži, ve svalu, v gastrické a jejunální sliznici.⁶²⁻⁶⁴ Byť je metoda limitována měřením průměrných rychlostí v definovaném tkáňovém mikroobjemu a získaná data tak nemusí odrážet heterogenitu krevního průtoku mikrocirkulací, jedná se o metodu, jejíž postavení v měření tkáňové perfuze je výjimečné z několika důvodů. LDF technologie umožňuje okamžité měření mikroprůtoku v místě aplikované sondy, je tedy získán okamžitý kvantitativní údaj v reálném čase se záznamem jeho vývoje v čase. V posledních letech byly vyvinuty vysoce specializované různé typy sond zcela přizpůsobené charakteru proměřované cílové tkáně a celkovému experimentálnímu designu v experimentu i klinice. Byly navrženy a úspěšně použity kožní, endoskopické, jehlové i úzkoprofilové LDF sondy navíc vybavené termočidlem ke kontinuálnímu měření teploty k maximální objektivitě a porovnatelnosti získaných dat. Přístroj k analýze LDF signálu a typy jednotlivých LDF sond firmy Moor Instruments jsou v Obr. 9 a 10 A-E. Další nespornou výhodou je velikost a snadná manipulace se sondami, v experimentu je možné měřit mikroprůtok např. v oblasti několika orgánů splanchniku najednou v jeden časový okamžik, což umožňuje studium orgánově specifických reakcí mikrocirkulace na inzult (např. sepse, hemoragie, chirurgické trauma) a následnou léčbu či její změnu.⁶⁵⁻⁶⁷

Obr. 9: MoorVMS-LDF™ laser Doppler monitor



Dvoukanálový a tříkanálový Laser Doppler monitor zobrazující hodnoty průtoku v perfusion units [PU] a teplotu v oblasti kontaktu LDF sondy s cílovou tkání.

Obr. 10 A-F: Příklady speciálních LDF sond pro MoorVMS-LDF™ laser Doppler monitor



A) Jehlová LDF sonda typu VP 5



B) Jehlová LDF sonda typu VP 4



C) Kožní LDF sonda typu VP 1T s teplotním čidlem



D) Endoskopická sonda typu VP6ds
s boční emisí laserového světla



E) Speciální endoskopická sonda typu
VP6L s boční emisí laserového světla
speciálně konstruovaná pro měření
rektálního průtoku

1.4 Studium mikrocirkulace a orgánové perfuze v perioperačním období

Předchozí výzkum jasně prokázal, že chirurgický výkon může být příčinou zřetelných změn v mikrocirkulaci, které jsou jednak výsledkem rozvoje syndromu systémové prozánětlivé odpovědi (SIRS), jednak tkáňové hypoxie a přímého tkáňového poškození.^{68,69} Navíc prokázaná souvislost mezi sníženým průtokem v mikrocirkulaci a zhoršeným hojením střevní anastomózy vypovídá o kauzální roli mikrocirkulační dysfunkce v rozvoji některých pooperačních komplikací.^{70,71} Proto splachnická hypoperfuze a hypoxie mohou být příčinou vzniku komplikací, kdy se zdá, že intestinální perfuze a s tím související bariérové funkce mohou být alterovány mnohem dříve, než systémová hemodynamika. Nebo tato není alterována vůbec a prvním projevem hypoperfuze může být porucha pasáže, dehiscence anastomózy či postupný rozvoj syndromu multiorgánové dysfunkce.^{72,73} Některé recentní práce již naznačují prognostický význam detekovaných změn v mikrocirkulaci, které byly indukovány chirurgickým traumatem.⁷⁴

Jak již bylo zmíněno dříve, velkou výzvou pro další experimentální i klinický výzkum splachnické perfuze zůstávají metody a postupy umožňující časnou detekci splachnické hypoperfuze a hypoxie s možností monitorovat odpověď mikrocirkulace na časný terapeutický zásah a to zejména v pooperačním období. Mezi základní dostupné metody pro posouzení splachnické perfuze patří laser Doppler flowmetrie (LDF), tkáňová oxymetrie, tkáňová mikrodialýza, gastrická tonometrie a nové neinvazivní optické technologie typu OPS a SDF zobrazení. Řada těchto metod je však omezena v perioperačním období u velkých výkonů abdominální chirurgie pouze na peroperační fázi a to z důvodu své konstrukce či velikosti měřících sond, a tak není možno pokračovat v monitoraci v průběhu pooperační péče a sledovat tak například efekt terapeutických intervencí na úrovni orgánové mikroperfuze – toto doposud prakticky umožňuje jen technologie LDF.

Určitou možností je pak hledat vztah mezi peroperačním vyšetřením mikrocirkulace a pooperační orgánovou funkcí. Tuto závislost sledoval Gero Puhl a kolektiv, kdy zjistili metodou OPS zobrazení korelaci mezi iniciálními hepatickými parametry mikrocirkulace a časnou funkcí graftu u ortotopické transplantace jater u člověka.²⁵ Další variantou perioperačního hodnocení mikrocirkulace je její vyšetření ve snadno dostupných tkáních (nejčastěji sublinguální sliznice, někdy kolostomie). Z těchto vyšetření lze odvozovat status orgánové perfuze, takto byla vyšetřována například mikrocirkulace sublinguální sliznice metodou OPS zobrazení v průběhu nekomplikované kardiochirurgické operace

v hypotermii.⁷⁵ S ohledem na orgánově specifické řízení krevního průtoku v mikrocirkulaci je zřejmé, že interpretace výsledků je limitována vztahem mezi sublinguální a splachnickou mikrocirkulací, přičemž tento vztah ještě nebyl podrobně popsán a definován. Recentní experiment na praseti studující vliv kumulativní tekutinové bilance a hypervolemické hemodiluce na mikrocirkulaci v mukóze ilea prokázal, že perioperační vyšší stupeň hypervolemické hemodiluce s významně pozitivní kumulativní tekutinovou bilancí vede k poklesu funkční kapilární denzity v klcích a k poklesu počtu homogenně perfundovaných klků. Tyto změny detegované technologií SDF zobrazení však nebyly zachyceny v současně vyšetřované mikrocirkulaci sublinguální sliznice.⁷⁶

Specifickou možností, jak kontinuálně monitorovat splachnickou perfuzi a její změny v celém perioperačním období, je gastrická lumenální tonometrie. Metoda je založená na nepřímé monitoraci stupně anaerobního metabolismu v žaludeční sliznici pomocí měření slizniční tkáňové tenze CO₂ a arteriálního bikarbonátu s předpokladem, že arteriální koncentrace bikarbonátu je v rovnováze s jeho koncentrací v žaludeční sliznici, na základě těchto měření a kalkulací je stanovována hodnota pH (pHi) v žaludeční sliznici. Ačkoli byly úspěšně provedeny perioperační klinické studie s terapií zohledňující monitoraci splachnické perfuze gastrickou tonometrií,⁷⁷⁻⁸⁰ řada metodologických omezení limituje přímé použití gastrické tonometrie v široké klinické praxi pro monitoraci i cílené ovlivnění splachnické perfuze.^{81,82}

Na základě dosavadních zkušeností z klinických i experimentálních studií je zřejmé, že optimální metoda k perioperační monitoraci splachnické perfuze musí splňovat řadu náročných kritérií (bezpečnost, jednoduchost, možnost vyhodnocování v reálném čase včetně odpovědi na terapeutický zásah, snadná interpretovatelnost, vysoká senzitivita a uspokojivá specifická, časná detekce hypoperfuze a možnost pokračovat v monitoraci i v pooperačním období). Tyto podmínky zřejmě nebude možné zajistit jedinou jednoduchou metodou, ale možným řešením může být např. kombinace dvou metod (např. LDF a SDF techniky či LDF a tkáňové oxymetrie).

1.5. Vliv vybraných anesteziologických technik na mikrocirkulaci orgánů – stav současného poznání

Prudký rozvoj anesteziologické péče v posledních třech dekadách zcela změnil pohled na anesteziologickou péči jako celek. Hlavním cílem anesteziologické péče již není pouze umožnit chirurgický výkon, zajistit analgézii, amnézii či bezvědomí, ale dalšími podstatnými atributy anesteziologie se staly jednak důraz na bezpečnost pacienta,^{83,84} jednak důraz na výzkum anesteziologických technik včetně jejich vlivu na outcome nemocných.⁸⁵ V ideálním případě je volba anesteziologické techniky pro individuálního pacienta založena na stanovení optimálního poměru riziko/benefit ve smyslu ovlivnění stresové odpovědi, uspokojivé tolerance ze strany pacienta a přijatelných nákladů. Naprostá většina klinických studií zaměřených na anesteziologickou techniku a outcome porovnává celkovou anestézií s kombinovanou anestézií (celková + epidurální, ev. spinální) a to zejména v abdominální,^{86,87} hrudní⁸⁸ a vaskulární chirurgii^{89,90} a v ortopedii.⁹¹ Dosavadní studie přinesly rozporuplné výsledky hodnocení vlivu anesteziologických technik na outcome, velká metaanalýza prokázala pouze nižší výskyt trombotických komplikací ve skupině s regionální nervovou blokádou,⁸⁹ některé jednotlivé práce prokázaly kratší dobu hospitalizace u nemocných s neuroaxiální blokádou.⁸⁷ Obtížná prokazatelnost vlivu anesteziologických technik na outcome nemocného v chirurgických oborech je zřejmě dána množstvím faktorů ovlivňujících výsledek léčby u této skupiny nemocných, dalšími důvody mohou být nejednotný design a statistická analýza. Přesto je zřejmé že hlavními faktory potenciálně ovlivňující outcome jsou efektivní peroperační a pooperační léčba bolesti blokující stresovou odpověď a cílená optimalizace orgánové perfuze.

V užším pohledu mezi anesteziologické techniky a postupy, které mají rozličný dopad na orgánovou perfuzi a mikrocirkulaci, patří jednak volba techniky celkové anestézie (inhalační, intravenózní, volba jednotlivých anestetik), kombinované anestézie (celková + epidurální nebo celková + periferní blokáda) a typu regionální blokády včetně volby lokálních anestetik. V širším pohledu k anesteziologickým technikám ovlivňujícím orgánovou perfuzi a mikrocirkulaci patří strategie perioperační tekutinové léčby či metody izovolemické hemodiluce. Byl také prokázán pozitivní vliv zvýšené dodávky kyslíku,^{92,93} perioperační normotermie⁹⁴ a optimalizované tekutinové léčby na incidenci pooperačních komplikací a délku hospitalizace.⁹⁵⁻⁹⁷ Obecné faktory ovlivňující pooperační výsledky léčby jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tab. 1. Faktory ovlivňující pooperační výsledky léčby

Pacient

ASA klasifikace
Rizikové faktory, komorbidity
Časná mobilizace

Anesteziologické faktory

Anesteziologické techniky
CA, SA, EA, CSE, CA+EA, nervové blokády, volby anestetik
Peroperační oxygenoterapie, udržování normotermie
Strategie perioperační tekutinové léčby
Techniky pooperační léčby bolesti – multimodální přístup

Chirurgické faktory

Oblast chirurgického výkonu
Chirurgická technika
Zkušenost chirurga
Místní podmínky (kvalita péče, vzdělanost sester, monitorování)
Nezjištěné patologické změny

ASA – American Society of Anesthesia, CA – celková anestézie, SA – spinální anestézie, EA – epidurální anestézie, CSE – kombinovaná spino-epidurální anestézie.

1.5.1. Vliv perioperační tekutinové strategie na orgánovou perfuzi

Přes velké úsilí věnované tekutinové strategii v průběhu velkých břišních výkonů zůstává perioperační tekutinová léčba předmětem mnoha diskusí.^{98,99} Předmětem mnoha odborných úvah je jednak tekutinová terapie různých koncepcí (liberální versus restriktivní tekutinový režim),¹⁰⁰ jednak volba samotných náhradních roztoků či jejich kombinace^{101,102} a v neposlední řadě je to dopad izovolemické či hypovolemické hemodiluce na orgánovou perfuzi a mikrocirkulaci a to s ohledem na mikrocirkulační změny spojené s poklesem viskozity krve.¹⁰³ Adekvátní tekutinová terapie kompenzující hypovolémii v úvodu velkého i nekomplikovaného chirurgického výkonu je nezbytným krokem, který pozitivně ovlivňuje odpověď splachnické cirkulace na chirurgický stres a současně vyrovnává akutní vasodilatační účinek podávaných anestetik a analgetik. Toto chování splachnické cirkulace a mikrocirkulace bylo pozorováno i v experimentu na praseti, kdy byl zkoumán vliv dvou typů peroperačních tekutinových režimů na mikrocirkulaci tenkého střeva cestou ileostomie. Metodou SDF zobrazení bylo zjištěno, že po zahájení tekutinové terapie hodnoty FCD v mukóze ilea a počet homogenně perfundovaných klků mírně stoupaly v obou skupinách

(restriktivní i s hypervolemickou hemodilucí), ovšem po dosažení určitého stupně pozitivní kumulativní bilance tekutin s odpovídajícím poklesem hematokritu se již hodnoty mikrocirkulačních parametrů nezvyšovaly a dokonce ve skupině s hypervolemickou hemodilucí došlo k jejich významnému poklesu.⁷⁶ Již v minulosti bylo prokázáno riziko tvorby intersticiálního edému v důsledku zvýšené vaskulární permeability a nadměrného přívodu krystaloidů, tento fenomén byl prokázán i v oblasti střeva.¹⁰⁴ Tento patofyziologický mechanismus může vést ke zhoršení difuze kyslíku a k buněčné hypoxii způsobené expanzí interkapilárního prostoru, což limituje difuzi plynů.¹⁰⁵ Recentní experimentální práce na praseti prokázaly, že intenzivní volumoterapie sama o sobě nevede ke zvýšení intestinální tkáňové tenze kyslíku (ptO₂) v oblasti zdravé střevní stěny, ani v okolí či přímo v oblasti střevní anastomózy na tlustém střevě.¹⁰⁶ Zvýšení tkáňové tenze kyslíku bylo dosaženo pouze navýšením inspirační frakce kyslíku. K velmi podobným výsledkům dospěl i Hildebrand a kol. zkoumající perfuzi jejunu prasete za různých tekutinových režimů.¹⁰⁷

Podstatným patofyziologickým mechanismem, který ovlivňuje mikrohemodynamiku v průběhu tekutinové terapie, je pokles hematokritu a s tím související pokles viskozity krve. Tento mechanismus ovlivňuje distribuci krevního průtoku v intestinální mikrocirkulační síti. Existují již recentní experimentální práce, které popisují vztah mezi poklesem hematokritu a stupněm vazokonstrikce. Vaskulární rezistence se zvyšuje až o 20% a zůstává na této úrovni až do poklesu hematokritu o 20%, což jednoznačně poukazuje na vasokonstrikci indukovanou nízkým hematokritem.¹⁰⁸ Dalším mechanismem, který může negativně ovlivnit splachnickou perfuzi v průběhu akutní hemodiluce, je změněná reologie erytrocytů se sníženou schopností deformability. Tyto změny mohou vést k částečné redistribuci krevního průtoku mimo splachnické orgány nebo mohou přeměrovat perfuzi do větších nenuutričních a zkratových cév uvnitř splachnické oblasti.¹⁰⁹ Některé experimentální práce také odhalily fenomén orgánově specifické reakce na akutní hemodiluci, kdy izovolemická hemodiluce koloidem s poklesem hematokritu na 25% vedla ke vzestupu tkáňové tenze kyslíku v kosterním svalu, ale nikoli v jaterním parenchymu.¹¹⁰

Velmi ucelený pohled na racionální přístup k perioperační tekutinové terapii respektující základní patofyziologické mechanismy přináší práce Chapella a kol.,¹¹¹ zdůrazněna je i bariérová funkce endotelu a glykokalyx v souladu s koncepcí dvojité bariéry v rámci vaskulární permeability. Glykokalyxová vrstva tak brání neúměrné extravazaci.¹¹² Intenzivně diskutovanou volbu krystaloidů a koloidů staví Chapell na etiologii a stupni hypovolémie s respektováním indikací, kontraindikací a nežádoucích účinků jednotlivých náhradních roztoků.

Souhrnně lze konstatovat, že odpovídající tekutinová terapie v iniciálních fázích chirurgického výkonu je nezbytná k udržení dostatečné splachnické perfuze, ale excesivní perioperační přívod tekutin, který neodpovídá samotné chirurgické proceduře a krevním ztrátám, může negativně ovlivnit intestinální mikrocirkulaci, jejíž změny mohou být podkladem pooperační dysfunkce či dalších komplikací. U pacientů podstupujících nekomplikovaný nitrobřišní výkon lze preferovat restriktivní tekutinový režim, který spíše odpovídá za dané situace reálným potřebám organismu, ukazuje se, že tento přístup má oporu i ve výsledcích studií na úrovni orgánové perfuze a mikrocirkulace.

1.5.2 Vliv anestetik na orgánovou perfuzi a mikrocirkulaci za fyziologických a patofyziologických okolností

V posledních letech se v anesteziologii do popředí zájmu více a více dostává výzkum non-anestetických účinků anestetik. K non-anestetickým účinkům anestetik řadíme jejich vliv na systémovou hemodynamiku, vliv na mikrocirkulaci a její řízení, z dalších klinických účinků se jedná o vliv anestetik na agregaci krevních destiček, neuroprotektivní účinky, antiemetické vlastnosti, alteraci imunitní odpovědi, studují se i protektivní účinky anestetik v průběhu mimotělního oběhu a v neposlední řadě je předmětem výzkumu vliv anestetik na metabolické dráhy oxidu dusnatého (NO).^{113.114} V tomto směru je nejvíce pokročilý výzkum non-anestetických účinků propofolu.¹¹⁵ Toto je jednak podmíněno samotnou molekulou, jednak faktem, že se jedná o lipidovou emulzi, důležitých faktorem je i jeho široké klinické použití v anesteziologii a intenzivní péči. Počet prací studujících non-anestetické účinky různých anestetik rychle narůstá, nicméně výzkum v této oblasti je stále na samém začátku. Doposud známá fakta týkající se anestetik ve vztahu k mikrocirkulaci jsme shrnuli zevrubně v recentní přehledové práci,¹¹⁶ níže jsou uvedena jen nejzákladnější doposud známá fakta.

1.5.2.1. Vliv intravenózních a inhalačních anestetik na mikrocirkulaci

Mechanismy účinku intravenózních anestetik na hemodynamiku až do úrovně mikrocirkulace byly předmětem intenzivního studia v posledních letech. Vliv propofolu, thiopentalu a ketaminu na makrohemodynamiku byl důkladně studován v experimentálních i klinických podmínkách a tyto znalosti jsou základem pro porozumění jejich účinku na mikrocirkulační úrovni.¹¹⁷⁻¹¹⁹ V případě propofolu a thiopentalu byl prokázán jejich centrální inhibiční účinek na sympatický nervový systém, naopak ketamin vykazuje

sympatomimetický účinek. Propofol snižuje kontraktilitu srdečního svalu a to snížením přenosu beta-adrenergního signálu v kardiomyocytech, který je způsoben inhibicí produkce cAMP.¹²⁰⁻¹²² *In vitro* studie prokázaly, že podkladem lokálního vazodilatačního účinku thiopentalu, propofolu a ketaminu je inhibice L-podtypu napěťově řízených Ca²⁺ kanálů.¹²³⁻¹²⁶ V experimentu s řízením mikrocirkulace bránice u potkana byla hodnocena role prostaglandinů a oxidu dusnatého během působení iv anestetik na artetrioly. Byl zjištěn predominantní vliv prostaglandinů při působení etomidátu, což nebylo pozorováno u propofolu a thiopentalu.¹²⁷

V současné době je publikován velmi malý počet experimentálních prací zaměřených na hodnocení hepatosplanchnické mikrocirkulace při vedení anestézie různými intravenózními anestetiky. Bylo prokázáno, že průměr mezenterických arteriol a venul u potkana byl větší při vedení anestézie propofolem s fentanylem v porovnání s anestézií vedenou ketaminem či thiopentalem, průměr kapilár stejně jako makromolekulární leak se mezi jednotlivými skupinami anestetik nelišil.¹²⁸ Existují již práce ověřující hypotézu o protizánětlivých účincích propofolu, na které bylo nepřímo usuzováno ze zjištění, že podávání propofolu vedlo k zachování průtoku v hepatosplanchnické oblasti v průběhu mimotělního oběhu, což může mít dopad na integritu intestinální slizniční bariéry.¹²⁹ Molekulární mechanismy propofolem podmíněných protizánětlivých a vaskulárních účinků zatím nebyly uspokojivě vysvětleny. *In vitro* a *ex vivo* studie u chirurgických pacientů v anestézii propofolem prokázala zvýšení konstitutivní produkce NO a snížení indukibilní produkce NO.¹³⁰ Jiný mechanismus protizánětlivého účinku propofolu spočívá ve změně rovnováhy cytokinového spektra ve prospěch protizánětlivých cytokinů (IL-10, IL-1, IL-1ra).¹³¹ Doposud známé účinky různých intravenózních anestetik na imunitní systém byly velmi detailně shrnuty již dříve.¹³² Experimentální práce u psů potvrdila na dávkově závislý účinek propofolu na regionální perfuzi ledvin, tenkého a tlustého střeva.¹³³ Vysoké dávky propofolu (24mg/kg/hod.) vedly k významnému snížení krevního průtoku v ledvinách, myokardu a tlustého střeva, průtok tenkým střevem byl nezměněn. Následná volumoterapie však upravila myokardiální a renální perfuzi. Při běžné dávce propofolu (12mg/kg/hod) nebyly pozorovány žádné významné změny v perfuzi myokardu a splanchnické oblasti. V recentní klinické studii byla po podání propofolu vyšetřena sublinguální mikrocirkulace u zdravých dobrovolníků v anesteziologickém riziku ASA I. Byl pozorován pokles celkové mikrovaskulární denzity o 9% a počet kontinuálně perfundovaných kapilár klesl o 16%.¹³⁴ Nicméně nyní je klinický význam těchto zjištění včetně dalších konsekvencí zcela nejasný.

Moderní potentní inhalační anestetika, která jsou v současné době v klinické praxi, zahrnují skupinu velmi specifických halogenovaných éterů, řadíme k nim hlavně izofluran, sevofluran a desfluran. V současnosti se inhalační anestetika v naprosté většině případů používají v koncentracích do 1 MAC (minimální alveolární koncentrace), kardiiovaskulární účinky vykazují jednoznačně závislost na dávce.⁴⁸

Jak již bylo zmíněno dříve, optimalizace globálních hemodynamických parametrů za patologických stavů různé etiologie nemusí automaticky vést k úpravě tkáňové perfuze na úrovni mikrocirkulace.¹⁶ Logicky pak vyvstává otázka, zda-li inhalační anestetika nealterují regionální průtok krve v mikrocirkulaci a to i v případě, kdy parametry systémové hemodynamiky jsou udržovány v normálních hodnotách. Předmětem klinických i experimentálních studií zaměřených na efekt inhalačních anestetik na tkáňovou perfuzi a mikrocirkulaci je nejčastěji oblast hepatosplanchniku a ledvin. U pacientů podstupujících velký nitrobřišní výkon byla vyhodnocena jejunální a jaterní perfuze ve fázi udržování anestézie izofluranem nebo desfluranem v dávce 1 MAC, perfuze byla hodnocena metodou laser Doppler flowmetrie. Anestezie vedená desfluranem byla spojena s vyšším průtokem jejunem v porovnání s izofluranem, perfuze jater se při použití obou anestetik významně nelišila.¹³⁵ Metodicky velmi propracovaná studie u psů s využitím průtokových sond a techniky s mikrosférami neprokázala pokles regionální perfuze duodena a jater ani ve skupině s desfluranem, ani ve skupině s izofluranem.¹³⁶ Hlubší úrovně anestézie (2x MAC) vedly k poklesu celkového průtoku krve játry v případě použití desfluranu, nikoli v případě izofluranu.¹³⁷ Jiná studie u psů přinesla podobné zjištění, kdy podávání izofluranu i sevofluranu vedlo k mírnému poklesu krevního průtoku v portálním řečišti, což nebylo pozorováno v arteriálním hepatickém řečišti.¹³⁸ Souhrnem lze konstatovat, že inhalační anestetika mohou ovlivnit průtok krve v portálním řečišti, ale současné poznání prokazuje zachovanou intestinální a hepatickou mikrocirkulaci a to ve vztahu ke tkáňové potřebě kyslíku.

Renální perfuze pod vlivem inhalačních anestetik byla opakovaně studována, nebyla však prokázána alterace regionálního krevního toku ledvinami a to ani v případě desfluranu či izofluranu a sevofluranu.^{137,139} Podávání desfluranu a izofluranu v obvyklých koncentracích nevedlo k porušení autoregulace průtoku krve ledvinami, byl-li systolický krevní tlak nad 90 mmHg.¹⁴⁰

Důležitou oblastí nepřetržitého výzkumu je vliv inhalačních anestetik na perfuzi myokardu, nejčastěji diskutovanými problémy je jednak vliv na koronární řečiště u ischemické choroby srdeční, jednak fenomén ischemické prekondice indukovaný inhalačními

anestetiky. Desfluran a izofluran u psů neměnily charakter distribuce krevního průtoku v myokardu, pokles myokardiální perfuze odpovídal poklesu myokardální práce.^{136,139,141} Poslední práce jasně prokazují schopnost potentních inhalačních anestetik navodit efekt ischemické prekondice a snížit tak citlivost myokardu k ischemickým inzultům.¹⁴²⁻¹⁴⁵

V současné době nejsou spolehlivé důkazy o navození koronárního steal fenoménu a následné myokardiální ischemie potentními inhalačními anestetiky.

Sevofluran a izofluran v humánních studiích snižují produkci prozánětlivých cytokinů (IL-1 β , TNF- α),¹⁴⁶ tatož anestetika snižují uptake neutrofilů v koronární cirkulaci¹⁴⁷ a omezují uvolňování hydroxylových radikálů v ischemickém srdečním svalu.¹⁴⁸

Souhrnně lze konstatovat, že inhalační anestetika, která jsou dnes široce rozšířená v klinické praxi, mají podobné účinky na orgánovou perfuzi a mikrocirkulaci. Při používání inhalačních anestetik v obvyklých koncentracích (1 MAC) zůstává perfuze důležitých orgánů zachována a odpovídá metabolickým nárokům tkání.

1.5.2.2. Vliv epidurální anestézie na mikrocirkulaci

Epidurální anestézie a analgézie jsou běžně používané regionální anesteziologické techniky uplatňované nejen v chirurgii, ale i v porodnictví, traumatologii a v léčbě chronické bolesti. Fyziologické účinky epidurální anestézie jsou neustále předmětem experimentálního i klinického zkoumání, obzvláště pak vliv na kardiopulmonální a splachnickou oblast na úrovni makro- i mikrocirkulace.¹⁴⁹

Zcela klíčovou a v současné době diskutovanou otázkou v experimentální i klinické medicíně jsou komplexní účinky epidurální analgézie a anestézie na gastrointestinální perfuzi. Omezení sympatomimetické aktivity a mezenterická venodilatace pod vlivem hrudní epidurální analgézie (TEA) jsou závislé na dávce a v těsném vztahu k rozsahu blokády.^{150,151} Velké chirurgické výkony, bolest a další inzulty zvyšují aktivitu sympatického nervového systému, vždy s potenciálním rizikem splachnické hypoperfuze a z toho vyplývajících následných komplikací. Proto hlavní diskutovanou hypotézou v posledních letech je klinický i mikrovaskulární dopad oslabené sympatické odpovědi na stresové stimuly, je-li součástí léčby bolesti hrudní epidurální analgézie.

V experimentálních studiích s použitím TEA byly výsledky relativně jednoznačné, kdy TEA prokazatelně zvyšovala krevní průtok v oblasti splachniku, bylo detegováno zlepšení perfuze i na úrovni mikrocirkulace. Například studie s TEA u psů podstupujících oesophagektomii prokázala lepší parametry gastrické mikrocirkulace hodnocené metodou

OPS zobrazení, ve skupině s TEA byla také signifikantně lepší pooperační motilita žaludku a střeva.¹⁵² Výsledky klinických studií přinášejí protichůdné výsledky, nejčastěji vysvětlované nejednotností technik pro vyhodnocení splachnické perfuze a nejednotnými anesteziologickými protokoly. Jak již bylo zmíněno dříve, vyjma peroperačního období je následné vyhodnocování splachnické perfuze v pooperační péči obvykle závislé na hodnocení nepřímých markerů orgánové perfuze (např. měření hladin prozánětlivých mediátorů, uvolňování vazoaktivních substancí, diuréza, hodnocení metodou gastrické tonometrie apod.). V jedné z klinických studií v abdominální chirurgii bylo peroperačně metodou LDF zjištěno zvýšení mikroprůtoku v oblasti tlustého střeva o 41% u pacientů s TEA.¹⁴⁹ V protikladu s tímto zjištěním v metodologicky obdobné práci byl nález signifikantního poklesu průměrného krevního průtoku v seróze kolon.¹⁵³

1.6. Specifika metodologie výzkumu anesteziologických technik a postupů, motivace k výzkumu.

Charakteristickým rysem většiny odborných prací zkoumajících vliv anestetik na mikrocirkulaci orgánů je přítomnost zcela stabilních klinických podmínek v průběhu hodnocení orgánové perfuze. Je zcela legitimní pokračovat ve výzkumu nonanestetických účinků anestetik se zaměřením na ovlivnění mikrocirkulace a její regulační mechanismy. Ukazuje se, že odlišná anestetika zcela odlišně ovlivňují nejen mikrocirkulaci samotnou, ale i její řízení za patologických stavů, přitom původních prací studujících jednotlivá anestetika ve vztahu k orgánové hypoperfuzi je velmi málo.¹⁵⁴ Výzkum anestetik a anesteziologických technik má tedy v současnosti minimálně tři aspekty. V klinice se jedná jednak o optimální výběr anestetika v peroperační fázi u vysoce rizikových nemocných (trauma, hemoragie, sepse, elektivní výkony velkého rozsahu, mimotělní oběh), jednak o volbu vhodné analgosedace v intenzivní péči s respektováním současného poznání o vlivu anestetik na mikrocirkulaci orgánů, byť toto poznání je zatím velmi malé. Druhý aspekt se týká experimentálních prací s výzkumem mikrocirkulace a orgánové perfuze, kde mnohdy instrumentace a průběh experimentu vyžadují celkovou anestézii laboratorního zvířete, nicméně vliv použitých anestetik a anesteziologických technik na výsledky a jejich interpretaci je zohledněn a diskutován jen výjimečně,¹⁵⁵ nehledě na fakt, že anestetické protokoly laboratorních zvířat se zásadně liší a nejsou srovnatelné. Třetím aspektem je etické hledisko výzkumu nonanestetických účinků anestetik a to jak v experimentu, tak v klinice. V naprosté většině případů totiž nelze vybrat „čistě“ kontrolní skupinu, protože charakter experimentu, instrumentace či operace prostě neumožňují nepodávat žádná analgetika či anestetika, což ovlivňuje přesnou interpretaci získaných dat.¹⁵⁶ V takových případech je vysoce standardizovaný anestetický protokol nezbytnou součástí klinické i experimentální práce týkající se mikrocirkulace.

Všechny výše uvedené aspekty výzkumu anestetik a jejich vlivu na orgánovou perfuzi by měly být důležitým faktorem při tvorbě designu dalších studií jak experimentálních, tak klinických. Jasným cílem pak je snadná interpretovatelnost a porovnatelnost získaných dat, nalezení optimální metody monitorace hepatosplanchnické perfuze a následná aplikace získaných poznatků do běžné klinické praxe v anesteziologii a intenzivní péči.

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

- Metodou SDF zobrazení zhodnocení účinku indukční a udržovací dávky vybraných anestetik (propofolu, thiopentalu, ketaminu a midazolamu) na hepatickou a intestinální mikrocirkulaci řízeně ventilovaných potkanů po předchozí laparotomii.
- Zavedení vysoce standardizovaného modelu pro studium vlivu anestetik na hepatosplanchnickou mikrocirkulaci potkana s použitím jednotných protokolů totální intravenózní anestézie s konkrétními anestetiky.
- Dle aktuálně dostupných informací neexistují klinické ani experimentální práce hodnotící hepatickou a intestinální mikrocirkulaci metodou SDF zobrazení v průběhu různých protokolů totální intravenózní anestézie.
- Základní hypotéza projektu: Vybraná intravenózní anestetika odlišně alterují hepatosplanchnickou mikrocirkulaci u ventilovaného potkana s laparotomií.

3. MATERIÁL A METODIKA

Všechny prováděné zákroky na potkanech byly v souladu s legislativou na ochranu zvířat proti týrání a byly schváleny Odbornou komisí Lékařské fakulty v Hradci Králové pro ochranu zvířat proti týrání dne 4.11.2008. Byla respektována etická pravidla doporučená pro publikace v odborné literatuře.¹⁵⁷ Při instrumentaci a operačních technikách na pokusných zvířatech bylo postupováno dle doporučení pro práci s potkanem v laboratoři.¹⁵⁸

3.1. Pokusná zvířata

Do studie bylo zařazeno třicet samců laboratorního potkana kmene Wistar (Bio-Test, Konárovice, Česká republika) o hmotnosti 340 ± 15 g. Dva potkani nezařazení do studie byli použiti na zavedení metodiky instrumentace a vyšetření metodou SDF zobrazení. Laboratorní potkani byli chováni za standardních teplotních a světelných podmínek (dvanáctihodinový cyklus osvětlení, teplota 21-22 °C, vlhkost vzduchu 55 – 65%) s přístupem ke krmivu a vodě bez omezení. Studie probíhala ve viváriu Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Po týdenní aklimatizační periodě byli potkani zařazení do studie.

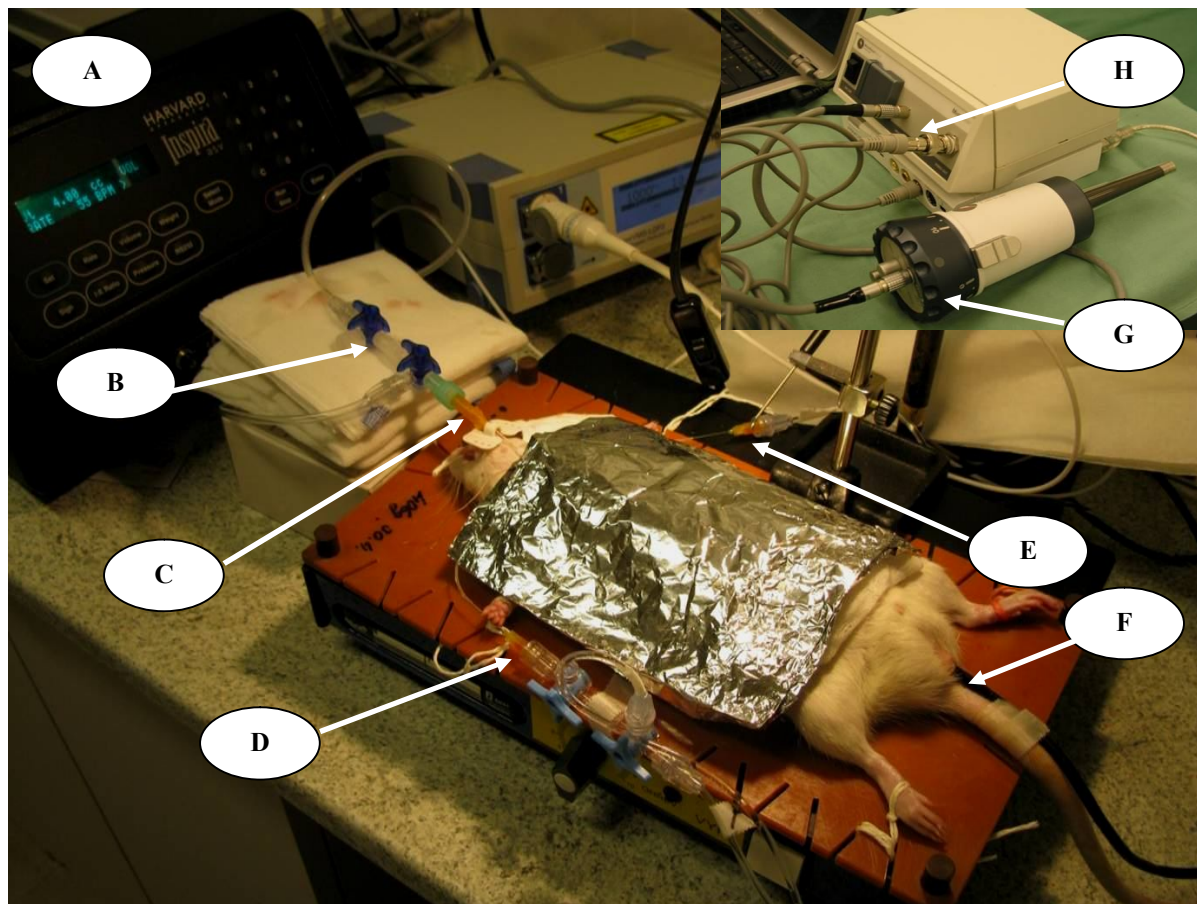
3.2. Anestézie, monitorace a chirurgická preparace

Po předchozím celonočním lačnění s neomezeným přístupem ke zdroji vody byli potkani uvedeni do celkové anestézie intraperitoneální indukční dávkou oxybarbiturátu pentobarbitalu (Nembutal, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA; 60 mg/kg tělesné hmotnosti). Následně byly laboratorní potkani umístěni v supinační poloze na vyhřívaném operačním stole (Heating desk VD typ 1, Vitrum Praha s.r.o., Praha, Česká republika), rektální teplota byla udržována v rozmezí 36,5 – 37,5°C. Poté byla zahájena preparace v oblasti krku. Nejprve s použitím polyetylenových katetrů velikosti 24G byly kanylovány pravá karotická tepna ke kontinuálnímu měření invazivního krevního tlaku a levá jugulární žíla k podávání kontinuální infuze krystaloidu (F1/1 – 10ml/kg/hod.), k podávání anestetik, svalového relaxancia pipecuronia (Arduan, Richter Ltd, Budapest, Maďarsko; 0,2 mg/kg) a opioidu fentanylu (Fentanyl Torrex, Torrex Chiesi, Praha, Česká republika; 2-5 µg/kg – dle potřeby). Po kanylaci velkých cév následovalo provedení tracheostomie (použita žilní flexila Vasocan 14G, B. Braun Melsungen AG, Německo), poté byla zahájena umělá plicní ventilace (ventilátor pro malá laboratorní zvířata, Harvard Scientific Apparatus, Boston, USA, se základním nastavením objemově řízené ventilace – IPPV s parametry: dechový objem 10

ml/kg, PEEP 2 cm H₂O, dechová frekvence 60-70/min., FiO₂ 0,4). Střední arteriální tlak (MAP), tepová frekvence a rektální teplota byly zaznamenávány každých 10 minut u každého zvířete po celou dobu experimentu (monitorace: GE Datex Ohmeda S5 Compact Monitor (Hoyer Praha, s.r.o., Praha, Česká republika). Dostatečnost hloubky anestézie byla vyhodnocována v pravidelných intervalech v průběhu celého experimentu (mióza, stabilita systémového krevního tlaku, reakce potkana na štípnutí v oblasti ocasu či ucha).¹⁵⁹

Po oholení břišní krajiny byla provedena mediální horní střední laparotomie a vizualizovány oboustranně laloky jater. V celém průběhu experimentu byly jaterní laloky ponechány „in situ“ bez jakékoli mechanické manipulace za účelem co nejvíce simulovat reálnou klinickou situaci v průběhu nitrobřišního chirurgického výkonu. Následně byla provedena preparace tenkého střeva dle publikovaným postupů¹⁶⁰⁻¹⁶¹ s určitými modifikacemi. Nejprve byla identifikována oblast ileocekálního přechodu, poté byl ozřejmen 4 cm dlouhý úsek distálního ilea 5 cm orálně od ileocekální chlopně. Tento úsek byl s použitím teplých a fyziologickým roztokem zvlhčených tamponů exponován mimo peritoneální dutinu. Při každém cyklu měření byla exponovaná střevní klička umístěna na zvlhčenou nastavitelnou plastovou podložku a oblast mimo měření byla překryta tenkou plastovou fólií k minimalizaci dehydratace exponované střevní kličky.¹⁶² Všechny ostatní exponované tkáně mimo vyšetřovací pole pro SDF zobrazení v průběhu monitorace mikrocirkulace byly intermitentně zvlhčovány fyziologickým roztokem o teplotě 37 °C. Po dokončení veškeré instrumentace probíhala stabilizační fáze po dobu 20 minut k dosažení stability kardiopulmonálních funkcí a rektální teploty. Laboratorního potkana po dokončení instrumentace s uspořádanými invazivními vstupy ve fázi stabilizace ukazuje Obr. 11.

Obr. 11: Umístění laboratorního potkana ve fázi stabilizace na vyhříváném operačním stole, uspořádání invazivních vstupů



(A) Ventilátor pro malá laboratorní zvířata - Harvard Scientific Apparatus, (B) okruh dýchacího přístroje, (C) tracheostomická kanyla – Vasocan 14G, (D) infuzní linka do centrálního žilního katetru, (E) arteriální katetr k měření invazivního tlaku v a. carotis, (F) rektální teploměr, (G) SDF sonda, (H) zdroj k SDF sondě a analogově digitální převodník pro digitalizaci signálu a propojení s výpočetní technikou.

3.3. Sidestream dark-field (SDF) zobrazení

Pro získání videosekvencí vyšetřované mikrocirkulace metodou SDF zobrazení bylo postupováno jednak dle vysoce standardizovaného protokolu a aktuálních doporučení, jednak dle zkušeností z předchozích experimentálních prací. Protokoly měření byly opakovaně velmi detailně vyvíjeny a přehodnocovány v posledních letech.^{15,21,53} Klíčovou komponentou metodiky jsou postupy k minimalizaci artefaktů vzniklých arteficiálním tlakem a pohybem SDF zobrazovací sondy (MicroScan Video Microscope, Microvision Medical, Inc., Amsterdam, Nizozemí) při kontaktu s vyšetřovanou tkání.⁵¹ Za tímto účelem bylo na zakázku ve spolupráci s firmou (Arrow International CR, a.s., Česká republika) vyvinuto flexibilní rameno se speciálním adaptérem, který umožňuje mikropohyb fixované SDF sondy v různých osách podle náklonu celého flexibilního ramene (Obr. 6A,B). S cílem maximálně objektivizovat SDF zobrazení a vyšetření mikrocirkulace byl pro získání vysoce kvalitních videosekvencí mikrocirkulace zvolen následující metodický postup. Bezprostředně po prvním kontaktu SDF sondy s vyšetřovaným orgánem (jaterní lalok, serózní povrch distálního ilea) byla zaostřovacím kroužkem SDF sondy nalezena taková tkáňová vrstva, kde byl vytvořen nejostřejší vysoce kontrastní on-line obraz mikrocirkulace vhodný v podobě videosekvence k další „off-line“ analýze. Vhodné okrsky (vyšetřovací pole) byly nahodile vybrány na ventrálním povrchu jater a na antimezenterální straně distálního ilea. Za účelem eliminace pohybových artefaktů v důsledku umělé plicní ventilace, což se ukázalo jako klíčové, muselo být přistoupeno při zobrazení jaterní mikrocirkulace k technice apnoické pauzy, která byla úspěšně použita k SDF zobrazení mikrocirkulace jater již dříve.¹⁶³ Všechny SDF videosekvence z povrchu jater byly získány v průběhu 5-7 sekund trvající apnoe. Po každé nahrané videosekvenci v apnoické pauze následovala 60 sekund trvající fáze stabilizace bez vyšetřování mikrocirkulace. SDF videosekvence na antimezenterální straně distálního ilea byly zaznamenávány po dobu nejméně 20 sekund. SDF vyšetření mikrocirkulační sítě bylo prováděno dle doporučení v nejméně třech odlišných oblastech vyšetřovaného orgánu.¹⁵ Všechny videosekvence byly průběžně ukládány k další „off-line“ analýze mikrocirkulačních parametrů.

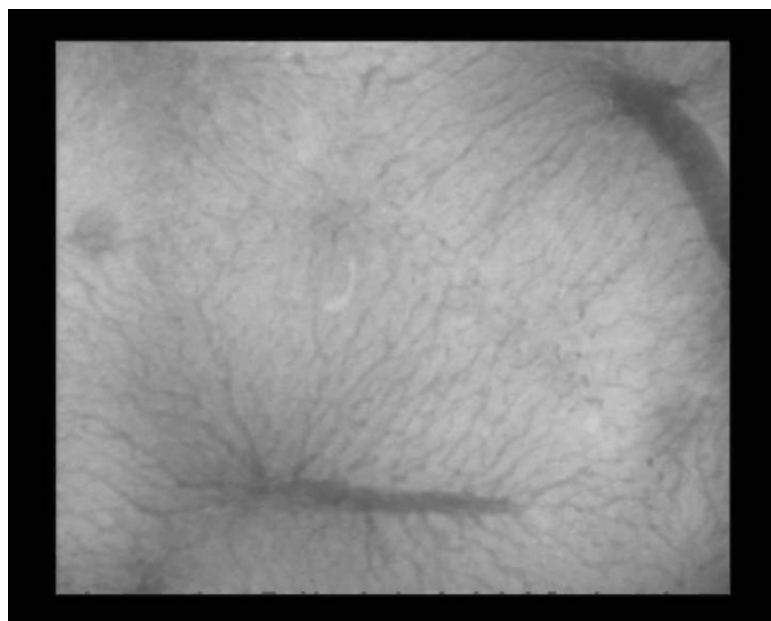
3.4. Off-line analýza

V rámci „off-line“ analýzy byly nejprve vybrány nejstabilnější videosekvence s čistými kontrastními obrazy. Následná analýza byla prováděna v souladu s doporučeními pro

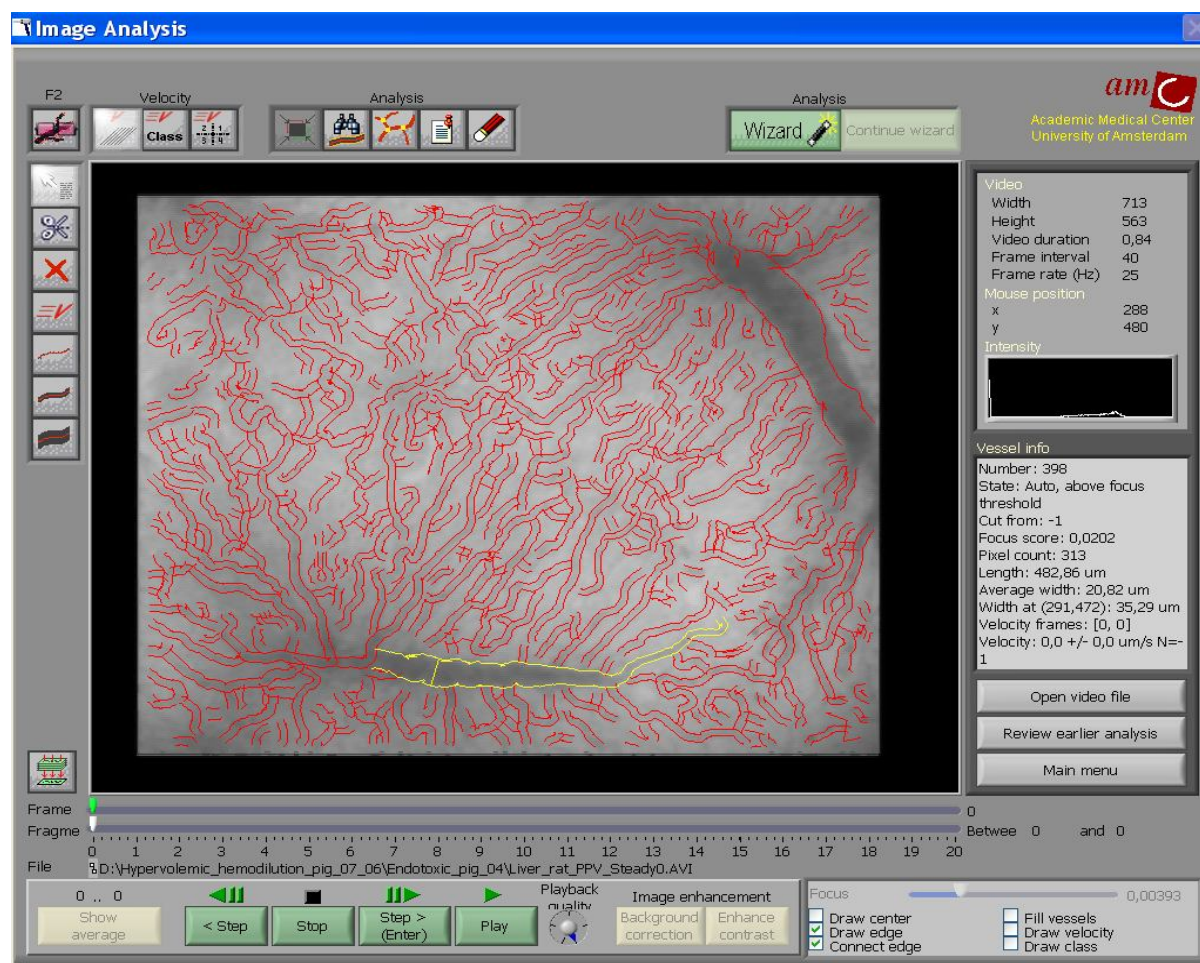
analýzu mikrocirkulace vyšetřovanou metodou SDF zobrazení.^{15,21} SDF sonda disponuje objektivem s optickým zvětšením 5x, konečné získané zvětšení při SDF analýzách bylo 325x. Pro každou fázi měření byly jednotlivé videosekvence před samotnou analýzou randomizovaně kódovány. V průběhu „*off-line*“ analýzy nebyl původ videosekvence pozorovateli (analyzujícím) znám. Dle předchozích doporučení pro analýzu mikrocirkulace^{155,164} byly analyzovány následující orgánově specifické parametry mikrocirkulace: funkční sinusoidální denzita (FSD – cm/cm^2), průměr sinusoid (SD - μm) a funkční kapilární denzita (FCD – cm/cm^2) longitudinální a cirkulární svalové vrstvy distálního ilea. Veškerá mikrocirkulační data byla získána analýzou v programu AVA 3 (Microvision Medical, Amsterdam, Nizozemí). Příklad a princip „*off-line*“ analýzy FSD dle stupňů šedi v programu AVA 3 je znázorněn na Obr. 12A,B. Nejprve jsou vybrány nejstabilnější části analyzované videosekvence, poté je obraz softwarovou úpravou stabilizován. Klíčovým krokem v eliminaci artefaktů je vyloučení z analýzy všech videosekvencí nebo jejich částí, které vykazují obleněný, intermitentní nebo zastavený tok ve venulách (v doporučeních alterovaný venulární flow).

Následuje výpočet denzity kapilár event. sinusoid založený na detekci stupňů šedi. Práh detekce je možné upravit dle míry kontrastu kapilár na pozadí, úpravou tohoto prahu jsou také částečně eliminovány artefakty. Označené artefakty, které by byly zahrnuty do výpočtu denzity, jsou manuálně eliminovány. Podobně je možné kapiláry, které zůstaly pod prahem detekce, označit a zahrnout do výpočtu denzity. Poté je provedeno měření průměru sinusoid. Po každém měření z jednoho stabilizovaného úseku dané videosekvence je generován záznam (microcirculatory report), ze kterého lze odečíst požadovaná data a exportovat buď do tabulkového editoru, nebo přímo do statistického softwaru. Struktura záznamu ze základního měření denzity kapilár je uvedena na Obr. 13.

Obr. 12A: Videosekvence před importem do programu AVA k off-line analýze



Obr.12B: Princip stanovení FSD, průměru sinusoid a postsinusidálních venul, AVA 3



Na základě detekce stupňů šedi je kalkulována celková délka označených sinusoid (kapilár), tato délka je vztažena k zobrazené ploše – je získán parametr FSD resp. FCD. Práh pro detekci stupňů šedi lze manuálně upravit k eliminaci artefaktů, naopak neznačené kapiláry lze dodatečně manuálně označit.

Obr. 13: Záznam z měření základních mikrocirkulačních parametrů v programu AVA

Microcirculatory report

Microcirculatory report

Consensus
Density distribution
De Backer density
Velocity distribution
Flow classification (per vessel)
Boerma flow

Parameters apply to ROI (Except MFI)
perfusion is based on velocity classification per vessel

Density (#)

	Small vessels	Other vessels	All vessels
Total Vessel Density (TVD) (mm/mm ²)	20,78	2,07	22,84
Perfused Vessel Density (PVD) (mm/mm ²)	21,46	1,25	22,70

Perfusion (*)

	Small vessels	Other vessels	All vessels
Proportion of Perfused vessels (PPV) (%)	91,15	8,22	99,38
Microvascular Flow Index (MFI)	2,25	2,75	2,62

NaN = Not a number (occurs, e.g., when MFI data is missing)

(*) Vessels are perfused if they are assigned either of the flow classifications: Sluggish Continuous Hyperdynamic

(#) Small vessels have a diameter of up to (um) 25

Consensus scoring is described in detail in: How to evaluate the microcirculation? Report of a round table conference, D. de Backer, S. Hollenberg, C. Boerma, P. Goedhart, G. Buchele, G. Ospina-Tascon, I. Dobbe, C. Ince, Critical Care 2007, 11:R101.

Distribution details:

Automatically detected vessels
 Vessels detected by user

Maximum diameter (um)

60

Distribution bins

40

Flow classifications

Classification	Flow type
0	No flow
1	Intermittent
2	Sluggish
3	Continuous
4	Hyperdynamic

Name patient Unknown patient

Date No date

Video details No video details

Video file (or Log file)

Logbook file stored -

Analyzed video frames: 0 to 37

Frame size (h x v) 692 x 554 pixels = 706 x 630 um

ROI (pixels) Left-top: (0, 0), Right-bottom: (691, 553)

ROI size (h x v) 692 x 554 pixels = 706 x 630 um

Area of ROI (um²) 444536

Focus threshold 0,00517580

Vessel detection parameters

Analysis scale (sigma in pixels)	3
Line detection threshold [0..1]	0,7
Capture angle for linking pixels (deg)	90
Capture range for linking pixel (pixels)	5
Horizontal pitch (um/pixel)	1,020408
Vertical pitch (um/pixel)	1,136364

3.5. Experimentální protokol

Po úvodní stabilizační fázi a měření vstupních hemodynamických a mikrocirkulačních parametrů ($t = 0$ min.) byla experimentální zvířata náhodně zařazena do jedné z pěti experimentálních skupin: ketamin (K; $n = 6$), propofol (P; $n = 6$), thiopental (T; $n = 6$), midazolam (M; $n = 6$) a kontrola – fyziologický roztok (C; $n = 6$). Anestetikum nebo ekvivalentní dávka fyziologického roztoku byly podány i.v. po dobu 2-3 minut ($t = 5$ min., **indukce**), následně bylo zahájeno kontinuální podávání příslušného anestetika nebo fyziologického roztoku po dobu 90 minut ($t = 5 - 95$ min., **udržování / vedení anestézie**).

S využitím již dříve popsanych a publikovaných anestetických protokolů^{165,166} byly laboratorním potkanům i.v. podávány jednak ketamin (Ketalar; Parke-Davis, Eastleigh, UK; 30 mg/kg indukční dávka a 40-90 mg/kg/hod. udržovací dávka), nebo propofol (Propofol Fresenius; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Německo; 10 mg/kg indukční dávka a 10-50 mg/kg/hod udržovací dávka), nebo thiopental (Thiopental Valeant, Valeant Czech Pharma, Praha, Česká republika; 30 mg/kg indukční dávka a 40-90 mg/kg/hod. udržovací dávka), nebo midazolam (Midazolam B. Braun, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Německo; 3 mg/kg indukční dávka a 5-6mg/kg/hod. udržovací dávka) a nebo fyziologický roztok (1 ml/kg bolus, 5–10 ml/kg/hod. kontinuální infuze). Jednotlivé dávky byly důsledně kalkulovány a připravovány s ohledem na důležitý předpoklad, že je nezbytné v jednotlivých experimentálních skupinách podávat velmi podobný celkový objem tekutin v průběhu indukce anestézie (2 ml/kg) a v průběhu udržování anestézie (2,5 – 5 ml/kg/hod.). Na základě posledních výsledků a publikací v souvislosti s podáváním různých anestetik u potkanů byla anestézie udržována metodou “*step up*” infuze, která zajišťuje kardiovaskulární stabilitu a stabilní plazmatické koncentrace jednotlivých podávaných anestetik.^{128,165} Ve všech experimentálních skupinách včetně kontrolní byla zajištěna hluboká analgézie kontinuálním podáváním fentanylu (30 μ g/kg/hod.) zahájená v čase $t = 5$ min. a ukončena v čase $t = 95$ min. Pipecuronium (Arduan, Richter Ltd, Budapest, Maďarsko; 0,2 mg/kg) bylo podáváno dle protokolu v jednotlivých časových bodech před každým zahájením SDF videomikroskopie k zajištění svalové relaxace, která umožnila kvalitní SDF in situ zobrazení mikrocirkulace na povrchu jater. SDF videomikroskopie povrchu jater a distálního ilea byla provedena v čase $t = 0$ min. (baseline, vstupní měření), po podání indukční dávky anestetika ($t = 5$ min.) a během udržování / vedení anestézie v následujících časových úsecích: $t = 35, 65$ a 95 min. Experimentální protokol je schematicky znázorněn na Obr. 14.

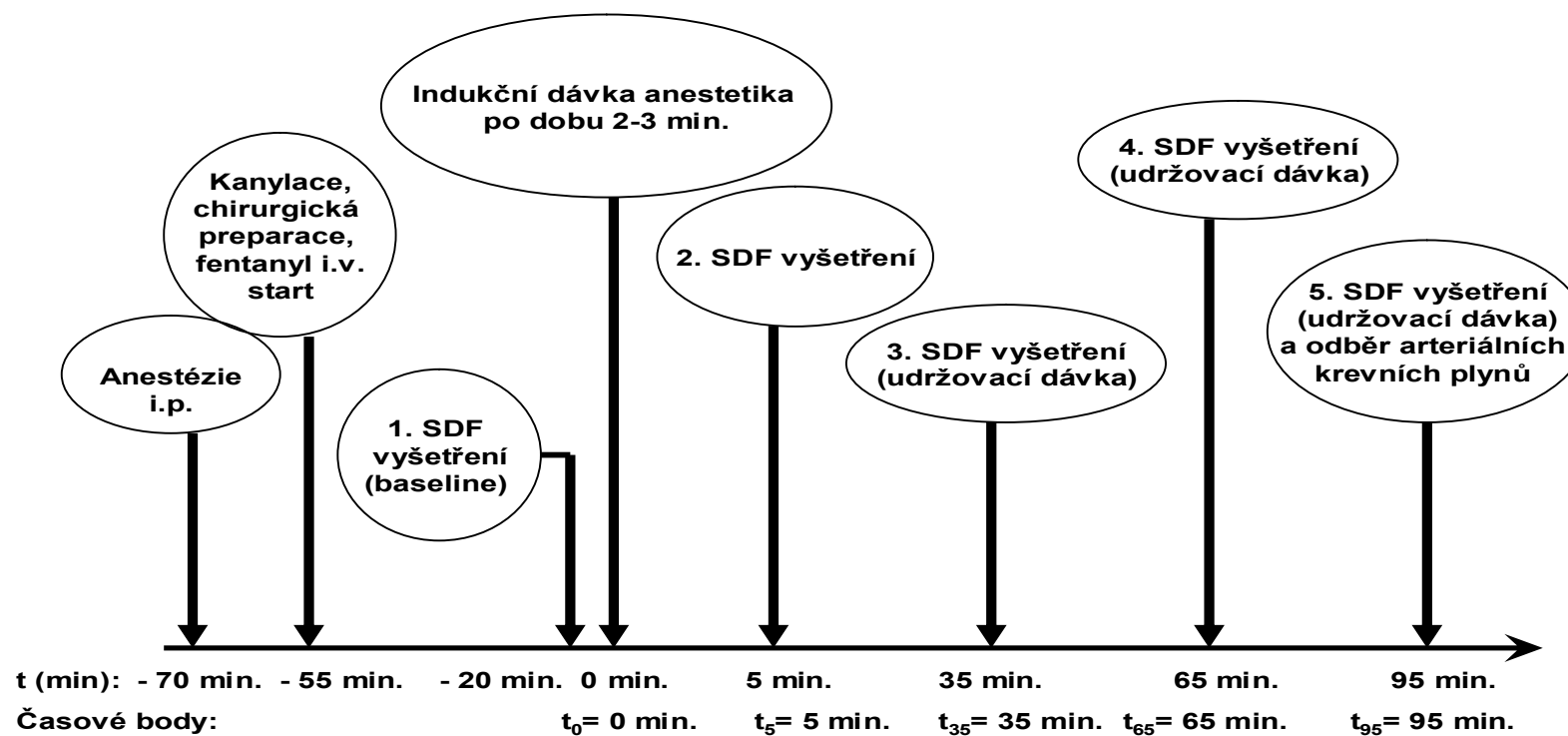
Na konci experimentu ($t = 95$ min.) byly odebrány vzorky arteriální krve (1-2ml)

z břišní aorty k následné analýze krevních plynů, acidobazické rovnováhy (ABR), laktátu a hematokritu s cílem vyloučit vliv případné poruchy ABR či výrazné odchylky v hematokritu na změny v mikrocirkulačních parametrech. Následně byla experimentální zvířata usmrcena letální dávkou barbiturátu (pentobarbital; 120 mg/kg) metodou rychlé intravenózní injekce.

3.6. Statistické vyhodnocení

Hodnoty tepové frekvence, střední arteriální tlak, hodnoty krevních plynů, laktatémie a hematokrit jsou vyjádřeny jako průměr \pm standardní odchylka (Std Dev). Mikrocirkulační parametry nevykazovaly normální rozdělení (Kolmogorov-Smirnov test), a proto byly použity Kruskal-Wallis ANOVA on ranks a Tukey test pro nonparametrická data ke zjištění rozdílů mezi experimentálními skupinami pro každé anestetikum. Pro detekci signifikantních změn uvnitř experimentálních skupin byl použit Kruskal-Wallis test. Data nevykazující normální rozdělení jsou vyjádřena jako medián (mezikvartilové rozpětí). Všechny výsledky jsou považovány za statisticky významné při $p < 0,05$. Všechny statistické výpočty byly provedeny v programech Sigmastat a Sigmaplot. (SIGMASTAT 3.1, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA and Sigma Plot 9.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Obr. 14: Časová osa experimentálního protokolu s důležitými fázemi studijního protokolu



4. Výsledky

4.1. Kardiovaskulární hodnoty

Vstupní hodnoty středního arteriálního tlaku (MAP) a tepové frekvence se statisticky významně nelišily mezi jednotlivými experimentálními skupinami. V kontrolní skupině byly hodnoty MAP a tepové frekvence stabilní po celou dobu experimentu ($t = 0 - 95$ min. – viz Tabulka 2). Ve skupinách s propofolem a thiopentalem se snížila tepová frekvence po indukci anestézie a v průběhu jejího vedení. Pokles MAP po indukci byl pouze přechodný, hodnoty MAP v průběhu vedení anestézie se ve skupinách s propofolem a thiopentalem statisticky významně nelišily od vstupních hodnot. Ve skupině s ketaminem došlo k vzestupu tepové frekvence po indukci, změny v průběhu vedení celkové anestézie nebyly statisticky významné. MAP se zvýšil po indukční dávce a poté v průběhu vedení anestézie postupně klesal ke vstupním hodnotám. Ve skupině s midazolamem nebyly pozorovány statisticky významné změny v tepové frekvenci, byl zaznamenán pokles MAP po indukci a následně postupný mírný pokles v průběhu celého vedení anestézie (Tabulka 2).

4.2. Mikrocirkulační parametry

V průběhu experimentu založeném na standardním modelu ventilovaného potkana za použití různých intravenózních anestetických protokolů byly získány vysoce kontrastní a čistě ostré SDF videosekvence z oblasti mikrocirkulace na povrchu jater a na serózním povrchu ilea (Obr. 15A,B). Mezi jednotlivými experimentálními skupinami nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ve vstupních hodnotách funkční sinusoidální denzity, průměru sinusoid a funkční kapilární denzity cirkulární a longitudinální svalové vrstvy ilea (Tabulky 3 a 4).

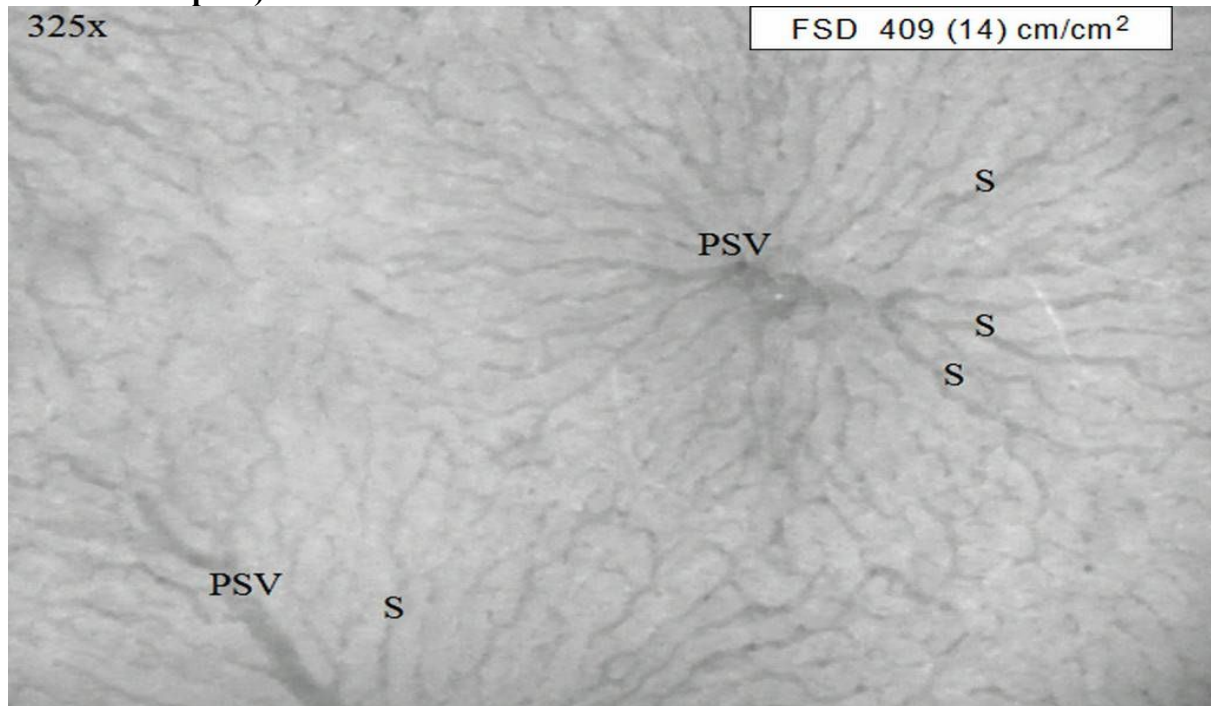
Tabulka 2

Vliv ketaminu, propofolu, thiopentalu a midazolamu na tepovou frekvenci a střední arteriální tlak bezprostředně po indukční dávce (t = 5 min.) a během vedení anestézie (t = 35, 65 a 95 min.).

	Čas (min.)	Srdeční frekvence (tep/min.)				
		Střední arteriální tlak (mmHg)				
		Ketamin	Propofol	Thiopental	Midazolam	Kontrolní skup.
Baseline	0	432 ± 12	442 ± 21	429 ± 22	425 ± 18	420 ± 21
Po indukční dávce	5	92 ± 8	95 ± 5	98 ± 7	96 ± 5	98 ± 5
		465 ± 16 ^{*†}	402 ± 15 ^{*†}	398 ± 12 ^{*†}	435 ± 21	432 ± 16
Udržování (vedení) anestézie	35	105 ± 10 ^{*†}	84 ± 6 ^{*†}	88 ± 8 [*]	82 ± 4 ^{*†}	95 ± 6
		425 ± 15	410 ± 14 [*]	395 ± 16 ^{*†}	429 ± 22	425 ± 13
	65	101 ± 9	92 ± 5	94 ± 7	86 ± 5 [*]	93 ± 3
		420 ± 12	405 ± 12 [*]	402 ± 18 [*]	433 ± 19	418 ± 10
95	95 ± 7	90 ± 6	90 ± 9	82 ± 6 ^{*†}	95 ± 8	
	435 ± 21	412 ± 20 [*]	390 ± 16 ^{*†}	422 ± 16	428 ± 11	
		91 ± 6	96 ± 8	95 ± 6	80 ± 4 ^{*†}	92 ± 4

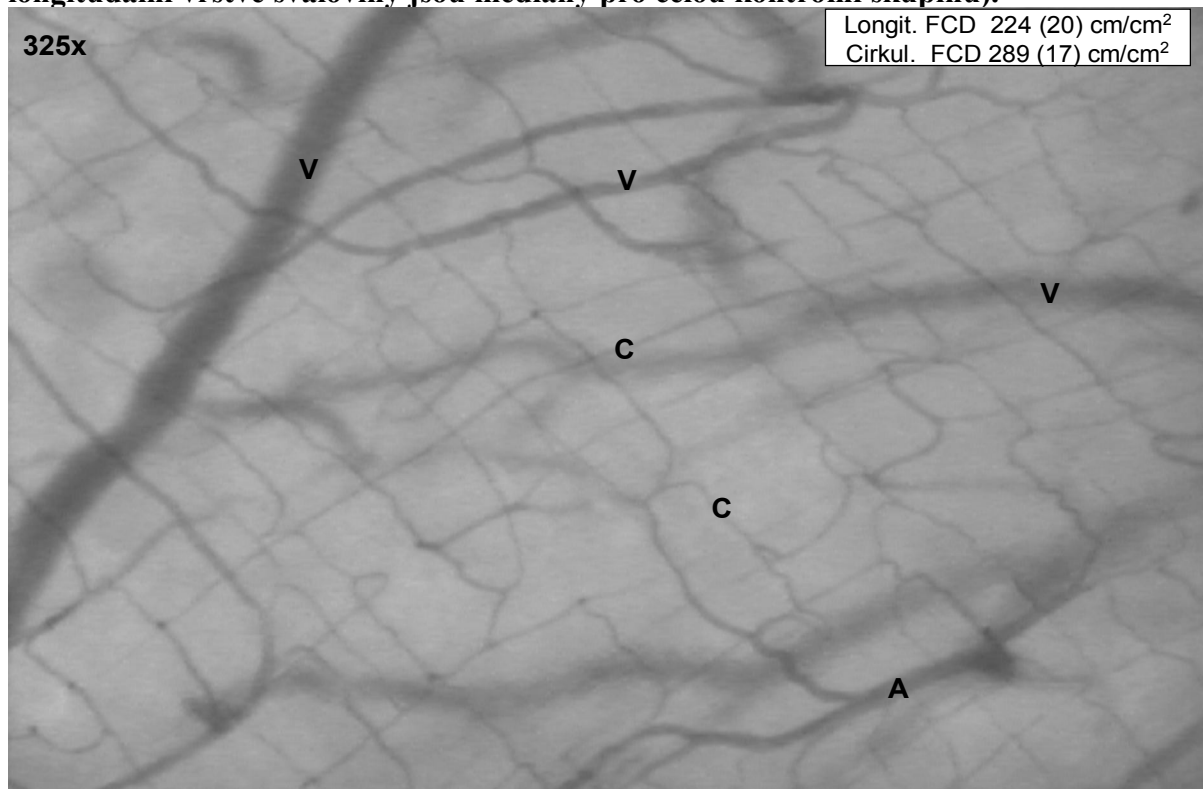
* $p < 0.05$, vs baseline (t = 0 min), † $p < 0.05$ ve srovnání s kontrolní skupinou (fyziol. roztok) ve stejném časovém okamžiku; data uváděna jako průměr ± SD

Obr. 15A: SDF obraz mikrocirkulace na povrchu jater ve fázi „baseline“, $t = 0$. (kontrolní skupina, reprezentativní obrázek, hodnota FSD je medián pro celou kontrolní skupinu).



(PSV – postsinusoidální venula, S – sinusoida, FSD – funkční sinusoidální denzita)

Obr. 15B: SDF obraz mikrocirkulace na serózním povrchu ilea ve fázi „baseline“ ($t = 0$, kontrolní skupina, reprezentativní obrázek, uvedené hodnoty FCD v cirkulární a longitudální vrstvě svaloviny jsou mediány pro celou kontrolní skupinu).



(V – venula, C – kapilára, A – arteriola)

4.2.1. Mikrocirkulace na povrchu jater

Ve skupině s indukcí a vedením anestézie propofolem došlo k signifikantnímu zvýšení FSD bezprostředně po indukční dávce ($t = 5$ min. +25%, $p < 0,05$), vyšší hodnoty FSD byly zjištěny i v průběhu udržování anestézie ($t = 95$ min. +10,3%, $p < 0,05$). V téže skupině bylo pozorováno přechodné zvýšení průměru sinusoid (SD) po indukční dávce ($t = 5$ min. +18,5%, $p < 0,05$), následně v průběhu vedení anestézie propofolem se hodnoty SD postupně vrátily k hodnotám měřeným před podáním indukční dávky. V experimentálních skupinách s anestézií zahájenou a vedenou ketaminem resp. midazolamem byl v obou skupinách zjištěn významný pokles FSD po indukčních dávkách ($t = 5$ min. -20,4%, $p < 0,05$, resp. -10,1%, $p < 0,05$), snížené hodnoty FSD ve srovnání se vstupními přetrvávaly i v průběhu udržování anestézie ($t = 65$ min. -11,6%, $p < 0,05$, resp. -11,4%, $p < 0,05$), byl však pozorován vzestupný trend hodnot FSD ve skupině s ketaminem i midazolamem ($t = 95$ min. -5,1%, $p = 0,11$, resp. -6,4%, $p = 0,09$). Konstrikce sinusoid (významné snížení SD) byla pozorována ve skupině s ketaminem i midazolamem bezprostředně po indukci ($t = 5$ min. -10,3%, $p < 0,05$; -11,4%, $p < 0,05$) a během vedení anestézie ($t = 65$ min. -8,2%, $p < 0,05$, resp. -9%, $p < 0,05$), byl však zřetelný vzestupný trend hodnot SD v čase $t = 95$ min. Ve skupině s anestézií thiopentalem, stejně jako v kontrolní skupině nebyly zjištěny statisticky významné změny v hodnotách FSD a SD po celou dobu experimentálního protokolu. Veškeré hepatické mikrocirkulační parametry zjištěné v jednotlivých experimentálních skupinách a jejich srovnání jsou přehledně shrnuty v Tabulce 3. Vzájemné porovnání hepatických mikrocirkulačních parametrů ve skupinách s propofolem a ketaminem, mezi nimiž byly největší rozdíly, je uvedeno v Grafech 1A,B.

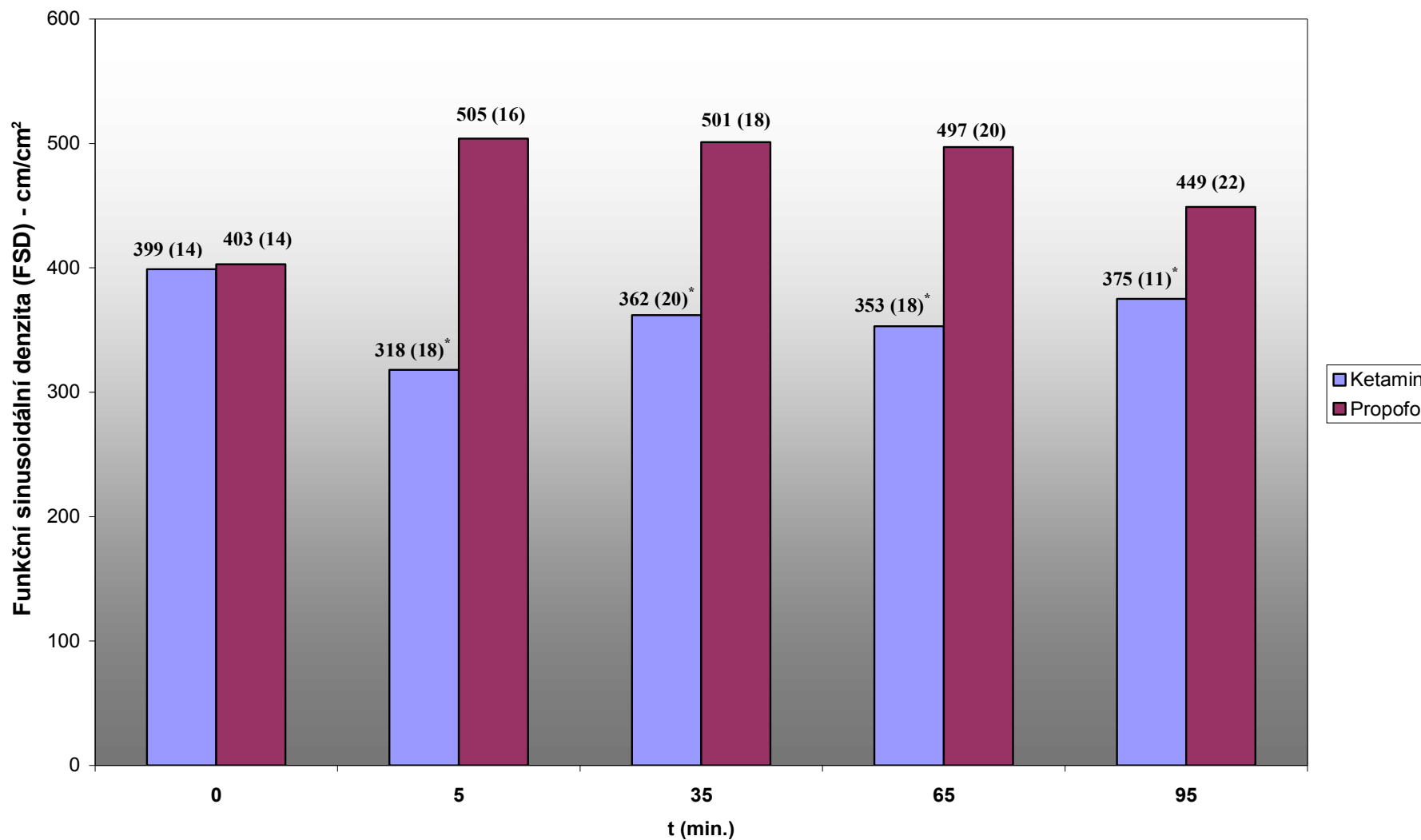
Tabulka 3

Vliv ketaminu, propofolu, thiopentalu a midazolamu na hepatickou funkční sinusoidální denzitu (FSD) a průměr sinusoid po indukční dávce (t = 5 min.) a během vedení anestézie (t = 35, 65 a 95 min.).

	Čas (min.)	Funkční sinusoidální denzita (FSD) – cm/cm ²				
		Průměr sinusoid (SD) – μm				
		Ketamin	Propofol	Thiopental	Midazolam	Kontrolní skup.
Baseline	0	399 (14)	403 (14)	402 (18)	395 (15)	409 (14)
Po indukční dávce	5	9,8 (1)	9,7 (1,0)	9,9 (1,0)	10,0 (0,9)	10,0 (0,5)
		318 (18) ^{*†}	504 (16) ^{*†}	404 (19)	355 (17) ^{*†}	411 (13)
Udržování (vedení) anestézie	35	8,6 (1,1) ^{*†}	11,5 (0,5) ^{*†}	10,2 (0,9)	9,2 (0,9) ^{*†}	10,1 (0,9)
		362 (20) ^{*†}	501 (18) ^{*†}	397 (11)	362 (20) ^{*†}	400 (7)
	65	8,9 (1,4) ^{*†}	9,5 (1,0)	10,0 (1,0)	9,0 (0,5) ^{*†}	10,0 (1,0)
		353 (18) ^{*†}	497 (20) ^{*†}	390 (10)	350 (16) ^{*†}	398 (15)
95	9,0 (1,1) [*]	9,5 (1,3)	9,8 (0,6)	9,1 (0,5) ^{*†}	9,6 (0,5)	
	375 (11) ^{*†}	449 (22) ^{*†}	385 (16)	370 (12) ^{*†}	399 (16)	
		9,3 (1,2)	9,3 (0,6)	10,2 (0,5)	9,0 (1,1) ^{*†}	9,9 (0,8)

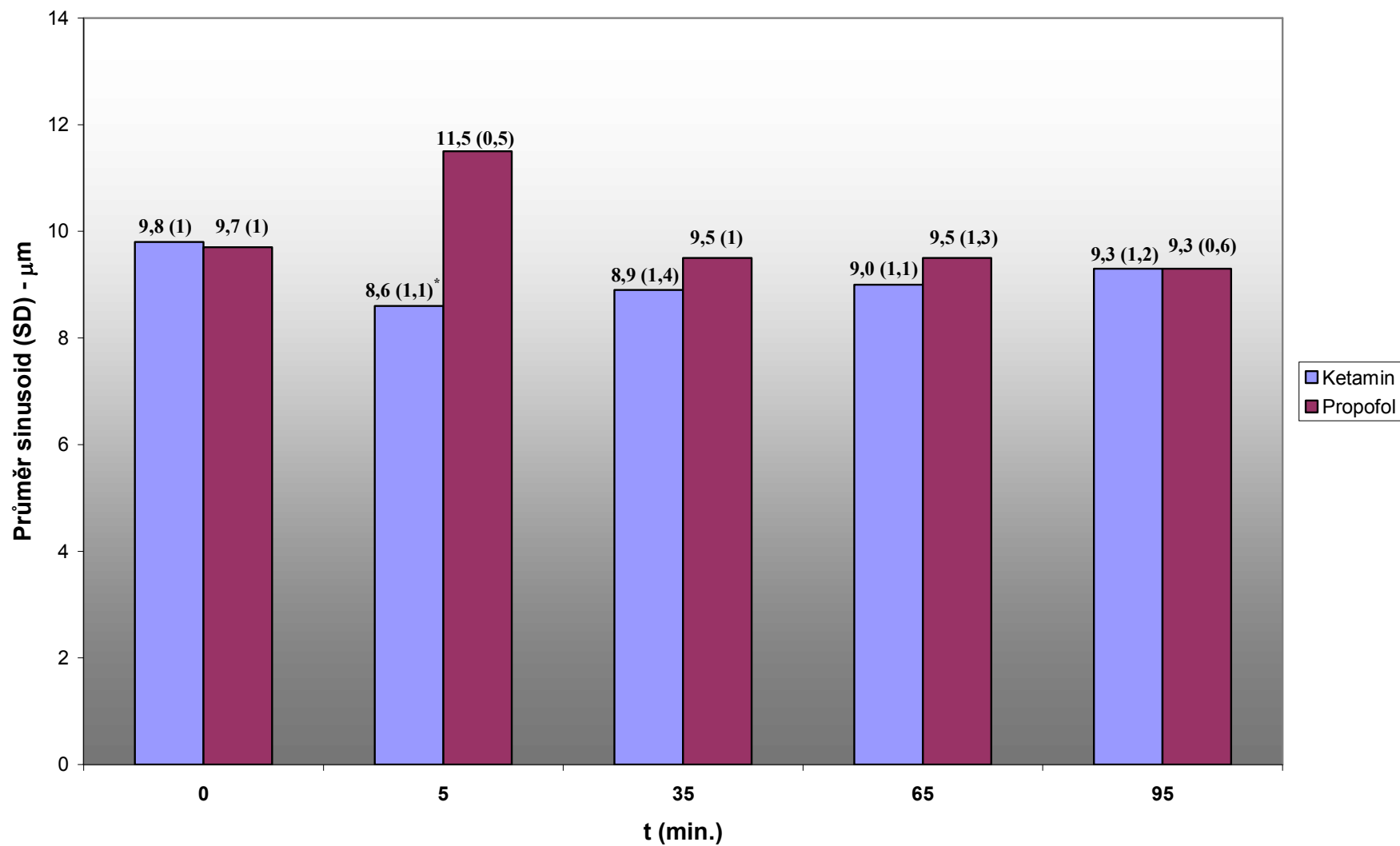
* $p < 0.05$, vs baseline (t = 0 min), † $p < 0.05$ ve srovnání s kontrolní skupinou (fyziol. roztok) ve stejném časovém okamžiku; data uváděna jako medián (interkvartilové rozpětí).

Graf 1A: Srovnání vlivu ketaminu a propofolu na hepatickou mikrocirkulaci – funkční sinusoidální denzitu



* $p < 0.05$ ve srovnání s propofolem ve stejném časové úseku; data uváděna jako medián (interkvartilové rozpětí).

Graf 1B: Srovnání vlivu ketaminu a propofolu na hepatickou mikrocirkulaci – průměr sinusoid



* $p < 0.05$ ve srovnání s propofolem ve stejném časové úseku; data uváděna jako medián (interkvartilové rozpětí).

4.2.2 Mikrocirkulace na povrchu ilea

V experimentální skupině, kde byl podáván propofol, nebyly detekovány žádné změny v FCD cirkulární svalové vrstvě ilea po celou dobu experimentálního protokolu, a to jak v porovnání se vstupními hodnotami, tak v porovnání s kontrolní skupinou v odpovídajících si časových momentech experimentální časové osy. Po podání indukční dávky propofolu došlo ke statisticky významnému vzestupu FCD longitudinální svalové vrstvy ilea ($t = 5$ min. $+10,6\%$, $p < 0,05$), v průběhu udržování anestézie tyto hodnoty postupně klesaly, až se statisticky nelišily od hodnot měřených vstupně. Ve skupinách s ketaminem a midazolamem došlo k významnému poklesu FCD v cirkulární vrstvě jak po indukci ($t = 5$ min. $-27,9\%$, $p < 0,05$, resp. $-29,8\%$, $p < 0,05$), tak v průběhu udržování anestézie ($t = 95$ min. $-14,5\%$, $P < 0,05$, resp. $-16,8\%$, $p < 0,05$). Podobně ve skupinách s ketaminem a midazolamem byl zjištěn významný pokles FCD v longitudinální vrstvě po indukci ($t = 5$ min. $-24,6\%$, $p < 0,05$, resp. $-21,1\%$, $p < 0,05$), přičemž tento pokles se v průběhu udržovací fáze zcela neupravil ($t = 95$ min. $-10,8\%$, $p < 0,05$; $-15,5\%$, $p < 0,05$). Ve skupině s thiopentalem a ve skupině kontrolní nebyly změny FCD v cirkulární ani v longitudinální vrstvě statisticky významné po celou dobu anestetického protokolu. Kompletní výsledky v podobě mikrocirkulačních parametrů získaných ze serózního povrchu ilea jsou uvedeny souhrnně v Tabulce 4. Vzájemné porovnání mikrocirkulačních parametrů z oblasti distálního ilea ve skupinách s propofolem a ketaminem, mezi nimiž byly zjištěny největší rozdíly, je uvedeno v Grafech 2A,B.

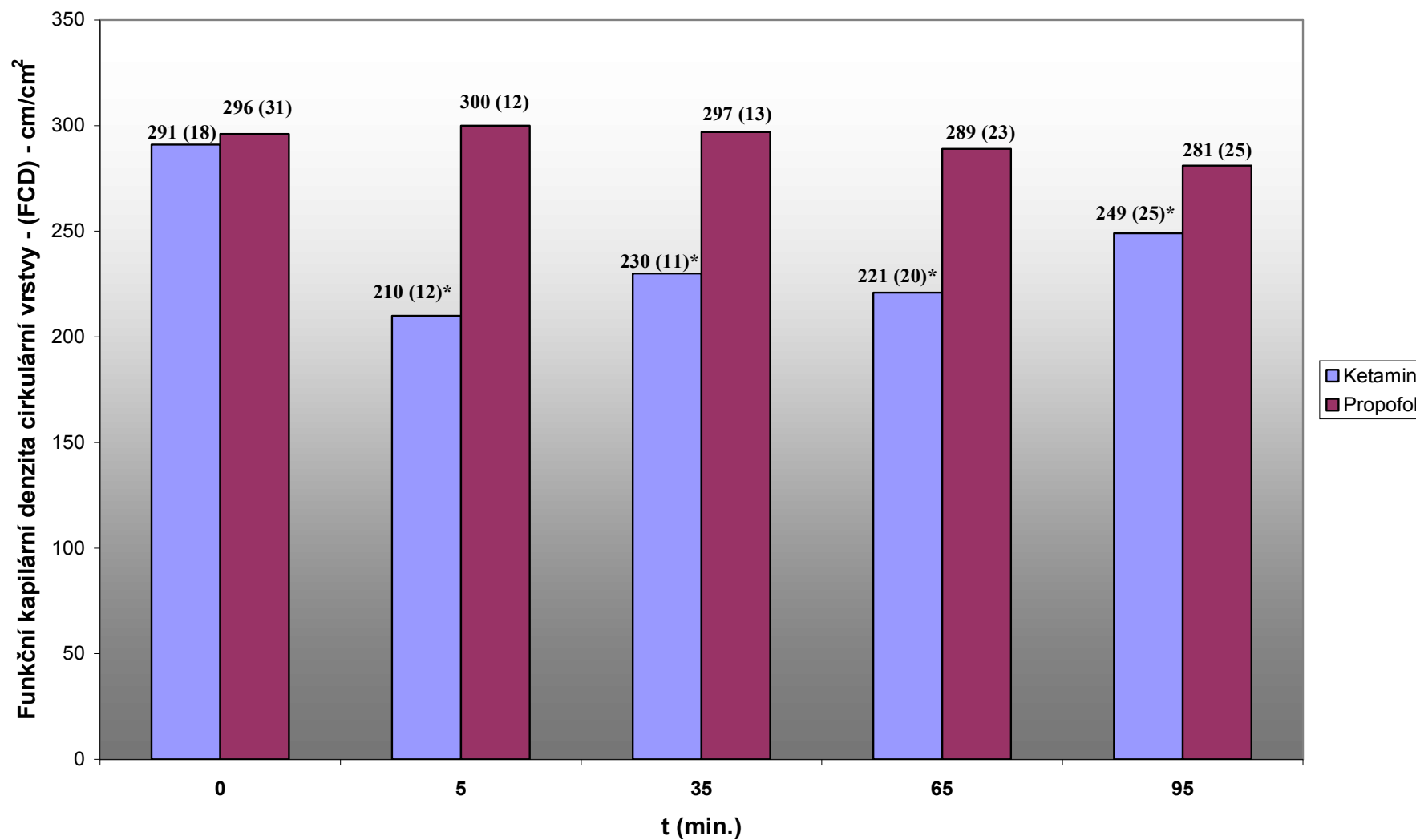
Tabulka 4

Vliv ketaminu, propofolu, thiopentalu a midazolamu na funkční kapilární denzitu (FCD) cirkulární a longitudinální svalové vrstvy ilea po indukční dávce (t = 5 min.) a během vedení anestézie (t = 35, 65 a 95 min.)

	Čas	Funkční kapilární denzita (FCD), cirkulární vrstva – cm/cm ²				
		Funkční kapilární denzita (FCD), longitudinální vrstva – cm/cm ²				
		(min)	Ketamin	Propofol	Thiopental	Midazolam
Baseline	0	291 (18)	296 (31)	293 (14)	299 (17)	289 (17)
Po indukční dávce	5	232 (10)	226 (15)	220 (11)	233 (20)	224 (20)
		210 (12) ^{*†}	300 (12)	297 (15)	214 (13) ^{*†}	294 (22)
Udržování (vedení) anestézie	35	175 (12) ^{*†}	250 (11) ^{*†}	228 (20)	184 (15) ^{*†}	228 (13)
		230 (11) ^{*†}	297 (13)	291 (17)	230 (11) ^{*†}	299 (18)
	65	205 (10) ^{*†}	231 (11)	230 (15)	205 (14) ^{*†}	231 (15)
		221 (20) ^{*†}	289 (23)	290 (22)	221 (20) ^{*†}	286 (22)
95	197 (13) ^{*†}	229 (12)	236 (18)	192 (13) ^{*†}	239 (17)	
	249 (25) ^{*†}	281 (25)	282 (20)	249 (27) ^{*†}	291 (18)	
		207 (22) [*]	224 (11)	229 (9)	197 (22) ^{*†}	229 (19)

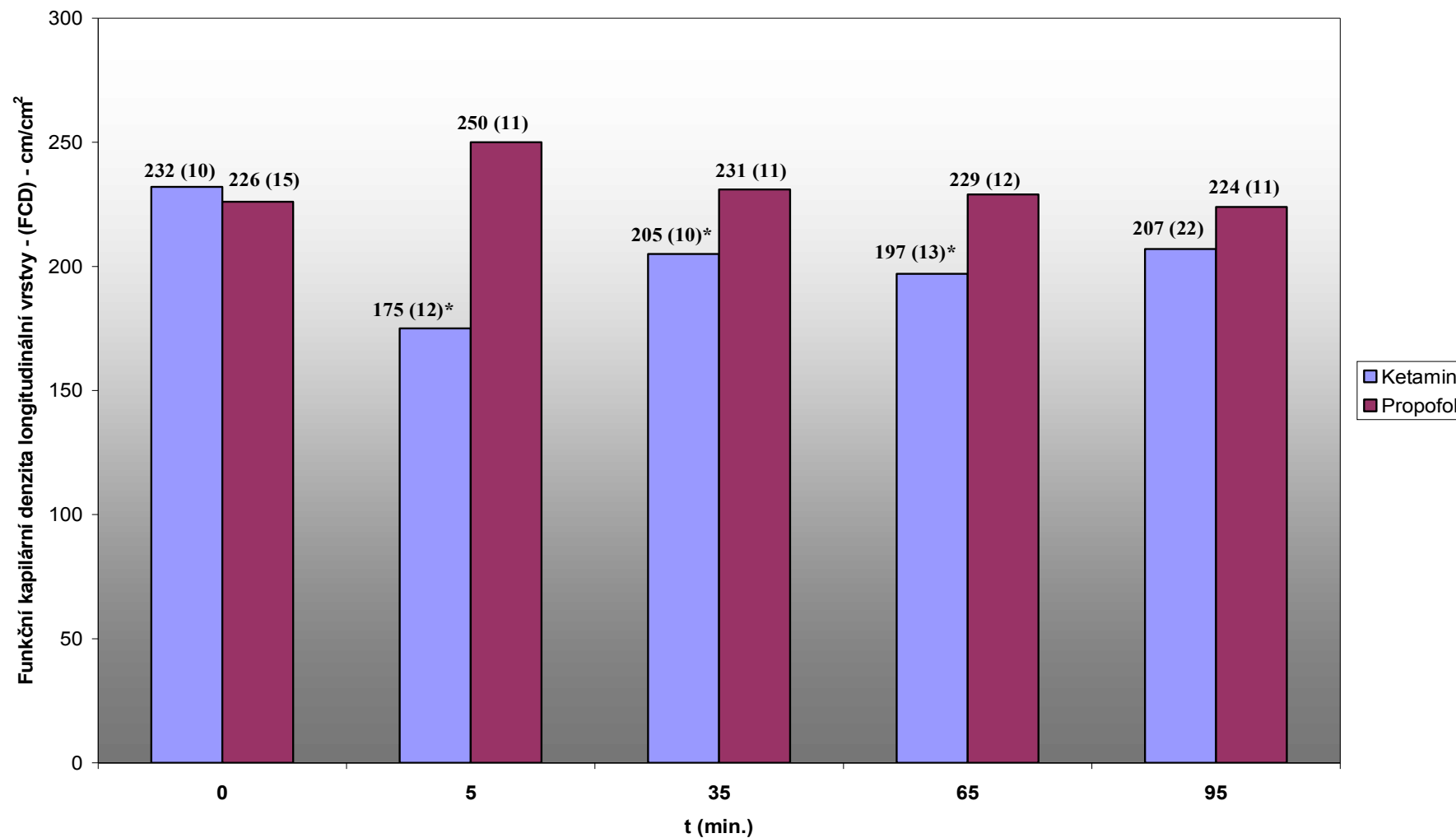
* $p < 0.05$, vs baseline (t = 0 min), † $p < 0.05$ ve srovnání s kontrolní skupinou (fyziol. roztok) ve stejném časovém okamžiku; data uváděna jako medián (interkvartilové rozpětí).

Graf 2A: Srovnání vlivu ketaminu a propofolu na mikrocirkulaci ilea – FCD cirkulární vrstvy



* $P < 0.05$ ve srovnání s propofolem ve stejném časové úseku; data uváděna jako medián (interkvartilové rozpětí).

Graf 2B: Srovnání vlivu ketaminu a propofolu na mikrocirkulaci ilea – FCD longitudinální vrstvy

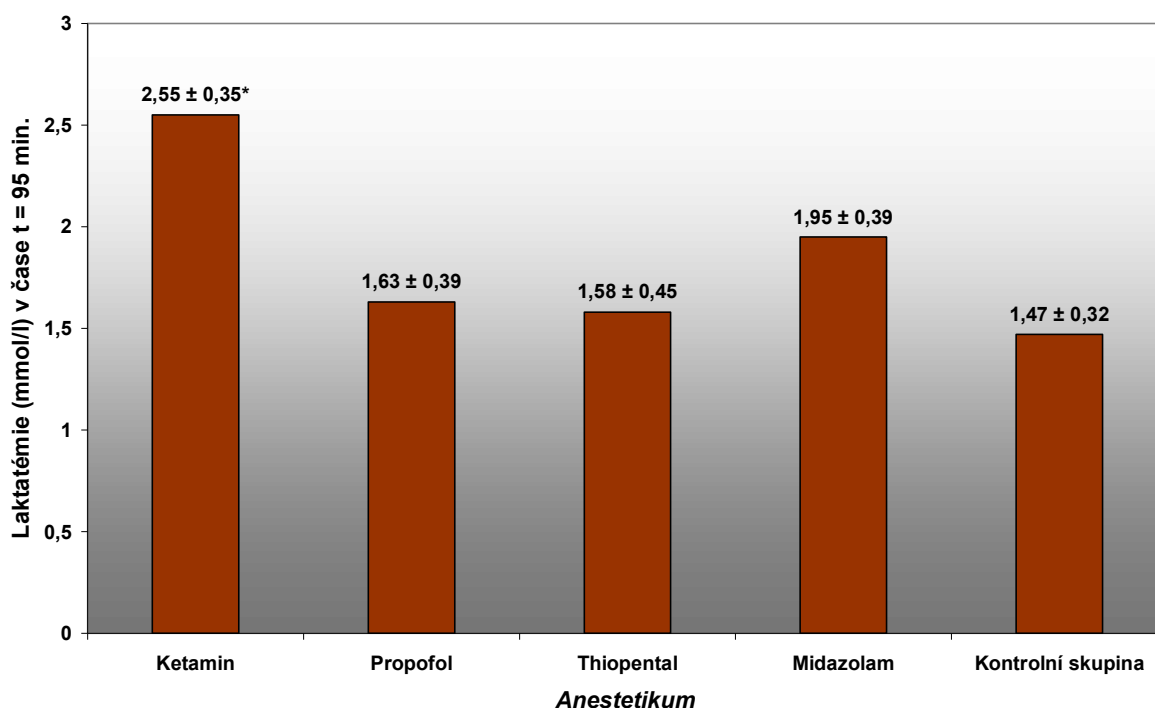


* $P < 0.05$ ve srovnání s propofolem ve stejném časové úseku; data uváděna jako medián (interkvartilové rozpětí).

4.3 Analýza krevních plynů

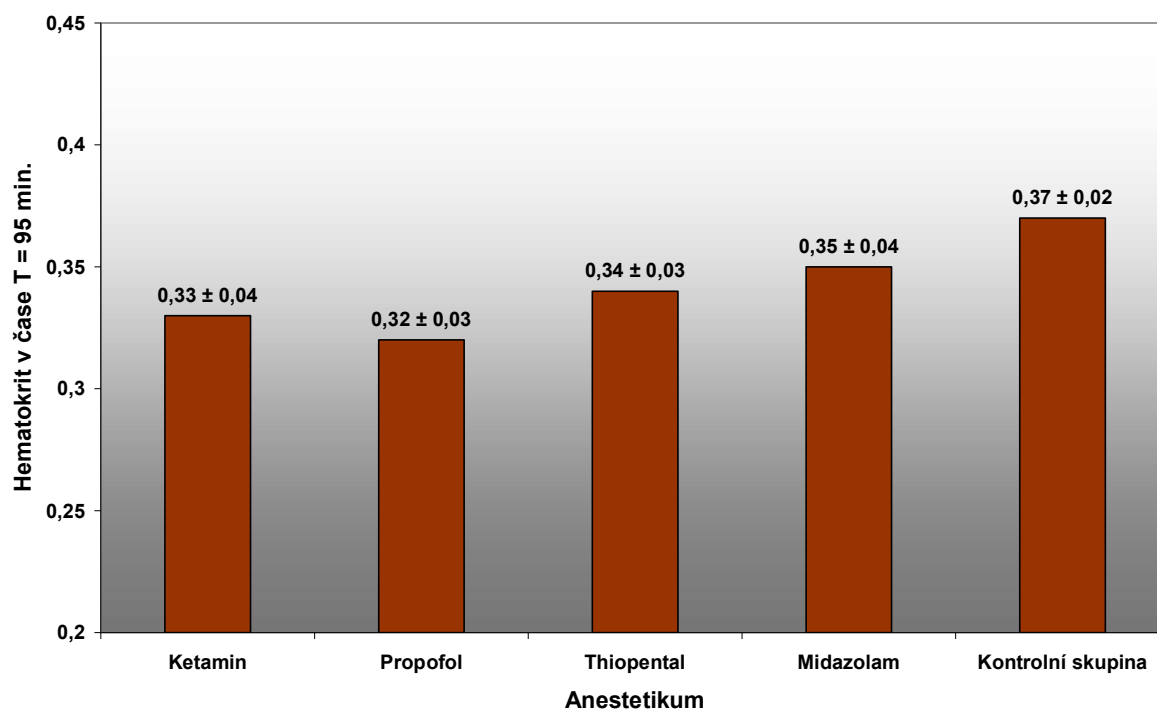
Hodnoty arteriálních krevních plynů a pH měřené ve všech experimentálních skupinách po ukončení SDF vyšetření v čase $t = 95$ min. vykazovaly mezi skupinami minimální rozdíly. Hodnoty hematokritu (Htc) měřené také na konci experimentálního protokolu ($t = 95$ min) vypovídaly o mírném stupni hemodiluce při srovnání s normálními tabulkovými hodnotami hematokritu u potkana. Mírný stupeň hemodiluce dle hodnoty Htc se mezi skupinami významně nelišil. Pouze hodnoty laktatémie byly mírně vyšší na konci experimentu ve skupině s anestézií ketaminem, zde dosahovaly statistické významnosti v porovnání s kontrolní skupinou ($2,6 \text{ mmol/l}$ vs $1,5 \text{ mmol/l}$, $p < 0,05$).

Graf 3A: Srovnání sérových hladin laktátu v jednotlivých experimentálních skupinách v čase $t = 95$ min.



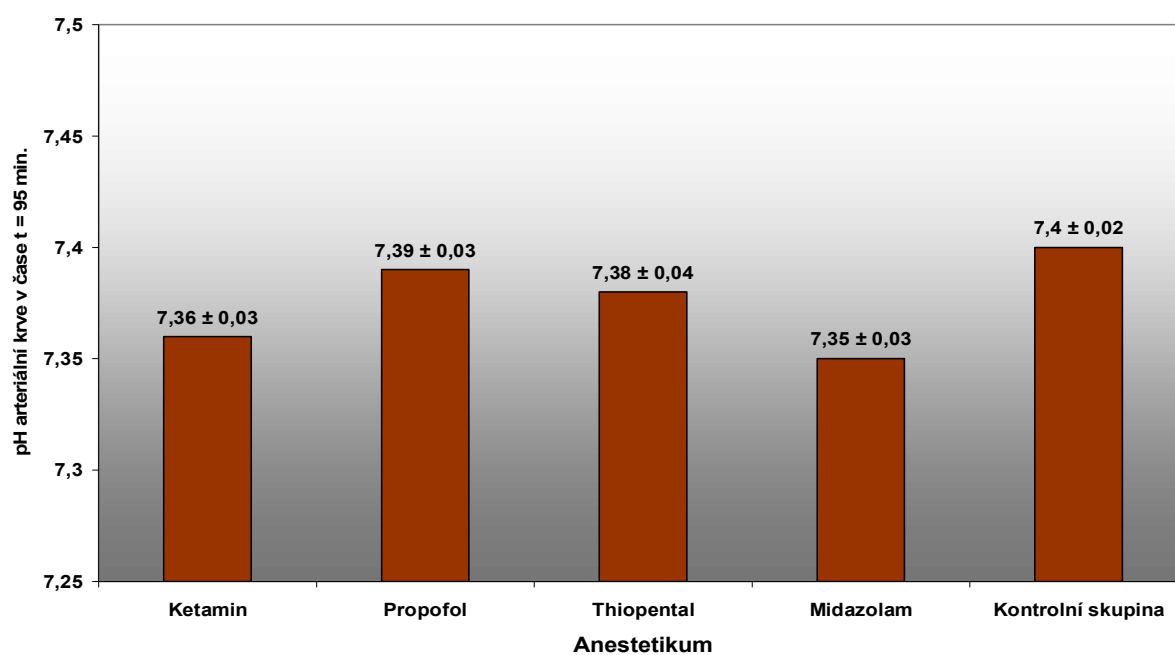
* $p < 0,01$ při srovnání s kontrolní skupinou, hodnoty uvedeny jako průměr \pm Std Dev

Graf 3B: Srovnání erythrocytárního hematokritu (Htc) v jednotlivých experimentálních skupinách v čase t = 95 min.



Bez statisticky významného rozdílu mezi skupinami, $p = 0,262$ hodnoty uvedeny jako průměr ± Std Dev

Graf 3C: Srovnání hodnot pH v experimentálních skupinách v čase t = 95min.



Bez statisticky významného rozdílu mezi skupinami, $p = 0,137$ hodnoty uvedeny jako průměr ± Std Dev

5. *Diskuse*

V prezentované práci byl úspěšně použit a zaveden vysoce standardizovaný model s různými protokoly anestézie u ventilovaného potkana s tracheostomií. Tento model byl použit ke sledování mikrovaskulárních změn v hepatosplanchnické oblasti. Změny mikrocirkulace byly sledovány během anestézie indukované a vedené ketaminem, propofolem, thiopentalem a nebo midazolamem. Tyto mikrovaskulární změny byly poprvé v tomto experimentálním uspořádání sledovány a vyhodnoceny novou optickou technologií SFD zobrazení. Tato technologie byla aplikována na povrchu jater a na serózním povrchu tenkého střeva – distálního ilea. Získaná experimentální data jasně prokázala zcela odlišné účinky ketaminu, propofolu, thiopentalu a midazolamu na mikrocirkulaci jater a tenkého střeva. A to jednak bezprostředně po indukční dávce, jednak v průběhu vedení totální intravenózní anestézie. Práce také jasně prokázala zachované hepatické mikrocirkulační parametry během indukce i vedení anestézie propofolem. Dále experiment prokázal ve skupině s propofolem zvýšení FCD v cirkulární i longitudinální svalové vrstvě ilea. Dilatace sinusoid byla pozorována také ve skupině s propofolem, nicméně detekována byla pouze přechodně a to bezprostředně po podání indukční dávky. Ve skupině s anestézií thiopentalem a v kontrolní skupině nevykazovaly hodnoty mikrocirkulačních parametrů po celou dobu experimentu statisticky významné změny a to jak v oblasti jater, tak v oblasti tenkého střeva. Naprosto odlišné chování mikrocirkulace v hepatosplanchnické oblasti bylo zjištěno ve skupinách, kde byla anestézie zahájena a vedena ketaminem resp. midazolamem. V těchto skupinách byl prokázán signifikantní pokles FSD a sinusoidální konstriktce po indukčních dávkách obou anestetik, významné snížení FSD přetrvávalo i v průběhu vedení anestézie. Velmi podobná odpověď mikrocirkulace na podávání ketaminu a midazolamu byla pozorována při vyšetření FCD v cirkulární i longitudinální svalové vrstvě ilea, kde byl v obou skupinách pozorován významný pokles FCD v obou svalových vrstvách ilea po indukčních dávkách i v průběhu udržování anestézie.

Jak bylo uvedeno v úvodu, dílčí výzkumy posledních let naznačují možný podíl podávaných anestetik na ovlivnění rovnováhy mezi jednotlivými systémy kontrolujícími perfuzi hepatosplanchnické oblasti na úrovni mikrocirkulace. Stoupá tak význam systematického studia „non-anestetických“ účinků anestetik za fyziologických i patofyziologických okolností.¹³²

Velmi komplexní řízení hepatické i gastrointestinální mikrocirkulace činí studium konkrétních mechanismů účinku anestetik v této oblasti velmi obtížným. Zdá se, že klíčovou

úlohu hrají změny v mikrovaskulární reaktivitě, změny v metabolismu NO, prostaglandinů a cytokinů a ovlivnění kalciových kanálů. Dle dostupných informací mohou jak propofol, tak ketamin, thiopental či midazolam významně zasáhnout do výše uvedených mechanismů. Výsledky takové interakce vybraných anestetik na úrovni heptosplanchnické mikrocirkulace potkana byly analyzovány v této práci.

Dle aktuálně dostupných informací neexistují v současné době experimentální ani klinické práce využívající SDF zobrazení hepatické a intestinální mikrocirkulace u ventilovaného potkana v různých standardizovaných režimech totální intravenózní anestézie. „In vitro“ a „ex vivo“ studie u chirurgických pacientů anestezovaných propofolem prokázala zvýšení aktivity konstitutivní NO syntetázy a snížení aktivity indukibilní NO syntetázy (iNOS).¹³² Vazodilatační účinky propofolu na úrovni mikrocirkulace byly prokázány za fyziologických podmínek na modelu mikrocirkulace kožní řasy a mezenteria u křečků a potkanů. Tyto mikrocirkulační změny nebyly pozorovány při podávání thiopentalu a ketaminu.^{123,128} Teoretické úvahy o propofolem indukovaných změnách v mikrocirkulaci jsou obvykle odvozovány nepřímo na základě nálezů zachované hepatické a intestinální mikrocirkulace, zachovaného poměru mezi přívodem a konzumpcí kyslíku a v neposlední řadě na základě zachovaných intaktních bariérových funkcí střeva za patofyziologických podmínek.^{129,167}

Konkrétní patofyziologické mechanismy účinku propofolu na mikrocirkulaci jsou doposud objasněny jen velmi částečně. Zdá se, že kromě mechanismů závislých na endotelu (změny v aktivitě NO) se uplatňují také vazodilatační mechanismy nezávislé na endotelu a závislé na dávce propofolu.¹²³ Některé práce dokládají efekt propofolu na kalciové kanály a připodobňují tento efekt verapamilu. Propofol se tedy může chovat jako blokátor kalciových kanálů.¹⁶⁸ Velmi důležitou skutečností ve studiu účinků propofolu na mikrocirkulaci je i přítomnost účinné látky v tukové emulzi. Některé experimentální práce řešily tento problém podávání propofolu v tukové emulzi a srovnávaly jeho účinek na mikrocirkulaci se skupinou, které byla podávána jen tuková emulze Intralipid. Výsledkem byl poznatek, že v mikrovaskulárních účincích propofolu hraje roli i samotná tuková emulze, zřejmě v důsledku tvorby vasoaktivních substancí v rámci lipolýzy.^{123,169,170}

Souhrnně lze říci, že tato práce studující vliv různých anestetik na heptosplanchnickou mikrocirkulaci potkana při laparotomii podporuje na mikrovaskulární úrovni teorii o zachované heptosplanchnické perfuzi v průběhu totální intravenózní anestézie vedené propofolem.

Již dříve publikované práce prokázaly dilataci arteriol a venul současně s konstrikcí kapilár v průběhu anestézie vedené ketaminem.¹²⁸ Tato pozorování jsou v souladu s nálezy zjištěnými v prezentované práci. Popsané změny v mikrocirkulaci vlivem podávání ketaminu lze alespoň částečně vysvětlit jeho známým sympatomimetickým účinkem nebo jeho schopností „down-regulace“ iNOS,¹⁷¹ další vysvětlující mechanismy nejsou zatím popsány. Mikrocirkulační změny indukované podáváním midazolamu jsou v literatuře popisovány velmi zřídka,^{172,173} byť se jedná stále o rutinně používané sedativum v experimentech i klinické praxi. Midazolam snižuje kapacitativní vstup kalcia do humánních hladkých svalových buněk arterií, současně midazolam zásadně zvyšuje rychlost inaktivace otevřených vápníkových kanálů v kardiomyocytech na modelu u psa, což je hlavní mechanismus vedoucí ke snížení myokardiálních funkcí.¹⁷³ Efekt midazolamu na Ca^{2+} kanály byl mnohem potentnější ve srovnání s propofolem. Výše popsané mechanismy mohou částečně vysvětlit nižší hodnoty středního arteriálního tlaku a hepatických a intestinálních mikrocirkulačních parametrů pozorovaných v této studii ve skupině anestezované midazolamem. V průběhu anestézie ve skupině s thiopentalem nebyly pozorovány po celou dobu experimentu významné změny v hlavních mikrocirkulačních parametrech hepatosplachnické oblasti. Toto je v rozporu s předchozím nálezem jedné studie, kde byly pozorovány podobné hodnoty průměru kapilár v mezenterické oblasti při srovnání skupiny s thiopentalem a midazolamem.¹⁶⁶ Tento rozpor může být částečně vysvětlen nezbytným podáním oxybarbiturátu pentobarbitalu u každého experimentálního zvířete v samém úvodu instrumentální fáze. Tento fakt může znesnadňovat detekci mikrocirkulačních změn indukovaných podáváním thiopentalu, který je ze skupiny thiobarbiturátů.

Interpretace výsledků této práce vyžaduje diskuzi nad některými limitacemi jejího experimentálního uspořádání. Přes vysoce standardizovaný anestetický protokol v jednotlivých experimentálních skupinách je prezentovaná práce z metodologických a etických důvodů limitovaná právě v samotném experimentálním uspořádání. Všechna experimentální zvířata byla iniciálně (na začátku instrumentační fáze) uvedena do celkové anestézie oxybarbiturátem pentobarbitalem, který zajišťuje hlubokou chirurgickou anestézii jak v průběhu instrumentace, tak i po dobu stabilizační periody. S ohledem na výše popsanou metodologii SDF vyšetření v hepatosplachnické oblasti, žádná kontrolní skupina zvířat při vědomí bez použití anestetik a analgetik nepřipadala v této práci v úvahu. Vstupní hodnoty byly proto získávány již po předchozím intraperitoneálním podání pentobarbitalu. V průběhu realizace experimentálního protokolu byla ve všech studijních skupinách podávána podobná, relativně vysoká dávka fentanylu a to jednak za účelem minimalizace na dávce závislého

účinku fentanylu na mikrocirkulaci, jednak s cílem udržování bezvědomí a dostatečné analgézie zabraňující jakémukoli dyskomfortu u zvířat v kontrolní skupině.¹⁷⁴ Velmi podobné, s experimentálním uspořádáním související limitace, lze očekávat i v podobně postavených reálných klinických studiích s vyhodnocováním hepatosplanchnické mikrocirkulace za různých anestetických protokolů v peroperační fázi. Recentní klinická práce analyzovala intestinální perfuzi kontrastní ultrasonografií (CEUS) u bdících pacientů, tato metoda tak přes svoje limitace představuje potenciální možnost v budoucích studiích porovnat intestinální mikrocirkulaci bez vlivu i s vlivem celkových intravenózních či inhalačních anestetik.^{175,176}

Metoda SDF zobrazení umožňuje v reálném čase přímou vizualizaci mikrocirkulace v oblasti sliznic a na povrchu mnoha solidních i dutých orgánů a to bez použití toxických fluorescenčních barviv. Přes vývoj mnoha novinek a řady vylepšení SDF technologie zůstává zde několik důležitých metodologických omezení, která je třeba vždy zohlednit při interpretaci a analýze dat zohlednit. Tlakové artefakty a laterální pohyb vyšetřované tkáně znesnadňují a omezují možnost kontinuálního monitorování. Cíleně na míru vyvinuté fixační a flexibilní rameno pro SDF sondu je zásadním předpokladem pro získání videosekvencí s minimem artefaktů.^{51,53} V prezentované práci byla jako další krok k eliminaci artefaktů z laterálního pohybu vyšetřované tkáně zvolena technika snímání SDF videosekvencí v oblasti jater v průběhu velmi krátké apnoické pauzy, což bylo umožněno bolusovým podáváním nedepolarizujícího svalového relaxancia právě před zahájením SDF vyšetření.

Výsledky této práce podporují již publikované důkazy o omezené korelaci mezi systémovou hemodynamikou a patofyziologickými změnami na úrovni mikrocirkulace.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Prezentovaný model peroperační monitorace splanchnické mikrocirkulace za různých intravenózních anestetických protokolů napomohl k dalšímu porozumění v oblasti tzv. „*non-anestetických*“ účinků anestetik, konkrétně anestetiky indukovaným změnám v orgánové mikrocirkulaci a perfuzi. Již nyní se objevují práce dokazující zcela odlišnou vaskulární reaktivitu pod vlivem různých anestetik v průběhu hemoragie. Hovoří se o změně farmakodynamiky anestetik a dokonce se zdá, že některé účinky anestetik na mikrocirkulaci a její adaptační mechanismy v průběhu hemoragie mohou být zcela opačné, než jaké jsou pozorovány za fyziologických okolností. Tento fenomén může být vysvětlován na propofolu závislou inhibicí vazoaktivní odpovědi na endogenní NO v průběhu krvácení.^{123,128}

Recentní práce naznačují, že vaskulární reaktivita a její regulace v průběhu anestézie s probíhajícím hemoragickým šokem mohou být ovlivněny jak odlišnými anestetiky, tak odlišnými mechanismy.¹²⁸ Navazující problematikou je pak vliv anestetik na imunitní systém

a to zejména v sepsi a septickém šoku a doprovázející fenomén imunomodulace vlivem anestetik.¹⁸⁰

Složitě řízení mikrovaskulární perfuze s orgánově a druhově specifickými rozdíly činí interpretaci jakýchkoli změn v mikrocirkulaci velmi složitou a obtížnou. Porozumění mechanismům, které zajišťují adekvátní mikrovaskulární perfuzi za fyziologických a patologických podmínek, včetně vlivu anestetik a sedativ, je klíčovým aspektem dalšího výzkumu mikrocirkulace v budoucnosti. Z těchto poznatků pak bude vycházet výzkum zaměřený na diagnostiku a léčbu, kdy budou součástí léčby postupy specificky ovlivňující změny v mikrocirkulační síti s možností vyhodnotit efektivitu terapeutického zásahu event. efekt upravené léčby.

6. Závěry

Závěrem lze shrnout, že tato práce potvrdila hypotézu, že různá intravenózní anestetika ovlivňují hepatickou a intestinální mikrocirkulaci zcela odlišně. Tento fakt byl potvrzen s použitím vysoce standardizovaného modelu umělé plicní ventilace potkana s následnou aplikací ověřených a vysoce standardizovaných různých protokolů intravenózní anestézie u potkanů. Získaná data podporují již předchozí úvahy o protektivním efektu propofolu ve vztahu k heptosplanchnické mikrocirkulaci. Jak bylo již zmíněno, každé anestetikum může alterovat mikrocirkulační a prozánětlivou odpověď organismu různými mechanismy. Z tohoto jasně vyplývá, že všechny modely studia mikrocirkulace vyžadující celkovou anestézii u experimentálních zvířat a následně získaná data musejí být interpretována i s ohledem na účinky použitých anestetik. Tento přístup je doposud velmi komplikovaný z důvodu velké nejednotnosti a velkého počtu anestetických protokolů u experimentálních zvířat včetně značných rozdílů v dávkování anestetik a analgetik. Výsledky prezentované práce mohou pomoci při volbě anestetického protokolu u různých studií zaměřených na hodnocení mikrocirkulace za nejrůznějších podmínek.

Použitý model peroperačního SDF zobrazování a vyhodnocování heptosplanchnické mikrocirkulace je také aplikovatelný ve svých hlavních krocích do klinické praxe. Naskýtá se tak velký potenciál s možností vyhodnotit mikrocirkulaci její přímou vizualizací v peroperační fázi abdominálního chirurgického výkonu a to za nejrůznějších patofyziologických okolností včetně možnosti hodnotit efekt různých anesteziologických postupů a akutních terapeutických intervencí. V této klinické oblasti může mít potenciálně nejvýznamnější klinický dopad vhodná volba anestetik a analgetik při nejčastějších šokových stavech, tedy při hemoragickém a septickém šoku, to vše ve vztahu k „*non-anestetickým*“ účinkům anestetik a s cílem minimalizovat negativní dopady podávaných anestetik. Bude velmi vhodné kombinovat technologii SDF zobrazení např. s laser Doppler flowmetrií. Nezbytnou součástí dalšího vývoje bude výzkum softwarových metod a výpočetní techniky umožňující rychlou automatizovanou on-line analýzu mikrocirkulační sítě. V budoucnu budou klíčové experimentální a klinické práce studující mikrovaskulární účinky anestetik ve spojitosti s orgánovou perfuzí a orgánovými funkcemi a následný vliv na celkový výsledek léčby.

7. Použitá literatura

Norma AMA: American Medical Association Manual for citation

1. Spronk PE, Zandstra DF, Ince C. Bench-to-bedside review: sepsis is a disease of microcirculation. *Crit Care*. 2004; 8(6):462-468.
2. Lehr HA, Bittinger F, Kirkpatrick CJ. Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy? *J Pathol*. 2000; 190: 373-86.
3. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005;9(suppl 4):S13-S19.
4. De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;168(1):98-104.
5. Nakajima Y, Baudry N, Duranteau J, Vicaut E. Microcirculation in intestinal villi. A comparison between hemorrhagic and endotoxin shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(8 Pt 1):1526-1530.
6. Groner W, Winkelman JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, Nadeau RG: Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nat Med*. 1999; 5:1209-1212.
7. Harris AG, Sinitsina I, Messmer K: Quantitative analysis of orthogonal polarization spectral images: Validation in the hamster dorsal skinfold chamber In: Messmer K, ed. *Orthogonal Polarization Spectral Imaging*. Basel: Karger; 2000;21-31.
8. Harris AG, Sinitsina I, MESSMER K: The Cytoscan Model E-II, a new reflectance microscope for intravital microscopy: comparison with the standard fluorescence method. *J Vasc Res*. 2000;37:469-476.
9. Cerny V, Turek Z, Parizkova R. Orthogonal polarization spectral imaging. A review. *Physiol Res*. 2007; 56(2):141-147.
10. Messmer K ed. *Orthogonal Polarization Spectral Imaging. A new tool for the observation and measurement of the human microcirculation*. Basel: Karger; 2000.
11. Milstein DM, Lindeboom JA and C. Ince: Sidestream dark-field imaging and image analysis of oral microcirculation under clinical conditions. In: Gullo A, ed. *Anaesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency A.P.I.C.E.*. Springer-Verlag Italia; 2006; Part 2, 79-88.

12. Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H. Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)*. 1997;42(6):168-175.
13. Dobbe JG, Streekstra GJ, Atasever B, van Zijderveld R, Ince C. Measurement of functional microcirculatory geometry and velocity distributions using automated image analysis. *Med Biol Eng Comput*. 2008;46:659–670.
14. Bezemer R, Dobbe JG, Bartels SA, et al. Rapid automatic assessment of microvascular density in sidestream dark field images. *Med Biol Eng Comput*. 2011; 49:1269–1278.
15. Boerma EC, Mathura KR, van der Voort PH, Spronk PE, Ince C. Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study. *Crit Care*. 2005;9(6):R601-606.
16. Elbers PW, Ince C. Bench-to-bedside review: Mechanisms of critical illness – classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Crit Care*. 2006;10(4):221-228.
17. Szabó A, Suki B, Csonka E, Eszlári E, Kucska K, Vajda K, Kaszaki J, Boros M. Flow motion in the intestinal villi during hemorrhagic shock: a new method to characterize the microcirculatory changes. *Shock*. 2004;21(4):320-328.
18. Nakajima Y, Baudry N, Duranteau J, Vicaut E. Microcirculation in intestinal villi. A comparison between hemoragic and endotoxin shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(8 Pt 1):1526-1530.
19. Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med*. 1998;198: 23–35.
20. Jakob SM. Splanchnic blood flow in low-flow states. *Anesth Analg*. 2003;96(4):1129-1138.
21. De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, Goedhart P, Büchele G, Ospina-Tascon G, Dobbe I, Ince C. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care*. 2007;11(5):R101.
22. Hanboon BK, Ekataksin W, Alsfasser G, et al. Microvascular dysfunction in hepatic ischemia-reperfusion injury in pigs. *Microvasc Res*. 2010;80(1):123-132.
23. Kondo T, Todoroki T, Hirano T, Schildberg FW, Messmer K. Impact of ischemia-reperfusion injury on dimensional changes of hepatic microvessels. *Liver*. 1998;198(2):63-72.

24. Kaszaki J, Wolfard A, Szalay L, Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2006;38(3) 826-828.
25. Puhl G, Schaser KD, Pust D, et al. Initial hepatic microcirculation correlates with early graft function in human orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl.* 2005;11(5):555-563.
26. Puhl G, Schaser KD, Vollmar B, Menger MD, Settmacher U. Noninvasive in vivo analysis of the human hepatic microcirculation using orthogonal polarization spectral imaging. *Transplantation.* 2003;75(6):756-761.
27. Spapen H. Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure. *Anatomical rekord.* 2008;291(6):714-720.
28. Ellis CG, Bateman RM, Sharpe MD, et al. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O₂ extraction in sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(1):H156-164.
29. Hildebrand LB, Krejci V, Banic A, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. *Crit Care Med.* 2000;28(9):3233-3241.
30. Chun K, Zhang J, Biewer J, Fergusson D, Clemens MG. Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers. *Shock.* 1999;1(1), 3-9.
31. Vollmar B, Menger MD. The Hepatic Microcirculation: Mechanistic Contributions and Therapeutic Targets in Liver Injury and Repair. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1269 - 1339.
32. Zhang JX, Pegoli W, Clemens Mg. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol.* 1994;266(4):G624-G632.
33. Zhang JX, Bauer M, Clemens MG. Vessel- and target cell-specific actions of endothelin-1 and endothelin-3 in rat liver. *Am J Physiol.* 1995;269(2): G269-277.
34. Bauer M, Bauer I, Sonin NV, et al. Functional significance of endothelin B receptors in mediating sinusoidal and extrasinusoidal effects of endothelins in the intact rat liver. *Hematology.* 2000;31(4):937-947.
35. Weigelt H, Baumgartl H, Hauck G, Lubbers DW. A vitalmicroscopic set-up to study vasomotion induced by electrical stimulation with microelectrodes. *Bibl Anat.* 1979;18: 81-84.
36. Lubbers DW, Hauck G, Weigelt H, Addicks K. Contractile properties of frog capillaries tested by electrical stimulation. *Bibl Anat.* 1979;17:3-10.

37. Franke RP, Fuhrmann R, Biebl B, Jung F. Influence of various radiographic contrast media on the buckling of endothelial cells. *Microvasc Res.* 2008;76(2):110-113.
38. Burkel, W., E. (1970). The fine structure of the terminal branches of the hepatic arterial system of the rat. *Anat Rec, 167*, 329-349.
39. Richter S, Vollmar B, Mucke I, Post S, Menger MD. Hepatic arteriolo-portal venular shunting guarantees maintenance of nutritional microvascular supply in hepatic arterial buffer response of rat livers. *J Physiol.* 2001;531(Pt 1):193-201.
40. Pannen BH. New insights into the regulation of hepatic blood flow after ischemia and reperfusion. *Anesth Analg.* 2002;94(6):1448–1457.
41. Ganong FW. Krevní oběh orgány. Přehled lékařské fyziologie, Ganong WF, H&H, Česká republika. 1999;32:515-516.
42. Ince C, Sinaasappel M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med.* 1999;27(7):1369-1377.
43. Marshall JC, Christou NV, Meakins JL. The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure. *Ann Surg.* 1993;218(2):111-119.
44. de Figueiredo LFP, Silva E, Cruz RJ, Silva MR. Gas tonometry for evaluation of gastrointestinal mucosal perfusion. Experimental model of trauma, shock and complex surgical maneuvers – part 1. *Acta Cir Bras.* [serial online] 2002;17(4); Available from URL> <http://Scilo.br/acb>.
45. Lundgren O. The circulation of the small bowel mucosa. *Gut.* 1974;15(12):1005-1013.
46. Nelson DP, Samsel RW, Wood LD, Schumacker PT. Pathological supply dependence of systemic and intestinal O₂ uptake during endotoxemia. *J Appl Physiol.* 1988;64(6):2410-2419.
47. Spanner R. Neue Befunde über die Blutwege der Darmwand und ihre funktionelle Bedeutung. *Morph Jb.* 1939;69:394-454.
48. Turek Z, Sykora R, Matejovic M, Cerny V. Anesthesia and the microcirculation. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 2009;13(4):249-258. Review.
49. Winkelman JW. Apparatus and method for in vivo analysis of red and white blood cell indices (4998553). USA, patent. 3-12-1991.
50. Nadeau RG, Groner W: Orthogonal polarization spectral imaging: State of the Art. In: Messmer K (ed). *Orthogonal Polarization Spectral Imaging.* Basel: Karger, 2000;vol 24:9-20.

51. Lindert J, Werner J, Redlin M, Kuppe H, Habazettl H, Pries AR. OPS imaging of human circulation: a short technical report. *J Vasc Res.* 2002;39(4):368-372.
52. Ince C. Sidestream dark-field (SDF) imaging: an improved technique to observe sublingual microcirculation. *Crit Care.* 2005;8(suppl):P72.
53. Turek Z, Cerny V, Pařízkova R. Noninvasive in vivo assessment of the skeletal muscle and small intestine serous surface microcirculation in rat: sidestream dark-field (SDF) imaging, *Physiol Res.* 2008;57(3):365-371.
54. Balestra GM, Bezemer R, Boerma EC, Yong ZY, Sjauw KD, Engstrom AE, Koopmans M, Ince C. Improvement of sidestream dark field imaging with an image acquisition stabilizer. *BMC Med Imaging.* 2010;13(10):15-22.
55. Goedhart PT, Khalilzada M, Bezemer R, Merza J, Ince C. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Opt Express.* 2007;15(23):15101-15114.
56. Harris AG, Leiderer R, Peer F, Messmer K. Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am J Physiol.* 1996;271(6):H2388–2398.
57. Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: An indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp.* 1995;15(5):244-249.
58. Sarelius IH, Duling BR. Direct measurement of microvessel hematocrit, red cell flux, velocity, and transit time. *Am J Physiol.* 1982;243(6):H1018–1026.
59. Drain LE. The laser Doppler technique, New York, Wiley, USA, 1980, 252s.
60. Rajan V, Varghese B, van Leeuwen TG, Steenbergen W. Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):269–283.
61. Humeau A, Steenbergen W, Nilsson H, Strömberg T. Laser Doppler perfusion monitoring and imaging: novel approaches. *Med Biol Eng Comput.* 2007;45(5):421-435.
62. Duranteau J, Sitbon P, Teboul JL, Vicaut E, Anguel N, Richard Ch, Samii K. Effects of epinephrine, norepinephrine, or the combination of norepinephrine and dobutamine on gastric mucosa in septic shock. *Crit Care Med.* 1999;27(5):893-900.
63. Nevriere R, Mathieu D, Chagnon JL, Lebleu N, Millien JP, Wattel F. Skeletal muscle microvascular blood flow and oxygen transport in patients with severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(1):191-195.

64. Young JD, Cameron EM: Dynamics of skin blood flow in human sepsis. *Intensive Care Med.* 1995;21(8):668-674.
65. Krejci V, Hildebrand L, Banic A, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Continuous measurements of microcirculatory blood flow in gastrointestinal organs during acute haemorrhage. *Br J Anaesth.* 2000;84(4):468-475.
66. Hildebrand LB, Krejci V, Banic A, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. *Crit Care Med.* 2000;28(9):3233-3241.
67. Banic A, Krejci V, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Effects of sodium nitroprusside and phenylephrine on blood flow in free musculocutaneous flaps during general anesthesia. *Anesthesiology.* 1999;90(1):147-155.
68. Choileain NN, Redmond PH. Cell Response to Surgery. *Arch Surg.* 2006;141:1132-1140.
69. Vellinga NA, Ince C, Boerma EC. Microvascular dysfunction in the surgical patient. *Curr Opin Crit Care.* 2010;16(4):377-383.
70. Miyazaki T, Kuwano H, Kato H, Yoshikawa M, Ojima H, Tsukada K. Predictive value of blood flow in the gastric tube in anastomotic insufficiency after thoracic esophagectomy. *World J Surg.* 2002;26(11):1319-1323.
71. Vignali A, Gianotti L, Braga M, Radaelli G, Malvezzi L, Di Carlo V. Altered microperfusion at the rectal stump is predictive for rectal anastomotic leak. *Dis Colon Rectum.* 2000;43(1):76-82.
72. Mythen MG, Webb AR. The role of gut mucosal hypoperfusion in the pathogenesis of post-operative organ dysfunction. *Intensive Care Med.* 1994;20(3):203-209.
73. Mythen MG, Webb AR. Intra-operative gut mucosal hypoperfusion is associated with increased post-operative complications and cost. *Intensive Care Med.* 1994;20(2):99-104.
74. Jhanji S, Lee C, Watson D, Hinds C, Pearse RM. Microvascular flow and tissue oxygenation after major abdominal surgery: association with post-operative complications. *Intensive Care Med.* 2009;35(4):671-677.
75. Bauer A, Kofler S, Thiel M, Eifert S, Christ F. Monitoring of the sublingual microcirculation in cardiac surgery using orthogonal polarization spectral imaging: preliminary results. *Anesthesiology.* 2007;107(6):939-945.

76. Turek Z, Cerny V, Parizkova R, Samek J, Oberreiter M. Prolonged hypervolemic hemodilution decreases functional capillary density of ileal mucosa in pigs revealed by sidestream dark-field imaging. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2011;12(10):867-874.
77. Pargger H, Hampl KF, Christen P, Staender S, Scheidegger D. Gastric intramucosal pH-guided therapy in patients after elective repair of infrarenal abdominal aneurysms: is it beneficial? *Intensive Care Med*. 1998;24(8):769-776.
78. Ivatury RR, Simon RJ, Islam S, Fueg A, Rohman M, Stahl WM. A prospective randomized study of end points of resuscitation after major trauma: global oxygen transport indices versus organ-specific gastric mucosal pH. *J Am Coll Surg*. 1996;183(2):145-154.
79. Mythen MG, Webb AR. Perioperative plasma volume expansion reduces the incidence of gut mucosal hypoperfusion during cardiac surgery. *Arch Surg*. 1995;130(4):423-429.
80. Theodoropoulos G, Lloyd LR, Cousins G, Pieper D. Intraoperative and early postoperative gastric intramucosal pH predicts morbidity and mortality after major abdominal surgery. *Am Surg*. 2001;67(4):303-308.
81. Brinkmann A, Calzia E, Träger K, Radermacher P. Monitoring the hepato-splanchnic region in the critically ill patient. Measurement techniques and clinical relevance. *Intensive Care Med*. 1998;24(6):542-556.
82. Cerny V, Cvachovec K. Gastric tonometry and intramucosal pH--theoretical principles and clinical application. *Physiol Res*. 2000;49(3):289-297.
83. Eichhorn JH. Special article: the anesthesia patient safety foundation at 25: a pioneering success in safety, 25th anniversary provokes reflection, anticipation. *Anesth Analg*. 2012;114(4):791-800.
84. Cooper JB. Towards patient safety in anaesthesia. *Ann Acad Med Singapore*. 1994;23(4):552-557. Review
85. Sadat U, Cooper DG, Gillard JH, Walsh SR, Hayes PD. Impact of the type of anesthesia on outcome after elective endovascular aortic aneurysm repair: literature review. *Vascular*. 2008;16(6):340-345.
86. Jayr C, Thomas H, Rey A, Farhat F, Lasser P, Bourgain JL. Postoperative pulmonary complications. Epidural analgesia using bupivacaine and opioids versus parenteral opioids. *Anesthesiology*. 1993;78(4):666-676.

87. Galimberti G, Caristi D, Iscra F, Frassanito P, Gullo A. Blended anaesthesia vs general anaesthesia : is blended anaesthesia a really cheaper technique in decreasing post-operative cost? *Br J Anaesth.* 1996;76:A227.
88. Salomäki TE, Leppäluoto J, Laitinen JO, Vuolteenaho O, Nuutinen LS. Epidural versus intravenous fentanyl for reducing hormonal, metabolic, and physiologic responses after thoracotomy. *Anesthesiology.* 1993;79(4):672-679.
89. Tuman KJ, McCarthy RJ, March RJ, DeLaria GA, Patel RV, Ivankovich AD. Effects of epidural anesthesia and analgesia on coagulation and outcome after major vascular surgery. *Anesth Analg.* 1991;73(6):696-704.
90. Davies MJ, Silbert BS, Mooney PJ, Dysart RH, Meads AC. Combined epidural and general anaesthesia versus general anaesthesia for abdominal aortic surgery: a prospective randomised trial. *Anaesth Intensive Care.* 1993;21(6):790-794.
91. McQuay HJ, Carroll D, Moore RA. Postoperative orthopaedic pain--the effect of opiate premedication and local anaesthetic blocks. *Pain.* 1988;33(3):291-295.
92. Greif R, Akca O, Horn EP, Kurz A, Sessler DI. Supplemental perioperative oxygen to reduce the incidence of surgical-wound infection. Outcomes Research Group. *N Engl J Med.* 2000;342(3):161-167.
93. Belda FJ, Aguilera L, Garcia de la AJ, et al. Supplemental perioperative oxygen and the risk of surgical wound infection: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2005;294(16):2035-2042.
94. Kurz A, Sessler DI, Lenhardt R. Perioperative normothermia to reduce the incidence of surgical-wound infection and shorten hospitalization. Study of Wound Infection and Temperature Group. *N Engl J Med.* 1996;334(19):1209-1215.
95. Grocott MP, Mythen MG, Gan TJ. Perioperative fluid management and clinical outcomes in adults. *Anesth Analg.* 2005;100(4):1093-1106.
96. Holte K, Kehlet H. Fluid therapy and surgical outcomes in elective surgery: a need for reassessment in fast-track surgery. *J Am Coll Surg.* 2006;202(6):971-989.
97. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M. A rational approach to perioperative fluid management. *Anesthesiology.* 2008;109(4):723-740.
98. Tote SP, Grounds RM. Performing perioperative optimization of the high-risk surgical patient. *Br J Anaesth.* 2006;97(1):4-11.
99. Bundgaard-Nielsen M, Secher NH, Kehlet H. 'Liberal' vs. 'restrictive' perioperative fluid therapy--a critical assessment of the evidence. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53(7):843-851.

100. Holte K, Sharrock NE, Kehlet H. Pathophysiology and clinical implications of perioperative fluid excess. *Br J Anaesth*. 2002;89(4):622-632.
101. Hildebrand LB, Kimberger O, Arnberger M, Brandt S, Kurz A, Sigurdsson GH. Crystalloids versus colloids for goal-directed fluid therapy in major surgery. *Crit Care*. 2009;13(2):R40.
102. Kimberger O, Arnberger M, Brandt S, et al. Goal-directed colloid administration improves the microcirculation of healthy and perianastomotic colon. *Anesthesiology*. 2009;110(3):496-504.
103. Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, Sakai H, Intaglietta M. Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skinfold model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1998;275 (6 Pt 2):H2170-2180.
104. Prien T, Backhaus A, Pelster F, Pircher W, Bunte H, Lawin P. Effect of intraoperative fluid administration and colloid osmotic pressure on the formation of intestinal edema during gastrointestinal surgery. *J Clin Anesth*. 1990;2(5):317-323.
105. Leach RM, Treacher DF. The pulmonary physician in critical care 2: Oxygen delivery and consumption in the critically ill. *Torax*. 2002;57(2):170-177.
106. Kimberger O, Fleischmann E, Brandy S, et al. Supplemental oxygen, but not supplemental crystalloid fluid, increases tissue oxygen tension in healthy and anastomotic colon in pigs. *Anesth Analg*. 2007;105(3):773-779.
107. Hildebrand LB, Pestel G, Hager H, Ratnaraj J, Sigurdson GH, Kurz A. Perioperative fluid management: comparison of high, medium and low fluid volume on tissue oxygen pressure in the small bowel and colon. *Eur J Anaesthesiol*. 2007;24(11):927-933.
108. Vazquez BY, Martini J, Tsai AG, Johnson PC, Cabrales P, Intaglietta M. The variability of blood pressure due to small changes of hematocrit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(3):H863-867.
109. Schwarte LA, Fournell A, van Bommel J, Ince C. Redistribution of intestinal microcirculatory oxygenation during acute hemodilution in pigs. *J Appl Physiol*. 2005;98(3):1070-1075.
110. Gottschalk A, Standl TG, Freitag M, Radtke P, Rempf C, Burmeister MA, Horn EP, Strate T, Schulte AM, Esch J. Effect of isovolaemic hemodilution on oxygenation of liver and skeletal muscle. *Eur J Anaesthesiol*. 2005;22(3):181-188.
111. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M. A rational approach to perioperative fluid management. *Anesthesiology*. 2008;109(4):723-740.

112. Rehm M, Zahler S, Lotsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, Becker BF: Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed. *Anesthesiology*. 2004;100:1211–1223.
113. Kurosawa S, Kato M. Anesthetics, immune cells, and immune response. *J Anesth*. 2008;22(3):263-277.
114. Hamburger JA, Meiler SE. Anesthesia drugs, immunity, and long-term outcome. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2006;19(4):423-428.
115. Vasileiou I, Xanthos T, Koudouna E, et al. Propofol: A review of its non-anaesthetic effects, *Eur J Pharmacol*. 2009;605(1-3):1-8.
116. Turek Z, Sykora R, Matejovic M, Cerny V. Anesthesia and the microcirculation. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2009;13(4): 249-258.
117. Ebert TJ, Kanitz DD, Kampine JP. Inhibition of sympathetic neural outflow during thiopental anesthesia in humans. *Anesth Analg*. 1990;71(4):319-326.
118. Krassioukov AV, Gelb AW, Weaver LC. Actions of propofol on central sympathetic mechanisms controlling blood pressure. *Can J Anaesth*. 1993;40(8):761-769.
119. Ivankovich AD, Miletich DJ, Reimann C, Albreich RF, Zahad B. Cardiovascular effects of centrally administered ketamine in goats. *Anesth Analg*. 1974;53(6):924-933.
120. Bilotta F, Fiorani L, La RI, Spinelli F, Rosa G. Cardiovascular effects of intravenous propofol administered at two infusion rates: a transthoracic echocardiographic study. *Anaesthesia*. 2001;56(3):266–271.
121. Sprung J, Ogletree-Hughes ML, McConnell BK, Zakhary DR, Smolsky SM, Moravec CS. The effects of propofol on the contractility of failing and nonfailing human heart muscles. *Anesth Analg*. 2001;93(3):550–559.
122. Kurokawa H, Murray PA, Damron DS. Propofol attenuates beta-adrenoreceptor-mediated signal transduction via a protein kinase C-dependent pathway in cardiomyocytes. *Anesthesiology*. 2002;96(3):688-698.
123. Holzmann A, Schmidt H, Gebhardt MM, Martin E. Propofol-induced alterations in the microcirculation of hamster striated muscle. *Br J Anaesth*. 1995;75(4):452-456.
124. Longnecker DE, Miller FN, Harris DE. Small artery and vein response to ketamine HCl in the bat wing. *Anesth Analg*. 1974;53(1):64-68.
125. Wada DR, Harashima H, Ebling WF, Osaki EW, Stanski DR. Effects of thiopental on regional blood flows in the rat. *Anesthesiol*. 1996;84(3):596-604.

126. Hirota K, Lambert DG. I.V. anaesthetic agents inhibit dihydropyridine binding to L-type voltage sensitive Ca²⁺ channels in rat cerebrocortical membranes. *Br J Anaesth.* 1996;77(2):248-253.
127. Bazin JE, Dureuil B, Danialou G, et al. Effects of etomidate, propofol and thiopental anaesthesia on arteriolar tone in rat diaphragm. *Br J Anaesth.* 1998;81(3):430-435.
128. Brookes ZL, Brown NJ, Reilly CS. Differential effects of intravenous anaesthetic agents on the response of rat mesenteric microcirculation in vivo after haemorrhage. *Br J Anaesth.* 2002;88(2):255-63.
129. Christiansen CL, Ahlburg P, Jacobsen CJ, Andresen EB, Paulsen PK: The influence of propofol and midazolam/halothane anesthesia on hepatic SvO₂ and gastric mucosal pH during cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1998;12(4):418-421.
130. Gonzalez-Correa JA, Cruz-Andreotti E, Arrebola MM, Lopez-Villodres JA, Jodar M, De La Cruz JP. Effects of propofol on the leukocyte nitric oxide pathway: in vitro and ex vivo studies in surgical patients. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2008;376(5):331–339.
131. Gilliland HE, Armstrong MA, Carabine U, McMurray TJ: The choice of anesthetic maintenance technique influences the antiinflammatory cytokine response to abdominal surgery. *Anesth Analg.* 1997;85(6):1394–1398.
132. Laffey JG, Boylan JF, Cheby DC. The systemic inflammatory response to cardiac surgery. Implication for the anesthesiologist. *Anesthesiology.* 2002;97(1):215-252.
133. Piriou V, Chiari P, Lehot JJ, Foex P, Arvieux CC. Effects of propofol on haemodynamics and on regional blood flows in dogs submitted or not to a volaemic expansion. *Eur J Anaesthesiol.* 1999;16(9):615-621.
134. Koch M, De Baker D, Vincent JL, Barvais L, Hennart D, Schmartz D. Effects of propofol on human microcirculation. *Br J Anaesth.* 2008;101(4): 473-478.
135. O'Riordan J, O'Beirne HA, Yang Y, Bellamy MC. Effects of desflurane and isoflurane on splanchnic microcirculation during major surgery. *Br J Anaesth.* 1997;78(1):95-96.
136. Hartman JC, Pagel PS, Proctor LT, Kampine JP, Schmeling WT, Warltier DC: Influence of desflurane, isoflurane and halothane on regional tissue perfusion in dogs. *Can J Anaesth.* 1992;39(8):877-887.
137. Merin RG, Bernard JM, Doursout MF, Cohen M, Chelly J. Comparison of the effects of isoflurane and desflurane on cardiovascular dynamics and regional blood flow in the chronically instrumented dog. *Anesthesiology.* 1991;74(3): 568-574.

138. Bernard JM, Doursout MF, Wouters P, Hartley CJ, Merin RG, Chelly JE. Effects of sevoflurane and isoflurane on hepatic circulation in the chronically instrumented dog. *Anesthesiology*. 1992;77(3):541-545.
139. Manohar M, Parks CM. Porcine systemic and regional organ blood flow during 1.0 and 1.5 minimum alveolar concentration of sevoflurane anesthesia without and with 50% nitrous oxide. *J Pharmacol Exper Therap*. 1984;231(3):640-648.
140. Sundeman H, Biber B, Raner C, Winso O. Autoregulation and vasodilator response by isoflurane and desflurane in the feline renal vascular bed. *Acta anaesthesiol Scand*. 1997;41(9):1180-1186.
141. Hartman JC, Pagel PS, Kampine JP, Schmeling WT, Warltier DC. Influence of desflurane on regional distribution of coronary blood flow in a chronically instrumented canine model of multivessel coronary artery obstruction. *Anesth Analg*. 1991;72(3):289-299.
142. Kersten JR, Orth KG, Pagel PS, Mei DA, Gross GJ, Warltier DC. Role of adenosine in isoflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology*. 1997;86(5):1128-1139.
143. Novalija E, Fujita S, Kampine JP, Stowe DF. Sevoflurane mimics ischemic preconditioning effects on coronary flow and nitric oxide release in isolated hearts. *Anesthesiology*. 1999;91(3):701-712.
144. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology*. 1999;91(5):1437-1446.
145. Toller WG, Gross ER, Kersten JR, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Sarcolemmal and mitochondrial adenosine triphosphate-dependent potassium channels: Mechanisms of desflurane-induced cardioprotection. *Anesthesiology*. 2000;92(6):1731-1739.
146. Mitsuhashi H, Shimizu R, Yokoyama MM: Suppressive effects of volatile anesthetics on cytokine release in human peripheral blood mononuclear cells. *Int J Immunopharmacol*. 1995;17(6):529-534.
147. Kowalski C, Zahler S, Becker BF, et al. Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. *Anesthesiology*. 1997;86(1):188-195.
148. Nakamura T, Kashimoto S, Oguchi T, Kumazawa T: Hydroxyl radical formation during inhalation anesthesia in the reperfused working rat heart. *Can J Anaesth*. 1999;46(5 Pt 1):470-475.

149. Clemente A, Carli F. The physiological effects of thoracic epidural anesthesia and analgesia on the cardiovascular, respiratory and gastrointestinal system. *Minerva Anesthesiol.* 2008;74(10):549-563.
150. Hogan QH, Stadnicka A, Kampine JP. Effect of epidural anesthesia on splanchnic capacitance. *Adv Pharmacol.* 1994;31:471-483.
151. Hogan QH, Stekiel TA, Stadnicka A, Bosnjak ZJ, Kampine JP. Region of epidural blockade determinates sympathetic and mesenteric capacitance effects in rabbits. *Anesthesiology.* 1995;83(3):604-610.
152. Lazar G, Kazsaki J, Abraham S, et al. Thoracic epidural anesthesia improves the gastric microcirculation during experimental gastric tube formation. *Surgery.* 2003;134(5):799-805.
153. Gould TH, Grace K, Thorne G, Thomas M. Effect of thoracic epidural anesthesia on colonic blood flow. *Br J Anaesth.* 2002;89(3):446-451.
154. Miyawaki I, Nakamura K, Terasako K, Toda H, Kakuyama M, Mori K. Modification of endothelium-dependent relaxation by propofol, ketamine, and midazolam. *Anesth Analg.* 1995; 81(1):474-479.
155. Lehmann Ch, Feyerherd F, Feyerherd T, et al. Ketamine does not affect intestinal microcirculation in pentobarbital-anaesthetized rats during experimental endotoxaemia. *Lab Anim.* 2007;41(1):55-62.
156. Turek Z, Lehmann C, Parizkova R, Samek J, Kaska M, Cerny V. Differential effects of intravenous anesthetics on hepatosplanchnic microcirculation in rats: Sidestream dark-field imaging study. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2012; Jan: e-pub, ahead of print.
157. Ethical guidelines for publication in Clinical Hemorheology and Microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010;44(1):1-2.
158. Živná Helena. Základy práce s potkanem v laboratoři. Ústřední komise pro ochranu zvířat, Ministerstvo zemědělství, Praha. Elektronická verze 2001.
159. Lump WV, Wynn JE eds. *Veterinary anesthesia.* Philadelphia, Pennsylvania: Lea & Febiger; 356 stran, 1973.
160. Bohlen HG, Gore RW. Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies. *Microvas Res.* 1976;11(1):103-110.
161. Nevieri RR, Pitt-Hyde ML, Piper RD, Sibbald WJ, Potter RF. Microvascular perfusion deficits are not a prerequisite for mucosal injury in septic rats. *Am J Physiol.* 1999;276(4 Pt 1):G933-9440.

162. Harris G, Costa JJ, Delano FA, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. Mechanisms of cell injury in rat mesentery and cremaster muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1998;274(3 Pt 2):H1009-H1015.
163. Cerny V, Turek Z, Parizkova R. In situ assessment of the liver microcirculation in mechanically ventilated rats using Sidestream dark-field (SDF) imaging. *Physiol Res*. 2009;58(1):49–55.
164. Langer S, Harris AG, Biberthaler P, von Dobschuetz E, Messmer K. Orthogonal polarization spectral imaging as a tool for the assessment of hepatic microcirculation: a validation study. *Transplantation*. 2001;71(9):1249-1256.
165. Brookes ZL, Brown NJ, Reilly CS. Response of the rat cremaster microcirculation to hemorrhage in vivo: differential effects of intravenous anesthetic agents. *Shock*. 2002;18(6):542-548.
166. Brookes ZL, Reilly CS, Brown NJ. Differential effects of propofol, ketamine, and thiopental on the skeletal muscle microcirculation of normotensive and hypertensive rats in vivo. *Br J Anaesth*. 2004;93(2):249-256.
167. Zhu T, Pang Q, McCluskey SA, Luo C. Effect of propofol on hepatic blood flow and oxygen balance in rabbits. *Can J Anaesth*. 2008;55(6):364-370.
168. Chang KS, Davis RF. Propofol produces endothelium-independent vasodilation and may act as a Ca²⁺ channel blocker. *Anesth Analg*. 1993;76(1):24-32.
169. Nakamura K, Hatano Y, Hirakata H, Nishiwada M, Toda H, Mori K. Direct vasoconstrictor and vasodilator effects of propofol in isolated dog arteries. *Br J Anaesth*. 1992;68(2):193-197.
170. Wilkison WO, Spiegelman BM. Biosynthesis of the vasoactive lipid monobutyrin. Central role of diacylglycerol. *J Biol Chem*. 1993;268(4):2844-2849.
171. Suliburk JW, Gonzalez EA, Kennison SD, Helmer KS, Mercer DW. Differential effects of anesthetics on endotoxin-induced liver injury. *J Trauma*. 2005;58(4):711–716.
172. Stowe DF, Bosnjak ZJ, Kampine JP. Comparison of etomidate, ketamine, midazolam, propofol, and thiopental on function and metabolism of isolated hearts. *Anesth Analg*. 1992;74(4):547-558.
173. Buljubasi N, Marijic J, Berczi V, Supan DF, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Differential effects of etomidate, propofol, and midazolam on calcium and potassium channel currents in canine myocardial cells. *Anesthesiology*. 1996;85(5):1092-1099.

174. Brookes ZL, Brown NJ, Reilly CS. The Dose-Dependent Effects of Fentanyl on Rat Skeletal Muscle Microcirculation In Vivo. *Anesth Analg.* 2003;96(2):456–462.
175. Girlich C, Schacherer D, Lamby P, Scherer MN, Schreyer AG, Jung EM. Innovations in contrast enhanced high resolution ultrasound improve sonographic imaging of the intestine. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2010;45(2-4):207-215.
176. Girlich C, Jung EM, Iesalnieks I, Schreyer AG, Zorger N, Strauch U, Schacherer D. Quantitative assessment of bowel wall vascularisation in Crohn's disease with contrast-enhanced ultrasound and perfusion analysis. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2009;43(1):141-148.
177. Nacul FE, Guia IL, Lessa MA, Tibirica E. The Effects of Vasoactive Drugs on Intestinal Functional Capillary Density in Endotoxemic Rats: Intravital Video-Microscopy Analysis. *Anesth Analg.* 2010;110(2):547–554.
178. Paes-da-Silva F, Gonzalez AP, Tibirica E. Effects of fluid resuscitation on mesenteric microvascular blood flow and lymphatic activity after severe hemorrhagic shock in rats. *Shock.* 2003;19(1):55–60.
179. Gori T, Di Stolfo G, Sicuro S, et al. Correlation analysis between different parameters of conduit artery and microvascular vasodilation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;35(4):509-515.
180. Sanders RD, Hussel T, Maze M. Sedation & immunomodulation. *Anesthesiol Clin.* 2011;29(4):687-706.