

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

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

**Michal Šitina**

**2013**

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

**Doktorský studijní program  
Chirurgie**

**Metody hodnocení tkáňové perfuze a mikrocirkulace v experimentu  
– soubor experimentálních prací**

**Methods of tissue perfusion and microcirculation assessment in experiment  
– set of experimental studies**

**MUDr. Michal Šitina**

Školitel: Prof. MUDr. Vladimír Černý, Ph.D., FCCM

Hradec Králové, 15.5.2013

Obhajoba dne: .....

**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 Digitálním depozitáři Univerzity Karlovy v Praze.

**Hradec Králové, 15. 5. 2013**

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli prof. MUDr. Vladimíru Černému, Ph.D. zejména za vždy velmi vstřícný a motivující přístup a aktivní podporu.

## Seznam použitých zkratek

$A_{out}/A_{in}$	Poměr radioaktivit na výstupu a vstupu mikrodialyzační sondy
ACM, MCA	<i>Arteria cerebri media</i>
ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
aPC	Aktivovaný protein C
$C_{out}/C_{in}$	Poměr koncentrací na výstupu a vstupu mikrodialyzační sondy
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CMV	Kontrolovaná mandatorní ventilace
CVR	Cévní rezistence mozku
CR	Kompresivní poměr
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
D	Potřeba kyslíku v oblasti tkáně
D/Q	Poměr potřeby a dodávky kyslíku v oblasti tkáně
EDHF	<i>Endothelium derived hyperpolarisation factor</i>
EDRF	<i>Endothelium derived relaxation factor</i>
EKG	Elektrokardiografie
EtCO <sub>2</sub>	Parciální tlak oxidu uhličitého ve vydechovaném vzduchu na konci výdechu
FCD	Funkční kapilární hustota
FiO <sub>2</sub>	Procento kyslíku ve vdechovaném vzduchu
FV <sub>mean</sub>	Střední rychlost toku
ICA	<i>Arteria carotis interna</i>
IVM	Intravitální mikroskopie
LDF	<i>Laser doppler fluxmetry</i>
LDFI	<i>Laser doppler flow imaging</i>
L/P	Poměr laktát/pyruvát na výstupu z mikrodialyzační sondy
MAP	Střední arteriální tlak
MFI	<i>Microvascular flow index</i>
MFI <sub>max</sub>	Nejvyšší MFI v hodnocených polích
MFI <sub>min</sub>	Nejnižší MFI v hodnocených polích
Na/K	Sodíko-draslíkový
NO	Oxid dusnatý

NOS	NO-syntáza
eNOS	Endotelová NOS
iNOS	Inducibilní NOS
nNOS	Neuronální NOS
O/I	Poměr koncentrací na výstupu a vstupu mikrodialyzační sondy
O <sub>2</sub> ER	Extrakce kyslíku
O <sub>2</sub> ER <sub>krit</sub>	Kritická extrakce kyslíku
OPS	<i>Orthogonal polarisation spectral imaging</i>
pCO <sub>2</sub>	Parciální tlak oxidu uhličitého
PEEP	Tlak v dýchacích cestách na konci výdechu
PPV	Procento perfundovaných cév
PVD	Hustota perfundovaných cév
Q	Dodávka kyslíku do oblasti tkáně
r	Poloměr
SDF	<i>Sidestream-darkfield imaging</i>
SVD	Hustota malých cév
TCD	Transkraniální dopplerovská ultrasonografie
TFPI	<i>Tissue factor pathway inhibitor</i>
THR	<i>Transient hyperaemic response</i>
THRR	<i>Transient hyperaemic response ratio</i>
TVD	Celková hustota cév
SaO <sub>2</sub>	Saturace hemoglobinu kyslíkem
V	Spotřeba kyslíku v oblasti tkáně

# OBSAH

Úvod.....	9
<b>A. Přehled recentních poznatků</b>	
<b>1 Fyziologická mikrocirkulace.....</b>	<b>11</b>
1.1 Morfologie mikrocirkulace.....	11
1.2 Reologie mikrocirkulace .....	12
1.3 Regulace tkáňové perfuze.....	14
1.3.1 Detekce tkáňové perfuze.....	15
1.3.2 Role endotelu.....	16
1.3.3 Retrográdní šíření vazodilatace.....	16
1.3.4 Role shear stress.....	17
1.4 Tlaková autoregulace.....	18
1.4.1 Metabolická teorie.....	19
1.4.2 Myogenní teorie.....	20
1.4.3 Rozdíly mezi malými a velkými arterioly.....	21
1.4.4 Hypotéza tkáňového a kapilárního tlaku.....	21
<b>2 Mikrocirkulace u kriticky nemocných.....</b>	<b>23</b>
2.1 Alterace mikrocirkulace u sepse.....	23
2.2 Heterogenita perfuze mikrocirkulace.....	25
2.3 Problém dodávky kyslíku.....	29
2.4 Vztah mikrocirkulace ke koagulaci.....	30
2.5 Úloha oxidu dusnatého v patogenezi sepse.....	31
2.6 Multiorganové selhání jako adaptivní odpověď.....	31
<b>3 Metody studia mikrocirkulace.....</b>	<b>33</b>
3.1 Intravitální mikroskopie.....	33
3.2 Laser doppler fluxmetry, Laser doppler flow imaging.....	35
3.3 Ortogonální polarizační zobrazení (OPS).....	36

3.3.1	<i>Validace OPS zobrazení.....</i>	37
3.3.2	<i>Technická omezení metody.....</i>	37
3.4	<b>Side-stream darkfield (SDF) zobrazení .....</b>	<b>38</b>
3.5	<b>Hodnocení tkáňové perfuze mikrodialýzou.....</b>	<b>42</b>
3.5.1	<i>Princip indikátorové mikrodialýzy.....</i>	43
3.5.2	<i>Faktory ovlivňující koncentraci indikátoru.....</i>	44
3.5.3	<i>Používané indikátory.....</i>	45
3.5.4	<i>Metodické studie.....</i>	46
3.5.5	<i>Indikátorová mikrodialýza a porucha tkáňové perfuze – experimentální a klinické studie.....</i>	47
3.5.6	<i>Zhodnocení indikátorové mikrodialýzy.....</i>	49
3.6	<b>Kvantitativní parametry k popisu mikrocirkulace.....</b>	<b>49</b>
3.7	<b>Doporučení pro snímání a analýzu obrazů mikrocirkulace.....</b>	<b>51</b>

## **B. Experimentální práce**

	<b>Cíle a hypotézy experimentálních prací.....</b>	<b>53</b>
	<b>In vivo validita indikátorové mikrodialyzační techniky pro hodnocení tkáňové perfuze .....</b>	<b>54</b>
	<b>Vliv střední hypotermie na mozkovou autoregulaci .....</b>	<b>62</b>
	<b>Faktory ovlivňující “Transient hyperaemic response” (THR) test mozkové autoregulace.....</b>	<b>69</b>
	<b>Posouzení mozkové mikrocirkulace in situ u mechanicky ventilovaných králíků pomocí „Sidestream dark-field“ (SDF) zobrazení.....</b>	<b>85</b>
	<b>Zachovaná mikrocirkulace mozku v časném stádiu endotoxémie u mechanicky ventilovaných králíků.....</b>	<b>95</b>
	<b>Závěry .....</b>	<b>103</b>
	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>104</b>



## Úvod

Mnoha studii bylo doloženo, že se poruchy mikrocirkulace účastní řady patologických procesů. Výzkum mikrocirkulace je proto celosvětově velmi rozsáhlý. V poslední dekádě bylo zavedeno několik nových technologií, umožňujících intravitální studium mikrocirkulace bez nutnosti aplikace fluorescenčních látek, včetně výzkumu v oblasti humánní medicíny.

Studium mikrocirkulace je i ústředním výzkumným tématem Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, na jejíž půdě doktorské studium probíhalo. V průběhu studia jsme postupně provedli několik experimentálních animálních studií, které využitím různých metod posuzovali morfologické a funkční aspekty mikrocirkulace. Nejprve jsme se zabývali využitím mikrodialýzy pro posouzení tkáňové perfuze, tzv. indikátorovou mikrodialyzační technikou. Posléze jsme studovali vliv hypotermie na mozkovou autoregulaci, tedy na jednu z funkcí mikrocirkulace. Pro metodu testování autoregulace, kterou jsme v experimentu použili, tzv. THR test, jsme též sestavili matematický model, jímž jsme se pokusili blíže analyzovat faktory, které výsledek THR testu ovlivňují. V poslední části studia jsme metodou SDF zobrazení hodnotili zejména morfologické aspekty mikrocirkulace povrchu mozku za normálního stavu a při endotoxémii.

Dizertační práce je rozdělena na 2 oddíly. První oddíl, „A. Přehled recentních poznatků“, v základech popisuje poznatky o mikrocirkulaci za normálních a patologických okolností relevantní pro provedené experimentální studie. Druhý oddíl, „B. Experimentální práce“, uvádí formou původních článků jednotlivé provedené studie.

## **A. Přehled recentních poznatků**

## 1. Fyziologická mikrocirkulace

Mikrocirkulací, oproti makrocirkulaci, přibližně míníme tu část cirkulace, která není viditelná prostým okem. Přibližně jde o cévy o průměru pod 100  $\mu\text{m}$ . Mikrocirkulace poskytuje rozhraní mezi krví a tkáněmi. Zajišťuje tedy výměnu kyslíku, nutričních substrátů a metabolických produktů mezi krví a tkáněmi, imunitní, hemostatické a další funkce. Reguluje též lokální průtok krve tkáně, tj. zejména distribuci krve uvnitř mikrocirkulace a z podstatné části i její celkový průtok.

### 1.1. Morfologie mikrocirkulace

S rozvojem intravitálních mikroskopických technik se postupně zpřesňoval popis mikrocirkulace. Podrobný popis morfologie fyziologické mikrocirkulace, platný s drobnými úpravami dosud, je znám od 30.-50. let 20. století (Zweifach 1950). Pozdější výzkum mikrocirkulace se zabýval popisem její funkce a morfologií a funkcí mikrocirkulace za patologických okolností.

Velké muskulární arterie se postupně opakovaně větví v arterie s klesajícím průměrem, které přecházejí v arterioly kruhového průsvitu o průměru cca 15-80  $\mu\text{m}$  s množstvím hladké svaloviny ve stěně. Po dalších 3-5 větveních přecházejí v metarterioly (prekapiláry). Zweifach popisoval struktury charakteru sfinkterů v okolí prekapilár. V mnoha pozdějších pracích však tyto struktury nalezeny nebyly, jejich existence je kontroverzní (Biederman 1976). Funkčně by pak těmito prekapilárními sfinkterům odpovídala svalovina terminálních arteriol, tj. arterioly úrovní těsně před prekapilárami. Z každé metarterioly vychází několik kapilár o průměru pod 20  $\mu\text{m}$ , vzájemně propojených s ostatními v kapilární síť. Délka a uspořádání kapilár se podstatně liší v jednotlivých orgánech. Např. v kosterní svalovině jsou kapiláry o délce až 1 mm lineárně uspořádané podél svalových vláken (Obr. 1), v glomerulu vytvářejí kapilární síť o rozměru několika desítek mikrometrů apod. Příklady obrazů mikrocirkulace různých orgánů zobrazené SDF technikou (viz oddíl 3.4.) jsou na obrázcích 15-18. Kapiláry se dále spojují ve venuly a ty postupně ve velké vény. Venuly drénující krev z určité oblasti odcházejí podél arteriol přivádějících krev do stejné oblasti, což má funkční význam (viz oddíl 1.3.3). Venula bývá širší než sousední arteriola. Tvar nízkotlakých venul nebývá kruhový, mění se podle okolních tlaků. Stěna venul obsahuje tenkou vrstvu hladké svaloviny. Přesto, vzhledem k nízkému intraluminálnímu tlaku, tato svalovina umožňuje podstatnou konstrikci vény, což je podstatou kapacitních schopností vén (Guyton 2000). Cesta z arterioly

do venuly není jediná, nýbrž jde o mnoho možných a různě dlouhých cest kapilární sítě (Lipowsky 2005).



**Obr. 1 Preparát mikrocirkulace svalu.**

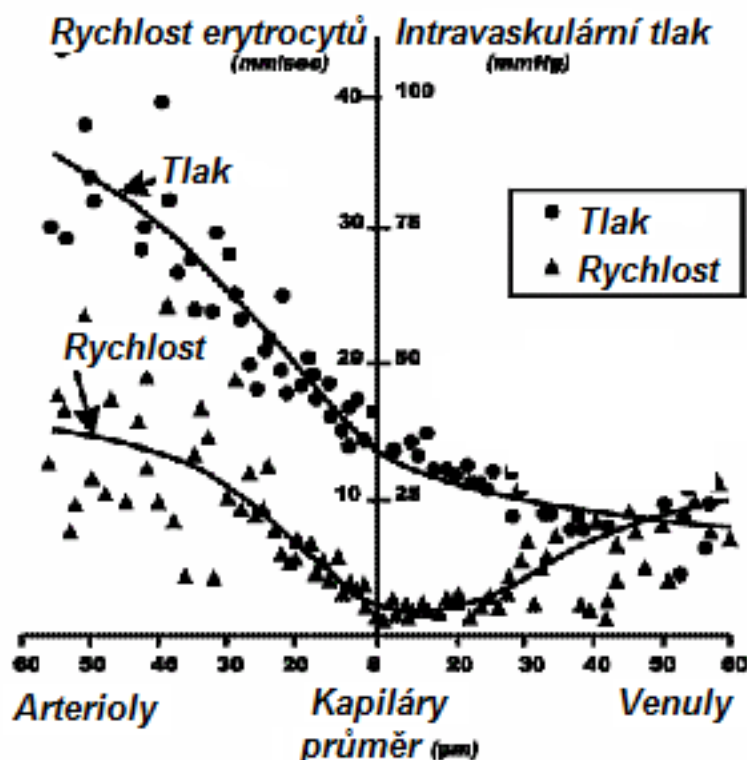
Konce šipek – 2 terminální arterioly, šipky – 2 odpovídající odvodné venuly. Úsečka = 250  $\mu$ m. Převzato z Segal 2005.

## 1.2. Reologie mikrocirkulace

Tok reálné tekutiny je omezován "vnitřním třením a třením s okolím", tj. vlastností označovanou jako viskozita (Westerhof 2005). Viskozita je materiálovou vlastností kapalin, závislou na teplotě. Pokud viskozita kapaliny nezávisí na rychlosti toku, přesněji na "aktuálním vnitřním třením" (*shear rate*), pak kapalinu označujeme jako newtonovskou (např. krevní plazma). Rozložení rychlostí toku newtonovské kapaliny v trubici má parabolický charakter a tok vyhovuje Poiseuilleově zákonu, zejména roste se 4. mocninou poloměru, resp. odpor toku klesá s  $r^4$ . Viskozita nenewtonovských kapalin se mění s rychlostí toku (resp. s *shear rate*), rozložení rychlostí nemá parabolický charakter a neplatí Poiseuilleův zákon. Příkladem jsou kapaliny obsahující korpuskulární částice, např. krev. Při rostoucí rychlosti toku se částice (erytrocyty), zvyšující tření vzájemným kontaktem mezi sebou a kontakty se stěnou trubice (cévy), koncentrují uprostřed toku a kapalina (krevní plazma) na okraji. Navíc se při rychlejším toku erytrocyty orientují ve směru toku. S rychlostí toku proto tzv. efektivní viskozita krve klesá. Při klesajícím perfuzním tlaku, např. v šokových stavech, tedy průtok krve klesá nelineárně, neboť odpor mikrocirkulace roste. Efekt odstředování plazmy k okraji (*skimming* efekt) se více projevuje u menších cév, proto efektivní viskozita klesá s klesajícím poloměrem cévy (Fareus-Lindquistův efekt) až po kriticky malý poloměr, kdy už se

„rozpadá“ uspořádání s erytrocyty uprostřed a efektivní viskozita opět roste (Lipowsky 2005). *Skimming* efekt způsobuje, že je hematokrit v mikrocévách nižší než hematokrit přitékající a odtékající krve, erytrocyty uprostřed totiž proudí rychleji než plazma na okraji. V důsledku *skimming* efektu též arterioly odstupující kolměji vedou preferenčně plazmu a erytrocyty při bifurkaci preferenčně proudí větví s vyšším průtokem. To vše přispívá k fyziologické heterogenitě tkáňové perfuze a snižuje dostupnost kyslíku. Za fyziologických okolností jsou tyto efekty bezvýznamné, heterogenita perfuze je však podstatným patogenetickým mechanismem např. u sepse (Walley 1999).

Ve velkých arteriích rychlost toku pulzuje a efekt viskozity na rozložení rychlostí je daleko převyšeno efekty setrvačnosti toku při změnách rychlosti (Lipowsky 2005). Rychlost toku v průřezu cévou se proto příliš nemění (chybí radiální gradient rychlostí), viskozitu lze zanedbat a krev lze považovat za newtonovskou kapalinu. Korpuskulární vlastnosti a *skimming* efekt se projevují až na úrovni malých arteriol. Bylo experimentálně ověřeno, že až po úroveň malých arteriol platí závislost na  $r^4$  (Lipowsky 1978). K cévní rezistenci cirkulace tedy dominantně přispívají arterioly (malý poloměr, řádově nižší počet než kapilár a řádově rychlejší tok), největší pokles tlaku nastává na jejich úrovni (Obr. 2).



Obr. 2 Distribuce intravaskulárních tlaků a rychlostí toku erytrocytů v cévním řečišti.

Převzato a upraveno z Lipowsky 2005.

Průtok krve kapilárami určují zcela jiné faktory. Průměr kapilár odpovídá velikosti erytrocytů a leukocytů, tok je však mnohem pomalejší než v arteriolách. Tok kapilárou má korpuskulární charakter, střídají se erytrocyty a mezery vyplněné plazmou (Golub 2005). Leukocyty preferenčně proudí širšími kapilárami. Stěna kapiláry je velmi tenká, zcela poddajná, proto minimální transmuralní tlak otevře kapiláru. Kapilára je tedy buď plně otevřená, nebo zcela kolabovaná. Otevření či uzavření kapiláry řídí prekapilární sfinkter, případně konstriktce či dilatace terminální arterioly. Toto střídavé otevření a uzavření kapiláry (a terminální arterioly) je označováno jako *vasomotion* (Guyton 2000). Tlakový gradient mezi začátkem a koncem kapiláry je spotřebován na deformaci erytrocytů a leukocytů při jejich prostupu kapilárou, přičemž konkrétní anatomická cesta erytrocytu kapilární sítí určuje potřebnou deformaci i rezistenci příslušné cesty (Lipowsky 2005). Rezistence kapilární sítě je tedy podmíněna snadností deformace erytrocytů a leukocytů i anatomickým uspořádáním kapilární sítě. Viskozita hraje podřadnou roli, Poiseuillův zákon neplatí. Celkově je rezistence kapilární sítě velmi nízká, poklesem tlaku je malý (Obr. 2). Dle matematického modelu se uzavření 30% kapilár prakticky neprojeví zvýšením rezistence (Hudetz 1993) a otevření mnoha kapilár s nárůstem funkční kapilární denzity na počátku svalové kontrakce není samo o sobě doprovázeno zvýšením celkového průtoku krve svalem (Honig 1982). Otevření dalších kapilár tedy poskytuje zvýšení výměnné plochy a snížení difúzní dráhy kyslíku k buňkám, nesnižuje však celkovou cévní rezistenci tkáně (Segal 2005). Podstatné snížení počtu perfundovaných kapilár za patologických okolností, např. adhezí leukocytů na stěnu kapiláry při zánětu, blokádu před kapilárou agregáty erytrocytů či poklesem deformability leukocytů při zánětu (Lipowsky 2005), však již celkový průtok krve tkání snižuje. Zejména však zvyšuje heterogenitu perfuze, kdy většina krve rychle proteče širokými krátkými kapilárami bez dostatečné výměny substrátů s tkáněmi (funkční zkratky).

Venuly jsou širší než arterioly, tok v nich je pomalejší, tlakový spád pozvolný, rezistence nevelká (Obr. 2). Adheze leukocytů na stěnu venul při zánětu však snižuje jejich efektivní průsvit a může podstatně zvýšit rezistenci (Lipowsky 2005). Venuly nemají kulový tvar, Poiseuillův zákon nelze dobře uplatnit. Zvýšení okolního tlaku, např. při svalové kontrakci, napomáhá vyprázdnění vén.

### **1.3. Regulace tkáňové perfuze**

Základním úkolem regulace mikrocirkulace je zajištění dostatečné perfuze tkáně, která musí odpovídat její metabolické aktivitě – tzv. *flow-metabolism coupling*. Zajištění konstantního průtoku při změnách perfuzního tlaku je označováno jako tlaková autoregulace,

její mechanismy jsou zčásti podobné (viz oddíl 1.4.). *Flow-metabolism coupling* je v současnosti vysvětlován především Metabolickou teorií. Dle této teorie stimuluje pokles tkáňové perfuze lokální produkci metabolitu, který pak difunduje k blízkým prekapilárním sfinkterům či menším arteriolám a vede k lokální vazodilataci se zpětnovazebným nárůstem perfuze. Byly navrženy i další teorie, které však nemají postačující experimentální podklady. Např. Teorie nedostatku kyslíku (Guyton 2005) předpokládá, že nedostatek kyslíku vede přímo k relaxaci hladké svaloviny cév a jejich dilataci. Neurogenní teorie pak předpokládá účast lokálních reflexů. Proti ní však mluví skutečnosti, že je lokální regulace zachována i při denervaci tkáně (Segal 2005) a že lokální anestetikum regulaci neovlivní (Johnson 1959, Selkurt 1958).

### 1.3.1. Detekce tkáňová perfuze

Co přesně je detektorem nedostatečné tkáňové perfuze, není zcela jasné. Přívod hypoxemické krve normálním průtokem rovněž způsobuje vazodilataci (Guyton 2000), což naznačuje důležitost deficitu kyslíku. Přímé působení kyslíku na arterioly však nebylo potvrzeno, arterioly o průměru větším než 15  $\mu\text{m}$  izolované od okolního parenchymu nereagují na změnu tenze kyslíku (Jackson 1987). Byly hledány nepřímé cesty působení deficitu kyslíku, tedy metabolity podmiňující dilataci arteriol, které jsou produkovány v důsledku nedostatku kyslíku, resp. nízké perfuze. Zvažovány byly adenosin, ionty  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ , laktát a jiné. Všechny vedou k dilataci arteriol, žádný z nich se však fyziologicky nevyskytuje v koncentracích postačujících k vyvolání vazodilatace.

V 90. letech byla studována i role erytrocytů jako senzoru tkáňové hypoperfuze, resp. hypoxie. V hypoxickém prostředí erytrocyty uvolňují ATP (vytvářené anaerobní glykolýzou) (Bergfeld 1992) a to lineárně úměrně desaturaci hemoglobinu (Jagger 2001). Mechanismem je zřejmě konformační změna hemoglobinu vázaného na membránu, která vede k otevření kanálů pro ATP (Ellsworth 2009). Uvolněné ATP se váže na purinergní receptory membrány endotelu, který secernuje faktory vyvolávající relaxaci okolní hladké svaloviny (oxid dusnatý a další), což vede k dilataci arteriol. Doba od uvolnění ATP z erytrocytu do dilatace arterioly představuje zhruba 500 ms (Ellsworth 2009). Maximální dilatace se projevuje při intraluminální koncentraci ATP  $10^{-6}$  M, což řádově odpovídá odhadované intraluminální koncentraci ATP v hypoxické mikrocirkulaci (Ellsworth 1995). Obdobný efekt má i adenosin (degradační produkt ATP), avšak při mnohem vyšší koncentraci (Forrester 1979). Uvolnění ATP je zpětnovazebně regulováno – ADP (degradační produkt ATP) (Wang 2005) i oxid dusný (Olearczyk 2004) tlumí uvolňování ATP z erytrocytů.

Alternativou k ATP-mechanismu je uvolňování oxidu dusnatého (NO) přímo z erytrocytů. Bylo prokázáno, že SH skupiny hemoglobinu váží NO, přičemž síla vazby roste s tenzí kyslíku (Jia 1996, Stamler 1997). Úměrně hypoxii prostředí se tedy může zvyšovat lokální uvolňování NO, který navodí vazodilataci (Segal 2005, Liu 2004). Nebylo však prokázáno retrográdní vedení vazodilatace (viz oddíl 1.3.3.) při přímém uvolňování NO, nicméně bylo prokázáno pro ATP (Ellsworth 2009).

Zdá se tedy, že erytrocyty působí nejen jako přenašeče kyslíku, nýbrž i jako senzory tkáňové hypoxie (tedy vztahu metabolické potřeby tkáně a průtoku) a regulátory tkáňové perfuze, zřejmě zejména mechanismem uvolňování ATP. Tento mechanismus má zřejmě i patofyziologický význam. Snížené uvolňování ATP z erytrocytů bylo dokumentováno např. u diabetu mellitu, přičemž uvolňování ATP klesá s hladinou glykovaného hemoglobinu (Sprague 2006).

### 1.3.2. Role endotelu

Klíčovou úlohu v regulaci tkáňové perfuze hraje endotel cévy. Nositel Nobelovy ceny Robert Furchgott demonstroval, že je pro dilatace izolované arterioly po aplikaci acetylcholinu nezbytná přítomnost endotelu (Furchgott 1980). Acetylcholin se váže na muskarinové receptory endotelu, který produkuje mediátory podmiňující vazodilataci. Prvním zjištěným mediátorem byl oxid dusnatý, později byly identifikovány i další, souhrnně označované EDRF (*endothelium-derived relaxation factors*) či EDHF (*endothelium-derived hyperpolarisation factors*) (Serban 2010). Mechanismus spočívá ve vazbě acetylcholinu na receptor endotelu, což stimuluje intracelulární enzym NO syntázu (NOS) katalyzující přeměnu argininu na citrulin, přičemž je uvolněn NO (Hibbs 1987, Palmer 1989, Rees 1989). Jiné intracelulární cesty vedou k uvolnění dalších EDRF. NO pak difunduje do okolních buněk hladkých svalů, kde se váže na guanylátcyklázu katalyzující tvorbu cGMP, což v důsledku vede k relaxaci svaloviny a dilataci cévy (Serban 2010). NO má i jiné účinky než snižování cévního tonu, například inhibuje agregaci trombocytů, inhibuje expresi adhezních molekul pro leukocyty (Radomski 1987) či snižuje produkci endotelinu-1. Byly popsány 3 izoformy NOS – neuronální, endotelová (souhrnně konstitutivní) a indukibilní (přítomná v leukocytech). I jiné faktory než acetylcholin stimulují endotel k produkci NO a EDRF – např. zvýšený *shear stress*, katecholaminy, produkty trombocytů a erytrocytů (ATP, ADP, serotonin), histamin, prostaglandiny, trombin a jiné (Vanhoutte 2009).



### 1.3.3. Retrográdní šíření vazodilace

Metabolická teorie vysvětluje působení na lokální úrovni, tj. dilataci či konstrikci prekapilárních sfinkterů či terminálních arteriol. Toto vede, jak bylo výše uvedeno, pouze k minimálnímu poklesu rezistence a minimálnímu nárůstu průtoku. Až 50% rezistence je přitom lokalizováno v arteriolách širších než 100  $\mu\text{m}$  (Smaje 1970, Meininger 1987). Pro účinné zvýšení perfuze tkáně je tedy nezbytná i dilatace větších přívodných arteriol a arterií (tzv. *upstream vasodilation*), které však již nejsou v dosahu difúze mediátoru či kyslíku z tkáně (Pohl 2000). Bylo popsáno několik mechanismů retrográdní vazodilatace - vedení signálu endotelem (tzv. *conducted vasodilation*), venulo-arteriální „feedback“ a průtokem podmíněná (*flow-dependent*) vazodilatace (Segal 2005).

Vedení endotelem spočívá v šíření elektrického vzruchu endotelem cestou gap junctions na vzdálenost několika milimetrů (Looft-Wilson 2004, Murrant 2004). V experimentu transektce a resutura arterie vazodilataci zabránila (Hilton 1959). Vedení endotelem bylo potvrzeno i po intraluminální aplikaci ATP (McCullough 1997). V proximálním místě cévy pak endotel uvolní vazodilatační substanci, příp. vzruch přechází myoendotelovými *gap junctions* na hladkou svalovinu.

Venulo-arteriální *feedback* vychází z těsného kontaktu arterioly a venuly téže oblasti tkáně. Tenze kyslíku ve venule prakticky odpovídá tenzi kyslíku v tkáni. Aplikace ATP i adenosinu do venuly vede k selektivní dilataci arteriol, které jsou v kontaktu s venulou (Collins 1998, Hester 1990). ATP, případně další substance, buď přímo difunduje k sousední arteriole, nebo je detekováno venulou, která produkuje dilatační substance. Tomu odpovídá experiment, kdy selektivní rozrušení endotelu venuly oslabilo dilataci arteriol po svalové kontrakci (Saito 1994). Možností je např. vazba ATP na endotel venuly s uvolněním oxidu dusnatého, který difunduje k arteriole. Kvantitativní význam venulo-arteriálního *feedbacku* je však nejasný, neboť paralelizmus arteriol a venul je velmi nerovnoměrný (Stingl 1996).

### 1.3.4. Role shear stressu

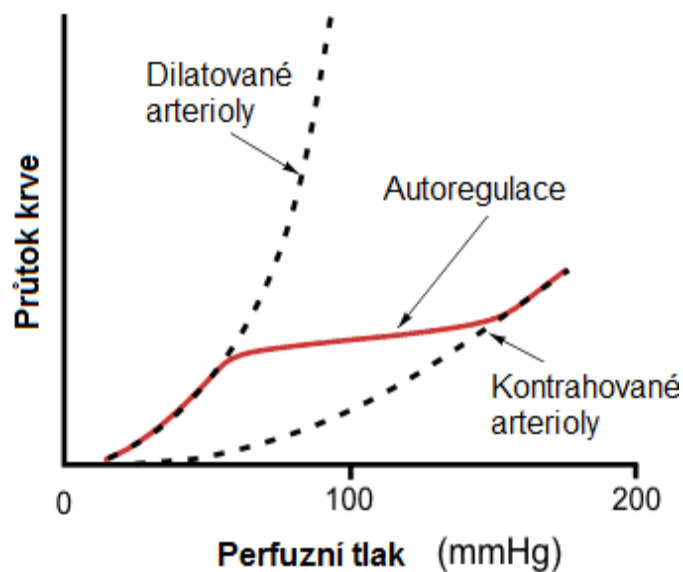
Vedení endotelem i venulo-arteriální feedback působí na vzdálenost několika milimetrů, zajistí proto nanejvýš dilataci menších arteriol. Při svalovém stahu však byla prokázána i dilatace větších arteriol a muskulárních arterií, a to i v případě denervace příslušné oblasti (Segal 2005). Vysvětlením je *flow-dependent* dilatace. Pokles distální cévní rezistence zvýší průtok přívodnou arterií, čímž vzroste tření o stěnu arterie (*shear-stress*) (Koller 1990). Zvýšené tření je vnímáno mechanoreceptory endotelu, který následně produkuje dilatační substance. V experimentu náhrada části plazmy činidlem s vysokou viskozitou

(vysokomolekulární dextran) vede k dilataci malých i velkých arteriol, ačkoli se průtok krve tkání nezměnil. Následná blokáda produkce oxidu dusnatého zcela eliminovala dilataci velkých arteriol (kde je tedy cesta přes NO dominantní mechanismus) a utlumila dilataci malých arteriol (de Wit 1997). *Shear stress* dependentní dilatace byla potvrzena i na izolovaných cévách (Melkumyants 1989).

Větší arterioly a arterie mají bohatou sympatickou inervaci, která navozuje vazokonstrikci. Během zvýšené metabolické aktivity (např. svalová práce) lokální vlivy podmiňují dilataci až po arterioly. Dilataci arterií omezuje zvýšení aktivity sympatiku, čímž zabraňuje poklesu systémového tlaku (Segal 2005).

#### **1.4. Tlaková autoregulace**

Kromě přizpůsobení tkáňové perfuze lokálnímu metabolismu zajišťuje tkáň také udržení konstantního průtoku při změnách perfuzního tlaku – mechanismus označovaný jako tlaková autoregulace (Paulson 1990) (Obr. 3). Od 60. let 20. století existují dvě stěžejní teorie autoregulace – Metabolická teorie (v podstatě identická s *flow-dependent coupling*) a Myogenní teorie. V tlakové autoregulaci se uplatňují oba mechanismy, ale s odlišným zastoupením v různých orgánech. V ledvinách se na autoregulaci podílí ještě další mechanismus, tzv. tubuloglomerulární feedback, který změnou tonu eferentní arterioly zajišťuje udržení konstantního intraglomerulárního filtračního tlaku. Při dlouhodobém zvýšení arteriálního tlaku dochází k morfologickým změnám arteriol (hypertrofie nebo atrofie stěny) a dlouhodobá "autoregulace" se tak stává účinnější (Folkow 1970).



**Obr. 3 Tlaková autoregulace.**

Zobrazeny křivky závislosti průtoku krve tkáně na perfúzní tlaku pro zcela dilatované a zcela kontrahované arterioly. Konstantní průtok je při rostoucím perfúzním tlaku zajištěn kontrakcí arteriol.

#### 1.4.1. Metabolická teorie

Podle Metabolické teorie pokles perfuzního tlaku sníží perfuzi tkáně, což vyvolá tkáňovou hypoxii vedoucí k produkci dilatačních faktorů s dilatací arteriol, čímž se obnoví (udrží) perfuze tkáně. Nárůst perfuzního tlaku naopak sníží koncentraci dilatačních faktorů. Pro metabolický mechanismus svědčí např. skutečnost, že ponoření tkáně do roztoku obohaceného kyslíkem zcela utlumilo dilataci arteriol při poklesu perfuzního tlaku (Kontos 1978). V jiném experimentu (a jiné tkáni) však ponoření do roztoku obohaceného kyslíkem autoregulaci pouze oslabilo, nikoli eliminovalo (Morff 1982), což naznačuje účast ještě dalšího mechanismu (např. myogenního). Pro metabolickou teorii svědčí i řada jiných experimentů (Johnson 1986).

Autoregulace, zejména v některých orgánech, např. v mozku, působí velmi účinně, v rozmezí středního arteriálního tlaku cca 60-130 mm Hg prakticky není měřitelná změna průtoku krve tkáně (Mosher 1964, Strandgaard 1974). Toto je nedostatkem metabolické teorie. Není totiž zcela jasné, jak dojde ke tkáňové hypoxii posléze dilatující cévy, je-li průtok tkáně prakticky konstantní. Možností je mimořádná citlivost detektorů hypoperfuze, kdy i experimentálně neměřitelný pokles perfuze je tkáně detegován. Jiné vysvětlení je následující.

Je prokázáno, že ztráty kyslíku z krve nenastávají teprve na úrovni kapilár, nýbrž až 2/3 ztráty kyslíku mezi arterií a venou nastávají před kapilárami, na úrovni arteriol (Duling 1970). Menší část kyslíku spotřebuje stěna arteriol, ostatní difunduje do sousedních venul a kapilár

s nižší tenzí kyslíku. Funkčně se tak vytváří prekapilární zkrat. Bylo navrženo, že dilatace přívodné arterioly při poklesu perfuzního tlaku vede (při konstantním průtoku) ke zpomalení rychlosti toku arteriolou, což poskytuje více času pro difúzi kyslíku z arterioly. Kyslík se navíc preferenčně více ztrácí z erytrocytů při stěně arterioly než uprostřed toku. Při bifurkaci pak tyto erytrocyty tečou do cév s nižším průtokem (viz oddíl 1.2.). Při zpomalení rychlosti toku se tak zvyšuje heterogenita tkáňové perfuze. Oba mechanismy se snaží vysvětlit (a zpochybnit tak slabinu Metabolické teorie), že i při nezměněném celkovém průtoku krve tkání může při poklesu perfuzního tlaku docházet k ložiskové hypoxii, která pak stimuluje dilataci přívodných arteriol (Johnson 1986).

#### 1.4.2. Myogenní teorie

Jak bylo uvedeno, v některých tkáních ponoření do roztoku obohaceného kyslíkem nevede k úplné eliminaci autoregulace (Morff 1982). Dále, současné zvýšení venozního i arteriálního tlaku nezmění průtok krve tkání, ale vede ke konstrikcí arteriol (Bouskela 1979). Konečně i arterioly ve tkáni s nulovým průtokem reagují konstrikcí na zvýšení tlaku (Baez 1968). To vše svědčí pro myogenní složku autoregulace, odehrávající se přímo v cévě, bez účasti metabolických faktorů a endotelu (Johnson 1986). Mechanismem je zřejmě aktivace kontrakce hladkých svalů přes iontové kanály citlivé na tenzi ve stěně cévy (*stretch-sensitive channels*). Bylo zjištěno, že zvýšení intraluminálního tlaku v izolované arteriole vede k depolarizaci membrány buněk hladké svaloviny, cca o 1,45 mV/10 mmHg (Harder 1984). Není zcela jasné, který parametr je myogenním mechanismem regulován. Zvažováno je napětí ve stěně cévy. Dle Laplaceova zákona ( $T=P.r$ , kde T je napětí ve stěně, P je transmurní tlak a r je poloměr cévy) může při zvýšení transmurního tlaku a snížení poloměru cévy zůstat napětí ve stěně konstantní. V některých studiích skutečně vycházelo dopočtené napětí ve stěně konstantní (Bouskela 1979), v jiných nikoli.

Problémem myogenní (ale i metabolické) tlakové autoregulace je možnost pozitivní zpětné vazby. Např. skokové zvýšení srdečního výdeje zvýší arteriální tlak. Myogenním (i metabolickým) mechanismem reagují arterioly konstrikcí, která však při nezměněném srdečním výdeji vede k dalšímu nárůstu arteriálního tlaku. Ten opět posílí konstrikcí, resp. zvýší rezistenci, čímž se rozvíjí bludný kruh. Tato pozitivní zpětná vazba by vedla ke zhroucení oběhu z hypertenze, případně by byl další nárůst tlaku zastaven baroreceptory. Pro rozvoj pozitivní zpětné vazby je nezbytné dostatečně vysoké zesílení zpětné vazby (tzv. *feedback gain*). Při normálním zesílení dojde jen k mírnému dodatečnému nárůstu tlaku (Guyton 2000). Bylo např. prokázáno, že část nárůstu tlaku po podání vazopresorů je

myogenního původu (Meininger 1988, Metting 1989). Konečně zesílení autoregulace není stejné u všech orgánů. Bylo potvrzeno v mnoha tkáních (mozek, myokard, ledviny, sval, mezenterium, střevní klky, kůže aj.), ale zejména intenzivní je autoregulace v mozku, myokardu a ledvinách (Johnson 1986). Průměrné celotělové zesílení autoregulace však nestačí k navození výraznější pozitivní zpětné vazby. Konečně inervace sympatikem je oslabena u vitálních orgánů. Aktivace sympatiku při hypotenzi tedy zabrání myogenní vazodilataci v „nevitálních“ orgánech (sval, kůže, střevo) a vede k centralizaci oběhu.

#### 1.4.3. Rozdíly mezi malými a velkými arterioly

Existují podstatné rozdíly mezi menšími a většími arterioly, v rámci orgánu i mezi orgány.

In vitro (při nulovém průtoku) vykazují velké i malé arterioly stejnou myogenní odpověď (Kuo 1988, Sun 1994). In vivo však velké arterioly myogenní odpověď nevykazují (de Wit 1998). Mechanismus zřejmě spočívá ve větším *shear stressu* ve velkých arteriolách, který podmiňuje uvolnění NO a dalších EDRF a tím brání myogennímu mechanismu (Pohl 2000). Konstrikce arterioly při zvýšení transmuralního tlaku zvýší shear stress (vyšší rychlost toku při nezměněném průtoku), což ihned vede k dilataci. Po zablokování tvorby NO (inhibitory NO syntázy) reagují malé i velké arterioly na zvýšení tlaku stejně, tj. i u velkých arterioly dochází ke konstrikci (de Wit 1998). Větší arterioly nejsou pod metabolickou kontrolou, vzhledem ke značné difúzní dráze od tkáně nebo přilehlé větší venuly. Větší arterioly jsou dále více inervovány sympatikem (Pohl 2000). Malé a velké arterioly však reagují koordinovaně se stejným cílem – zajištění konstantní perfuze.

#### 1.4.4. Hypotéza tkáňového a kapilárního tlaku

Pro tlak na úrovni kapilár přibližně platí  $P_c = P_v + F \cdot R_v$ , kde  $P_v$  je tlak v žilách,  $F$  průtok a  $R_v$  odpor toku žilního systému. Je vidět, že kapilární tlak nezávisí na arteriálním tlaku, což bylo i experimentálně potvrzeno (Jarhult 1974, Johnson 1962). Závisí však na průtoku krve tkání. Je-li tedy regulována tkáňová perfuze, je regulován i intrakapilární tlak. Konstantní intrakapilární tlak zajišťuje konstantní transkapilární filtraci a tedy i konstantní tkáňový tlak. Alternativní hypotézy uvažují, že cílem autoregulace není udržení konstantního průtoku, nýbrž konstantního kapilárního či tkáňového tlaku.

Za patologických okolností byla popsána tzv. pseudoautoregulace (falešná autoregulace). Při poranění mozku bylo pozorováno zachování autoregulace v místech závažnějšího poranění, avšak autoregulace nebyla patrna v místech méně závažně poraněných (Enevoldsen

1977, Enevoldsen 1978). Poranění mozku vede k poruše autoregulačních mechanismů. V závažně poraněných oblastech je porušena i hematoencefalická bariéra. Zvýšení arteriálního tlaku v těchto místech zvyšuje kapilární únik a zvyšuje tak okolní tkáňový tlak. Zvýšený tkáňový tlak vede k poklesu lokálního perfuzního tlaku a k poklesu perfuze. Systém tedy pouze zdánlivě reguluje vlastní průtok. Dekomprese příslušné oblasti však pseudoautoregulaci eliminuje i v závažně poraněných oblastech (Johnson 1986).

## 2. Mikrocirkulace u kriticky nemocných

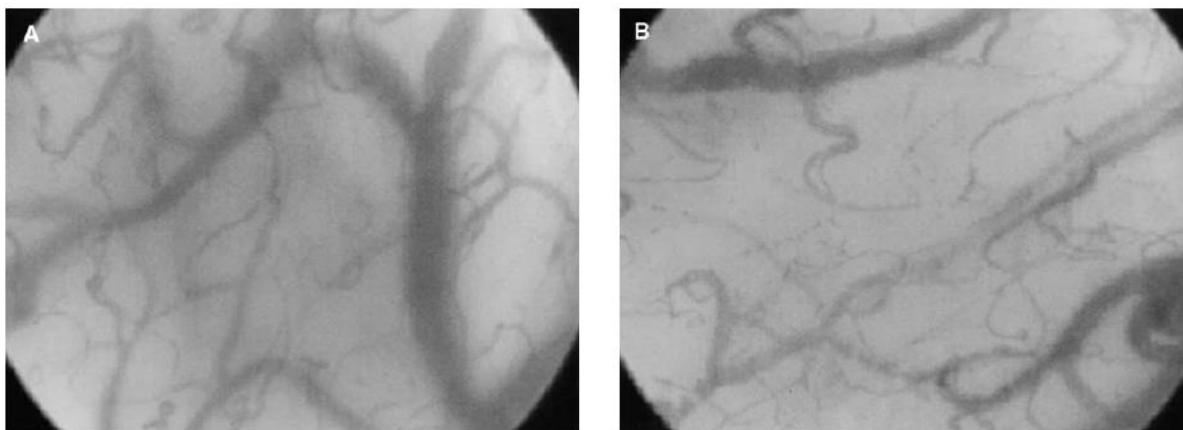
Pacienti v „kritickém stavu“ představují nemalou část pacientů jednotek intenzivní péče. Kritický stav (*critical illness*) není pouze synonymem pro „závažný stav“, ale má charakteristické klinické a laboratorní atributy (např. zvýšený laktát, hypotenze, dysfunkce řady orgánů apod.) a podobnou patogenezi. Od 70. let 20. století jsou mechanismy šokových stavů rozdělovány do 4 skupin – mechanismus hypovolemický, obstrukční, kardiogenní a distribuční (Weil 1971). V konkrétních případech šoku (kardiogenního, septického, popáleninového, traumatického apod.) se tyto mechanismy kombinují. Schematicky je hypovolemický, obstrukční a kardiogenní mechanismus charakterizován primárně sníženým srdečním výdejem se sníženou dodávkou kyslíku a sekundární alterací mikrocirkulace. V případě distribučního mechanismu je srdeční výdej (resp. dodávka kyslíku) normální či zvýšený, ale alterace tkáňových mechanismů (např. alterace mikrocirkulace či mitochondriální dysfunkce) vedou k poruše utilizace kyslíku.

Zřejmě nejsložitějším a nejvíce studovaným případem kritického stavu je seps. Jde o extrémně komplexní problém. Existují desetitisíce prací o sepsi (v současnosti téměř 120000 odkazů na výraz „*sepsis*“ v databázi PUBMED) s rozpornými a nejednoznačnými výsledky, mimo jiné v důsledku heterogenity sepse. Studie byly provedeny za nestejných podmínek – různá stádia sepse, odlišná intenzita, léčba, etiologie, dále se uplatňují mezidruhové rozdíly, rozdílné genetické pozadí jedinců, metodické a technické aspekty studií apod. Interpretace takto heterogenní a objemné skupiny studií je mimořádně problematická a současné chápání sepse je značně omezené.

### 2.1. Alterace mikrocirkulace u sepse

De Backer (De Backer 2002) podrobně popsal alteraci mikrocirkulace u septických pacientů a porovnal ji s ostatními pacienty v intenzivní péči i se zdravými jedinci (Obr. 4). Typickým nálezem byla snížená hustota malých cév, zvýšené procento malých cév s vymizelým či intermitentním průtokem na úkor cév s normálním průtokem (snížená funkční kapilární denzita) a neměnné procento malých cév se zrychleným průtokem. Alterace mikrocirkulace je popisována i v mnoha dalších studiích (např. Ellis 2002). Konkrétní podoba mikrocirkulace současně závisí na stupni objemové resuscitace, srdečním výdeji, intenzitě sepse apod. Díky snížené hustotě malých cév je do určité oblasti tkáně přiváděno méně kyslíku a difúze kyslíku z okolí je omezena větší vzdáleností. Rozložení hustoty cév ve tkáni je navíc heterogenní, deficit kyslíku se tedy týká pouze okrsků tkáně. Konečně procento

perfundovaných malých cév bylo vyšší u přeživších nemocných než u zemřelých, což naznačuje patogenetický význam poruch mikrocirkulace.



**Obr. 4** Sublinguální mikrocirkulace v OPS zobrazení A) u zdravého člověka a B) u pacienta se sepsí.

Převzato z De Backer 2002.

De Backer (De Backer 2002) současně ukázal, že lokální aplikace acetylcholinu (beze změny parametrů makrocirkulace) vede k téměř úplné normalizaci obrazu mikrocirkulace (Tab. 1), což dokazuje, že změny morfologie mikrocirkulace jsou dominantně funkčního původu. I v jiných studiích nebyl prokázán podstatný příspěvek mikrotrombů k „morfologické obstrukci“ mikrocirkulace (Croner 2006).

	Pacienti se sepsí (n=11)		Dobrovolníci (n=10)
	Baseline	Acetylcholin (0,01 M)	
Celkový počet cév, 1/mm	4,9	6	5,4
Procento perfundovaných cév, %	83	99	98
Procento perfundovaných venul, %	100	100	100
Procento perfundovaných kapilár, %	44	94	94
Nepřítomný tok (kapiláry), %	29	1	3
Intermitentní tok (kapiláry), %	24	8	5

**Tab. 1** Efekt lokální aplikace acetylcholinu na mikrocirkulaci při sepsi.

Převzato z De Backer 2002.

Byla popsána řada mechanismů podmiňujících heterogenitu tkáňové perfuze a zástavu průtoku některými kapilárami (Ellis 2005, De Backer 2009) – funkční alterace (vazodilatace, vazokonstrikce, abnormální reakce prekapilárních sfinkterů, porucha vedení signálu endotelem (Tymel 2001), intersticiální edém komprimující mikrocirkulaci, porušený glykokalyx endotelu (normálně vykazující antiagregační efekt), adheze a rolování leukocytů,

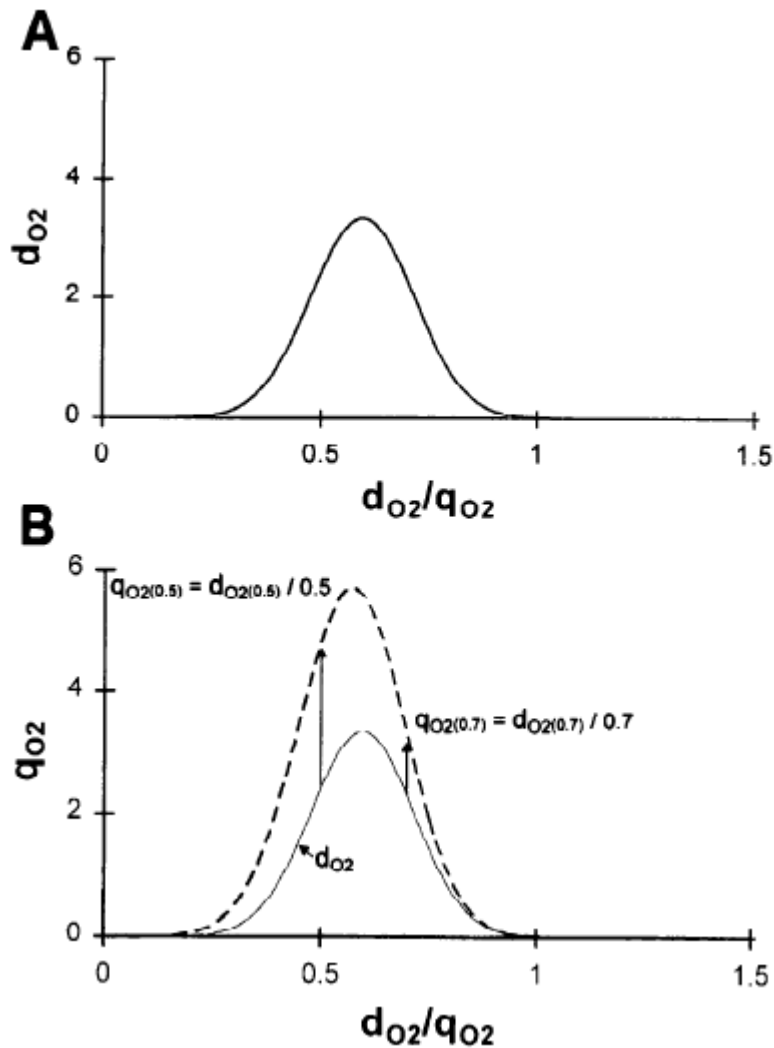


adheze destiček, zhoršení deformability erytrocytů i leukocytů, tvorba shluků erytrocytů, mikrotromby, porušení *skimming* efektu při snížení průtoku (viz oddíl 1.2) a jiné.

## 2.2. Heterogenita perfuze mikrocirkulace

Důsledky heterogenity mikrocirkulace teoreticky rozpracoval Walley (Walley 1999) jako analogii s ventilačně-perfuzními vztahy plic. Rozdělil tkáň na pomyslné malé oblasti. Každá oblast má určitý požadavek na kyslík, úměrný jejímu metabolismu, a určitou dodávku kyslíku, úměrnou perfuzi příslušné oblasti a oxygenaci přiváděné krve. Pro každou oblast je možno určit poměr potřeby (D) a dodávky (Q) kyslíku (D/Q) a histogramem popsat relativní zastoupení oblastí s příslušným D/Q poměrem, případně místo četnosti uvádět celkovou potřebu kyslíku či celkovou dodávku kyslíku do oblastí s příslušným D/Q poměrem (Obr. 5). Budou-li oblasti dostatečně malé, pak bude rozložení D/Q poměrů přibližně Gaussovo. V homogenní mikrocirkulaci má většina oblastí D/Q poměr blízký průměru (rozptyl je malý), s heterogenitou mikrocirkulace se rozložení rozšiřuje.

Předpokládejme dále, že je oblast tkáně schopna využít veškerý jí přivedený kyslík. Pokud bude dodávka kyslíku větší než potřeba ( $D/Q < 1$ ), pak je spotřeba kyslíku (V) rovna potřebě ( $V=D$ ) a oblast metabolizuje pouze aerobně. Pokud bude dodávka kyslíku nižší než potřeba ( $D/Q > 1$ ), pak je spotřeba kyslíku rovna dodávce ( $V=Q$ ) a oblast metabolizuje zčásti anaerobně. Oblasti s velmi nízkým D/Q působí jako funkční zkratky (*shunts*).

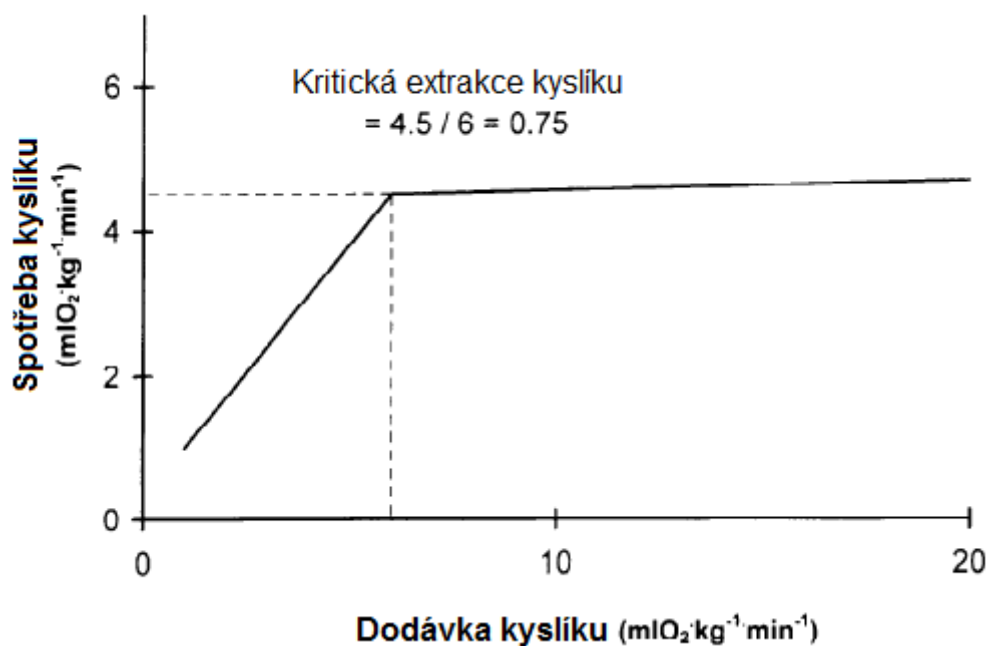


**Obr. 5** Histogram A - potřeby ( $d_{O_2}$ ) a B - dodávky ( $q_{O_2}$ ) kyslíku vůči poměru potřeba/dodávka.

Plocha pod křivkou představuje celkovou potřebu a celkovou dodávku kyslíku. Převzato a upraveno z Walley 1999.

I v případě naprosto homogenní mikrocirkulace, kde je navíc možná úplná utilizace přiváděného kyslíku, dojdeme při postupném snižování celkové dodávky kyslíku k okamžiku, kdy celková dodávka bude nižší než celková potřeba, a celková spotřeba se tedy začne rovnat celkové dodávce – spotřeba se stane závislou na dodávce (Obr. 6). Poměr celková spotřeba kyslíku tkání/celková dodávka kyslíku do tkáně je označován jako extrakce kyslíku ( $O_2ER$ ). Nejvyšší možná  $O_2ER$  je tzv. kritická extrakce, tj. extrakce v oblasti závislé na dodávce. V hypotetickém případě homogenní mikrocirkulace se 100% utilizací kyslíku a nulovými prekapilárními ztrátami je  $O_2ER_{krit}=1$ . Za fyziologické situace se  $O_2ER_{krit}$  pohybuje okolo 0,75. Důvodem je jednak heterogenita mikrocirkulace, jednak přestup kyslíku z arteriol do sousedních venul (čímž kyslík obejde kapiláry) (Sharan 1988), jednak difúzní limitace,

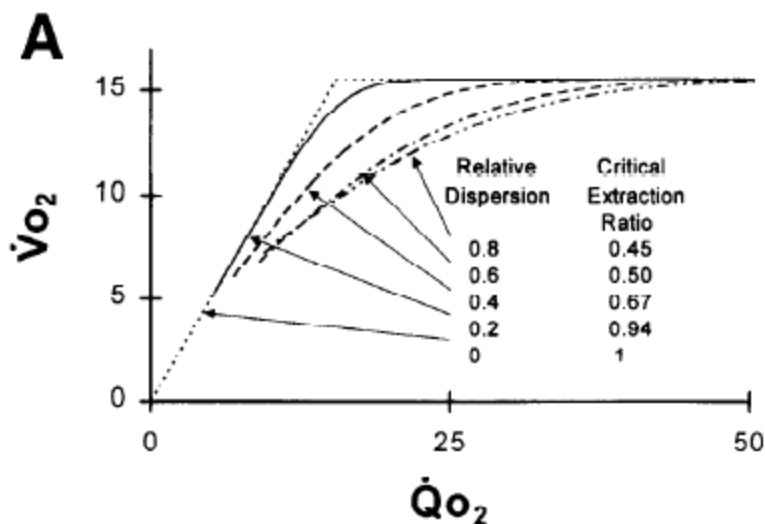
v důsledku které není ani maximální extrakce z kapiláry 100% (Drazenovic 1992). Existence anatomických arteriovenózních zkratů nebyla uspokojivě prokázána.



**Obr. 6** Schéma závislosti spotřeby kyslíku na dodávce kyslíku.

Po dosažení kritické extrakce kyslíku je spotřeba závislá na dodávce.  
Převzato a upraveno z Walley 1999.

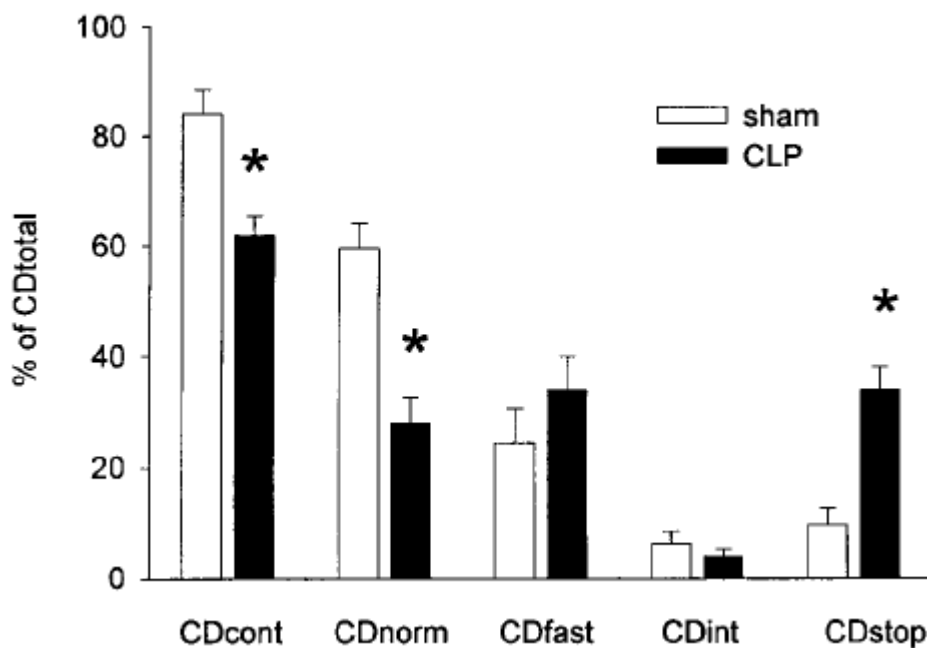
Pro každou známou celkovou dodávku kyslíku a známé rozložení D/Q poměrů je možné určit celkovou spotřebu. Pro různé hodnoty dodávky je možné získat závislost mezi spotřebou a dodávkou (Obr. 7). Při rostoucí heterogenitě perfuze mikrocirkulace se postupně ztrácí ostrá hranice mezi oblastí nezávislou a závislou na dodávce kyslíku a snižuje se maximální extrakce kyslíku ( $O_2ER_{krit}$ ) – závislost spotřeby na dodávce je méně strmá. Nedostatkem Walleyova modelu je uvažování hranic mezi pomyslnými oblastmi tkáně. Tímto je nadhodnocen vliv funkčních zkratů. Pokud bychom hranice neuvažovali, pak by kapiláry s rychlým průtokem mohly kyslíkem zásobit i vzdálenější oblasti, přičemž by toto zásobení bylo limitováno pouze difúzí. Takové kapiláry by pak nevytvářely (tak významné) funkční zkratky.



**Obr. 7** Závislost spotřeby kyslíku ( $V_{O_2}$ ) na dodávce kyslíku ( $Q_{O_2}$ ) dle matematického modelu.

S rostoucí heterogenitou mikrocirkulace roste relativní disperze, klesá kritická extrakce kyslíku a křivka závislosti se oplošťuje. Převzato z Walley 1999.

Mimořádně precizní studii publikoval Ellis (Ellis 2002). Ve svalu septických potkanů sledoval pomocí intravitální mikroskopie jednak celkovou kapilární denzitu, jednak podíl kapilár s normálním (rychlost toku erytrocytů 20 – 325  $\mu\text{m/s}$ ), rychlým, intermitentním a nulovým průtokem, dále rychlost toku erytrocytů kapilárami (tedy průtok jednotlivými kapilárami) a konečně saturaci hemoglobinu kyslíkem na začátku a na konci kapiláry a jeho kapilární extrakci. Zjistil, že při sepsi se tok v některých kapilárách s původně normálním tokem zastavil, ale podíl kapilár s rychlým tokem se nezměnil (Obr. 8). V kapilárách s normálním tokem klesla saturace a vzrostla extrakce kyslíku. Průměrná rychlost toku v kapilárách s normálním tokem se přitom nezměnila. V septické skupině prokázal negativní korelaci mezi saturací na venózním konci (resp. extrakcí kyslíku) kapilár s normálním tokem a počtem kapilár s nulovým průtokem. Pokles hustoty kapilár s normálním tokem byl tedy kompenzován nárůstem kyslíkové extrakce. Saturace venózní krve je směsí saturace z kapilár s normálním tokem i rychlým tokem (a nízkou extrakcí kyslíku), může tedy být abnormálně vysoká. Alternativní teorií vysvětlující vysokou venózní saturaci je neschopnost tkáně využít kyslík, např. díky mitochondriální dysfunkci. Ellis však dokázal, že schopnost tkáně využít kyslík je v časně fázi sepse zachována, neboť v kapilárách s normálním tokem dochází ke zvýšení extrakce kyslíku při snížení jeho dodávky.



**Obr. 8** Změna rozložení perfuze kapilár při sepsi.

CDtotal – celková kapilární hustota, CDcont – hustota kapilár s kontinuálním průtokem, CDnorm - hustota kapilár s normálním průtokem, CDfast - hustota kapilár s rychlým průtokem, CDint - hustota kapilár s intermitentním průtokem, CDstop - hustota kapilár s nulovým průtokem. CLP – septická skupina, sham – kontrolní skupina. Převzato z Ellis 2002.

Data z Ellisovy studie byla použita v podrobném matematickém modelu septické mikrocirkulace (Goodman 2006). Model ukázal, že i kapiláry s rychlým průtokem se dobře uplatňují při výměně kyslíku a nelze je tedy automaticky považovat za funkční zkratky. Difúzní vzdálenosti byly i přes snížení počtu normálních kapilár postačující pro úplné zásobení tkáně kyslíkem. Při modelování snížení celkové dodávky kyslíku (snížení srdečního výdeje či nízká arteriální saturace) však již některé oblasti hypoxické byly. Konkrétní situace septické tkáně je tedy závislá na stupni poruchy mikrocirkulace i na dodávce kyslíku.

### 2.3. Problém dodávky kyslíku

Výše uvedené úvahy naznačují, že zvýšení dodávky kyslíku “překoná” alteraci mikrocirkulace a zajistí dostatečnou oxygenaci tkáně. Patologická závislost spotřeby na dodávce kyslíku byla prokázána u části septických pacientů, zejména s vysokým laktátem a s výrazným snížením srdečního výdeje (Vincent 2004). Cílení léčby na supranormální dodávku kyslíku (nad 600 ml/min.m<sup>2</sup>) skutečně vedlo k podstatnému snížení mortality u kriticky nemocných pooperačních pacientů (Shoemaker 1982), avšak nikoli u smíšené skupiny všech kriticky nemocných (Gattinoni 1995, Hayes 1994). Důvodem je zřejmě skutečnost, že se část

kriticky nemocných skutečně nachází v oblasti závislosti na dodávce. Tito nemocní z cílení na supranormální dodávku kyslíku profitují. U ostatních však převažují nežádoucí účinky nepotřebné léčby, což v součtu anuluje či dokonce převyšuje efekt u první skupiny. V jiné klinické studii bylo dosaženo snížení mortality při časně hemodynamické léčbě (tekutiny, inotropika) se snahou o dosažení jisté centrální žilní saturace (Rivers 2001). Při nepřilíš velké alteraci mikrocirkulace (jako např. ve studii Ellise 2002), která ještě tkáním umožňuje extrahovat dostatek kyslíku, může vést nízký srdeční výdej k nízké centrální žilní saturaci a zvýšení žilní saturace při léčbě je důsledkem žádoucího zvýšení srdečního výdeje. Bude-li však alterace mikrocirkulace značná (či bude-li přítomna mitochondriální dysfunkce), budou se více projevovat funkční zkratky, centrální žilní saturace bude neadekvátně vysoká a nebude jí možné použít jako cíl léčby.

#### **2.4. Vztah mikrocirkulace ke koagulaci**

Zánětlivá aktivace endotelu vede současně k prokoagulační aktivaci endotelu. Dochází např. k expresi tkáňového faktoru, snížení exprese trombomodulinu i TFPI či degradaci glykokalyxu (obsahujícího heparin-like molekuly) (Ait-Oufella 2010). Laboratorní známky aktivace koagulace jsou obvyklou součástí sepse, přičemž existuje vztah mezi intenzitou zánětu, klinickou závažností stavu a aktivací koagulace (Huisse 2008). In vitro byla prokázána zvýšená adheze leukocytů k endotelu v prostředí septické plazmy oproti normální plazmě. Tato adheze leukocytů byla dále zvýšena obohacením plazmy o trombocyty (Krschenbaum 2004). Vzhledem k představě o tvorbě mikrotrombů při aktivaci koagulace byl studován efekt některých antikoagulancií při sepsi. Septiční pacienti s nízkou plazmatickou hladinou proteinu C mají vyšší mortalitu (Shorr 2008). V experimentu aktivovaný protein C (aPC) zlepšil mikrocirkulaci mnoha orgánů (Gierer 2007). U pacientů s těžkou sepsí podávání aPC (drotrecogin alfa) snížilo mortalitu z 30% na 24% (PROWESS study, Bernard 2001). U septických pacientů aPC mírně zvýšil procento perfundovaných kapilár oproti septickým pacientům neléčeným aPC (De Backer 2006). Mechanismem působení může být např. snížení adheze leukocytů k endotelu (De Backer 2009). Podobně pro antitrombin bylo prokázáno snížení adheze a rolování leukocytů (Neviere 2001). Po modifikaci antitrombinu, která znemožňuje jeho vazbu na endotel, ale zachovává jeho antikoagulační vlastnosti, ke snížení adheze nedošlo. Některá antikoagulancia tedy zlepšují alteraci mikrocirkulace, ale mechanismus je zřejmě odlišný od vlastního antikoagulačního působení (De Backer 2009). To koresponduje i s nízkým záchytem mikrotrombů v septické mikrocirkulaci (Croner 2006).

## 2.5. Úloha oxidu dusnatého v patogenezi sepse

Oxid dusnatý (NO) je všudypřítomný a má četné funkce (viz oddíl 1.3). V sepsi je jeho produkce zvýšena a společně se podílí na poruše regulace perfuze, vazodilataci a hypotenzi (Hollenberg 2008). Přesná role NO v sepsi však prozatím není dobře vyjasněna. Neselektivní inhibice NO syntázy (resp. NO syntáz) v klinické studii zmírnila hypotenzi, avšak nevedla ke snížení mortality (Lopez 2004). Neselektivní inhibice NOS dále zvyšuje adhezi leukocytů (Sundrani 2000). Myši se selektivně sníženou expresí nNOS vykázaly vyšší mortalitu a horší eliminaci bakterií, podobně jako myši se selektivní blokadou nNOS (Cui 2007). Naproti tomu byly myši s nadměrnou expresí eNOS chráněny před myokardiální dysfunkcí při sepsi (Ichinose 2007). Lokální aplikace acetylcholinu, jehož efekt je zprostředkován přes NO, vede prakticky k normalizaci septické mikrocirkulace (De Backer 2002). Podobně nitroglycerin zlepšil mikrocirkulaci u sepse (Spronk 2002) a kardiogenního šoku (den Uil 2009), bez vlivu na systémovou hemodynamiku. V jiné studii (Boerma 2010), kritizované pro velmi nízkou intenzitu sepse s minimální alterací mikrocirkulace, však nitroglycerin mikrocirkulaci neovlivnil. To vše naznačuje možné protektivní působení NO, přesněji konstitutivních NOS (nNOS a eNOS). Naproti tomu selektivní inhibice iNOS vedla k mírnému zlepšení septické mikrocirkulace (Hollenberg 2007) a selektivní inhibice iNOS spolu se zametači (*scavengers*) kyslíkových radikálů v klinicky relevantním modelu sepse vedla ke zlepšení makrocirkulačních i mikrocirkulačních paramerů (Matějovič 2007).

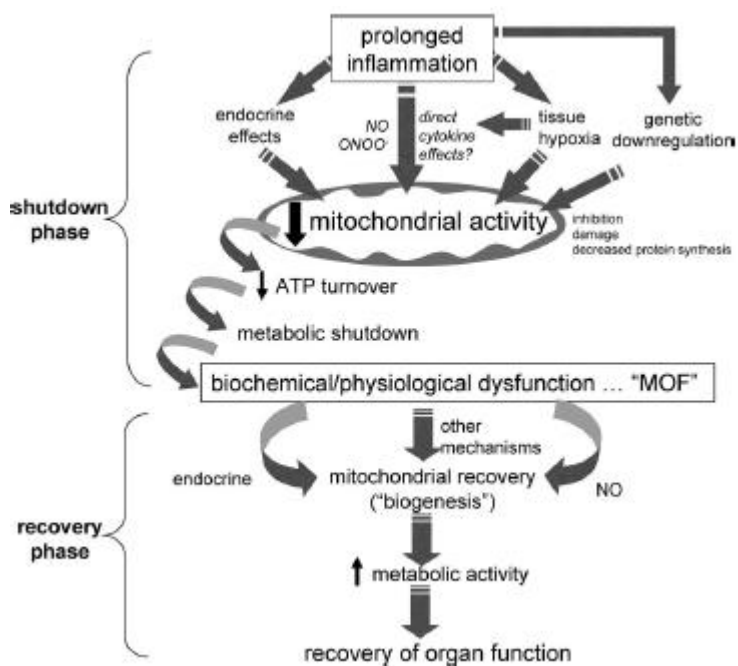
## 2.6. Multiorgánové selhání jako adaptivní odpověď

Několik poznatků neodpovídá představě, že dysfunkce mikrocirkulace vede k tkáňové hypoxii, nekróze a dysfunkci mnoha orgánů. V časných posmrtných biopsiích mnoha orgánů u pacientů zemřelých v důsledku sepse byly nalezeny jen minimální známky nekrózy či apoptózy (Hotchkiss 1999). Většina funkcí se u přeživších nemocných upraví ad integrum (Singer 2008). Některé práce prokázaly zvýšenou tkáňovou tenzi kyslíku při sepsi (v pozdějších stádiích) (Winter 2007), což odpovídá nižší utilizaci kyslíku tkáněmi, kontrastuje však s absencí nekrot. Vysvětlením může být snížení metabolismu tkání, kdy je i při snížené spotřebě kyslíku zachována integrita buňky. Snížená utilizace kyslíku vedla ke studiu mitochondrií. Bylo prokázáno snížení exprese genů pro mitochondriální proteiny dýchacího řetězce v sepsi (Calvano 2005). Nižší hladina trijodtyroninu a kortizolu při sepsi zvyšuje efektivitu utilizace kyslíku v mitochondriích (Stark 2007).

Vzhledem k programovanému snížení exprese mitochondriálních proteinů, hormonálním adaptacím, absencím nekrot a představě, že evoluce „měla dostatek času a příležitostí“ pro

rozvoj strategie boje s těžkou infekcí, byla navržena teorie, že rozvoj multiorgánové dysfunkce není dysregulovaný patologický proces, nýbrž adaptivní mechanismus, umožňující přežití v situaci nedostatečné dodávky kyslíku (Singer 2004). Proces, který je v podobě hibernace běžnou součástí přírody. Jiným příkladem podobného procesu je omráčení myokardu ischemií (*myocardial stunning*). Nedávno byly popsány změny analogické hibernaci (ukládání glykogenu, up-regulace glukózových transportérů) v myokardu septických potkanů (Levy 2005).

Bylo navrženo, že sepsis probíhá ve 3 fázích (Obr. 9). Časná hypermetabolická fáze s normální utilizací kyslíku, následovaná (pokud je inzult těžký a protražovaný) obdobím metabolického útlumu s klinickým obrazem orgánové dysfunkce. Pokud organismus přežije, rozvíjí se reparační fáze s nárůstem metabolické aktivity a novotvorbou mitochondrií (Haden 2007).



**Obr. 9 Schéma vývoje sepsy.**

Akutní fáze přechází při protražovaném zánětu v útlum. Po odeznění inzultu se obnovuje funkce orgánů. Převzato ze Singer 2007.



### 3. Metody studia mikrocirkulace

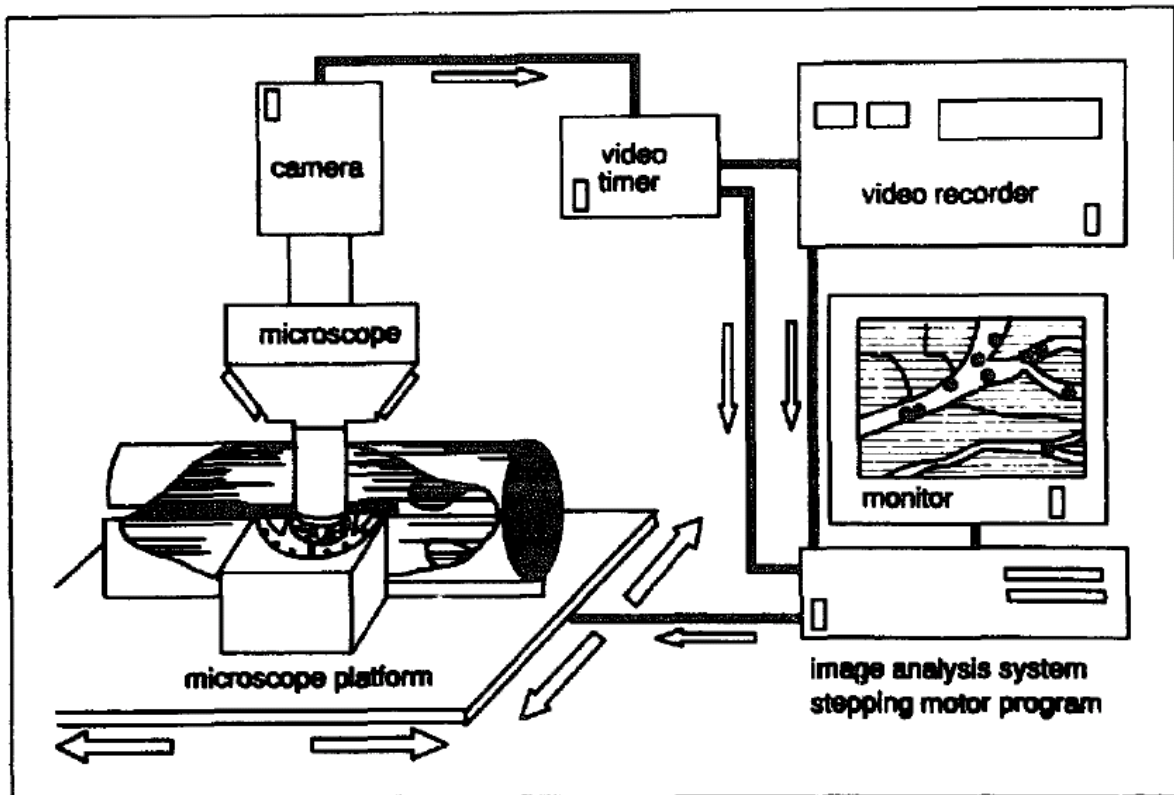
Byla vyvinuta řada metod ke studiu mikrocirkulace. Zde bude zmíněno několik nejvýznamnějších. Nejde o vyčerpávající přehled. Podrobně jsou popsány metody OPS a SDF a metoda indikátorové mikrodialýzy, které jsme používali během experimentů.

#### 3.1. Intravitální mikroskopie

Intravitální mikroskopie (IVM) je nejstarší a nejpodrobněji rozpracovaná metoda pro studium mikrocirkulace (Menger 1993). Je zlatým standardem, vůči kterému jsou srovnávány ostatní novější techniky. Je používána několik desítek let, poskytla velkou část dnes známých morfologických i funkčních poznatků o mikrocirkulaci. Jde o modifikaci klasické mikroskopie (Obr. 10). Pro klasickou mikroskopii je zapotřebí tenký preparát tkáně pro dobré prosvícení (transiluminaci) a ostrý obraz. Intravitální mikroskopii byly zprvu studovány dostatečně průsvitné tkáně některých tělních krajin (např. jazyk, nehtové lůžko, ušní lalůček). Použití zeleného monochromatického světla, absorbovaného hemoglobinem, usnadnilo zobrazení cév, které jsou pak patrné jako tmavé struktury na světlém pozadí. Osvětlení z boku (epiiluminace) poskytovalo nekvalitní obraz vzhledem k výraznému odrazu světla od povrchu studované tkáně. Bouřlivý rozvoj zaznamenala IVM až se zavedením fluorescenčních *markerů*. Fluorescenční *markery* (např. fluorescein sodný, Na-thiokyanát) vázané např. na erythrocyty nebo albumin v cévním řečišti fluoreskují po buzení světlem příslušné vlnové délky. Využívána je zejména metoda epiiluminace. Tato fluorescence je snímána mikroskopem, kdy je patrna svítící mikrocirkulace na tmavém pozadí (Obr. 11). Metoda dosahuje zvětšení až 1000x. Možnost použití epiiluminace umožňuje i studium neprůsvitných tkání, např. povrchu orgánů, do hloubky několika milimetrů. Může být použito i několik fluorescenčních značek, mohou být vázány na jiné buňky či proteiny (např. studium migrace leukocytů při zánětu, propustnosti značeného albuminu kapilární stěnou apod.). Metoda umožňuje jak zobrazení morfologie mikrocirkulace, tak měření dynamických parametrů (např. rychlost toku erythrocytů). Nutnost použití fluorescenčních *markerů* znesnadňuje humánní použití metody. Dalším technickým pokrokem bylo zavedení CCD kamer, umožňujících zobrazení fluorescence v neviditelném spektru nebo světla nízké intenzity, které není patrné prostým okem.

Je možné zobrazovat mikrocirkulaci bezprostředně po chirurgické přípravě (tzv. akutní preparáty) nebo používat tzv. chronické preparáty (Menger 2002), kdy je část určité vrstvy tělní stěny, např. kůže s podkožím nebo část lebky, nahrazena průhledným materiálem.

Chronické modely umožňují opakované sledování stejné oblasti mikrocirkulace (např. posouzení vývoje mikrocirkulace v delším čase) bez nutnosti celkové anestezie zvířete. V tomto směru nejpropracovanější metodou je vytvoření okna v dorzální kožní řase křečka.



Obr. 10 Schéma uspořádání přístrojů a dalších prvků při intravitální mikroskopii.

Převzato z Menger 1993.



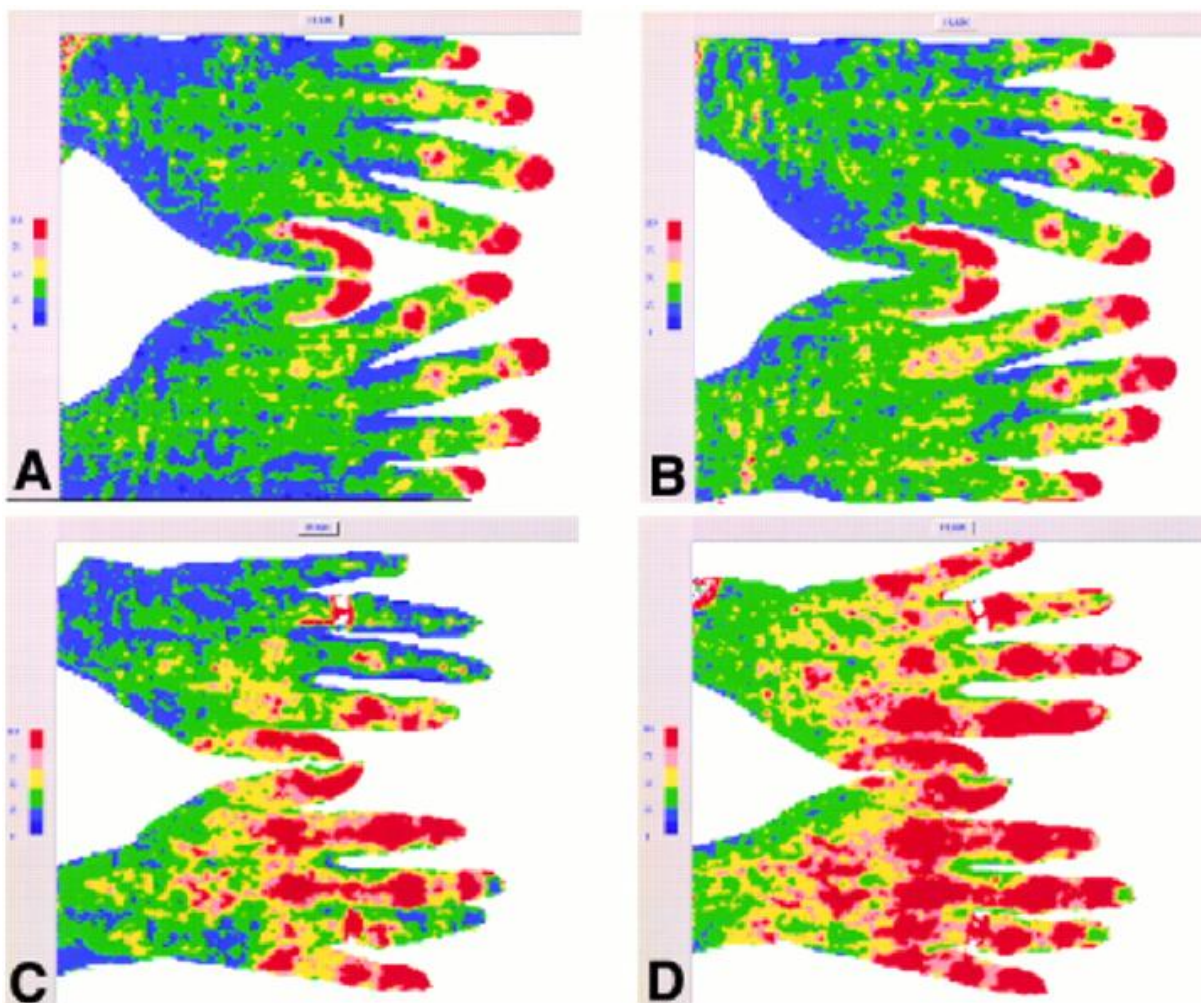
Obr. 11 Příklady obrazů mikrocirkulace pomocí intravitální mikroskopie.

A - normální mikrocirkulace v mozku, B – mikrocirkulace v mozku při endotoxémii. Patrna extravazace značené plazmy mimo cévy.

### 3.2. Laser doppler fluxmetry a Laser doppler flow imaging

*Laser doppler fluxmetry* (LDF) je metoda měřící průtok krve v mikrocirkulaci na základě fázového posunu (resp. frekvenčního rozšíření) monochromatického laserového světla při odrazu světla od erytrocytů pohybujících se v mikrocirkulaci tkáně (Bonner 1980). LDF sonda o velikosti cca 1 mm je přiložena a fixována ke tkáni, vysílá laserové světlo do okolí tkáně a snímá světlo odražené. Signál tedy odpovídá průměrnému průtoku sítí kapilár v blízkém okolí sondy, přibližně v rozsahu do několika milimetrů. Metoda má však řadu podstatných nedostatků. Při úplné zástavě toku (klampy přívodné tepny i žíly) neklesne signál na nulu. Přetrvávající signál je označován jako „biologická nula“ a musí být odečten od každého měřeného signálu. Příčinou jsou zřejmě Brownův pohyb a *vasomotion* (Kernick 1999). Ačkoli byla potvrzena lineární korelace mezi celkovým průtokem tkání a LDF signálem (Stern 1975, Bonner 1980), tato korelace není dostatečně těsná pro vytvoření kalibrace umožňující převod arbitrárních jednotek udávaných přístrojem na průtok krve tkání. Konečně fluktuace signálu v čase i mezi blízkými místy znesnadňuje odečtení hodnoty signálu, porovnání více měření a detekci malých změn signálu.

*Laser doppler flow imaging* (LDFI) je rozšířením metody LDF. Při této metodě laserový paprsek skenuje měřenou oblast (o velikosti několika  $\text{cm}^2$ ) a měřený signál se zobrazuje jako barva jeho intenzitě úměrná. Např. dobře perfundovaná oblast je modrá, špatně perfundovaná oblast červená (Obr. 12) (Wardell 1993). Metoda nemá vysoké rozlišení, nepoužívá mikroskop a neumožňuje tak morfologické zobrazení stavu mikrocirkulace. Podobně jako LDF nemůže být měřený signál vyjádřen v absolutních hodnotách.



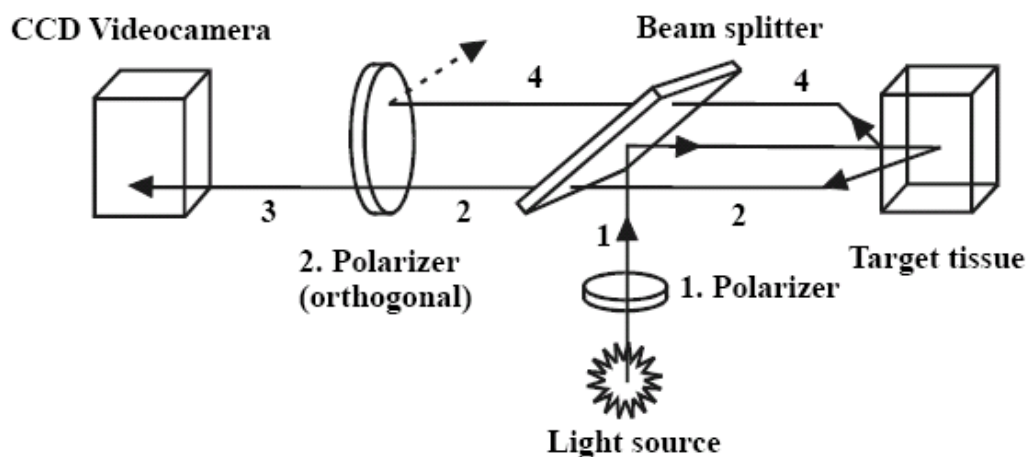
**Obr. 12** Zobrazení rozvoje Raynaudova fenoménu pomocí Laser Doppler flow imaging.

Červená barva odpovídá nejnižší perfuzi, modrá barva nejvyšší perfuzi.

### 3.3. Ortogonální polarizační zobrazení (OPS)

Metoda *Orthogonal polarisation spectral (OPS) imaging* je relativně nová neinvazivní metoda zobrazení tkáňové mikrocirkulace. V principu jde o modifikaci intravitální mikroskopie, kde je řešen základní problém nativního (bez použití fluorescenčního markeru) mikroskopického zobrazení, totiž odraz od povrchu zobrazované tkáně/orgánu, který intenzitou přehluší odrazy zevnitř tkáně (Groner 1999, Lindert 2002). Princip je schematicky zobrazen na Obr. 13. Polarizované světlo (po průchodu polarizátorem) prochází světlovodným tunelem (směr k CCD kameře je blokován) ke tkáni/orgánu, k níž je konec OPS mikroskopu přiložen. Světlo se poté odráží jednak od povrchu tkáně, jednak od vnitřních struktur tkáně z hloubky až 3 milimetrů (dle údajů výrobce). Většina odraženého světla (zejména od povrchových struktur) zůstává polarizována a při zpětném průchodu

světlovodem mikroskopu je filtrována kolmým polarizátorem (analyzátor). Část světla (méně než 10%) se uvnitř tkáně odráží opakovaně a ztrácí přitom svou polarizaci (MacKintosh 1989, Schmitt 1992). Analyzátor umožní průchod tohoto depolarizovaného světla přes zvětšující čočky k CCD kameře. Je používáno zelené světlo o vlnové délce 548 nm, které je absorbováno hemoglobinem (identicky oxyhemoglobinem i deoxyhemoglobinem). V obrazu OPS mikroskopu jsou tedy zobrazeny tmavé krevní cévy (mikrocirkulace) na světlém (přibližně homogenním) pozadí (Obr. 4). Získaný obraz je ekvivalentní situaci, jako kdyby byl zdroj světla umístěn za zobrazovanou tkáň (transiluminace). V současnosti je dostupný videomikroskop Cytoscan firmy Cytometrics ([www.cytometrics.com](http://www.cytometrics.com)). Jde o ruční přenosný mikroskop, jehož „objektiv“ může být snadno přiložen ke slizničním povrchům či povrchům orgánů. Výhodou OPS technologie oproti fluorescenční intravitální mikroskopii je, že není zapotřebí fluorescenčních markerů, což umožňuje humánní použití. Metoda umožňuje několikasetnásobné zvětšení.



**Obr. 13** Princip ortogonální polarizačního zobrazení (OPS).

Šipky ukazují tok světla. Vysvětlení v textu. Převzato z Černý 2007.

### 3.3.1. Validace OPS zobrazení

OPS metoda byla použita k zobrazení mikrocirkulace mnoha orgánů za fyziologických i patologických okolností v humánních i animálních studiích. Většina validací je založena na porovnání s fluorescenční intravitální mikroskopií, která je vnímána jako zlatý standard pro zobrazení mikrocirkulace. Validace proběhla např. na standardizovaném chronickém modelu dorzální kožní řasy křečka (Harris 2000a, b), kožního laloku myši a preparátu z *m. cremaster* (Laemmel 2000), při zobrazení jater (Langer 2001), pankreatu (von Dobschuetz 2003), tračnicku (Biberthaler 2001), nádorové tkáně (Pahernik 2002) či při různém stupni hemodiluce

(Harris 2002). V jedné studii byla OPS metoda srovnávána s kapilární mikroskopií u lidí (Mathura 2001). Ve všech uvedených studiích byla OPS metoda shledána jako srovnatelná s intravitální mikroskopií, nebyl rozdíl v měřených kvantitativních parametrech mikrocirkulace (rozměry mikrocév, kapilární denzita, denzita sinusoid v játrech, rychlost toku erytrocytů). Bylo opakovaně demonstrováno zhoršení mikrocirkulace při sepsi - v animálních modelech (Tugtekin 2001) i u člověka (Boerma 2005, De Backer 2002, Sakr 2004 a další).

### 3.3.2. *Technická omezení metody*

OPS metoda má několik technických omezení (Lindert 2002). Nežádoucí tlak přiložené sondy mikroskopu může snížit krevní průtok v zorném poli. Známkou nepřiměřeně vysokého tlaku je oblenění průtoku ve venulách, který je při absenci zevního tlaku zachován i při těžké hypoperfuzi mikrocirkulace (De Backer 2007). Problém lze zčásti řešit upevněním sondy do stabilizačních zařízení umožňujících mikropohyb ke tkáni a minimalizaci kontaktního tlaku. Mírnou nevýhodou videomikroskopu Cytoscan je, že zaostření obrazu se provádí přibližováním a oddalováním sondy od tkáně (Goedhart 2007). Shoda s parametry z intravitální mikroskopie, která není kontaktní metodou, je důkazem, že při řádné manipulaci se sondou se tlakové artefakty neuplatňují. Další limitací je laterální pohyb tkáně vůči sondě (např. souhyb jater s dechovými exkurzemi bránice) či sondy vůči tkáni při nedostatečné stabilizaci sondy. Takový pohyb vede k rozostření obrazu, znemožňuje kontinuální sledování určité oblasti po delší dobu a měření rychlosti toku erytrocytů. Obraz lze i částečně softwarově stabilizovat (De Backer 2007). Limitací metody je i nemožnost měřit vyšší rychlosti toku erytrocytů. Princip měření rychlosti pohybu erytrocytů spočívá v měření posunu erytrocytů (resp. např. plazmatické mezery mezi erytrocyty) mezi jednotlivými obrazy kinematografického záznamu, jejichž časový odstup je známý. Je-li např. frekvence záznamu 30 snímků za minutu a šířka zorného pole 1 mm, pak se erytrocyt může pohybovat rychlostí nejvýše cca 30 mm/s (1 mm za třicetinu sekundy), aby byl ještě přítomen na dalším snímku. Současný technický limit měření rychlosti je okolo 20 mm/s. Přesně lze měřit rychlosti přibližně do 1 mm/s (Lindert et al. 2002). Klinické použití je limitováno tím, že jsou přístupny pouze tkáně kryté tenkou vrstvou epitelu (např. sublingvální sliznice), orgány jsou přístupny pouze perioperačně.

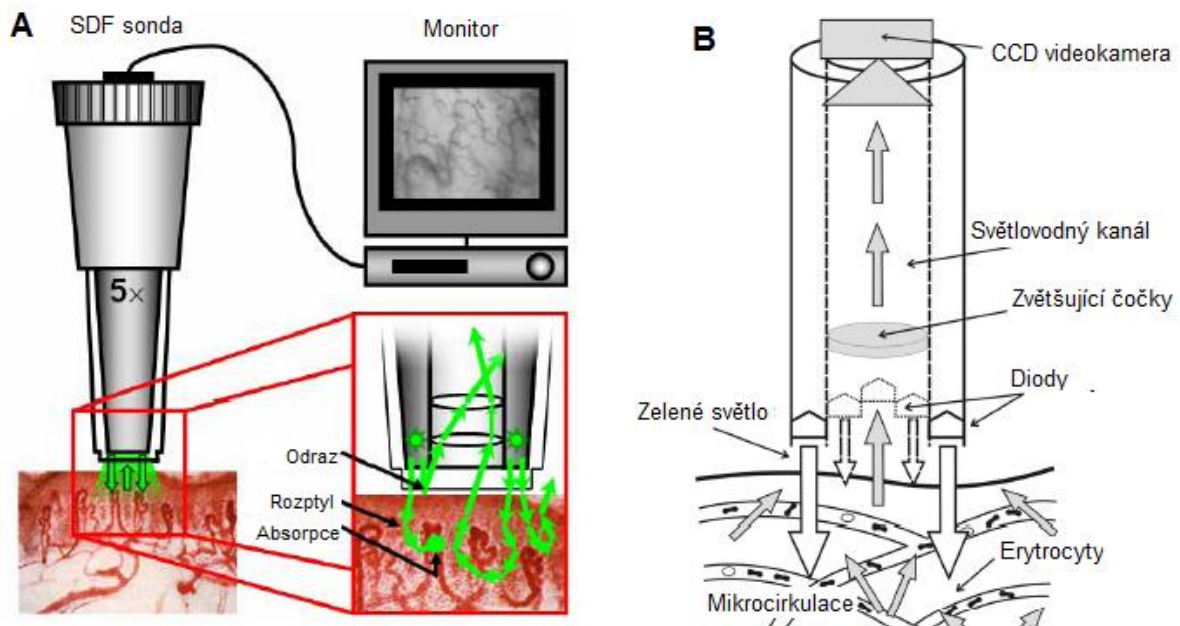
### 3.4. „Side-stream darkfield“ (SDF) zobrazení

*Side-stream darkfield* (SDF) zobrazení je podobně jako OPS modifikací intravitální mikroskopie se snahou o omezení odrazu od povrchu (Ince 2005). Princip není založen na

polarizaci světla, kdy světlo tkáň osvěcující/prosvěcující i z tkáň přicházející využívá tentýž světlovod, nýbrž na optické izolaci světla tkáň osvěcujícího od světla přicházejícího z tkáň (Obr. 14). Poněvadž je sonda svým koncem přiložena přímo ke tkáni, světlo vycházející z prstence osvěcujících diod umístěných na zevním okraji konce sondy se nemůže přímo odrazit od povrchu tkáň. Sonda prosvěcuje tkáň a veškeré světlo přicházející do sondy je odražené od vnitřních struktur tkáň. Světlo dále přechází přes zvětšující čočky k CCD kameře. Je rovněž používáno zelené světlo o vlnové délce cca 540 nm, obrazem jsou opět tmavé cévy na světlém pozadí. Typické ukázky SDF obrazů jsou na Obr. 15-18.

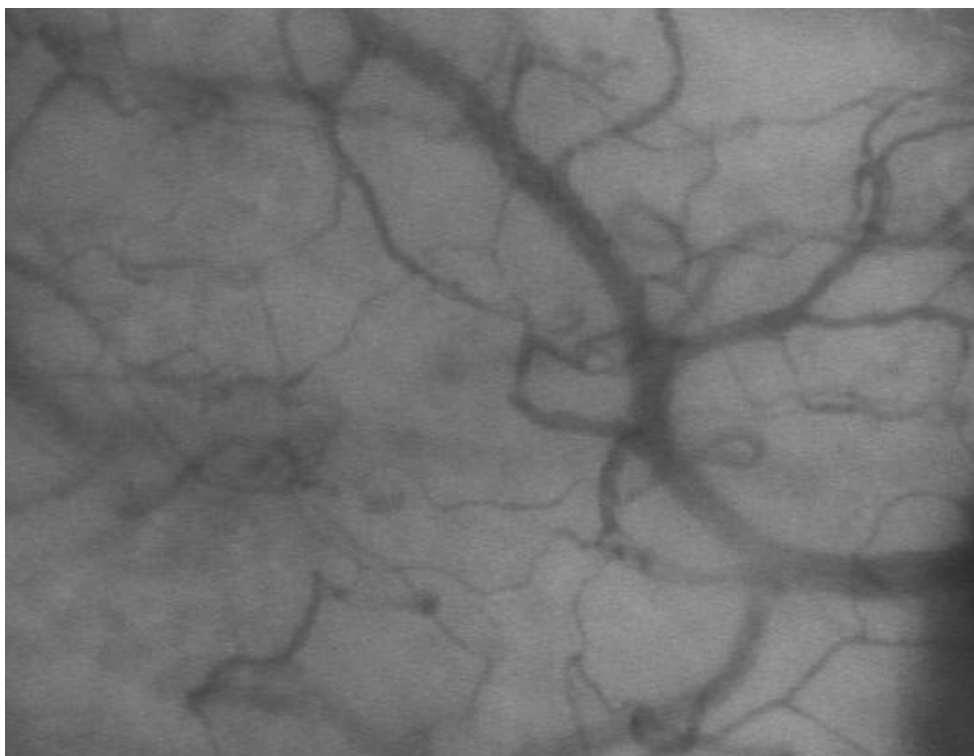
SDF metoda je novější než OPS metoda, v současnosti je komerčně dostupný videomikroskop MicroScan firmy Microvision Medical. Dostupné zvětšení je rovněž několikasetnásobné. Použití i limitace metody jsou podobné s OPS metodou. Výhodou SDF zobrazení oproti OPS je skutečnost, že se konec sondy během zaostřování nepohybuje (pohybuje se rovina CCD kamery), což usnadňuje prevenci tlakových artefaktů (Obr. 19). SDF technologie poskytuje vyšší rozlišení a zřetelnost obrazů ve srovnání s OPS technologií (Goedhardt 2007) (Obr. 20).

SDF technologie představuje relativně snadnou možnost posouzení tkáňové mikrocirkulace v experimentu i v klinické medicíně. Např. objemová resuscitace či dávkování katecholaminů mohou být cíleny na dosažení/sledování jistých parametrů mikrocirkulace. Potenciál metody v těchto směrech je v současnosti rozvíjen.

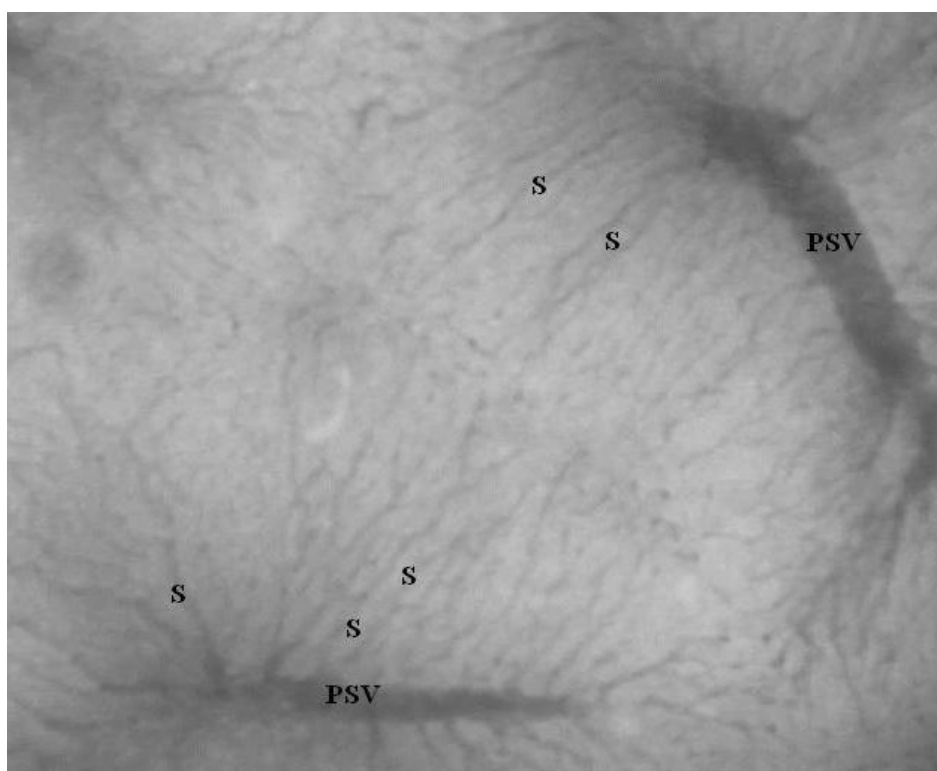


**Obr. 14 Princip SDF zobrazení a uspořádání technických prvků.**

A) vztah sondy a tkáň, B) detail vedení světla. Převzato a upraveno z Goedhardt 2007 a Černý 2007.

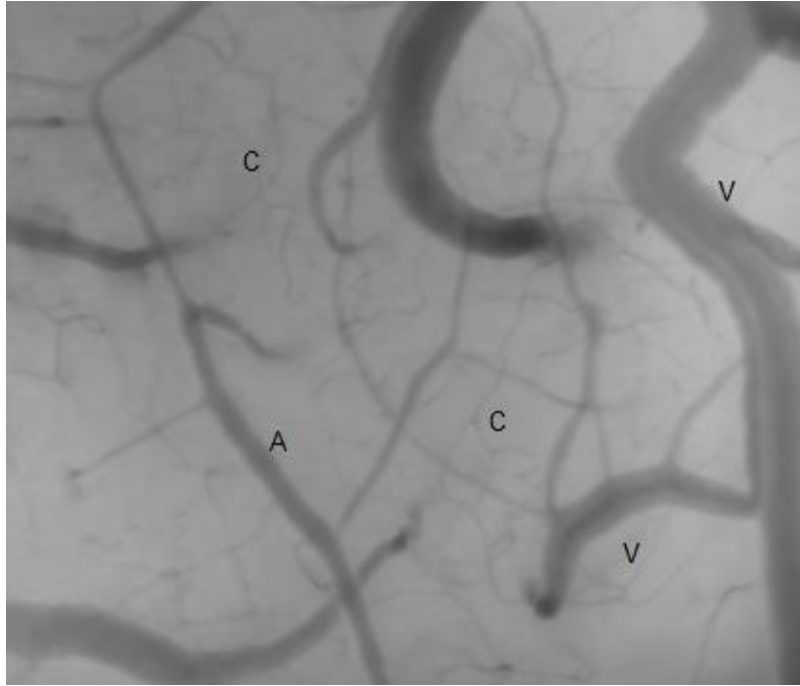


**Obr. 15** Typický SDF obraz sublingvální mikrocirkulace.

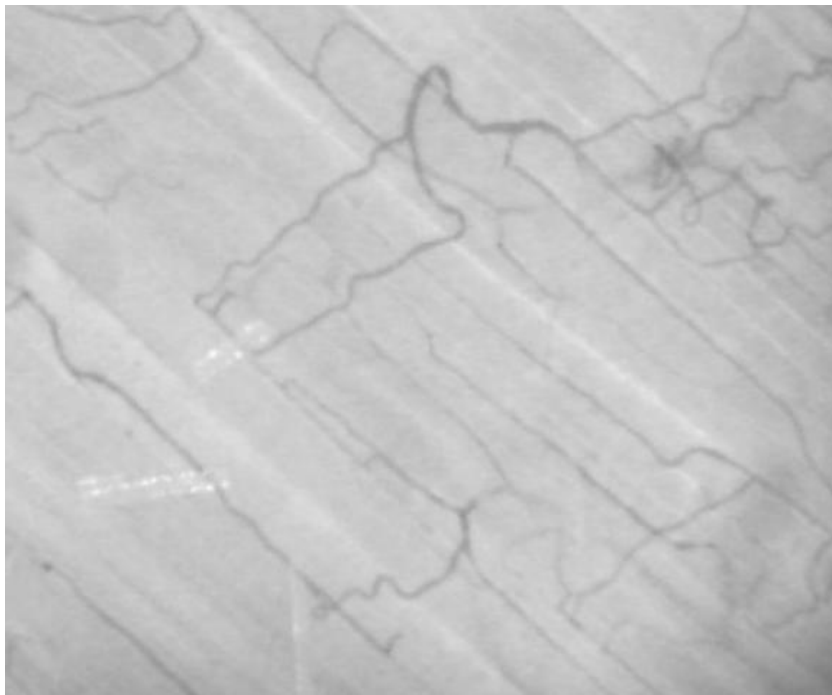


**Obr. 16** Typický SDF obraz mikrocirkulace z povrchu jater.  
S – sinusoida, PSV – větev portální žíly.

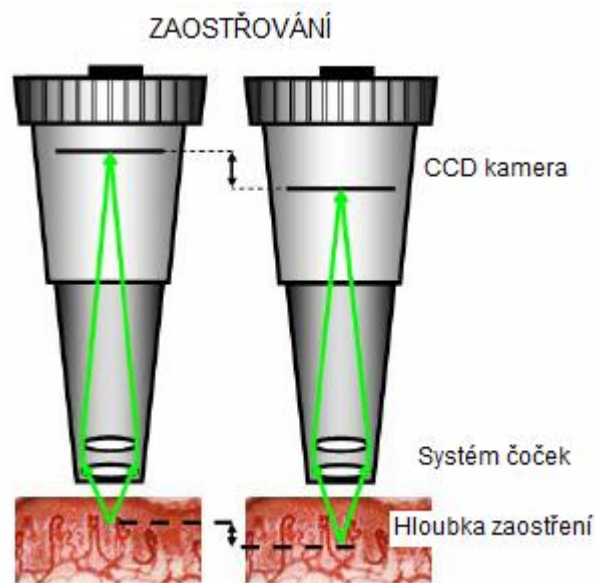




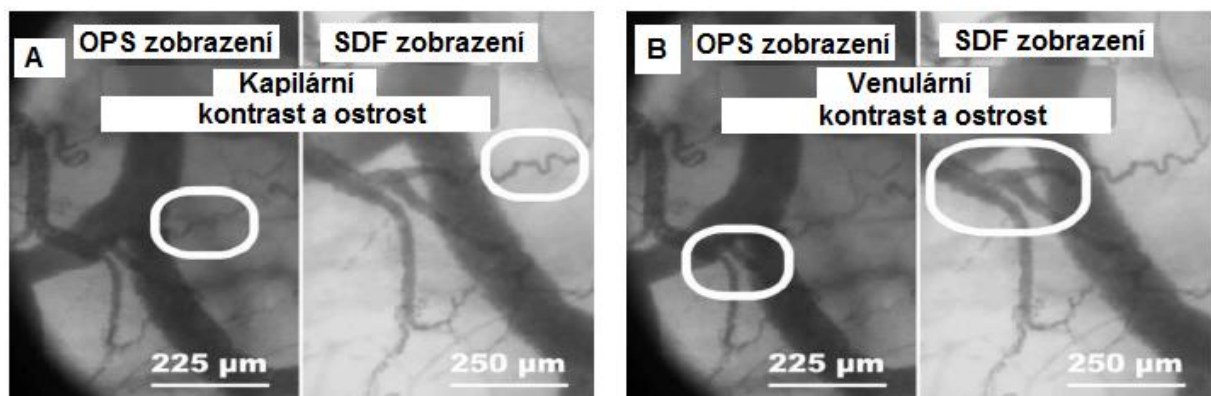
**Obr. 17** Typický SDF obraz mikrocirkulace z povrchu mozku.  
A – arteriola, V – venula, C – kapilára



**Obr. 18** Typický SDF obraz mikrocirkulace z povrchu kosterního svalu.



**Obr. 19 Princip zaostřování SDF sondy.**  
Převzato a upraveno z Goedhart 2007.



**Obr. 20 Rozdíly v kvalitě zobrazení kapilár a venul pomocí A- OPS a B- SDF zobrazení.**

Převzato z Goedhart 2007.

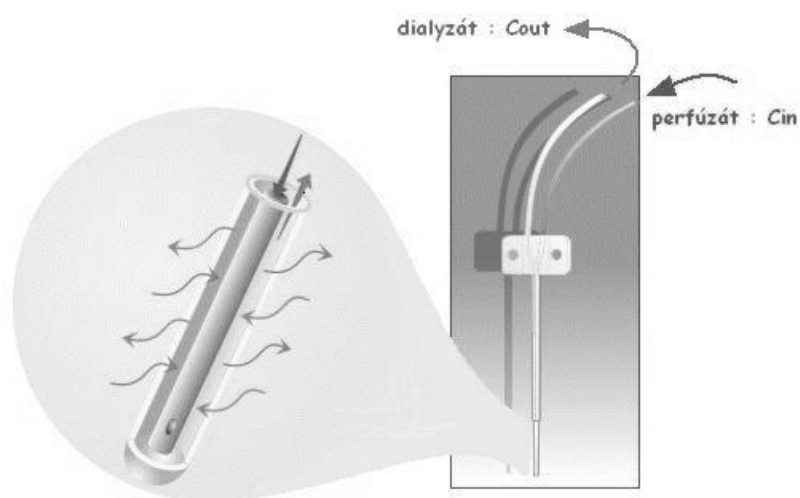
### 3.5. Hodnocení tkáňové perfuze mikrodialýzou

Existují v principu dvě metody, jak použít mikrodialýzu k hodnocení tkáňové perfuze. První metoda spočívá v měření tkáňových koncentrací substancí (s využitím mikrodialýzy), jejichž koncentrace se mění při hypoperfuzi. Většinou jde o měření tkáňové koncentrace laktátu a pyruvátu (a poměru laktát/pyruvát), případně ještě stanovení glycerolu a glutamátu, které jsou ukazateli tkáňového poškození (Klaus 2003). Největšího klinického uplatnění dosáhla tato metoda v neurointenzivní péči (Klaus 2003, Bellander 2004, Sarrafzadeh 2002),

nicméně ani zde nepředstavuje obvyklou součást monitorace klinického stavu. Druhou metodou je tzv. indikátorová mikrodialýza, která bude dále popisována.

### 3.5.1. Princip indikátorové mikrodialýzy

Metoda indikátorové mikrodialýzy využívá speciální sondu, zavedenou do místa, kde chceme sledovat tkáňovou perfuzi. Konstrukce sondy pro mikrodialýzu je zobrazena na Obr. 21. Na svém konci zavedeném do tkáně je sonda kryta dialyzační membránou s póry umožňujícími vstup částic o velikosti řádově až desítek kilodaltonů (kDa) - zde probíhá výměna molekul mezi tekutinou v nitru sondy a intersticiem. Membrána sondy nepředstavuje prakticky žádné omezení difúze pro malé molekuly, koncentrační spád na membráně je minimální. Rychlost difúze ze sondy je určena rychlostí difúze ve tkáni. Sondu je možné použít nejen pro absorpci molekul z intersticia, ale rovněž pro přívod molekul ze sondy do intersticia. Molekuly difundují ze sondy do intersticia, odkud jsou zčásti eliminovány resorpcí do krevních kapilár, a to tím více, čím větší je průtok krve tkání. Poměr koncentrací sledované látky (indikátoru) na výstupu a vstupu sondy ( $C_{out}/C_{in}$ ) by teoreticky měl být úměrný perfuzi tkáně, tj. s rostoucí perfuzí by měl poměr substancí klesat a naopak. Tkáňová difuzibilita malých molekul je větší než difuzibilita velkých molekul (Stallknecht 1999), čemuž odpovídá nižší poměr  $C_{out}/C_{in}$  pro malé molekuly. Teoreticky je malá velikost molekuly pro indikátorovou mikrodialyzační techniku výhodou, ovšem relativní časový vývoj poměru  $C_{out}/C_{in}$  pro různě velké molekuly (pokud je poměr menší než 0,9) je totožný (Stallknecht 1999). Výběr indikátoru bývá určen spíše snadností jeho měření než velikostí jeho molekuly.



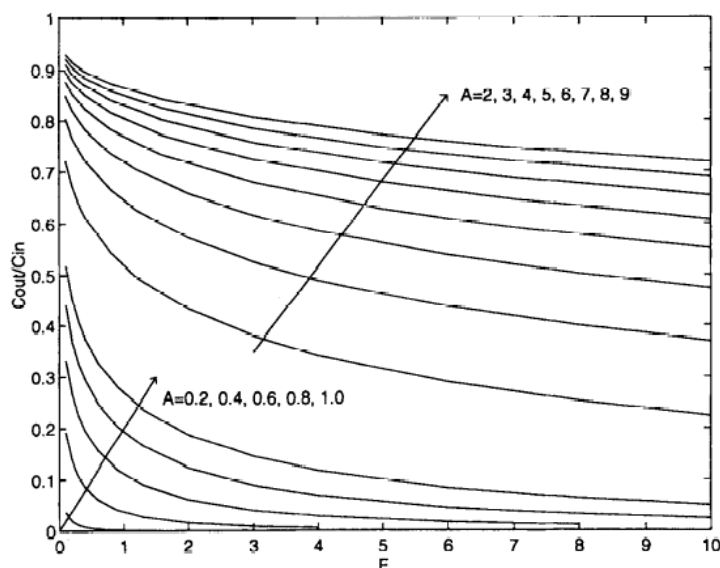
Obr. 21 Konstrukce sondy pro mikrodialýzu.

### 3.5.2. Faktory ovlivňující koncentraci indikátoru

Po zavedení sondy do tkáně a jejím promývání roztokem (tzv. perfuzátem) dochází postupně k difuzi molekul indikátoru ze sondy do intersticia, přičemž se v intersticiu vytváří koncentrační gradient, koncentrace klesá se vzdáleností od sondy. Eliminace molekul indikátoru z intersticia do krevních kapilár v jistém bodě je úměrná jejich koncentraci a tkáňové perfuzi v tomto bodě. V okamžiku, kdy se vyrovná rychlost úniku indikátoru ze sondy s rychlostí jeho tkáňové eliminace kapilárami, dochází k ustavení stacionárního stavu (Stahle 2000), kdy se dále s časem nemění ani koncentrace indikátoru ve tkáni, ani poměr  $C_{out}/C_{in}$ . Poměr  $C_{out}/C_{in}$  ve stacionárním stavu je tedy úměrný perfuzi tkáně. Doba do ustavení stacionárního stavu se označuje jako časová konstanta a závisí zejména na perfuzi tkáně, s klesající perfuzí se prodlužuje. Teoretický model (Wallgren 1995) dospěl k hodnotě cca 60 minut při perfuzi sondy rychlostí 2  $\mu\text{l}/\text{min.}$ , což je ve shodě s experimentálním měřením (Stallknecht 1999), kde rovněž po 60 minutách dochází k ustálení poměru  $C_{out}/C_{in}$ . V případě nulové tkáňové perfuze dochází k ustavení tzv. pseudostacionárního stavu přibližně po 140 minutách (Stallknecht 1999). Intersticiem se pak neustále doplňuje indikátorem, který dále migruje směrem od sondy. Použijeme-li značenou vodu jako indikátoru, zůstává poměr  $C_{out}/C_{in}$  na (pseudostacionární) hodnotě 0,7, ačkoli by teoreticky (po velmi dlouhé době) měl být roven 1,0 (stacionární stav). Velkou nevýhodou mikrodialýzy pro měření nízkých tkáňových perfuzí je tedy značně dlouhá časová konstanta, což omezuje detekci rychlých změn průtoku (Stallknecht 1999). Rovněž pohyby tkáně a/nebo sondy mohou změnit tkáňovou difuzibilitu indikátoru a ovlivnit poměr  $C_{out}/C_{in}$  (Radegran 1998). Koncentrace indikátoru v intersticiu klesá se vzdáleností od sondy. Za předpokladu normální tkáňové perfuze odhaduje matematický model (Wallgren 1995) téměř nulovou koncentraci ve vzdálenosti zhruba trojnásobku průměru mikrodialyzační sondy, což bylo potvrzeno i experimentálně, ve vzdálenosti 3-5 mm od sondy byla naměřena koncentrace etanolu méně než 0,1% z perfuzátu (Hickner 1995). Metodicky obdobná studie (Wallgren 1995) uvádí vzdálenost 7 mm. S rychlostí průtoku perfuzátu klesá doba kontaktu perfuzátu s intersticiem, a roste proto poměr  $C_{out}/C_{in}$ . Podobně pro kratší sondu je poměr  $C_{out}/C_{in}$  při stejné rychlosti perfuzátu vyšší. Teoretický model i jeho experimentální ověření ukazují jako optimální rychlost perfuzátu 1-2  $\mu\text{l}/\text{min}$  (Wallgren 1995, Hickner 1995).

Při všech rychlostech perfuze sondy je závislost mezi poměrem  $C_{out}/C_{in}$  a krevním průtokem nelineární (Obr. 22), přičemž s vyšším tkáňovým průtokem klesá poměr  $C_{out}/C_{in}$ . Ve studii Hicknera (Hickner 1995) však byla zjištěna téměř lineární závislost mezi poměrem

$C_{out}/C_{in}$  a tkáňovou perfuzí při perfuzi sondy 1  $\mu\text{l}/\text{min}$ . v rozmezí tkáňové perfuze 4-47  $\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$ . ( $r = -0.98$ ) a 4-45  $\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$ . ( $r = -0.92$ ) při perfuzi 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Variace poměru při opakovaných odběrech z jedné sondy při neměnném krevním průtoku (tzv. časová heterogenita) se pohybuje v rozmezí 3-18% (střední koeficient rozptylu) a hodnota variace narůstá s klesající rychlostí perfuzátu. Rozdíl poměrů  $C_{out}/C_{in}$  mezi různými sondami ve stejném okamžiku při daném krevním průtoku (tzv. prostorová heterogenita) rovněž stoupá s klesajícím krevním průtokem, koeficient variace se pohybuje v širokém rozmezí 4-59% v závislosti na tkáňové perfuzi. Důvodem je zřejmě odlišná difuzibilita molekul v různých oblastech tkáně. Je proto obtížné srovnávat poměry získané z různých sond, přesnější je časový vývoj poměrů z jedné sondy. Významným faktorem je i ultrafiltrace perfuzátu přes dialyzační membránu sondy. Při použití izotonického roztoku perfuzátu je rychlost ultrafiltrace do 10% průtoku perfuzátu (Wallgren 1995), přičemž pro kratší sondy, nízké rychlosti perfuze a menší póry v membráně je stupeň ultrafiltrace nižší.



**Obr. 22** Závislost poměru  $C_{out}/C_{in}$  na průtoku krve tkání ( $F$ ).

Série křivek pro 2 různé indikátory a různou rychlost promývání mikrodialyzační sondy (charakterizováno parametrem  $A$ ). Převzato z Wallgren 1995.

### 3.5.3. Používané indikátory

Původně byla metoda vypracována pro etanol (Wallgren 1995, Hickner 1995), který byl zvolen pro relativně malou molekulu a nízkou tkáňovou toxicitu. Nevýhodou etanolu je nutnost velmi rychlé analýzy vzorku v krátké době po odběru při 4 °C a vypařování v průběhu

sběru dialyzátu ze sondy a během zpracování. Alternativou s nižším stupněm vypařování je např. gentamycin nebo litium (Mand'ák 2004). Jejich výhodou je snadné rutinní stanovení, ale jak gentamycin, tak litium mají velkou molekulu (včetně hydratačního obalu) s nízkou difuzibilitou ve tkáni, tedy vysoký poměr  $C_{out}/C_{in}$  (přes 0,9), což podstatně snižuje přesnost metody. Z hlediska snadnosti měření jsou nejvýhodnější radioaktivně značené indikátory, nejčastěji  $^{14}\text{C}$ -etanol a značená voda ( $^3\text{H}_2\text{O}$ ). Předností značené vody je malá velikost molekuly s nízkými poměry  $C_{out}/C_{in}$ , nulová tkáňová toxicita, snadné měření a nízká evaporace (Stallknecht 1999). Průběh poměru  $C_{out}/C_{in}$  v čase je pro  $^{14}\text{C}$ -etanol i  $^3\text{H}_2\text{O}$  obdobný (Stallknecht 1999). Při používání značených indikátorů jsou používány aktivity řádově jednotky kBq/ml perfuzátu (Hickner 1995), radioaktivní zátěž je velmi nízká.

#### 3.5.4. Metodické studie

Metoda indikátorové mikrodialýzy s etanolem byla testována na modelu kontrolované perfuze (Hickner 1995). Získané výsledky měly malé rozptyly a dobře odpovídaly predikci z teoretického modelu. Poměr  $C_{out}/C_{in}$  se v určité oblasti tkáňové perfuze měnil lineárně s perfuzí a bylo možno ze změřeného poměru dopočítat tkáňovou perfuzi. Práce položila základ koncepce využití metody ke kvantitativnímu zhodnocení tkáňové perfuze. Studie užívající model kontrolované perfuze (Stallknecht 1999) posuzovala validitu metody při nižší tkáňové perfuzi (1-21 ml/100g/min.), zhruba odpovídající klidovému průtoku svalovou tkání. Autoři práce nejprve testovali změnu poměru  $C_{out}/C_{in}$  při zvýšení perfuze z nízkých do středních hodnot a zpět, poté při zvyšování rychlosti perfuze ze středních hodnot k vysokým a zpět. V první části experimentu došlo k signifikantnímu poklesu pouze při zvýšení průtoku z nízké na střední perfuzi, k signifikantnímu vzrůstu při opětovném snížení perfuze již nedošlo. V druhé části experimentu došlo jak k signifikantnímu poklesu, tak následně k signifikantnímu vzrůstu poměru  $C_{out}/C_{in}$ . Vysvětlení výsledků první části experimentu hledají autoři v dlouhé časové konstantě při nízké perfuzi. Zároveň ukázali, že při ztrojnásobení průtoku došlo k poklesu poměru  $C_{out}/C_{in}$  pouze o cca 0,05 a uzavírají, že metoda je schopna kvalitativně posoudit tkáňovou perfuzi, ale není schopna přesné kvantifikace. Studie Radegrana posuzovala vliv pohybu na změnu poměru  $C_{out}/C_{in}$  etanolu (Radegran 1998). Zdravým dobrovolníkům byly zavedeny kanyly do femorální tepny a žíly a současně mikrodialyzační sondy do *m. quadriceps femoris*. Dvě skupiny byly kontrolní, dvě se zvýšeným průtokem v důsledku podání adenosinu do *a. femoralis*, jedna se zvýšeným průtokem v důsledku cvičení dolní končetinou a jedna se zvýšeným průtokem v důsledku kombinace cvičení a adenosinu. Ve skupinách bez cvičení nedošlo k signifikantní změně

oměru  $C_{out}/C_{in}$  etanolu při změnách průtoku, naproti tomu ve skupinách se cvičením došlo k signifikantnímu poklesu poměru, ale bez ovlivnění podáním adenosinu. Autoři výsledky uzavírají jako průkaz nezávislosti poměru  $C_{out}/C_{in}$  etanolu na perfuzi tkáně a změnu poměru interpretují jako důsledek svalových kontrakcí. Zodpovědným mechanismem by mohla být změna difuzibility etanolu v intersticiu v důsledku kontrakce (tzv. „míchací“ efekt kontrakce). V diskusi uvádějí, že v originální Hicknerově práci (Hickner 1995) byla pro dosažení vyšších tkáňových perfuzí použita elektrostimulace svalu a závěrem zpochybňují validitu mikrodialyzační indikátorové techniky k měření tkáňové perfuze. Alternativní vysvětlení výsledků poskytuje Newman (Newman 2001), který na základě dřívějších prací předpokládá existenci dvou skupin krevního oběhu ve svalu: nutritivního (je v kontaktu s myocyty a mikrodialyzační sondou) a tzv. non-nutritivního, který se pravděpodobně nachází zejména v interfibrilárních septech svalu a nemá dobrý kontakt se sondou. Tzv. non-nutritivní oběh je homogenně distribuován ve svalu a nejedná se o arteriovenózní zkratky, noradrenalin zvyšuje průtok nutritivním oběhem na úkor non-nutritivního, serotonin naopak. V uvedené studii (Newman 2001) byl měřen poměr  $C_{out}/C_{in}$  značené vody a etanolu na modelu s kontrolovanou konstantní perfuzí končetiny. Ve skupině s aplikací noradrenalinu došlo k poklesu poměru  $C_{out}/C_{in}$  u značené vody i etanolu, při aplikaci serotoninu poměr klesl, i přes konstantní celkovou perfuzi. Autoři předpokládají, že adenosin může napodobovat efekt serotoninu a vést k redistribuci průtoku do non-nutritivní části cirkulace s odkazem na dřívější práci (Borgstrom 1990), která pomocí intravitální mikroskopie mimo jiné ukázala, že např. izoproterenol specificky dilatuje příčné arterioly svalu králíka a přesouvá tok krve od myocytů k intersticiu. Výsledek Radegranovy studie (Radegran 1998) tedy může být důsledkem existence dvou skupin průtoků a nemusí nutně zpochybňovat validitu indikátorové mikrodialyzační techniky.

### *3.5.5. Indikátorová mikrodialýza a porucha tkáňové perfuze – experimentální a klinické studie*

Metoda měření tkáňové perfuze pomocí indikátorové mikrodialýzy byla použita v relativně malém počtu studií zabývajících se tkáňovou (hypo)perfuzí. Luchetteova studie (Luchette 2002) prokazovala hypotézu, že hypoxie není jedinou příčinou produkce laktátu během šoku, nýbrž že sama zvýšená koncentrace adrenalinu se podílí na zvýšené produkci laktátu (pravděpodobně mechanismem zvýšení aktivity membránové Na/K pumpy závislé na ATP získaném z anaerobní glykolýzy). Byla měřena koncentrace laktátu v dialyzátu a poměr  $C_{out}/C_{in}$  etanolu ze sondy ve svalu během lokálního podání adrenalinu a během

hemoragického šoku. Části zvířat byl podáván ouabain, který blokuje činnost Na/K pumpy. Během podání adrenalinu došlo k pětinasobnému zvýšení koncentrace laktátu ve skupině bez podání ouabainu a přibližně k trojnásobnému zvýšení ve skupině s ouabainem, poměr  $C_{out}/C_{in}$  etanolu vzrostl o cca 0,15, ouabain vzestup poměru neovlivnil. Obdobné výsledky platí pro hemoragický šok, pouze vzestupy koncentrace laktátu i poměru  $C_{out}/C_{in}$  etanolu byly menší. Vrchol vzrůstu koncentrace laktátu byl posunut za vrchol vzrůstu poměru  $C_{out}/C_{in}$ , což odráží zřejmě primární pokles perfuze a teprve následně produkci laktátu. Přidání ouabainu snižuje produkci laktátu, ale neovlivňuje poměr  $C_{out}/C_{in}$ . Metoda byla použita k posouzení tkáňové perfuze i na modelu hypotenze (Dewachter 2005). Autoři použili model anafylaktického šoku, ve druhé skupině navodili ekvivalentní hypotenzi nikardipinem. Mikrodialyzační sondou ve svalu měřili koncentraci laktátu a pyruvátu v dialyzátu i poměr  $C_{out}/C_{in}$  etanolu. Poměr  $C_{out}/C_{in}$  etanolu signifikantně vzrostl jak u anafylaktického šoku, tak u indukované hypotenze (0,45 vs. 0,51), podstatně větší změny však byly nalezeny při měření laktátu a pyruvátu, poměr laktát/pyruvát u anafylaxe vzrostl téměř dvacetinásobně. Mikrodialyzační technika s gentamycinem byla použita ve studii metabolických změn v kosterním svalu během mimotělního oběhu (Mand'ák 2004). Pacienti podstupující kardiochirurgický výkon s mimotělním oběhem byli rozděleni na normotermickou a hypotermickou skupinu. V dialyzátu ze sondy v *m. deltoideus* byla měřena koncentrace laktátu a gentamycinu. Koncentrace laktátu během operace signifikantně vzrostla cca 8 krát, v obou skupinách stejně. Poměr  $C_{out}/C_{in}$  gentamycinu se během operace signifikantně neměnil, ale mezi skupinami byl trvale signifikantní rozdíl (0,9 u normotermické ve srovnání s hodnotou 1,1 u hypotermické skupiny). Interpretace výsledků je zde problematická, za pozornost stojí jednak velmi vysoké poměry  $C_{out}/C_{in}$  v obou skupinách, pravděpodobně díky značné velikosti a nízké difuzibilitě molekuly gentamycinu, jednak fakt, že poměr v hypotermické skupině byl dokonce vyšší než 1, což je zřejmě způsobeno filtrací čistého perfuzního roztoku (bez gentamycinu) do svalu při použitých velmi nízkých perfuzních rychlostech (0,3  $\mu\text{l}/\text{min}$ .). Přesto však existují práce, kde i za podmínek nekontrolovaného průtoku tkání se podařilo dosáhnout poměrně homogenních výsledků se statisticky významnými trendy i rozdíly (Luchette 2002, Dewachter 2005).

Sami jsme publikovali metodickou studii (Šitina 2007, viz oddíl 1. v části B Experimentální práce), kdy jsme na modelu objemově kontrolovaného hemoragického šoku u potkana testovali schopnost indikátorové mikrodialyzační techniky kvantitativně posoudit tkáňovou perfuzi. Zatímco střední arteriální tlak signifikantně klesal a koncentrace laktátu v mikrodialyzátu i poměr L/P signifikantně rostly s krevními ztrátami, poměr  $C_{out}/C_{in}$  byl



během celého experimentu totožný u experimentální i kontrolní skupiny, bez vztahu ke krevním ztrátám.

### 3.5.6. Zhodnocení indikátorové mikrodialýzy

Indikátorové mikrodialyzační techniky jsou schopny posoudit tkáňovou perfuzi jen přibližně a spíše semikvantitativně. Základním podmínkou získání co nejpřesnějších výsledků je maximální konzistentnost celého postupu (zavedení sondy - místo, hloubka, nehybnost sondy i tkáně, zcela neměnné podmínky při odběru vzorků a jejich analýze), což je v podmínkách *in vivo* prakticky nemožné. Přestože se v některých *in vivo* studiích podařilo dosáhnout poměrně homogenních a statisticky významných výsledků, možnost uplatnění indikátorové mikrodialyzační metody v klinické praxi je dle našeho názoru minimální.

## 3.6. Kvantitativní parametry k popisu mikrocirkulace

Pro dobrou představu o perfuzi tkáně je nutné posoudit hustotu kapilární sítě, průtok kapilární sítě (rychlost toku) a heterogenitu perfuze. Morfologické zobrazovací metody (intravitální mikroskopie, OPS a SDF) jsou variantami mikroskopie, mohou proto k popisu mikrocirkulace používat stejné parametry. Expertní skupinou bylo v roce 2007 (De Backer 2007) navrženo užívání následujících jednotných parametrů k popisu mikrocirkulace.

Celková hustota cév (*total vessel density*, TVD) vyjadřuje hustotu cévní sítě v zorném poli bez ohledu na velikost cévy. De Backer (De Backer 2002) navrhl TVD vyjadřovat jako počet průsečíků cévní sítě s 6 arbitrárními úsečkami (3 svislými a 3 vodorovnými) nakreslenými na obrazu mikrocirkulace dělený součtem délky všech 6 úseček, tzv. De Backer skóre, v jednotkách  $\text{mm}^{-1}$  (Obr. 23 A). Tento parametr se nemění s velikostí zorného pole (tj. se zvětšením), je však citlivý na dodatečné zpracovávání záznamu, kdy může dojít ke zmenšení zobrazované oblasti (a tudíž počtu průsečíků), aniž by bylo současně uváženo odpovídající zkrácení úseček. Při dostupnosti softwaru pro zpracování obrazu (např. AVA z Academic Medical Centre, Nizozemí) je alternativou (Nolte 1995) vyjádření hustoty cév jako podílu celkové délky cév (všech či pouze malých) v zorném poli a plochy zorného pole (v jednotkách  $\text{mm}/\text{mm}^2$ ). Obě vyjádření hustoty jsou spojitě proměnné a mají dobrou reprodukovatelnost (podobný výsledek při opakovaných měřeních) (De Backer 2002).

Hustota malých cév (*small vessel density*, SVD) je ekvivalentem TVD, kde jsou ovšem započítávány pouze malé cévy (obvykle s průměrem pod 20-25  $\mu\text{m}$ , menší než venuly), které se účastní vlastní výměny metabolitů s intersticiem. Vzhledem k fenoménu *vasomotion*, kdy je část malých cév intermitentně uzavřena (krev v nich stagnuje, případně krev vůbec

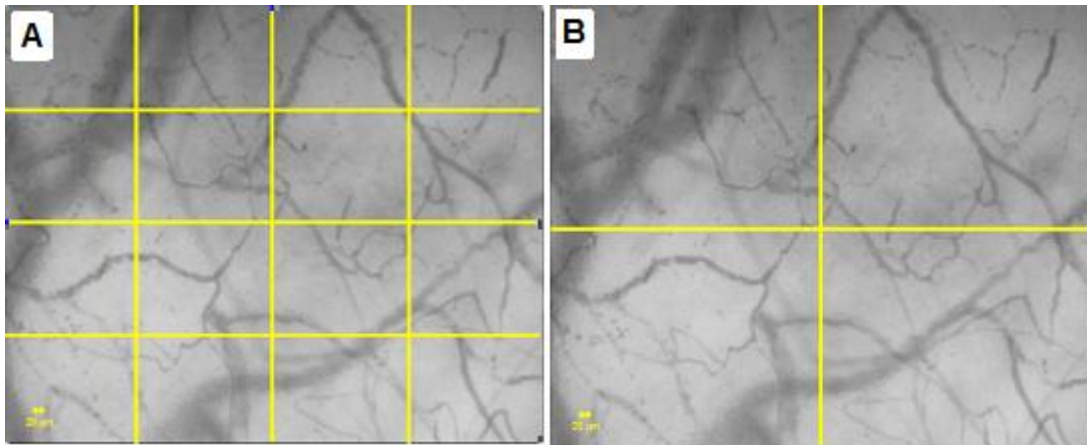
neobsahují a nejsou tudíž patrné při použití IVM či OPS a SDF), může při změně metabolismu tkáně dojít ke změně hustoty viditelné cévní sítě. „Potenciální“ hustota všech případně využitelných cév není výše zmíněnými metodami zjistitelná.

V části cév je sice krev přítomna, ale tok v nich je natolik pomalý, že se tyto cévy funkčně prakticky neuplatňují. V De Backerově systému je zavedeno semikvantitativní skóre, kdy se prostým okem posuzuje tok v jednotlivých cévách: tok přítomný (kontinuální během alespoň dvacetisekundového záznamu), nepřítomný (stagnující krev v cévě) a intermitentní (střídá se období toku a stagnace). Funkčně se uplatňuje pouze přítomný tok. Byly proto zavedeny parametry Procento perfundovaných cév a Procento perfundovaných malých cév (PPV). Vynásobením TVD nebo SVD lze získat Hustotu perfundovaných cév a Hustotu perfundovaných malých cév (*Perfused small vessel density*, PVD). PVD nejlépe vyjadřuje hustotu funkčně se uplatňující cévní sítě, je odhadem Funkční kapilární hustoty (FCD).

PPV nepřímo informuje o rychlosti toku, současná znalost SVD a PPV dává i nepřímou představu o heterogenitě toku. Lepším parametrem pro popis rychlosti i heterogenity toku je semikvantitativní *Microvascular flow index* (MFI) (Spronk 2002). Při jeho výpočtu se zorné pole rozdělí na 4 pomyslné kvadranty (Obr. 23. B), každému kvadrantu se odhadem (dle převažující perfuze) přiřadí hodnota 0-3 a získané 4 hodnoty se zprůměrují. Hodnota 0 odpovídá převažujícímu nepřítomnému toku, hodnota 1 intermitentnímu toku, hodnota 2 toku kontinuálnímu obleněnému a hodnota 3 rychlému normálnímu toku. Nevýhodou indexu je jeho kategorická povaha, tj. rozdíl mezi hodnotami nemá „fyzikální“ smysl (např. nárůst z hodnoty 1 na 2 není stejný jako nárůst z 2 na 3). Měření rychlosti toku v jednotlivých kapilárách (oddíl 3.3.2) je časově velmi náročné a přínos takového měření oproti rychlému „odhadu“ neprokázaný.

Trzeciak navrhl a použil Index heterogenity, kdy z 3-5 různých zorných polí je vybrán kvadrant s nejvyšším ( $MFI_{max}$ ) a nejnižším ( $MFI_{min}$ ) MFI, a index je vypočten jako  $(MFI_{max} - MFI_{min}) / \text{průměrný MFI ve všech kvadrantech}$  (Trzeciak 2007).

Některé orgány mají specifickou morfologii a používají se proto specifické parametry k popisu mikrocirkulace (např. hustota sinusoidálních kapilár u jater či klků u střev).



**Obr. 23** Způsob určení A-De Backerova skóre a B- MFI.  
Převzato z De Backer 2007.

### **3.7. Doporučení pro snímání a analýzu obrazů mikrocirkulace**

Existují nemalé rozdíly mezi jednotlivými zobrazenými poli. Všechny parametry uvedené v oddílu 3.6 by měly být průměrem z 3-5 různých zorných polí. Je nutno se vyvarovat tlakových artefaktů, např. použitím speciálních nosičů sond umožňujících mikropohyb ke tkáni a od ní. Pro posouzení kontinuity toku je vhodný záznam o délce alespoň 20 sekund. Takto dlouhý záznam je paměťově velmi náročný na zálohové médium (50-100 MB na 20 sekund). Záznam je nutno pořídít v nekomprimovaném formátu.

## **B. Experimentální práce**

## **Cíle a hypotézy experimentálních prací**

Cílem studie „In vivo validita indikátorové mikrodialyzační techniky pro hodnocení tkáňové perfuze” bylo posoudit schopnost indikátorové mikrodialyzační techniky se značenou vodou jako indikátorem kvantitativně posoudit změny lokálního průtoku krve v kosterním svalu a játrech na modelu hemoragického šoku u potkana. Testovaná hypotéza předpokládala korelaci mezi aktivitou značeného indikátoru a stupněm tkáňové hypoperfuze vyplývající z krevní ztráty.

Cílem studie „Vliv střední hypotermie na mozkovou autoregulaci“ bylo zjistit, zda samotná střední hypotermie, bez současného cerebrálního inzultu, ovlivňuje mozkovou autoregulaci. Testovaná hypotéza předpokládala, že střední hypotermie zhoršuje funkci mozkové autoregulace.

Cílem teoretické studie „Faktory ovlivňující Transient hyperaemic response (THR) test mozkové autoregulace” bylo pomocí matematického modelu mozkové cirkulace posoudit vliv „vnitřních“ faktorů na výsledek THR testu: vliv setrvačnosti (zrychlení) toku v karotidě (a souvisejících faktorů – délka a průměr karotidy, srdeční frekvence), vliv opožděného (asynchronního) uvolnění karotidy oproti počátku systolického vzestupu arteriálního tlaku („fázový posun“) a vliv průchodnosti Willisova okruhu.

Cílem studie „Posouzení mozkové mikrocirkulace in situ u mechanicky ventilovaných králíků pomocí Sidestream dark-field (SDF) zobrazení“ bylo posoudit proveditelnost a přesnost in situ zobrazení povrchové (piální) mozkové mikrocirkulace pomocí SDF a určit základní parametry mozkové mikrocirkulace u králíků.

Cílem studie „Zachovaná mikrocirkulace mozku v časném stádiu endotoxémie u mechanicky ventilovaných králíků” bylo vyšetřit změny v povrchové (piální) mozkové mikrocirkulaci po podání endotoxinu u králíků. Testovaná hypotéza předpokládala alteraci mozkové mikrocirkulace v časném stádiu endotoxémie.

# In vivo validita indikátorové mikrodialyzační techniky pro hodnocení tkáňové perfuze

## Úvod

Indikátorová mikrodialyzační technika (Černý 2006) je jednou z řady metod určených k měření regionální tkáňové perfuze, která využívá závislosti mezi perfuzí tkáně a rychlostí eliminace indikátoru z mikrodialyzační sondy. Metoda je založena na předpokladu, že molekuly indikátoru, které difundují dialyzační membránou mikrodialyzační sondy do intersticia, jsou zčásti eliminovány z intersticia resorpcí do krevních kapilár, přičemž tato eliminace vzrůstá s rostoucím průtokem krve tkání (Wallgren 1995, Stahle 2000). Poměr koncentrace resp. aktivity indikátoru (v případě radioaktivního indikátoru) na výstupu a vstupu sondy ( $C_{out}/C_{in}$  resp.  $A_{out}/A_{in}$ ) by měl být úměrný tkáňové perfuzi a využitelný pro její měření. Závěry dosud provedených studií používajících indikátorovou mikrodialyzační techniku k hodnocení tkáňové perfuze (Stallknecht 1999, Hickner 1995, Radegran 1998, Newman 2001, Luchette 2002, Dewachter 2005) jsou rozporné.

Cílem této studie bylo posoudit schopnost indikátorové mikrodialyzační techniky detekovat změny tkáňové perfuze na modelu hemoragického šoku potkana. Testovaná hypotéza předpokládá korelaci mezi aktivitou značeného indikátoru a stupněm tkáňové hypoperfuzie vyplývající z krevní ztráty.

## Materiály a metody

Komise na ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové schválila protokol této studie. Studie byla provedena v souladu s obvyklými pravidly humánního zacházení s experimentálními zvířaty.

Jako experimentální zvířata jsme použili samce potkanů kmene Wistar o hmotnosti 280–320 g (objem krve 6–7 ml/100g). Jeden den před zahájením experimentu byly v celkové anestezii (50 mg/kg Pentobarbitalu intraperitoneálně i.p.) vypreparovány levá *a. carotis* a pravá *v. jugularis* a byly do nich zavedeny plastové kanyly s utěsněnými konci vyplněné heparinem. Po odeznění efektu anestezie byla zvířata vrácena do kotců. Následující den před zahájením experimentu byla zvířata znovu uvedena do celkové anestezie (50 mg/kg Pentobarbitalu i.p.) a přifixována k operačnímu stolu. Arteriální kanyla byla připojena k monitoru arteriálního tlaku a žilní kanyla ke stříkačce s fyziologickým roztokem. Poté byla provedena tracheotomie horizontálním řezem těsně pod úrovní chrupavek hrtanu a tenká (16

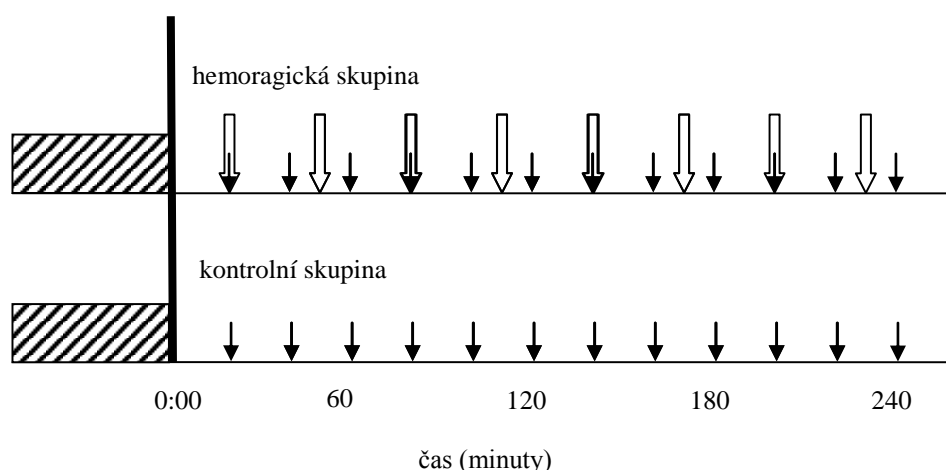
G) plastová kanyla o délce 30 mm byla zavedena do trachey 8-10 mm pod incizi a přifixována k průdušnici. Zvířata byla ponechána spontánně ventilující. Anestezie byla udržována intermitentní aplikací 10 mg/kg Pentobarbitalu i.p. při známkách nedostatečné hloubky anestezie (t.j. pohyby vousů, čelisti, končetin nebo náhlý nárůst arteriálního krevního tlaku apod.). Střední arteriální tlak a rektální teplota byly kontinuálně monitorovány (monitor Datex-Ohmeda, USA), teplota byla udržována pomocí termolampy v rozmezí 36,5 – 38,0 °C.

Mikrodialyzační sondy: První sonda (CMA20, CMA, Švédsko) byla po pečlivé chirurgické přípravě zavedena do levého m. quadriceps femoris do hloubky zhruba 20 mm a poté byla fixována ke kůži. Druhá sonda (CMA20, CMA, Švédsko) byla zavedena do pravého mediálního laloku jater horní střední laparotomií. Před zavedením vlastní mikrodialyzační sondy bylo jaterní pouzdro perforováno 18G jehlou.

Zvířata byla rozdělena do dvou skupin – hemoragické a kontrolní. V hemoragické skupině byl navozen kontrolovaný hemoragický šok opakovanými (každých 30 minut) odběry 1 ml krve z jugulární žíly až do úmrtí zvířete. První odběr krve proběhl 20 minut po začátku experimentu. V kontrolní skupině nebyly krevní odběry prováděny, po 4 hodinách byla zvířata usmrcena exsanguinací (Obr. 1).

Mikrodialyzační sondy byly připojeny k 1 ml stříkačkám (CMA102, CMA, Švédsko) naplněným fyziologickým roztokem s příměsí  $^3\text{H}_2\text{O}$  tak, aby nedošlo k průniku vzduchu do sondy. Před začátkem vlastního experimentu byly sondy 30 minut *in situ* promývány fyziologickým roztokem obsahujícím indikátor (značená voda  $^3\text{H}_2\text{O}$ , aktivita perfuzátu zhruba 15kBq/ml) rychlostí 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ . pomocí mikrodialyzační pumpy (CMA102, CMA, Švédsko). Během experimentu byla sonda nadále promývána stejným roztokem rychlostí 2  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Dialyzát byl sbírán do plastových mikrozkušavek ve dvacetiminutových intervalech (zhruba 40  $\mu\text{l}$  dialyzátu na vzorek). Prvně byla zkumavka vyměněna (t.j. odebrán dialyzát) 20 minut po začátku experimentu, těsně před prvním odběrem krve.

Aktivita  $^3\text{H}_2\text{O}$  ve vzorcích byla stanovena týž den po ukončení experimentu. 15 $\mu\text{l}$  vzorku bylo napipetováno do 10 ml Brayova roztoku (převádí beta záření na světelné scintilace) a scintilace, tj. aktivita, roztoku byla měřena analyzátozem LS6000 (Beckman Instruments, USA). Ze změřené aktivity dialyzátu ( $A_{\text{out}}$ ) a perfuzátu ( $A_{\text{in}}$ ) byl dopočítán poměr aktivit  $A_{\text{out}}/A_{\text{in}}$ . Zbývající vzorek dialyzátu byl uchován pro další analýzu při – 5 °C. Po rozmražení byla stanovena koncentrace laktátu a pyruvátu a dopočítán poměr laktát pyruvát (L/P). Analýza laktátu i pyruvátu byla provedena pomocí analyzátoru ISCUS (CMA, Švédsko) enzymatickou metodou.



**Obr. 1** Uspořádání experimentu.

Šrafovaná oblast – příprava zvířete a proplach sond, prázdná šipka – odběr 1 ml krve, plná šipka – výměna mikrozkuřavky s dialyzátem.

Statistické zpracování bylo provedeno pomocí programu MedCalc (verze 8.1.1.0). Výsledky jsou uvedeny jako skupinový průměr a 95 % interval spolehlivosti. Normalita dat byla ověřena  $\chi^2$  testem. Meziskupinové rozdíly ve stejném čase byly hodnoceny T testem, nelineární korelace mezi hodnotami byla posuzována Spearmanovým koeficientem nelineární korelace. Hladina statistické významnosti byla zvolena 0,05.

## Výsledky

8 zvířat bylo zařazeno do hemoragické skupiny a 4 zvířata do kontrolní skupiny. Do hemoragické skupiny bylo zařazeno více zvířat z důvodu vyšší variability.

### *Krevní tlak*

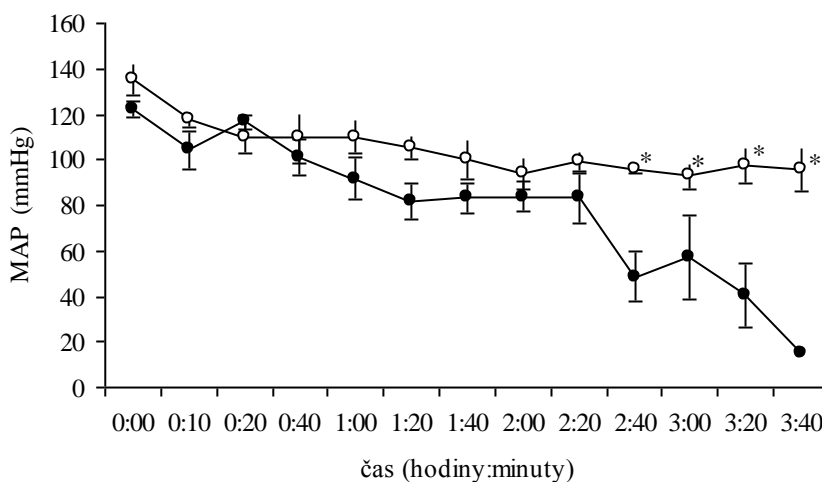
Hodnoty středního arteriálního tlaku (MAP) jsou uvedeny na Obr. 2. V prvních 140 minutách nebyly zjištěny žádné rozdíly v hodnotách MAP mezi skupinami. Od 160. Minuty experimentu dále byly hodnoty MAP signifikantně nižší v hemoragické skupině než v kontrolní. Zjistili jsme negativní korelaci mezi krevní ztrátou a středním arteriálním tlakem ( $r = -0,572, p < 0,0001$ ). V kontrolní skupině došlo k signifikantnímu poklesu MAP vůči vstupní hodnotě.

### *Značená voda*

Časový vývoj poměru  $A_{out}/A_{in}$  pro játra a sval je zobrazen na Obr. 3a a 3b. Během celého experimentu nedosahovaly rozdíly poměru  $A_{out}/A_{in}$  mezi kontrolní a hemoragickou skupinou



statistické významnosti. Nebyla zjištěna signifikantní korelace mezi krevními ztrátami a poměrem  $A_{out}/A_{in}$  ( $r = 0,323$  pro játra,  $r = 0,300$  pro sval) ani mezi středním arteriálním tlakem a poměrem  $A_{out}/A_{in}$  ( $r = 0,460$  pro játra,  $r = -0,301$  pro sval) ani mezi koncentrací laktátu a poměrem  $A_{out}/A_{in}$  ( $r = -0,237$  pro játra,  $r = 0,454$  pro sval). V hemoragické skupině se poměr  $A_{out}/A_{in}$  pohyboval mezi 0,64 – 0,70 pro játra a 0,71 – 0,76 pro sval, v kontrolní skupině mezi 0,61 – 0,65 pro játra a 0,78 – 0,84 pro sval.

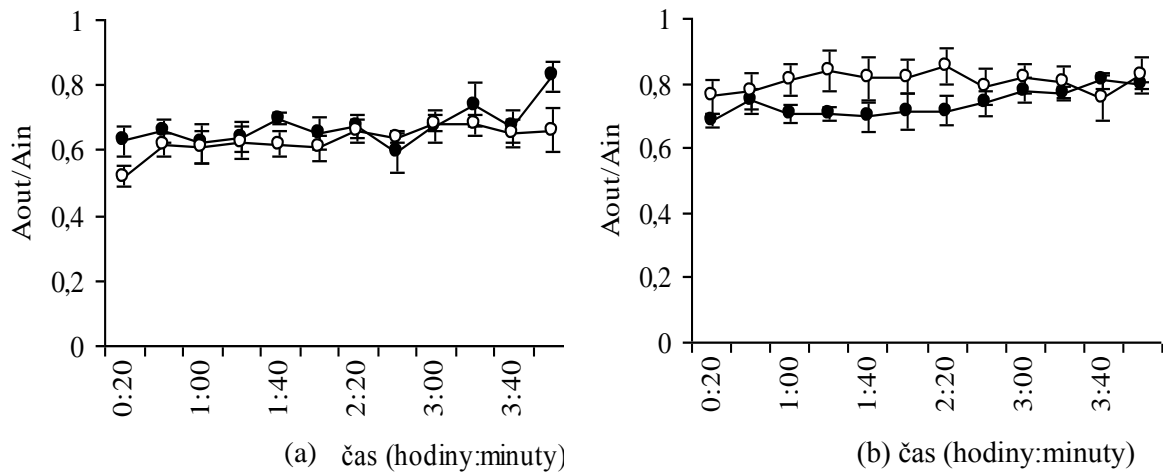


**Obr. 2** Časový průběh středního arteriálního tlaku (MAP).  
 Plné body – hemoragická skupina, prázdné body – kontrolní skupina.  
 \* - statisticky signifikantní výsledky

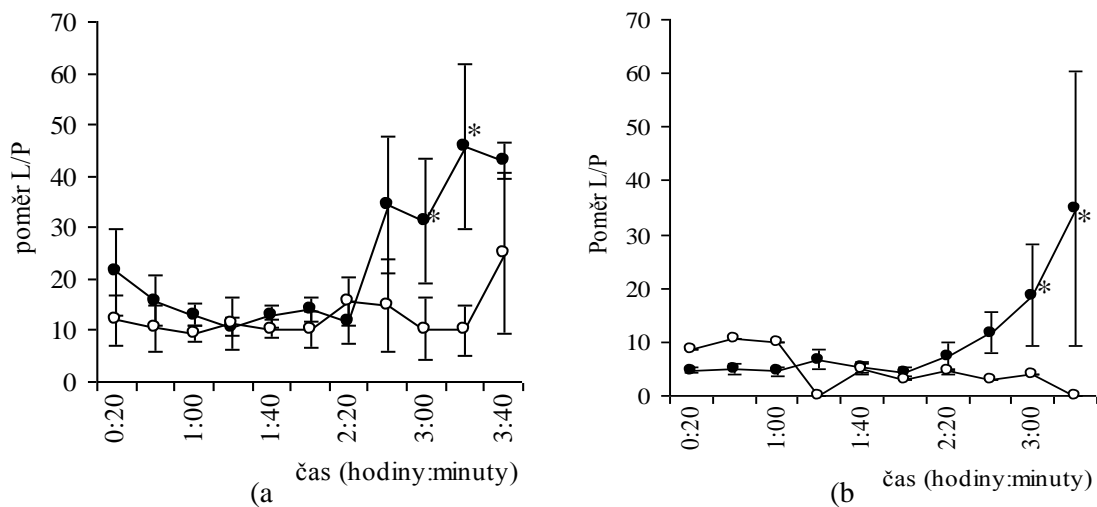
#### *Laktát, pyruvát a poměr laktát/pyruvát*

Poměry L/P pro játra a sval jsou zobrazeny na Obr. 4a a 4b. Koncentrace laktátu z jater a svalu jsou uvedeny na Obr. 5a a 5b. Během prvních 180 minut se poměry L/P mezi kontrolní a hemoragickou skupinou pro játra ani sval signifikantně nelišily. Od 180. minuty dále byly poměry L/P z jater i svalu signifikantně vyšší v hemoragické skupině než v kontrolní skupině, kde se poměr L/P neměnil. Podobný časový vývoj byl pozorován pro laktát ze svalu i jater. Od 160. minuty dále koncentrace laktátu v hemoragické skupině rostla, zatímco v kontrolní skupině zůstala neměnná. Koncentrace laktátu z jater byla 2-4 násobně vyšší než ze svalu během celého experimentu. Koncentrace pyruvátu byly v obou skupinách stejné během celého experimentu a v čase se neměnily. Zjistili jsme signifikantní korelaci mezi krevní ztrátou a koncentrací laktátu ze svalu ( $r = 0,619$ ,  $p < 0,0001$ ) a krevní ztrátou a poměrem L/P ze svalu ( $r = 0,546$ ,  $p < 0,0001$ ). Nebyly zjištěny signifikantní korelace mezi krevní ztrátou a laktátem z jater ( $r = 0,370$ ), krevní ztrátou a poměrem L/P z jater ( $r = 0,403$ ) a mezi středním

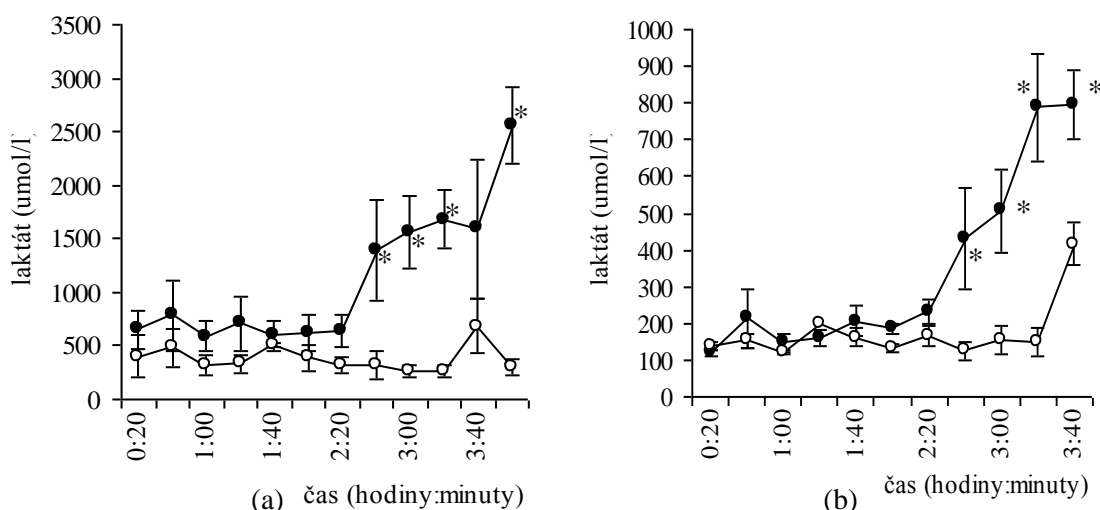
arteriálním tlakem a laktátem i poměrem L/P ze svalu i jater. Podobně nebyla nalezena korelace mezi laktátem ani poměrem L/P a poměrem  $A_{out}/A_{in}$  pro játra ani sval.



**Obr. 3 Časový průběh poměru  $A_{out}/A_{in}$  pro játra (a) a sval (b).**  
 $A_{out}$  – aktivita dialyzátu,  $A_{in}$  – aktivita perfuzátu, plné body – hemoragická skupina, prázdné body – kontrolní skupina.



**Obr. 4 Časový průběh poměru L/P pro játra (a) a sval (b).**  
 Plné body – hemoragická skupina, prázdné body – kontrolní skupina, \* - statisticky signifikantní rozdíl.



**Obr. 5** Časový průběh koncentrace laktátu pro játra (a) a sval (b).

Plné body – hemoragická skupina, prázdné body – kontrolní skupina, \* - statisticky signifikantní rozdíl.

## Diskuze

Ze získaných výsledků je zřejmé, že změny poměru  $A_{out}/A_{in}$  nekorelují se stupněm krevních ztrát ani s dalšími markery hypoperfuze (krevní tlak, laktát, poměr L/P). Nicméně signifikantní pokles MAP spolu s nárůstem koncentrace laktátu a poměru L/P v dialyzátu naznačují, že použitý model objemově kontrolovaného krvácení vedl k rozvoji šoku s tkáňovou hypoperfuzí (Eldridge 1974).

Příčiny neúspěchu indikátorové techniky mohou být četné. První metodologická studie (Hickner 1995) indikátorové mikrodialýzy posuzovala metodu na modelu uměle kontrolované perfuze s definovaným a neměnných průtokem končetinou. Autoři dosáhli velmi přesné lineární závislosti mezi poměrem  $C_{out}/C_{in}$  a perfuzí tkáně v jistém rozmezí krevního průtoku. Současně zjistili, že rozptyl tohoto poměru při opakovaných stanoveních z jedné sondy s identickým průtokem krve (t.j. časová heterogenita) se pohyboval mezi 3-18 % (střední koeficient rozptylu) a rozptyl poměrů mezi různými sondami ve stejném časovém okamžiku při stejném průtoku krve (t.j. prostorová heterogenita) se pohyboval mezi 4 % až dokonce 59 %. Příčinou jsou zřejmě nesteré difúzní vlastnosti molekul v různých oblastech tkáně spolu s nehomogenní prostorovou i časovou distribucí perfuze tkáně. Pokud navíc uvážíme, že u živých zvířat, oproti modelu s kontrolovanou perfuzí, není ani globální perfuze, určená zejména srdečním výdejem a regionální cévní rezistencí, konstantní, pak je zjevné, že porovnání měření mezi jednotlivými zvířaty je velmi obtížné.

V podobné studii (Stallknecht 1999) s kontrolovanou perfuzí vedlo trojnásobné zvýšení perfuze ke změně poměru  $C_{out}/C_{in}$  pouze o 0,05, tedy o 5 % z maximální hodnoty. Změření takto malého rozdílu vyžaduje pro in vivo studii téměř nedosažitelnou přesnost provedení mikrodialýzy i analýzy vzorku. Například chyba při měření aktivity pomocí analyzátoru LS Beckmann se pohybuje okolo 2% a ještě více pro poměr aktivit. Dalším možným zdrojem chyby je nepřesnost při pipetování velmi malých objemů vzorku. Možným řešením je buď zvýšení rychlosti promývání sondy, což ovšem současně zvyšuje poměr  $C_{out}/C_{in}$  a tedy snižuje přesnost metody, nebo prodloužení doby sběru dialyzátu, což ovšem znemožňuje detekci rychlých změn tkáňové perfuze. Dalším rušivým faktorem je pohyb tkáně, kde je zavedena sonda (např. respirační souhyb jater), který podstatně ovlivňuje poměr  $A_{out}/A_{in}$ , jak bylo demonstrováno ve studii na zdravých dobrovolnících (Radegran 1998).

Díky nelineární závislosti poměru  $C_{out}/C_{in}$  na tkáňové perfuzi (Wallgren 1995) poměr  $C_{out}/C_{in}$  rychle roste s klesající tkáňovou perfuzí, což je příznivý faktor. Současně se však s klesající perfuzí prodlužuje doba do dosažení ustáleného stavu, kdy se pro danou tkáňovou perfuzi poměr  $C_{out}/C_{in}$  již dále nemění. Poměr  $C_{out}/C_{in}$  je však úměrný tkáňové perfuzi pouze během ustáleného stavu. Toto znesnadňuje měření rychlých změn průtoku při nízké tkáňové perfuzi, protože poměr  $C_{out}/C_{in}$  v neustáleném stavu neodpovídá skutečné tkáňové perfuzi (Stallknecht 1999).

Setrvalý pokles středního arteriálního tlaku není patrný pouze v hemoragické skupině, nýbrž i v kontrolní skupině. Příčinou může být jednak mírná hypovolémie, jednak efekt anestezie Pentobarbitalem. Ačkoli nelze vyloučit i mírný setrvalý pokles tkáňové perfuze v kontrolní skupině, lze předpokládat, že tkáňová perfuze byla nižší v hemoragické skupině, vzhledem k nižšímu střednímu arteriálnímu tlaku a vyššímu laktátu v mikrodialyzátu. Pouhý efekt anestezie nebo hypovolémie v kontrolní skupině tedy dostatečně nevysvětluje negativní výsledek studie.

Jistou limitací našich výsledků je nízký počet zvířat zařazených do studie. Z jistého pohledu je však tento počet postačující. Nelze sice vyloučit, že by zvětšení rozsahu souboru vedlo ke statisticky signifikantním rozdílům mezi skupinami, absence měřeného rozdílu při stávajícím počtu zvířat však nepochybně značí, že metoda není dostatečně přesná např. pro využití v klinické medicíně.

Je cenné poznamenat, že se koncentrace laktátu a poměr L/P, v kontrastu s poměrem  $A_{out}/A_{in}$ , zvýšily během rozvoje šoku několikanásobně. Monitorování koncentrace laktátu a poměru L/P pomocí mikrodialýzy se tedy zdá být vhodnější metodou pro sledování stupně tkáňové hypoperfuze než indikátorová mikrodialyzační technika s  $^3\text{H}_2\text{O}$ .

## **Závěr**

Na modelu objemově kontrolovaného hemoragického šoku u potkanů jsme hodnotili schopnost indikátorové mikrodialyzační techniky kvantitativně posoudit tkáňovou perfuzi. Zjistili jsme, že zatímco střední arteriální tlak významně klesl a koncentrace laktátu a poměru L/P v mikrodialyzátu významně vzrostly s rostoucí krevní ztrátou, korelace mezi krevní ztrátou a poměrem  $A_{\text{out}}/A_{\text{in}}$  nedosáhla statistické významnosti a poměr  $A_{\text{out}}/A_{\text{in}}$  se nelišil mezi kontrolní a hemoragickou skupinou. Schopnost indikátorové mikrodialyzační techniky posoudit změny tkáňové perfuze se tedy zdá být nízká a její klinické využití metody je dle našeho názoru prakticky vyloučeno.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MZO 00179906

ŠITINA, M., ČERNÝ, V. Evaluating tissue perfusion using labelled water indicator microdialysis in a rat model of haemorrhagic shock. *Physiological Measurement*. June 2007, vol. 28, No. 6, s. 689-696.

# Vliv střední hypotermie na mozkovou autoregulaci

## Úvod

Mozková tlaková autoregulace zajišťuje v příslušném rozmezí perfuzních tlaků konstantní průtok krve mozkem i přes měnící se perfuzní tlak. Řada faktorů ovlivňuje funkci mozkové autoregulace (Paulson 1990). Jedním z faktorů, jehož význam pro funkci mozkové autoregulace není dosud spolehlivě popsán, je hypotermie. Střední hypotermie okolo 33 °C je přitom stále častěji užívána jako součást postupů ochrany mozku po kardiopulmonální resuscitaci (Geocardin 2006), případně i při kraniocerebrálním poranění (Jiang 2006) či mozkové ischémii (Hemmen 2004). Zachování funkce mozkové autoregulace během hypotermie je důležitým předpokladem pro protektivní užití hypotermie u těchto stavů, kde významné změny systémového arteriálního tlaku (s potenciálem navození další ischémie mozku) jsou běžnou součástí. Cílem této studie bylo zjistit, zda samotná střední hypotermie, bez současného cerebrálního infarktu, ovlivňuje mozkovou autoregulaci.

## Materiály a metody

Studie byla provedena na 7 samicích prasete domácího o hmotnosti 48-60 kg. Protokol studie byl schválen Odbornou komisí pro ochranu zvířat proti týrání Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzity Obrany. Studie byla prováděna v souladu se standardními pravidly pro humánní zacházení s experimentálními zvířaty.

### *Stručný popis experimentu*

12 hodin před zahájením experimentu zvíře lačnilo. Poté bylo intramuskulárně cestou uvedeno do anestezie, byl zajištěn periferní žilní přístup, zaveden rektální teploměr a arteriální katetr do pravé a. femoralis. V kombinaci lokální a celkové anestezie byla za spontánní ventilace provedena tracheotomie a zavedena tracheální kanyla. Byly kontinuálně monitorovány: EKG, invazivně arteriální tlak, saturace hemoglobinu kyslíkem pomocí oxymetru (SaO<sub>2</sub>), parciální tlak oxidu uhličitého na konci výdechu (EtCO<sub>2</sub>) a rektální teplota (Datex-Ohmeda monitor, USA). Po zahájení intravenózní analgosedace a myorelaxace bylo prase připojeno k ventilátoru. Byla vypreparována levá a. carotis a založena její uvolnitelná klampáž. Po otočení prasete na pravý bok byl levým temporálním oknem transkraniálně snímán dopplerovský ultrazvukový signál z levé a. cerebri media (ACM), sonda byla fixována v neměnné poloze. Zahřívací dečkou (Warmtouch, DK Heating Systems, USA) byla tělesná

teplota zvířete udržována na 37 °C. Po klidové periodě 60 minut byl proveden test autoregulace. Poté byla indukována hypotermie okolo 33 °C kombinací zevního a vnitřního chlazení a znovu byl proveden test autoregulace. Po ukončení experimentu bylo zvíře utraceno aplikací letální dávky T61 (0,3 ml/kg T61, Hoechst AG, Frankfurt, Germany; směs embutramid, mebezonium jodid, tetrakain hydrochlorid).

#### *Analgoosedace, myorelaxace, umělá plicní ventilace, příjem tekutin*

Úvod do anestezie byl proveden intramuskulární aplikací směsi ketaminu 20 mg/kg (Narkamon, Zentiva, Praha, Česká republika), azaperonu 2 mg/kg (Stresnil, Nanesen, Beerse, Belgie) a atropinu 0,05 mg/kg (Atropin, Hoechst-Biotika, Martin, Slovensko).

Kontinuální sedace byla udržována kombinací midazolamu 1 mg/kg/hod. (Dormicum, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Bazilej, Švýcarsko) a fentanylu 10 µg/kg/hod. (Fentanyl Torrex, Torrex Pharma GmbH, Sien, Rakousko), myorelaxace byla udržována pankuroniem 0,3 mg/kg/hod (Pavulon, N.V. Organon, Oss, Nizozemí).

K mechanické ventilaci byl použit ventilátor Siemens Servo 900C, režim CMV, dechový objem 10 ml/kg, dechová frekvence 20 dechů/min., FiO<sub>2</sub> 0,4. Ventilační parametry byly individuálně upraveny k dosažení hodnoty EtCO<sub>2</sub> 38-42 mmHg při normotermii i hypotermii.

Bazální příjem tekutin činil 15 ml/kg/hod. fyziologického roztoku. Další tekutiny (maximálně 80 ml/kg fyziologického roztoku) byly podány během chlazení zvířete.

#### *Tracheotomie*

Podkoží krku v okolí střední čáry 10 cm nad jugulem bylo infiltrováno 1% trimekainem (Mesocain, Zentiva, Praha, Česká republika). Byl proveden 5 cm kožní řez ve střední čáře, krvácení bylo stavěno kompresí peánem. Jednotlivé vrstvy podkoží a přední krční fascie byly tupě preparovány, až byla dostatečně ozřejmena trachea. Mezi 1. a 2. prstencem trachey byl proříznut příčný otvor délky 1 cm, kudy byla zavedena tracheální rourka velikosti 7 do vzdálenosti 18 cm od tracheální incize. Symetrie dýchání byla ověřena auskultací.

#### *Preparace karotické arterie*

Podkoží krku vlevo mediálně od *m. sternocleidomastoideus* v oblasti *trigonum caroticum* bylo infiltrováno 1% trimekainem. Byl proveden 6 cm kožní řez infiltrovanou oblastí, krvácení bylo stavěno kompresí peánem. Jednotlivé vrstvy podkoží, *m. platysma* a krční fascie byly tupě preparovány, až byl ozřejmen nervově-cévní svazek, jehož jednotlivé struktury byly tupě rozpreparovány. Poté byla pod levou a. carotis podvléknuta gumová

hadička, jejíž konce byly protaženy větší gumovou hadičkou (turniketem) umožňujícím intermitentní kompresi karotidy při zatažení.

### *Indukce hypotermie*

Ochlazení na 33 °C bylo docíleno kombinací vnitřního chlazení pomocí infuze chlazeného fyziologického roztoku (4 °C, rychlost podání 60 ml/kg/hod, maximální dávka 80 ml/kg) a zevního chlazení pomocí studených roušek rozprostřených po povrchu těla.

### *Měření průtoku krve mozkem a testování autoregulace*

Průtok krve mozkem byl nepřímo posuzován transkraniálním měřením rychlosti průtoku v ACM pomocí dopplerovské ultrazvukové sondy (TCD). Byl použit přístroj DWL Multidop X4 RC (DWL, Sippligen, Německo) s 2 MHz transkraniální pulzní dopplerovskou sondou (Moppet 2004).

Oblast levého temporálního okna - plocha asi 2x1,5cm dorzálně od zadního okraje orbity - byla oholena a levá ACM byla zaměřena v hloubce 32-35 mm. Sonda byla stabilizována v neměnné poloze pomocí speciálně konstruovaného fixátoru.

Ze snímané křivky rychlosti průtoku v čase byla zaznamenána střední rychlost průtoku (FVmean). Z FVmean a středního arteriálního tlaku (MAP) byla dopočtena mozková cévní rezistence (CVR<sub>v</sub>) podle vztahu  $CVR_v = MAP/FV_{mean}$ .

THR (Transient hyperemic response) test autoregulace: Levá společná a. carotis byla po dobu 20 sekund komprimována podvléknutou gumovou hadičkou, poté byla komprese ihned uvolněna. Během testu byly zaznamenány FVmean před kompresí, FVmean během komprese a FVmean z 1. pulzu rychlosti ihned po uvolnění komprese. Byly dopočteny poměr THRR (Transient hyperemic response ratio) = FVmean bezprostředně po uvolnění komprese/FVmean před kompresí, a Kompresivní poměr CR (*Compressive ratio*) = (FVmean před kompresí - FVmean během komprese)/FVmean před kompresí. Test byl při každé teplotě proveden dvakrát s přestávkou v trvání 2 minut mezi jednotlivými měřeními.

### *Statistické zpracování*

Statistická analýza byla provedena pomocí programu MedCalc verze 8.1.1.0. Normalita dat byla ověřena Kolmogorovým-Smirnovým testem. T test byl použit pro meziskupinová porovnání (normotermie vs. hypotermie). Hladina statistické významnosti byla zvolena 0,05. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± střední chyba průměru.



## Výsledky

Při normotermii se tělesná teplota pohybovala mezi 36,3 a 37,3 °C u všech zvířat, při hypotermii mezi 33,0 a 33,5 °C u 5 zvířat. U dvou zvířat se indukce hypotermie nezdařila pro rozvoj tachyarytmie během ochlazování.

Změřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 1. Během hypotermie, ve srovnání s normotermií, byly střední arteriální tlak a mozková cévní rezistence signifikantně vyšší a střední rychlost toku byla signifikantně nižší. Srdeční frekvence se s teplotou významně nezměnila.

Výsledky THR testu autoregulace jsou uvedeny v Tabulce 2. Kompresivní poměry se při testech provedených za normotermie a hypotermie významně nelišily. THR poměr byl signifikantně vyšší při hypotermii.

	normotermie	hypotermie
teplota (°C)*	36,3-37,3	33,0-33,5
MAP (mmHg)*	93±2	116±5
frekvence (1/min)	87±5	109±10
FVmean (cm/s)*	47,6±5,2	22,3±3,9
CVRv (mmHg.s/cm)*	2,2±0,3	5,5±1,1

**Tab. 1. Měřené hodnoty při normotermii a hypotermii.**

MAP = střední arteriální tlak; FVmean = střední rychlost toku v levé a. cerebri media; CVRv = mozková cévní rezistence; \*Signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ); hodnoty jsou průměr ± střední chyba průměru

	normotermie	hypotermie
CR	0,53±0,03	0,50±0,02
THRR*	0,98±0,02	1,16±0,04

**Tab. 2. Výsledky transient hyperemic response testu při normotermii a hypotermii.**

CR = kompresivní poměr; THRR = transient hyperemic response poměr; \*Signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ); hodnoty jsou průměr ± střední chyba průměru

## Diskuze

Mozková tlaková autoregulace je komplexní mechanismus udržující konstantní průtok krve mozkem při změně perfuzního tlaku. Byla navržena řada testů posuzujících funkci mozkové autoregulace (Moppett 2004). *Transient hyperemic response* test posuzuje současně dynamickou i statickou složku autoregulace, jeho výhodou je zejména snadnost provedení bez farmakologické intervence. THRR byl navržen jako parametr charakterizující funkci autoregulace při THR testu a byla prokázána jeho těsná korelace jak s testem statické autoregulace (Tibble 2001), tak s testem dynamické autoregulace (Smielewski 1996). Čím vyšší je hodnota THRR než 1, tím lépe autoregulace funguje (Tibble 2001).

Ze získaných výsledků plyne, že střední hypotermie nezhoršila funkci mozkové autoregulace testovanou THR testem.

Otázkou vlivu střední hypotermie na mozkovou autoregulaci se dosud zabývalo několik studií, s různými studovanými modely i použitými metodami. Část studií dospěla k závěru, že hypotermie neovlivňuje funkci mozkové autoregulace (Bedel 2004, Georgiadis 2002, Jalan 2001, Tahala 1988, Johnsson 1987), v části studií hypotermie zhoršovala funkci mozkové autoregulace (Verhaegen 1993, Kishi 2000, Irikura 1998).

Verhaegen (Verhaegen 1993) studoval vliv hypotermie na mozkovou autoregulaci v závislosti na přístupu k acidobazii během hypotermie. Hypotermie obecně snižovala funkci mozkové autoregulace, avšak při použití *pH-stat* režimu bylo zhoršení výraznější než při použití *alfa-stat* režimu. Autoři závěr vysvětlují relativní hyperkapnií během *pH-stat* režimu oproti *alfa-stat* režimu, která působí vazodilataci mozkových arteriol. Arterioly pak již nemohou dále dilatovat v reakci na hypotenzi, což zhoršuje funkci mozkové autoregulace.

V naší studii nebyla hodnota PaCO<sub>2</sub> měřena z arteriálních krevních plynů, ale nahrazena hodnotou EtCO<sub>2</sub>, která se ve stavu hypotermie blíží hodnotě PaCO<sub>2</sub> korigované na teplotu organismu (Sitzwohl 1998). Ventilační parametry byly přitom upraveny tak, aby se EtCO<sub>2</sub> pohybovalo kolem 40 mmHg ve stavu normotermie i hypotermie. Experimentální uspořádání tedy odpovídalo *pH-stat* režimu (Edmark 1959).

Vzhledem k minimálním změnám průměru ACM během změn perfuzního tlaku mozku odpovídají relativní změny rychlosti toku v ACM velmi přesně relativním změnám průtoku krve mozkem (Newell 1994). Obdobné tvrzení nutně platí i o mozkové cévní rezistenci dopočítané z rychlosti průtoku (CVR<sub>v</sub>). Naše výsledky ukazují, že během hypotermie došlo ke snížení průtoku krve mozkem a k nárůstu mozkové cévní rezistence. Nárůst cévní rezistence je přitom podmíněn vazokonstrikcí mozkových arteriol. Jestliže mozkové arterioly reagují na pokles průtoku krve mozkem vyvolaný během THR testu vazodilatací, pak by

hypotermie měla prostor pro vazodilataci spíše zvětšovat než zmenšovat. To může být vysvětlením, proč v naší studii hypotermie funkci mozkové autoregulace spíše mírně zesilovala, než oslabovala (THRR byl během hypotermie signifikantně vyšší než při normotermii). Naše výsledky, v rozporu s vysvětlením Verhaegena, tedy ukazují, že relativní hyperkapnie během *pH-stat* režimu oproti *alpha-stat* režimu nepřevýší vliv hypotermie na nárůst mozkové cévní rezistence.

Zajímavé by bylo studovat vliv hypotermie na výsledek testu autoregulace s indukcí hypertenze (např. infuzí noradrenalinu). Pokud je adekvátní reakcí mozkových arteriol na hypertenzi vazokonstrikce, pak je možné spekulovat, že během hypotermie je prostor pro další vazokonstrikci omezen a odpověď mozkové autoregulace na hypertenzi bude snížena. *pH-stat* režim oproti *alfa-stat* režimu by měl přitom odpověď mozkové autoregulace na hypertenzi během hypotermie spíše potencovat než oslabit. Z dostupných studií byl hypertenzní test autoregulace pro studium vlivu hypotermie použit pouze ve studii Georgiadise (Georgiadis 2002). I při použití *alpha-stat* režimu však nebyl prokázán negativní vliv střední hypotermie na mozkovou autoregulaci. Původním záměrem naší studie bylo použít hypotenzní i hypertenzní test autoregulace, pro rozvoj supraventrikulární tachykardie při aplikaci noradrenalinu během hypotermie však hypertenzní test proveden nebyl.

Během experimentu byl zvířatům podán poměrně vysoký objem krystaloidů, zejména během indukce hypotermie. Vysoký příjem tekutin by mohl zvyšovat centrální žilní tlak a tudíž snižovat perfuzní tlak mozku. Během THR testu však případný vysoký centrální žilní tlak snižuje perfuzní tlak jak před kompresí *a. carotis*, tak po uvolnění komprese. THR poměr  $F_{vmean}$  před kompresí a po kompresi by tedy neměl být podstatně ovlivněn změnou centrálního žilního tlaku. Rozdíl v THRR mezi normotermií a hypotermií tedy nemůže být jednoduše vysvětlen vysokým příjmem tekutin během ochlazování zvířete.

Diskutabilní je, proč THRR během normotermie nebyl statisticky významně odlišný od jedné, což odpovídá špatné funkci autoregulace. Z dostupné literatury vyplývá, že metoda TCD byla pro studium mozkové cirkulace u prasete použita pouze jednou (Bein 2006), nebyla přitom testována mozková autoregulace. Z této práce byly převzaty přibližné technické parametry nastavení TCD sondy včetně umístění na hlavě, hloubky snímání i orientačního úhlu zaměření. Přesné nastavení bylo upraveno u každého zvířete individuálně. Detaily THR testu u člověka byly studovány v další studii (Cavill 1998), kde byla karotida zevně komprimována. Optimálních výsledků testu autoregulace bylo dosaženo, pokud komprese trvala alespoň 10 sekund a rychlost toku během komprese klesla pod 60% rychlosti před kompresí. Tohoto požadavku bylo v naší studii vždy dosaženo, doba komprese byla navíc

prodloužena z 10 na 20 sekund. Je možné uvažovat o negativním vlivu anestezie, avšak vzhledem k nízkým dávkám i druhu použitých anestetik je vliv anestezie nepravděpodobný. V dostupné literatuře jsme nenalezli žádnou studii posuzující efekt ketaminu, midazolamu, fentanylů ani pancuronium na mozkovou autoregulaci. Dále je možné spekulovat, že nástup autoregulace u prasete je pomalejší než u člověka a parametry THR testu postačující u člověka nemusí být dostatečné u prasete. Konečně je ke zvážení, zda ihned po uvolnění komprese karotidy skutečně došlo k jejímu plnému otevření do původního průsvitu nebo parciální zúžení karotidy nepřetržovalo ještě po uvolnění zevní komprese. Jasné vysvětlení pro výsledek THR testu při normotermii však nemáme.

### **Závěr**

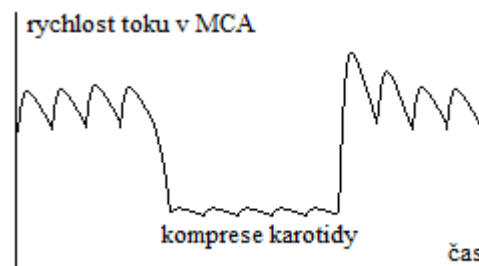
Testovali jsme vliv střední hypotermie na mozkovou autoregulaci u prasete pomocí modifikovaného THR testu. Neprokázali jsme ovlivnění funkce mozkové autoregulace střední hypotermií.

Studie byla podpořena Výzkumným záměrem MZO 00179906.

# Faktory ovlivňující Transient hyperaemic response (THR) test mozkové autoregulace

## Úvod

Mozková tlaková autoregulace je komplexní mechanismus udržující konstantní průtok krve mozkem při změnách perfuzního tlaku. K posouzení funkce mozkové autoregulace je dostupných několik testů (Panerai 1998). Transient hyperaemic response (THR) test hodnotí dynamickou i statickou složku autoregulace, je snadno proveditelný, levný a nevyžaduje farmakologickou intervenci. Spočívá v měření vzestupu rychlosti toku v a. cerebri media (MCA) ihned po uvolnění přechodné komprese a. carotis interna (ICA). Komprese ICA sníží průtok krve mozkem (zjm. stejnostranně), na což mozková autoregulace reaguje dilatací arteriol. Po uvolnění komprese dojde k přechodnému vzestupu rychlosti toku ve stejnostranné MCA nad úroveň před kompresí. Tento vzestup, hodnocený jako THR poměr (THRR) – průměrná rychlost toku v MCA během prvního pulzu po uvolnění komprese ICA dělená průměrnou rychlostí před kompresí (Obr. 1), je úměrný mozkové autoregulaci (Giller 1991). Existuje blízká korelace THRR a jiných statických (Tibble 2001) i dynamických (Moppett 2004) testů autoregulace. Čím vyšší je THRR, tím lépe autoregulace funguje, hodnota 1,0 odpovídá nepřítomnosti autoregulace



**Obr. 1 Rychlost toku v a. cerebri media během THR testu.**

Motivací pro naši studii byly problematické výsledky THR testu v naší předchozí experimentální studii, kde hodnoty THRR naznačovaly absenci autoregulace, pro což nemáme dobré vysvětlení. Je otázkou, zda by nějaké faktory, které přímo nesouvisí s autoregulací, mohly vést k nízkému THRR, naznačujícímu absenci autoregulace, ačkoli by autoregulace byla funkční.

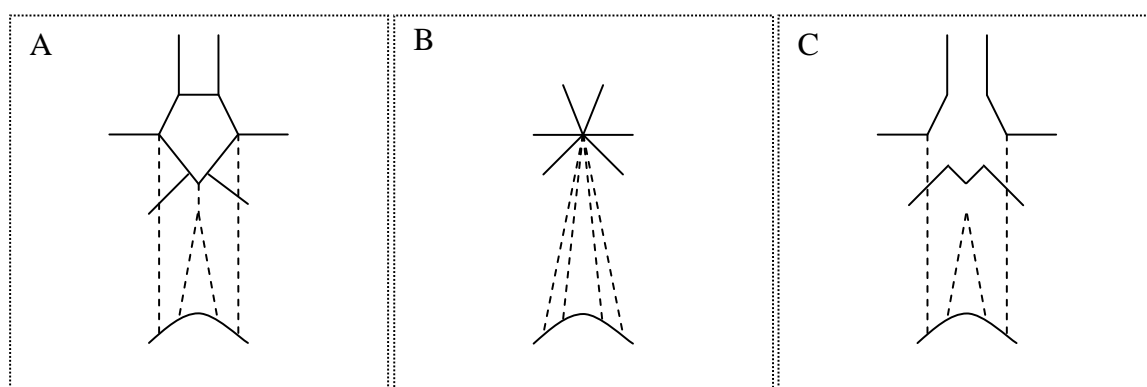
Dle naší literární rešerše se dosud dvě studie zabývaly technickým provedením THR testu. Byla testována optimální doba komprese ICA a minimální nezbytný pokles průtoku v MCA během komprese ICA (Cavill1998, Smielewski 1996). Bylo dosud publikováno několik

teoretických modelujících studií vztahujících se k THR testu (Mopett 2007, Czosnyka 1992, Czosnyka 1997), avšak žádná z nich se nezabývala otázkou vlivu faktorů nesouvisejících s autoregulací. Všechny tyto studie předpokládají nekonečné zrychlení krevního toku (nulovou setrvačnost).

V této teoretické studii jsme se pokusili zhodnotit význam několika faktorů, které by mohly ovlivnit THR test, ale nesouvisejí přímo s autoregulací. Pracovně jsme je označili jako „vnitřní“ faktory. Jde o setrvačnost toku, rozměry ICA (délka, poloměr), průchodnost Willisova okruhu ( $W_o$ ) a asynchronizaci mezi uvolněním komprese ICA a pulzacemi arteriálního tlaku („fázový posun“). Setrvačnost toku se projevuje skutečností, že zrychlení toku krve v ICA po uvolnění komprese není nekonečné, maximum rychlosti toku tedy není dosaženo ihned po uvolnění komprese

## Metody

Pro analýzu těchto faktorů jsme vytvořili matematický model prvků účastnících se THR testu a při různých parametrech jsme modelovali průtoky krve v jednotlivých cévách a vzestup rychlosti toku v MCA po uvolnění komprese ICA. Vzhledem k interindividuálně odlišné průchodnosti  $W_o$  (Obr. 2A) jsme modelovali dvě extrémní situace – dokonale průchodný ( $dW_o$ ) (Obr. 2B) a zcela izolovaný Willisův okruh ( $iW_o$ ) (Obr. 2C) – a porovnali jsme rozdíly výsledků mezi oběma variantami.



**Obr. 2 A) Willisův okruh. B) Dokonale průchodný Willisův okruh, C) Zcela izolovaný Willisův okruh.**

Čárkované linie – aferentní arterie. Plné linie - eferentní arterie.

## *Hodnoty konstant a proměnných*

Použité konstanty a proměnné jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. Jejich hodnoty byly získány z různých zdrojů (Krejza 2006, Yazici 2005, Hendrikse 2005, Tanaka 2006), případně

dopočítány z jiných známých hodnot tak, aby odpovídaly běžným hodnotám u dospělého člověka. Předpokládáme, že a) průtok krve mozkem je 750 ml/min., b) průtoky  $q_1=q_2=300$  ml/min.,  $2q_v=150$  ml/min. (Tanaka 2006) a c) výstupní tlak  $p_o$  je identický pro všechny odvodné cévy a je roven intrakraniálnímu tlaku (Ursino 1997).

**Tab. 1 Použité konstanty a koeficienty.**

q	průtok krve cévou
v	rychlost toku krve v cévě
$q_1$	průtok krve v a. carotis interna
$q_{10}$	počáteční průtok krve v a. carotis interna (v t=0)
$q_2$	průtok krve v druhostranné a. carotis interna
$q_{20}$	počáteční průtok krve v druhostranné a. carotis interna (v t=0)
$q_v$	průtok krve v a. vertebralis
$q_{v0}$	počáteční průtok krve v a. vertebralis (v t=0)
$q_a$	průtok krve v a. cerebri anterior
$q_{a0}$	počáteční průtok krve v a. cerebri anterior (v t=0)
$q_m$	průtok krve v a. cerebri media
$q_{m0}$	počáteční průtok krve v a. cerebri media (v t=0)
$q_p$	průtok krve v a. cerebri posterior
$q_{p0}$	počáteční průtok krve v a. cerebri posterior (v t=0)
R	rezistence a. carotis interna
$R_v$	rezistence a. vertebralis
$R_a$	rezistence a. cerebri anterior
$R_m$	rezistence a. cerebri media
$R_p$	rezistence a. cerebri posterior
L	index setrvačnosti a. carotis interna
$L_v$	index setrvačnosti a. vertebralis
$L_a$	index setrvačnosti a. cerebri anterior
$L_m$	index setrvačnosti a. cerebri media
$L_p$	index setrvačnosti a. cerebri posterior
$p_i$	vstupní tlak (v aortálním oblouku)
$p_o$	výstupní tlak (tj. intrakraniální tlak)
p	tlak na úrovni Willisova okruhu
$p_s$	systolický arteriální tlak
$p_d$	diastolický arteriální tlak
$\Delta P$	tlakový gradient mezi začátkem a koncem cévy
t	Čas
l	délka cévy
r	poloměr cévy
S	plocha příčného průřezu cévy
T	srdeční perioda
f	srdeční frekvence
$\varphi$	podíl času od začátku systoly do uvolnění komprese a periody
$\rho$	hustota krve
m	hmotnost krve v cévě
F	síla působící na krev v cévě, způsobující zrychlení toku krve
c	volitelná konstanta
d	volitelná konstanta

**Tab. 2** Hodnoty konstant a počátečních podmínek.

---

$q_{10}$	0 ml/s
$q_{20}$	8,04 ml/s
$q_{v0}$	2,01 ml/s
$q_{a0}$	1,21 ml/s
$q_{m0}$	3,62 ml/s
$q_{p0}$	1,21 ml/s
$q_{a0i}$	0 ml/s
$q_{m0i}$	0 ml/s
$q_{10i}$	0 ml/s
$R_0$	131,6 Pa.s/ml
$R_v$	526,3 Pa.s/ml
$R_a$	8,95 kPa.s/ml
$R_m$	2,98 kPa.s/ml
$R_p$	8,95 kPa.s/ml
$L_0$	$1,27 \cdot 10^7$ kg/m <sup>4</sup>
$L_v$	$3,54 \cdot 10^7$ kg/m <sup>4</sup>
$L_a$	$2,98 \cdot 10^7$ kg/m <sup>4</sup>
$L_m$	$2,55 \cdot 10^7$ kg/m <sup>4</sup>
$L_p$	$2,98 \cdot 10^7$ kg/m <sup>4</sup>
$p_o$	1,32 kPa
$p_s$	15,8 kPa
$p_d$	10,5 kPa
$l_0$	25 cm
$r_0$	2,5 mm
$l_v$	25 cm
$r_v$	1,5 mm
$l_a$	6 cm
$r_a$	0,8 mm
$l_m$	8 cm
$r_m$	1 mm
$l_p$	6 cm
$r_p$	0,8 mm
$\rho$	1000 kg/m <sup>3</sup>
$c$	100
$d$	2

---

### *Předpoklady modelu*

Model je založen na předpokladech, že 1) cévy jsou rigidní, tj. zanedbáváme změny průměru cév během tlakových pulzací i jejich kapacitní vlastnosti, a 2) průměr cév se v jejich průběhu nemění (změna průměru cév nastává pouze při jejich větvení).



### Popis toku krve v izolované cévě

Považujme cévu za rigidní trubici délky  $l$  a poloměru  $r$ . Při ustáleném toku krve s konstantní rychlostí platí

$$\Delta P = Rq$$

kde  $q=v.S$ .

Pokud však tok krve zrychluje, část tlakového gradientu se spotřebuje na zrychlení. Dle 2. Newtonova zákona platí  $F=m.a$ . Přitom  $F=\Delta P.S$ ,  $m=\rho.S.l$  a  $a=dv/dt$ . Po dosazení získáme vztah

$$\Delta P = \frac{\rho l}{S} \frac{dq}{dt}$$

Pokud je současně přítomná ztráta tlaku podmíněná vizkozním odporem toku (rezistencí), můžeme psát

$$\Delta P = \frac{\rho l}{S} \frac{dq}{dt} + Rq = L \frac{dq}{dt} + Rq$$

kde  $L=\rho.l/S$  je index setrvačnosti.

### Dokonale průchodný Willisův okruh

Při dWo můžeme jeho rozměry považovat za zanedbatelné oproti rozměrům přírodních a odvodných cév a můžeme Wo ztotožnit s jedním bodem, do něhož přicházejí a z něhož odcházejí všechny přírodní a odvodné cévy (Obr. 2B). Na obrázku 3 je zobrazen fyzický a analogický elektrický model mozkové cirkulaci při dWo. Pokud tlak ve Wo označíme  $p$ , můžeme celý systém popsat soustavou rovnic

$$p_i - p = L \frac{dq_1}{dt} + Rq_1$$

$$p_i - p = L \frac{dq_2}{dt} + Rq_2$$

$$p_i - p = L_v \frac{dq_v}{dt} + R_v q_v$$

$$p - p_o = L_a \frac{dq_a}{dt} + R_a q_a$$

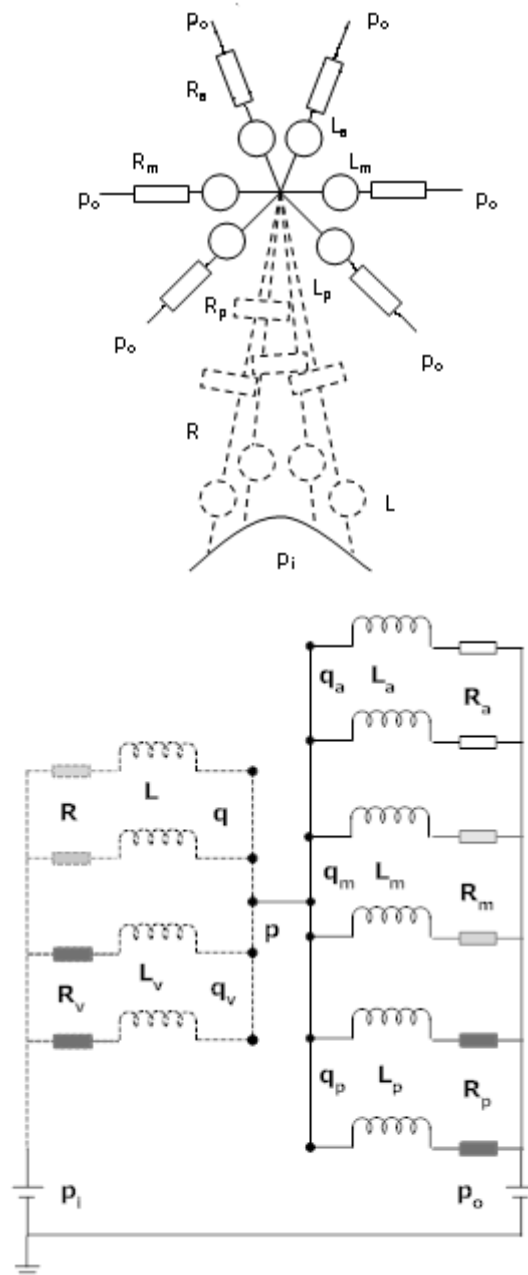
$$p - p_o = L_m \frac{dq_m}{dt} + R_m q_m$$

$$p - p_o = L_p \frac{dq_p}{dt} + R_p q_p$$

Vzhledem ke kontinuitě toku musí platit

$$q_1 + q_2 + 2q_v = 2q_a + 2q_m + 2q_p$$

Rezistence  $R_a$ ,  $R_m$  a  $R_p$  jsou kombinované (sériové) rezistence vývodné cévy a cévního řečiště periferně za cévou.



Obr. 3 Fyzický a analogický elektrický model mozkové cirkulace.

### *Izolovaný Willisův okruh*

Pokud je  $W_o$  zcela izolovaný, můžeme mozkovou cirkulaci považovat za 3 izolované cirkulace, kde přívodnými cévami jsou a.carotis dx, a.carotis sin. a a. basilaris (dvojice aa. vertebrales) (Obr. 2C). Pro potřeby modelování THR testu pak stačí modelovat část cirkulace s jednou přívodnou ICA a a.cerebri anterior a MCA jako odvodnými arteriemi. Můžeme tedy psát

$$p_i - p = L \frac{dq_1}{dt} + Rq_1$$
$$p - p_o = L_a \frac{dq_a}{dt} + R_a q_a$$
$$p - p_o = L_m \frac{dq_m}{dt} + R_m q_m$$

a vzhledem ke kontinuitě toku

$$q_1 = q_a + q_m$$

### *Model pulzací arteriálního tlaku*

Poněvadž uvolnění komprese nemusí nastat synchronně s nárůstem arteriálního tlaku, může nárůst rychlosti toku po uvolnění komprese nastat v době poklesu arteriálního tlaku. První maximum rychlosti (a THRR) přitom bude falešně sníženo. V modelu je čas 0 časem uvolnění komprese. Časový posun mezi uvolněním komprese a začátkem nárůstu arteriálního tlaku jsme pracovníčně označili jako „fázový posun“. Jeho mírou je  $\varphi$  ( $= 0 - 1$ ), podíl času od začátku nárůstu arteriálního tlaku do uvolnění komprese ze srdeční periody.

V naší studii jsme vstupní tlak  $p_i$ , tj. tlak v oblouku aorty, modelovali pomocí 2 funkcí: systolickou část jako logaritmickou funkci

$$p_i = p_d + K \ln[c(t + \varphi T) + 1]$$

a diastolickou část jako klesající exponenciální funkci

$$p_i = A + B e^{d(0.28 - t - \varphi T)}$$

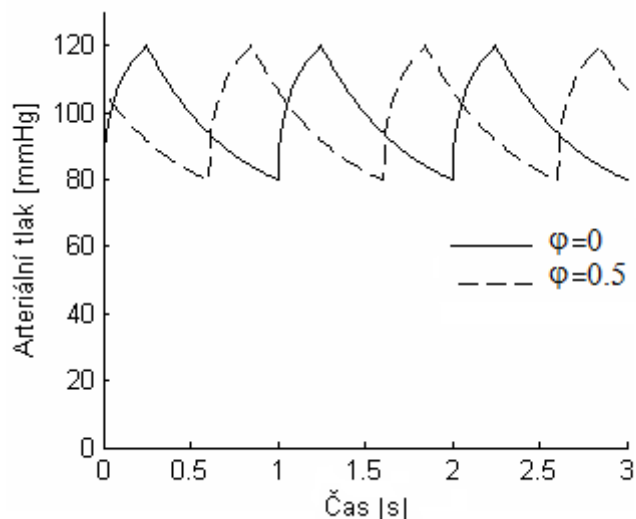
kde

$$B = \frac{p_s - p_d}{1 - e^{d(0.28 - T)}}$$

$$A = p_s - B$$

$$K = \frac{p_s - p_d}{\ln(0.28c + 1)}$$

Délku systoly jsme zvolili jako 1/3 trvání srdeční periody při frekvenci 70/min (tj. 0,28 s) a považovali jsme ji za konstantní. Se změnou frekvence se měnila pouze doba trvání diastoly. Průběh tlaku  $p_i$  je při těchto parametrech zobrazen na Obr. 4.



**Obr. 4 Pulzace arteriálního tlaku.**

#### Řešení modelu

Řešení sestaveného matematického modelu jsme provedli pomocí programu MATLAB v. R2008a. Šlo o řešení soustavy obyčejných diferenciálních rovnic, které získáme po eliminaci proměnné  $p$  z výše uvedených rovnic. Použili jsme funkci *ode45* s parametry *reltol*  $10^{-13}$ , *abstol*  $10^{-15}$ , *initialstep*  $10^{-9}$ . Hodnoty počátečních podmínek jsou uvedeny v Tabulce 2. Model jsme řešili za předpokladu absence mozkové autoregulace, tj. všechny rezistence i indexy setrvačnosti jsou v čase konstantní. Při absenci autoregulace je ideální hodnota THRR=1, „vnitřní“ faktory tuto ideální hodnotu snižují, úměrně svému významu.

#### Hodnocené veličiny

Cílem modelu bylo zhodnotit efekt tří faktorů – zrychlení toku krve v ICA (a souvisejících parametrů – délka a poloměr ICA), fázového posunu (a související srdeční frekvence) a průchodnosti  $W_o$ . Při různých parametrech jsme modelovali závislosti THRR na délce a poloměru ICA a na fázovém posunu pro dokonalý i izolovaný Willisův okruh.

### A) Posouzení efektu zrychlení toku krve v ICA

Efekt zrychlení jsme posuzovali porovnáním dvojic závislostí při uvažovaném zrychlení a neuvažovaném zrychlení. Pokud neuvažujeme existenci zrychlení, pak  $L=0$  a průtok ve všech oddílech je vždy ihned přímo úměrný aktuálním tlakovým gradientům.

Modelovali jsme závislosti THRR na délce a poloměru ICA, pro  $\varphi=0$  a  $\varphi=0,5$ , pro dokonalý i izolovaný  $W_0$ , při uvažovaném i neuvažovaném zrychlení. Závislosti byly modelovány při frekvenci 70/min. Vlivy změny délky a poloměru ICA na její rezistenci a index setrvačnosti byly kalkulovány rovnicemi

$$\frac{R}{R_0} = \frac{l}{l_0} \cdot \left(\frac{r_0}{r}\right)^4$$
$$\frac{L}{L_0} = \frac{l}{l_0} \cdot \left(\frac{r_0}{r}\right)^2$$

kde  $L_0$  a  $R_0$  jsou hodnoty při  $l_0$  a  $r_0$ .

Dále jsme dopočetli čas do 1. maxima toku v MCA od uvolnění komprese ICA při  $\varphi=0,5$ . Protože při  $\varphi=0,5$  arteriální tlak již klesá, 1. maximum toku v MCA nastává v případě neuvažovaného zrychlení ihned (t.j. při  $t=0$ ). Naopak, čas pro zrychlení toku v ICA z nuly k prvnímu maximu (pokud je zrychlení ve výpočtu uvažováno) může být chápán jako měřítko efektu zrychlení.

### B) Posouzení efektu fázového posunu a srdeční frekvence

Modelovali jsme závislosti THRR na fázovém posunu při různých srdečních frekvencích pro dokonalý i izolovaný  $W_0$ . Závislosti byly modelovány pro  $r=0,25$  cm a  $l=25$  cm.

### C) Posouzení efektu průchodnosti $W_0$

Hodnoty vypočtené pro izolovaný a dokonalý  $W_0$  byly vzájemně porovnány.

## Výsledky

### *Efekt zrychlení toku krve v ICA*

Závislosti THRR na délce a poloměru karotidy jsou zobrazeny na Obr. 5 a 6. Pro žádný z parametrů nebyla nalezena podstatná závislost ani podstatný rozdíl mezi  $dW_0$  a  $iW_0$ . Byla nalezena pouze marginální závislost mezi THRR a délkou ICA. Rovněž rozdíly mezi

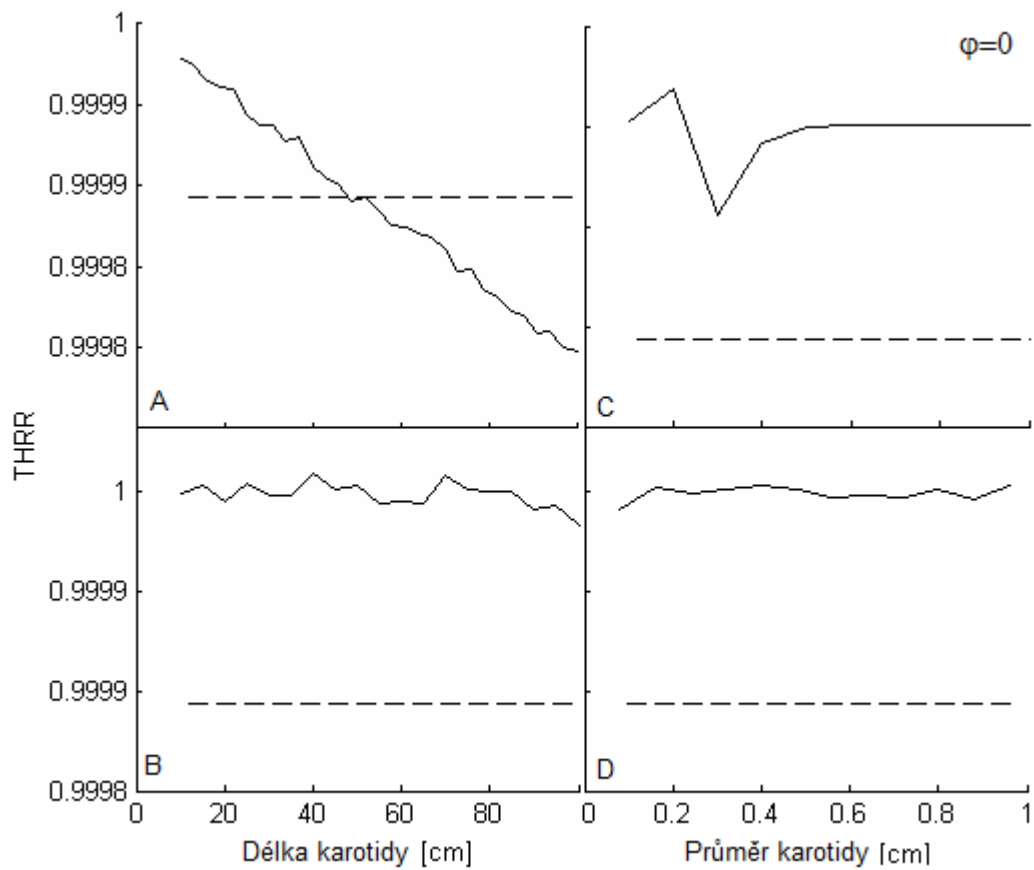
uvažovaným a neuvažovaným efektem zrychlení byly minimální (nejvyšší rozdíl v THRR je menší než 0,05). Čas do prvního maxima toku v MCA se při  $\varphi=0,5$  pohybuje okolo 0,05 s při uvažovaném zrychlení a 0 s při neuvažovaném zrychlení (Obr. 7). Čas okolo 0,05 s tedy odpovídá době zrychlování toku krve v ICA po uvolnění její komprese, je nepatrně delší pro  $iW_o$ .

#### *Efekt fázového posunu a srdeční frekvence*

Závislosti THRR na fázovém posunu při různých srdečních frekvencích pro  $dW_o$  i  $iW_o$  jsou zobrazeny na Obr. 8. Pro  $dW_o$  i  $iW_o$  byly nalezeny podstatné závislosti. S rostoucím fázovým posunem THRR klesá, s rostoucí frekvencí THRR roste. Pokles THRR s rostoucím fázovým posunem je mírně větší pro  $iW_o$ , kde THRR dosahuje hodnoty až 0,7.

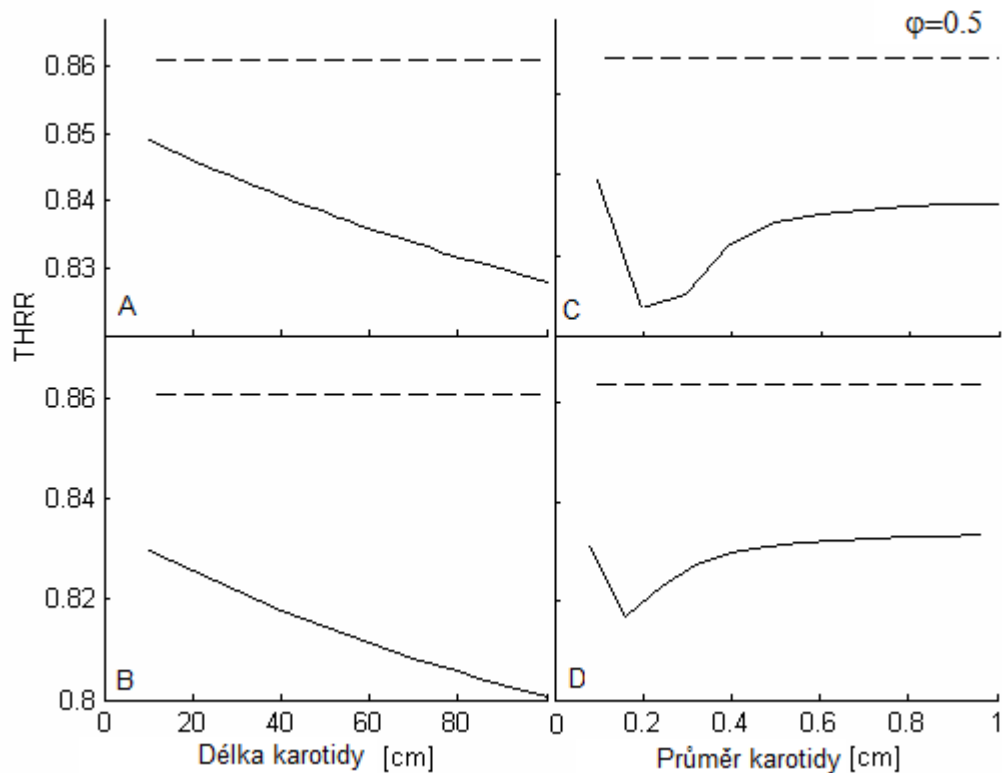
#### *Efekt průchodnosti $W_o$*

V Tab. 3 jsou porovnány THRR mezi  $dW_o$  a  $iW_o$ , pro normální parametry (frekvence 70/min,  $l=25$  cm,  $r=0,25$ cm) a různé fázové posuny. Je patrné, že mezi  $dW_o$  a  $iW_o$  se liší pouze THRR pro vyšší fázové posuny, rozdíly jsou však minimální.

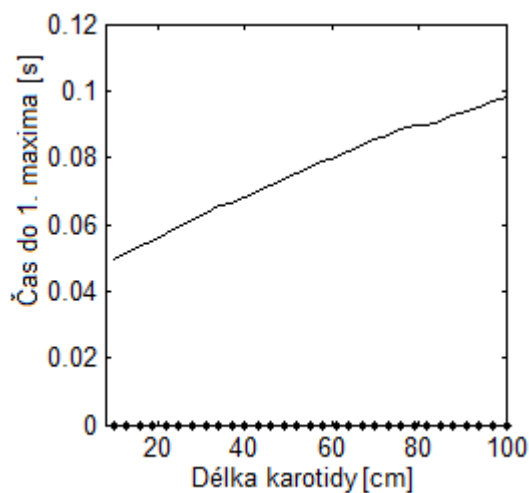


**Obr. 5 Závislost THRR na délce a průměru ICA pro  $\varphi=0$ .**

A) pWC,  $r=0,25$  cm; B) iWC,  $r=0,25$  cm; C) pWC,  $l=25$  cm; D) iWC,  $l=25$  cm. Čárkovaná čára – neuvažované zrychlení. Plná čára - uvažované zrychlení.

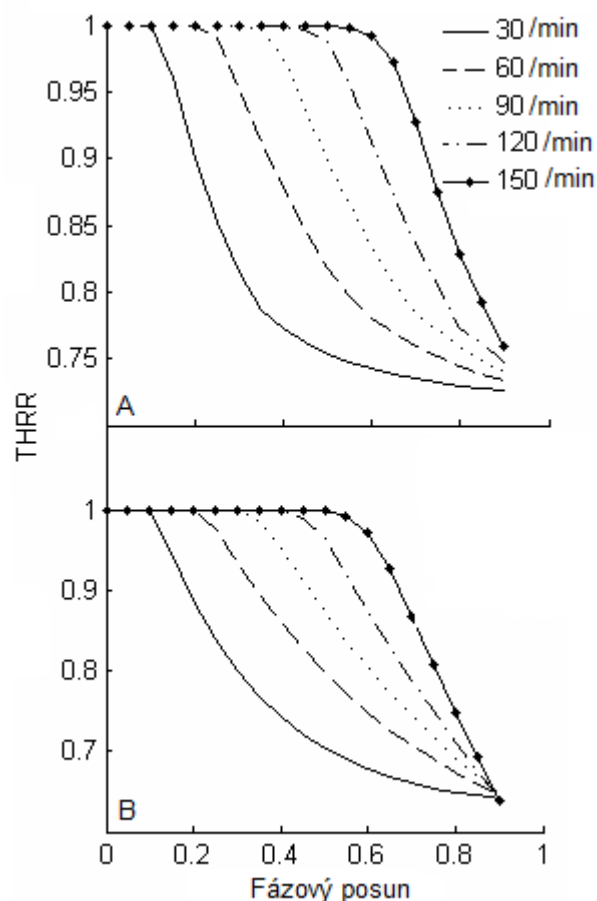


**Obr. 6 Závislost THRR na délce a průměru ICA pro  $\varphi=0,5$ .**  
 A) dWC,  $r=0,25$  cm; B) iWC,  $r=0,25$  cm; C) dWC,  $l=25$  cm; D) iWC,  $l=25$  cm. Čárkovaná čára – neuvažované zrychlení. Plná čára – uvažované zrychlení.



**Obr. 7 Závislost času do prvního maxima rychlosti toku v MCA po uvolnění komprese ICA.**  
 iWC,  $r=0,25$  cm,  $\varphi=0,5$ .





**Obr. 8** Závislost THRR na fázovém posunu při různých srdečních frekvencích.

A) dWC,  $l=25$  cm,  $r=0.25$  cm; B) iWC,  $l=25$  cm,  $r=0.25$  cm.

**Tab. 3** Efekt průchodnosti Willisova okruhu.

$\varphi$	THRR	
	pWC	iWC
0,0	1,00	1,00
0,2	1,00	1,00
0,4	0,92	0,90
0,6	0,80	0,78
0,8	0,77	0,70

## Diskuze

Použitý matematický model vedl k několika závěrům: a) efekt zrychlení (setrvačnosti) a souvisejících parametrů (délky a poloměru ICA) je zanedbatelný; b) efekt „fázového posunu“ může významně snižovat THRR, což může zcela anulovat autoregulační podmíněný nárůst THRR; c) průchodnost  $W_o$  vylídek THR testu prakticky neovlivňuje.

Z praktického hlediska lze doporučit provádět THR test autoregulace několikrát a z naměřených hodnot THRR vybrat nejvyšší, která je pravděpodobně nejméně ovlivněna fázovým posunem. Provedení pouze jednoho měření nese riziko náhodného uvolnění ICA s vyšším fázovým posunem, což může významně ovlivnit výsledek THR testu. Řešením může být též užití až 2. maxima pulzací v MCA pro výpočet THRR, nikoli „neúplného“ 1. maxima, jak je obvykle uváděno v literatuře. Prodlužuje se tím ovšem čas mezi uvolněním komprese ICA a uvažovaným (2.) maximem (o cca 1 sekundu při srdeční frekvenci 60/min.). Časová konstanta mozkové autoregulace je, nicméně, přibližně 20 s (Ursino 1997, Aaslid 1989), rezistence mozkových arteriol se tedy mezi 1. a 2. maximem prakticky nezmění a případné prodloužení doby do odečtu THRR výsledek neovlivní.

Studie má několik limitací.

Cévy jsou považovány za rigidní trubice, nikoli elastické elementy s šířením pulzních vln. Pokud uvažujeme pulzní vlny, pak ke zrychlení krve nedochází současně v celé délce cévy (jako je tomu v případě rigidní trubice), avšak pouze v úseku právě probíhající vlny. Odtud plynou dva důsledky – jednak časové zpoždění mezi uvolněním karotidy a zrychlením v MCA, jednak snížení významu zrychlení (setrvačnosti). Časové zpoždění mezi uvolněním karotidy a zrychlením v MCA odpovídá době šíření pulzní vlny po ICA a Willisově okruhu. Na vlastní nárůst rychlosti v MCA nemá toto zpoždění vliv. Snížení významu zrychlení (setrvačnosti) je dáno skutečností, že tlakový gradient podmiňující zrychlení krve v příslušném úseku ICA (kde právě probíhá vlna) působí pouze na sloupec krve v tomto úseku, nikoli na sloupec v celé cévě. Při daném tlakovém gradientu (který je identický v případě rigidní i elastické ICA) je přitom zrychlení nepřímo úměrné hmotnosti sloupce krve v cévě (2. Newtonův zákon). Lokální zrychlení v elastické cévě je tedy vyšší než zrychlení sloupce krve v celé rigidní cévě. Jestliže tedy použitý zjednodušený matematický model vedl k závěru, že efekt zrychlení (setrvačnosti) je nevýznamný, model uvažující pulzní vlny by k tomuto závěru vedl tím spíše.

Efekt průchodnosti  $W_o$  byl hodnocen porovnáním výsledků z pouze dvou extrémních situací –  $dW_o$  a  $iW_o$ . V případě  $iW_o$  je rychlost toku v ICA i MCA při  $t=0$  nulová. V případě  $dW_o$  je při  $t=0$  nulová pouze rychlost toku v ICA. Krev v MCA při  $t=0$  teče nenulovou rychlostí, ale pomaleji než před kompresí. Po určité době od uvolnění komprese ICA se toky v ICA i MCA mezi  $iW_o$  a  $dW_o$  neliší, poněvadž se neliší ani metabolismus mozkové tkáně a oblasti zásobené příslušnými eferentními arteriemi. Tok v MCA tedy musí zrychlit více v případě  $iW_o$  než  $dW_o$ , což trvá déle. Náš model však ukázal, že je tento časový rozdíl nepatrný (zhruba 0,05 s). Pokud se průchodnost  $W_o$  nachází mezi dvěma extrémy ( $iW_o$  a

dWo), tok v MCA zrychluje z nenulové hodnoty, ale nižší než v případě dWo. Proto se doba zrychlování nachází mezi 0 s a 0,05 s. Tato úvaha rozšiřuje závěry odvozené pro dvě extrémní situace na Wo s libovolnou průchodností.

Použitý model dále neuvažuje existenci extra-intrakraniálních arteriálních anastomóz. Nicméně jejich přítomnost by neměla podstatný vliv na výsledek modelu. V případě dWo by se jejich vliv neuplatnil, protože „anastomóza“ cestou přívodných cév do Wo (obcházejících komprimovanou ICA) již dokonalá je. Poněvadž převážná část cévní rezistence mozku je lokalizována periferně od Wo (Tab. 2), další anastomóza by pouze odčerpala část krve tekoucí již existující „anastomózou“, ale významně by nezvýšila celkový přívod krve do mozku. V případě iWo by extra-intrakraniální anastomóza porušila „izolovanost“ a cévní situace by se ocitla mezi dokonalou a izolovanou variantou Wo. Jestliže jsme však neshledali podstatný rozdíl mezi těmito dvěma extrémními variantami, pak by ani existence extra-intrakraniální anastomózy neznamenal podstatný rozdíl.

Při řešení jsme neuvažovali mozkovou autoregulaci, tj. všechny rezistence i indexy setrvačnosti jsme považovali za konstantní. Poněvadž se mechanismus autoregulace uplatňuje převážně v oblasti rezistence periferně od vývodních cév (Paulson 1990), nemá přítomnost či nepřítomnost autoregulace jiný vliv na chování systému v oblasti velkých cév (tj. až po vývodné cévy Willisova okruhu), než že ovlivňuje nejvyšší hodnotu průtoku velkými cévami. Poněvadž žádný z analyzovaných „vnitřních“ faktorů (délka a poloměr ICA, srdeční frekvence, fázový posun) není odvozen od parametrů cév periferně od vývodných cév, nejsou závěry modelu ovlivněny přítomností či nepřítomností autoregulace. Jestliže tedy efekt "vnitřních" faktorů sníží THRR např. o 0,2 a autoregulace zvyšuje THRR o 0,4, pak THRR při příslušném THR testu vychází 1,2, nikoli 1,4.

Konečně možným faktorem ovlivňujícím THR test je nepredikovatelná doba obnovení normálního průsvitu ICA po uvolnění její komprese. V naší studii předpokládáme, že je tato „reparace“ ICA okamžitá.

## **Závěr**

S pomocí matematického modelu THR testu jsme ukázali, že z „vnitřních“ faktorů THR testu je podstatný pouze efekt fázového posunu, efekty zrychlení a průchodnosti Willisova okruhu jsou zanedbatelné. Při provádění THR testu doporučujeme změřit několik hodnot THRR a pro hodnocení autoregulace zvolit tu nejvyšší, případně využít druhého vrcholu rychlosti toku v MCA po uvolnění ICA komprese pro výpočet THRR.

Studie byla podpořena Výzkumným záměrem MZO 00179906.

# **Posouzení mozkové mikrocirkulace in situ u mechanicky ventilovaných králíků pomocí Sidestream dark-field (SDF) zobrazení**

## **Úvod**

Postupně přibývá důkazů naznačujících účast mikrocirkulace v mnoha patologických stavech (Elberts and Ince 2006, Ellis 2005, den Uil 2008). Je dostupných několik technologií umožňujících intravitální zobrazení mikrocirkulace. Nejčastěji používané jsou intravitální mikroskopie (IVM), *orthogonal polarization spectral* (OPS) zobrazení, *sidestream dark-field* (SDF) zobrazení a laser Doppler flowmetry (De Backer and Dubois 2001). U SDF metody (Ince 2005) zelené nepolarizované světlo emitové prstencem diod umístěným okolo konce světlovodného kanálu přímo osvětluje tkáň. Toto světlo je opticky izolováno od světla vracejícího se z tkáně světlovodným kanálem, čímž je zabráněno odrazům světla od povrchu tkáně. Protože je zelené světlo absorbováno hemoglobinem, cévy se jeví jako tmavé struktury na světlém pozadí. SDF technologie poskytuje lepší rozlišení a kontrast obrazů než OPS technologie (Goedhardt 2007). Validací studie ukázaly dobrý souhlas mezi daty získanými pomocí OPS a SDF technologií a IVM (Cerny 2007).

Ačkoli byla mikrocirkulace několika orgánů důkladně studována (den Uil 2008), pouze omezený počet studií se zabýval mikrocirkulací mozku.

Cílem naší studie bylo posoudit kvalitu zobrazení mozkové mikrocirkulace pomocí SDF metody a změřit základní parametry mozkové mikrocirkulace u mechanicky ventilovaných králíků. Získané výsledky jsme porovnali s výsledky jiných studií mozkové mikrocirkulace.

## **Materiály a metody**

Experiment byl proveden se souhlasem Komise na ochranu zvířat proti týrání Lékařské fakulty Univerzity Kralovy v Hradci Králové, v souladu s legislativou České republiky na ochranu zvířat. Do studie bylo zařazeno sedm samic králíků (Bio-Test, Konárovice, Česká republika) o hmotnosti 3,0-4,0 kg. Zvířata byla chována ve standardních koticích při teplotě 21°C s 12 hodinovým cyklem světlo/tma s neomezeným příjmem laboratorní stravy a vody. Po týdenní aklimatizaci bylo zvíře zařazeno do studie.

### *Anestezie a chirurgická příprava*

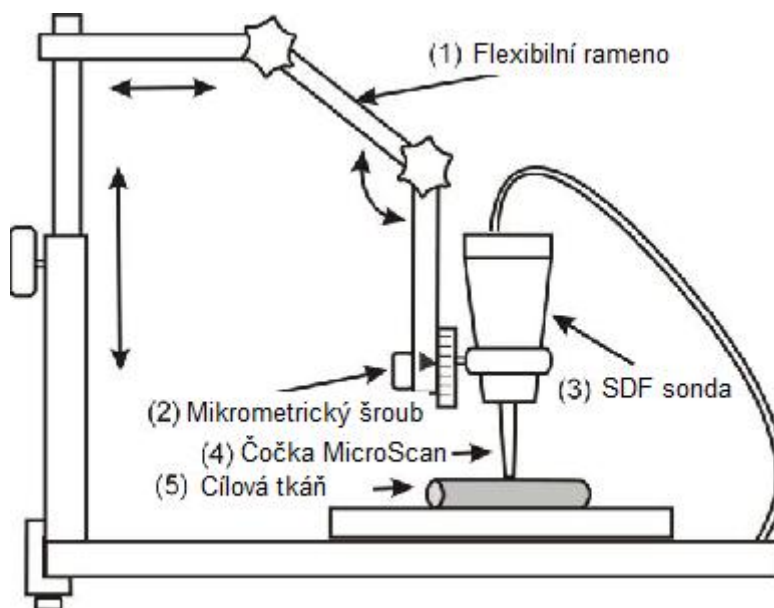
Po nočním lačnění s neomezeným přístupem k vodě byli králíci uvedeni do anestezie intramuskulární aplikací ketaminu (50 mg/kg, Calyptol, Gedeon Richter Plc., Maďarsko) a xylazinu (4 mg/kg, Rometar, Bioveta, Česká republika). Zvíře bylo otočeno na hřbet a fixováno k operačnímu stolu. Ušní arterie a dvě marginální žíly byly zakanylovány polyetylenovými kanylymi pro kontinuální monitoraci krevního tlaku, analýzu arteriálních krevních plynů a kontinuální infuzi tekutin (fyziologický roztok, 10 ml/kg/hod.), anestetik (fentanyl 0,5 µg/kg/min. (Fentanyl-Janssen, Janssen Pharmaceutica N.V., Belgie), midazolam 33 µg/kg/min. (Dormicum, Roche, Praha, Česká republika), propofol 0,1 mg/kg/min. (Diprivan, AstraZeneca, Velká Británie)) a svalových relaxancií (pipecurionium bromid 0,6 mg/kg/hod., Arduan, Gedeon Richter Plc., Maďarsko). Zvířatům byla provedena tracheotomie, zavedena polyetylenová endotracheální kanyla o průměru 3 mm incizí trachey a byla zahájena mechanická ventilace (Harvard Scientific ventilator, Boston, USA, ventilační parametry: dechový objem = 8 ml/kg, PEEP = 0 cm H<sub>2</sub>O, dechová frekvence = 30/min, FiO<sub>2</sub> = 0,21). Adekvátnost ventilace (pCO<sub>2</sub> 4-6 kPa) byla ověřena analýzou arteriálních krevních plynů. Během studie byly monitorovány střední arteriální tlak (MAP), srdeční frekvence a rektální teplota. Rektální teplota byla udržována v rozmezí 38,5 – 39,5°C pomocí zahřívací ploténky.

Zvíře bylo poté otočeno do pronační polohy a pravá temporo-parieto-okcipitální oblast hlavy byla oholena. Kůže a periost oholené oblasti lebky byly incidovány a odklopeny. Okraje exponované oblasti, o rozměrech zhruba 1,5 cm x 1,5 cm, byly tvořeny střední čarou, bazí pravého ucha, zevní okcipitální protuberancií a pravým kaudálním supraorbitálním výběžkem. V lebce byly vyvrtány tři 3mm otvory a zbytky kosti byly odlámány pomocí malého peánu. Rozměry vytvořeného kraniálního okna byly přibližně 12 mm x 10 mm s intaktní dura mater na spodině. Krvácení z diploe bylo zastaveno pomocí kostního vosku. Rána byla kryta tampony navlhčenými sterilním fyziologickým roztokem o teplotě 37 °C. Po kontrole krvácení a 30-minutové stabilizační periodě s vyšším příjmem tekutin (20 ml/kg/hod fyziologického roztoku) byla provedena incize dura mater, čímž byl odkryt temporoparietální povrch pravé mozkové hemisféry. SDF sonda byla ihned přiložena k povrchu mozku a byla zobrazena mikrocirkulace.

### *Sidestream dark-field zobrazovací procedura*

Pro minimalizaci tlakových a pohybových artefaktů byla SDF sonda (MicroScan Video Microscope, Microvision Medical, Inc., Amsterdam, Nizozemí) upevněna ve speciálně

vyrobeném (Arrow International Czech Republic, a.s.) fixátoru s flexibilním ramenem umožňujícím mikropohyb SDF sondy v různých osách a současně pevnou stabilizaci (Obr. 1). Ve snaze maximálně standardizovat SDF zobrazování mikrocirkulace byl použit následující postup. Když byla vybrána oblast k zobrazení, SDF sonda byla umístěna přibližně 0,5 mm nad cílovou tkáň pomocí flexibilního ramene. Rameno bylo posléze zafixováno a sonda, krytá plastovým pouzdrům, byla posunována adaptérem pro mikropohyb. Jakmile došlo ke kontaktu s povrchem mozku, byl obraz zaostřen k získání ostrého a kontrastního obrazu. Místa měření na povrchu mozku byla vybrána náhodně, jak umožňovaly anatomické podmínky. Veškeré exponované tkáně, s výjimkou tkáně právě kryté SDF sondou, byly intermitentně zvlhčovány ad hoc kapkami sterilního fyziologického roztoku o teplotě 37 °C. U každého zvířete byly pořízeny záznamy ze dvou různých oblastí (polí) exponovaného povrchu mozku. Veškerá SDF zobrazení mikrocirkulace byla digitálně zaznamenána a později analyzována off-line. Po ukončení experimentu byla zvířata usmrcena předávkováním chloridu draselného.



**Obr. 1 Schéma fixátoru SDF sondy.**

(1) Flexibilní rameno umožňující horizontální, vertikální a rotační mikropohyb, (2) mikrometrický šroub pohyb SDF sondy, (3) SDF sonda, (4) konec SDF sondy se systémem čoček, (5) zobrazovanou tkání.

### *Off-line analýza*

Pro „off-line“ analýzu byly vybrány nejstabilnější ostré a kontrastní videosekvence. Celkově 6 sekvencí (3 sekvence pro každou oblast) v trvání 10 sekund bylo analyzováno u každého zvířete a jejich průměr byl použit pro následné výpočty. Konečné zvětšení obrazu na monitoru SDF přístroje bylo 325x, skutečné rozměry zobrazovaného pole byly 1280  $\mu\text{m}$  x 960  $\mu\text{m}$ . Microcirkulační parametry byly měřeny pomocí softwaru AVA V3.0 (AMC, University of Amsterdam, Nizozemí). Software je schopen automatické detekce cév a kalkulace jejich parametrů – průměru, délky, hustoty a dalších dopočtených parametrů. Pokud není detekce cévy správná, je možná manuální korekce automatické detekce.

Analyzovány byly následující parametry:

1. Celková hustota malých nebo všech cév, definovaná jako celková délka malých nebo všech cév uvnitř obrazu dělená celkovou plochou obrazu, uváděná v  $\text{mm}/\text{mm}^2$  (De Backer 2007).
2. De Backeovo skóre, uváděné v  $\mu\text{m}^{-1}$ , je kalkulováno jako počet průsečíků cév s třemi horizontálními a třemi vertikálními čarami stejné délky (nakreslenými na obrazovce) dělený celkovou délkou všech 6 čar (De Backer 2007).
3. Microvascular flow index (MFI), který je průměrnou hodnotou 4 semikvantitativních skóre (0 – nepřítomný tok, 1 – intermitentní tok, 2 – kontinuální obleněný (pomalý) tok, 3 – kontinuální normální (rychlý) mikrovaskulární tok) ve čtyřech kvadrantech obrazu, subjektivně posuzovaných pozorovatelem (De Backer 2007).
4. Délkou vážená distribuce poloměrů cév, kde hodnota pro dané rozmezí průměrů vyjadřuje procento celkové délky cév s průměry v příslušném rozmezí z celkové délky všech cév v obrazu, uváděná v %.
5. Plochou vážená distribuce poloměrů cév, kde hodnota pro dané rozmezí průměrů vyjadřuje procento celkové plochy cév s průměry v příslušném rozmezí z celkové plochy všech cév v obrazu, uváděná v %.

Malé cévy jsou definovány poloměrem menším než 25  $\mu\text{m}$ . “Plocha cévy” je plocha v projekci cévy do roviny SDF obrazu.

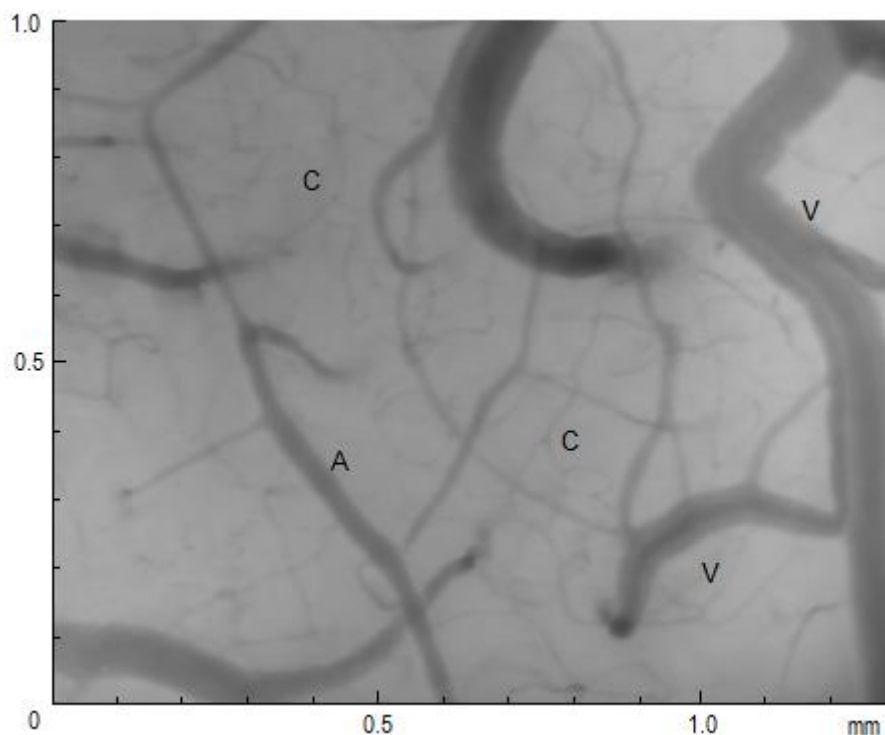
### *Statistické zpracování*

Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SIGMASTAT 2.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Normalita dat byla ověřena Kolmogorovým - Smirnovým testem. Popisná data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru.



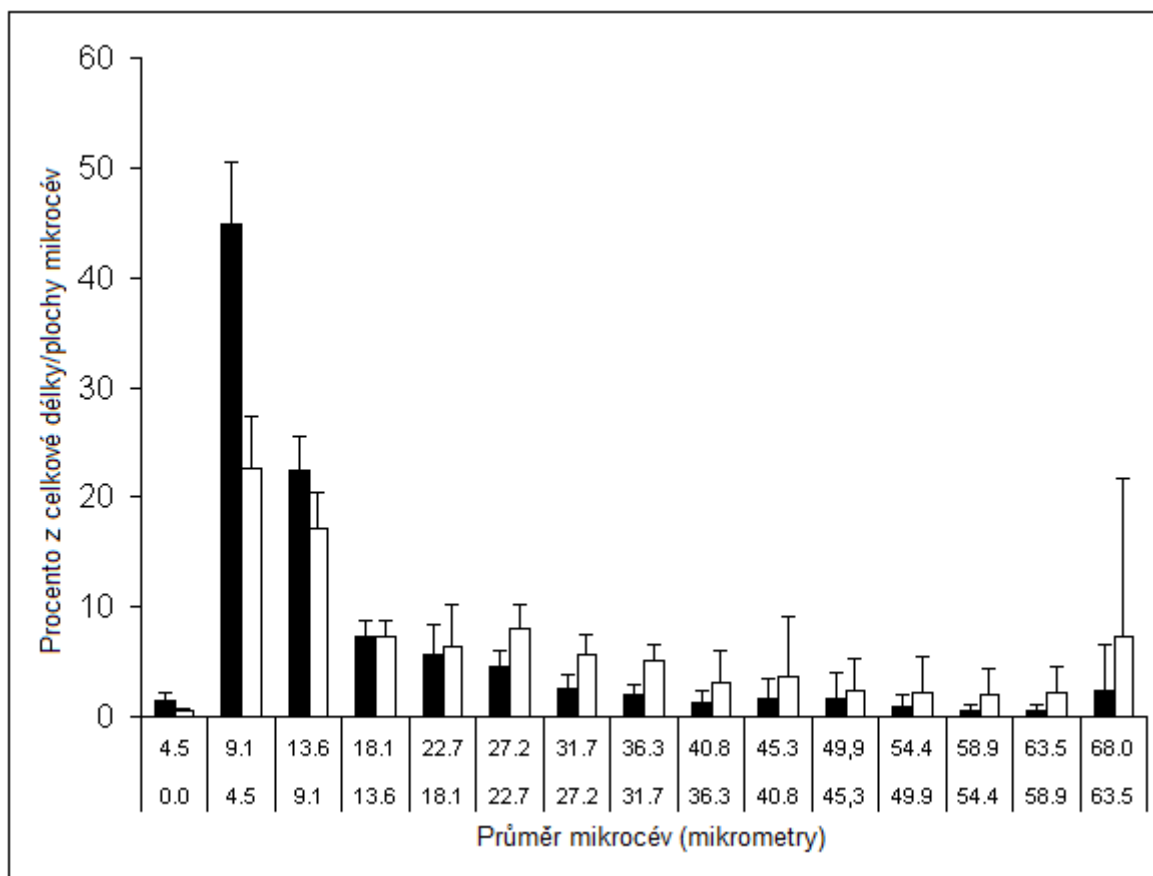
## Výsledky

Hlavní kardiovaskulární parametry byly během studie stabilní, s MAP  $71 \pm 4$  mmHg. S použitím speciálního fixačního aparátu pro SDF sondu byly úspěšně získány ostré, vysoce kontrastní obrazy z povrchu mozku králíků in situ pomocí SDF technologie. Morfologické struktury mozkové mikrocirkulace byly zřetelně identifikovány a bylo možné provést základní měření mikrocirkulačních parametrů. Typický obraz pořízený SDF sondou je ukázán na Obr. 2. Celková hustota malých cév byla  $14,6 \pm 1,8$  mm/mm<sup>2</sup>, celková hustota všech cév byla  $17,9 \pm 1,7$  mm/mm<sup>2</sup>, De Backerovo skóre  $12,0 \pm 1,6$   $\mu\text{m}^{-1}$  a *microvascular flow index*  $3,0 \pm 0,0$ . Délkou a plochou vážené distribuce poloměrů cév jsou zobrazeny na Obr. 3.



**Obr. 2** Typický Sidestream dark-field (SDF) obraz mozkové mikrocirkulace králíka.

Objektiv 5 $\times$ , na obrazovce 325 $\times$ , velikost zobrazené oblasti 1280  $\mu\text{m}$  x 960  $\mu\text{m}$ . A – arteriola, V – venula, C – kapilára.



**Obr. 3 Délkou a plochou vážené distribuce cévních průměrů.**

Plné sloupce - délkou vážené distribuce, prázdné sloupce - plochou vážené distribuce. Hodnota pro dané rozmezí poloměrů vyjadřuje procento celkové délky/plochy cév s průměry v příslušném rozmezí z celkové délky/plochy všech cév v obraze, uváděná v %.

## Diskuze

Studie potvrdila proveditelnost a přesnost posouzení mozkové mikrocirkulace králíka pomocí SDF zobrazení.

Tabulka 1 shrnuje hodnoty mikrocirkulačních parametrů získané z několika studií, které se zabývaly intravitální morfologií mozkové mikrocirkulace (Ben Mime 2005, Duebener 2001, Hudetz 1997a, Hudetz 1997b, Hudetz 1995, Kroppenstedt 2003, Pennings 2004, Pennings 2006, Pérez-Bárcena 2009, Ristagno 2007, Ristagno 2009, Thomale 2001, Wan 2009). Rozličné parametry byly měřeny různými metodami u různých živočišných druhů (potkan, prase, člověk). Důsledkem je poněkud obtížné porovnání těchto údajů. Intravitální zobrazení mozkové mikrocirkulace králíka dosud publikováno nebylo.

autor studie	Experimentální objekt	metoda	průměr cévy (μm)	rychlost toku krve (mm/s)	jiné ukazatele
BenMime 2005	prase	IVM			
Duebener 2001	prase	IVM			
Hudetz 1997	potkan	IVM		C 0,6	
Hudetz 1995	potkan	IVM		C 1,47±0,58	
Hudetz 1997		IVM		C 0,5-1,8	
Kroppenstedt 2003	potkan	OPS	A 15, V 24	V 0,5, A 4	
Thomale 2001	potkan	OPS	A 19,1±2,7 V 22,2±1,4	V 0,68±0,08	
Pennings 2004	člověk	OPS	A 53±39 V 51±48		
Pennings 2006	člověk	OPS	A 53±39 V 51±48		Funkční C hustota 30,0±0,5, MFI 3
Ristagno 2007	prase	OPS			Počet perfund. C 15, MFI 3
Ristagno 2009	prase	OPS			Počet perfund. C 15, MFI 3
Wan 2009	potkan	SDF			Procento perfund. cév 98 MFI 3 DeBacker score 5,0
Pérez-Bárcena 2009	člověk	SDF			distribuce

**Tab. 1** Souhrn hodnot mikrocirkulačních parametrů z několika studií zabývajících se intravitální morfologií mozkové mikrocirkulace.

A – arterioly, V – venuly, C— kapiláry, IVM – intravitální mikroskopie, OPS – *orthogonal polarization spectral* zobrazení, SDF - *sidestream dark-field* zobrazení, MFI – *microvascular flow index*.

V naší studii jsme vyšetřovali cévy do průměru arterioli (a venul) a menší, ale nerozlišovali jsme mezi arterioly a venulami. Ačkoli viditelný tok erytrocytů v SDF záznamu umožňuje rozlišení mezi arterioly a venulami, není snadné určit hranici mezi kapilárami a arterioly či venulami. Pokud jsou tyto typy mikrocév definovány rozmezím průměrů, pak „průměr“ arterioli a venul, jak je uveden ve studiích v Tabulce 1, je váženým průměrem rozmezí průměrů. Namísto konkrétního “průměru” proto uvádíme distribuci průměrů cév váženou podle délky nebo plochy odpovídajících cévních segmentů na SDF obrazu. Toto poskytuje detailnější a úplnější popis průměrů cév v mikrocirkulaci. Vážený průměr libovolného rozmezí průměrů cév může být dopočten. Například dopočtený délkou vážený průměr všech cév (arterioli i venul) o průměru větším než 10  $\mu\text{m}$  je 30,0  $\mu\text{m}$ , čímž spadá mezi literární hodnoty pro potkana (15 a 24  $\mu\text{m}$  pro arterioly a venuly - Kroppenstedt 2003) a člověka (53 a 51  $\mu\text{m}$  pro arterioly a venuly - Pennings 2004).

Pouze ve studii Péreze-Bárceny (Pérez-Bárcena 2009) jsou uvedeny distribuce cévních průměrů (u mozkové mikrocirkulace člověka). Po úpravě hranic distribučních tříd (Tab. 2) je zjevná podobnost uvedených a námi neměřených distribucí. Ačkoli byly živočišné druhy (člověk vs. králík) odlišné, relativní distribuce průměrů cév jsou téměř stejné, což naznačuje, že je architektura mozkové mikrocirkulace podobná.

Průměr cévy	Procento z celkové délky cév	
	Pérez-Bárcena 2009	Naše studie
0-20 $\mu\text{m}$	77,9	81,6
20-40 $\mu\text{m}$	12,3	10,4
40-60 $\mu\text{m}$	6,7	5,7
nad 60 $\mu\text{m}$	3,1	2,9

**Tab. 2 Porovnání distribuce délkou vážených průměrů v naší studii a ve studii Péreze-Bárceny.**

Poněvadž jsme neindexovali všechny cévy viditelné na SDF obrazu Boermovými indexy (De Backer 2007), nemůžeme určit hustotu perfundovaných cév (resp. funkční hustotu) a procento perfundovaných cév, jak bylo navrženo v konsenzuální konferenci (De Backer 2007). Jako přibližné náhradní parametry můžeme kombinovat hustotu všech (případně jen malých) cév a microvascular flow index (MFI). Protože byl MFI 3,0 ve všech měřeních,

indexování všech individuálních cév by vedlo k hustotě perfundovaných cév blíží se hustotě všech cév. Ve studii Penningse (Pennings 2006) u člověka byla funkční kapilární hustota, odpovídající hustotě malých cév v naší studii,  $30 \pm 5 \text{ mm/mm}^2$ , oproti  $14,6 \pm 1,8 \text{ mm/mm}^2$  v naší studii. Poněkud vyšší hodnota pro mozkovou povrchovou mikrocirkulaci člověka (než králíka) není v rozporu s intuitivním očekáváním.

Každý záznam mikrocirkulace trval zhruba 10 sekund. V přípravné fázi experimentu jsme pořizovali i záznamy delší než 60 sekund, avšak nezjistili jsme žádné podstatné rozdíly v čase. Považujeme proto pozorování po dobu 10 sekund za postačující. Takto dlouhá pozorování jsou uváděna i v jiných pracích užívajících stejnou technologii.

Králík byl zvolen jako experimentální druh díky optimálnímu kompromisu mezi rozměrem hlavy zvířete a velikostí SDF sondy. Hlava (a tedy i mozek) menších zvířat, např. potkanů, má rozměry podobné SDF sondě, z čehož plyne potřeba relativně rozsáhlé kraniotomie se souběžnými technickými obtížemi (zjm. kvácení z diploe při kraniotomii). Bylo by rovněž ještě obtížnější získat obrazy z více než dvou či třech oblastí povrchu mozku, jak je doporučeno konsenzuální konferencí (De Backer 2007), poněvadž by konec SDF sondy velikostí těsně odpovídal kraniotomii. Na druhou stranu větší zvíře, např. prase, zvyšuje náklady na experiment, aniž by větší rozměry zvířete přinášely jinou podstatou výhodu. Považujeme proto králíka za ideální zvíře pro studium mozkové mikrocirkulace pomocí SDF technologie.

Studie má několik limitací.

Tlakové artefakty při kontaktu s SDF sondou jsou společným problémem všech kontaktních metod (Lindert 2002). Používali jsme velmi opatrnou techniku SDF záznamu, jak je uvedeno v metodické části, ve snaze minimalizovat tento typ artefaktu. Jednou z výhod SDF zobrazení (oproti OPS zobrazení) je fixní (nehybná) pozice konce SDF sondy při zaostřování (Goedhardt 2007).

Bočný pohyb tkáně je další obecnou limitací SDF metody, interferující zejména s měřením rychlosti toku. V naší studii jsme SDF sondu fixovali ve speciálně konstruovaném fixátoru umožňujícím mikropohyb, ale omezujícím bočný pohyb sondy. Výhodou zobrazování povrchu mozku je poměrně stabilní pozice tkáně v hlavě, což dále omezuje bočný pohyb během zobrazení.

Artefakty jsou rovněž navozeny punkcí dura a arachnoidea mater. Ve studii Thomala (Thomale 2001) provedené na potkanech nebyla dura mater otvírána, SDF záznam byl pořízen transdurálně. V případě králíků přítomnost dura mater podstatně zhoršuje vizuální ostrost obrazu povrchové mikrocirkulace a prakticky znemožňuje transdurální SDF

zobrazování, nejspíše díky širší dura mater i širšímu subarachnoidálnímu prostoru než u potkanů. Po otevření arachnoidey byl mozek intermitentně zvlhčován fyziologickým roztokem o teplotě 37 °C během celého experimentu. Nepříznivé důsledky takového zvlhčování, jako např. odstranění přirozeného mozkomíšního moku, na mozkové mikrocirkulační parametry nemůžeme zcela vyloučit.

## **Závěr**

Potvrdili jsme proveditelnost a přesnost posouzení mozkové mikrocirkulace králíka pomocí SDF zobrazení a změřili jsme základní mikrocirkulační parametry, které jsou srovnatelné s měřeními jiných autorů. Výsledky mohou být použity jako reference pro budoucí studie mozkové mikrocirkulace na králičím modelu. Metoda SDF zobrazení se zdá být použitelná v animálních studiích či během operace u lidí. Poskytuje jedinečnou možnost studovat mozkovou mikrocirkulaci za různých experimentálních a klinických podmínek.

Studie byla podpořena Výzkumným záměrem MZO 00179906

Děkujeme společnosti Arrow International Czech Republic za konstrukci speciálního fixátoru SDF sondy.

ŠITINA, M., et al. In situ assessment of the brain microcirculation in mechanically-ventilated rabbits using sidestream dark-field (SDF) imaging. *Physiological Research*. January 2011, vol. 60, No. 1, s. 75-81.

# Zachovaná mikrocirkulace mozku v časném stádiu endotoxémie u mechanicky ventilovaných králíků

## Úvod

Existuje rozsáhlá evidence důležité role mikrocirkulace v patogenezi sepse (Den Uil 2008, Elberts 2006, Ellis 2005). Role mikrocirkulační dysfunkce je rovněž zvažována v patogenezi septické encefalopatie, avšak důkazy jsou méně jasné (Ebersoldt 2007, Papadopoulos 2000, Sharshar 2006, Pytel 2007). Encefalopatie je často popisována jako časný příznak sepse, který předchází dalším klinickým příznakům (Papadopoulos 2000). V databázi PubMed jsme však nenalezli žádnou studii zabývající se intravitálním zobrazením mozkové mikrocirkulace v časném stádiu sepse či endotoxémie.

Cílem naší studie bylo vyšetřit změny v povrchové (piální) mozkové mikrocirkulaci po podání endotoxinu u králíků. Testovanou hypotézou je signifikantní alterace mozkové mikrocirkulace v časném stádiu sepse indukované aplikací endotoxinu.

## Materiály a metody

### *Příprava zvířete*

Po nočním lačnění s neomezeným přístupem k vodě byli králíci uvedeni do anestezie intramuskulární aplikací ketaminu (50 mg/kg, Calypsol, Gedeon Richter Plc., Maďarsko) a xylazinu (4 mg/kg, Rometar, Bioveta, Česká republika). Zvíře bylo otočeno na hřbet a připevněno k operačnímu stolu. Ušní arterie a dvě marginální žíly byly zakanylovány polyethylenovými kanyly pro kontinuální monitoraci krevního tlaku, analýzu arteriálních krevních plynů a kontinuální infuzi tekutin (fyziologický roztok, 10 ml/kg/hod.), anestetik (fentanyl 0,5 µg/kg/min. - Fentanyl-Janssen, Janssen Pharmaceutica N.V., Belgie, midazolam 33 µg/kg/min. - Dormicum, Roche, Praha, Česká republika, propofol 0,1 mg/kg/min. Diprivan, AstraZeneca, Velká Británie) a svalových relaxancií (pipecuronium bromid 0,6 mg/kg/hod, Arduan, Gedeon Richter Plc., Maďarsko). Zvířatům byla provedena tracheotomie, zavedena polyetylenová endotracheální kanyla o průměru 3 mm incizí v trachee a byla zahájena mechanická ventilace (Harvard Scientific ventilator, Boston, USA, ventilační parametry: dechový objem = 8 ml/kg, PEEP = 0 cm H<sub>2</sub>O, dechová frekvence = 30/min., FiO<sub>2</sub> = 0,21). Adekvátnost ventilace (pCO<sub>2</sub> 4-6 kPa) byla ověřena analýzou arteriálních krevních plynů. Během studie byly monitorovány střední arteriální tlak (MAP), srdeční frekvence a

rektální teplota. Rektální teplota byla udržována v rozmezí 38,5 – 39,5°C pomocí zahřívací ploténky.

Zvíře bylo poté otočeno do pronační polohy a pravá temporo-parieto-okcipitální oblast hlavy byla oholena. Kůže a periost oholené oblasti lebky byly incidovány a odklopeny. Okraje exponované oblasti, o rozměrech zhruba 1,5 cm x 1,5 cm, byly tvořeny střední čarou, bazí pravého ucha, zevní okcipitální protuberancí a pravým kaudálním supraorbitálním výběžkem. V lebce byly vyvrtány tři 3 mm otvory a zbytky kosti byly odlámány pomocí malého peánu. Rozměry vytvořeného kraniálního okna byly přibližně 12 mm x 10 mm, s intaktní dura mater na spodině. Krvácení z diploe bylo zastaveno pomocí kostního vosku. Rány byla kryta tampony navlhčenými sterilním fyziologickým roztokem o teplotě 37 °C. Po kontrole krvácení a 30-minutové stabilizační periodě s vyšším příjmem tekutin (20 ml/kg/hod. fyziologického roztoku) byla opatrně provedena incize dura mater, čímž byl odkryt temporoparietální povrch pravé mozkové hemisféry pro vizualizaci piální mozkové mikrocirkulace.

#### *Experimentální protokol*

Králíci byli náhodně rozděleni do dvou skupin - „endotoxemická“ a kontrolní. Endotoxemické skupině byl navozen endotoxinový šok 30-minutovou intravenózní infuzí 2 mg/kg endotoxinu (lipopolysacharid z *E. coli* 055:B5, L4005, Sigma-Aldrich) zředěného ve 20 ml fyziologického roztoku. Kontrolní skupině bylo podáno 20 ml fyziologického roztoku 30-minutovou intravenózní infuzí. Pokud bylo nutno, MAP byl udržován na hodnotě 70±5 mmHg titrací infuze s noradrenalinem (1 mg noradrenalinu ve 20 ml fyziologického roztoku). Žádné další tekutiny, vyjma kontinuální infuze fyziologického roztoku (10 ml/kg/hod.), nebyly během zbytku experimentu podány. Záznam mozkové mikrocirkulace byl pořízen vstupně (před podáním endotoxinu nebo fyziologického roztoku) a 90 minut poté (t.j. 60 minut po podání endotoxinu nebo fyziologického roztoku). Po ukončení experimentu byla zvířata usmrcena vysokou dávkou chloridu draselného.

#### *Sidestream dark-field zobrazovací procedura*

Mikrocirkulace byla zobrazena Sidestream dark-field (SDF) technologií (Černý 2007, Goedhart 2007). Pro minimalizaci tlakových a pohybových artefaktů byla SDF sonda (MicroScan Video Microscope, Microvision Medical, Inc., Amsterdam, Nizozemí) upevněna ve speciálně vyrobeném (Arrow International Czech Republic, a.s.) fixátoru s flexibilním ramenem umožňujícím mikropohyb SDF sondy v různých osách a současně pevnou



stabilizaci. Ve snaze maximálně standardizovat SDF zobrazování mikrocirkulace byl použit následující postup. Když byla vybrána oblast k zobrazení, SDF sonda byla umístěna přibližně 0,5 mm nad cílovou tkáň pomocí flexibilního ramene. Rameno bylo posléze zafixováno a sonda, krytá plastovým pouzdrém, byla posunována adaptérem pro mikropohyb. Jakmile došlo ke kontaktu s povrchem mozku, zaostřovacím prstencem byl obraz zaostřen k získání ostrého a kontrastního obrazu. Místa zájmu na povrchu mozku byla vybrána náhodně, jak umožňovaly anatomické podmínky. Veškeré exponované tkáně, s výjimkou tkáně právě kryté SDF sondou, byla kontinuálně zvlhčovány fyziologickým roztokem o teplotě 37 °C. U každého zvířete byly pořízeny záznamy ze dvou různých oblastí (polí) exponovaného povrchu mozku. Veškerá SDF zobrazení mikrocirkulace byla digitálně zaznamenána a později analyzována „off-line“.

#### *Off-line analýza*

Pro „off-line“ analýzu byly vybrány nejstabilnější ostré a kontrastní videosekvence. Celkově 6 sekvencí (3 sekvence pro každou oblast) v trvání 10 sekund bylo analyzováno u každého zvířete a jejich průměr byl použit pro následné výpočty. Konečné zvětšení obrazu na monitoru SDF přístroje bylo 325x, skutečné rozměry zobrazovaného pole byly 1280  $\mu\text{m}$  x 960  $\mu\text{m}$ . Microcirkulační parametry byly měřeny pomocí softwaru AVA V3.0 (AMC, University of Amsterdam, Nizozemí). Software je schopen automatické detekce cév a kalkulace jejich parametrů – průměru, délky, hustoty a dalších dopočtených parametrů. Pokud není detekce cévy správná, manuální korekce automatické detekce je možná.

Analyzovány byly následující parametry (De Backer 2007):

1. Celková hustota malých nebo všech cév, definovaná jako celková délka malých nebo všech cév uvnitř obrazu dělená celkovou plochou obrazu, uváděná v  $\text{mm}/\text{mm}^2$ .
2. De Backerovo skóre, uváděné v  $\mu\text{m}^{-1}$ , je kalkulováno jako počet průsečíků cév s třemi horizontálními a třemi vertikálními čarami stejné délky (nakreslenými na obrazovce) dělený celkovou délkou všech 6 čar.
3. Microvascular flow index (MFI), který je průměrnou hodnotou 4 semikvantitativních skóre (0 – nepřítomný tok, 1 – intermitentní tok, 2 – kontinuální obleněný (pomalý) tok, 3 – kontinuální normální (rychlý) mikrovaskulární tok) ve čtyřech kvadrantech obrazu, subjektivně posuzovaných pozorovatelem.

Malé cévy jsou definovány poloměrem menším než 25  $\mu\text{m}$ .

### Statistické zpracování

Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu SIGMASTAT 2.0 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Normalita dat byla ověřena Kolmogorovým - Smirnovým testem. Popisná data jsou uvedena jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru. Porovnání dat před a po aplikaci endotoxinu nebo fyziologického roztoku bylo provedeno pomocí párového T-testu a porovnání dat mezi endotoxemickou a kontrolní skupinou bylo provedeno pomocí nepárového T-testu. Hladina významnosti byla zvolena 0,05.

### Výsledky

Celkem bylo 5 králíků zařazeno do endotoxemické skupiny a 5 do kontrolní skupiny. 1 králík kontrolní skupiny zemřel během chirurgických výkonů. Tabulka 1 porovnává několik hemodynamických, respiračních a fyzických parametrů obou skupin. Po podání endotoxinu došlo k signifikantnímu nárůstu dávky noradrenalinu a srdeční frekvence. Žádné další parametry se signifikantně nelišily.

Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v žádném z měřených parametrů mozkové mikrocirkulace, jak je uvedeno v Tabulce 2. MFI byl 3,0 ve všech měřeních u všech zvířat.

Typický obraz pořízený SDF sondou je ukázán na Obr. 1.

Podání	Parametry	Endotoxemická skupina	Kontrolní skupina
	Hmotnost (kg)	3,4 $\pm$ 0,1	3,4 $\pm$ 0,2
	Příjem tekutin (ml/kg)	70,9 $\pm$ 2,0	65,2 $\pm$ 0,9
před endotoxinem/ fyziologickým roztokem	MAP (mmHg)	74,0 $\pm$ 2,0	69,6 $\pm$ 1,8
	Srdeční frekvence (min <sup>-1</sup> )	215,0 $\pm$ 7,2*	200,5 $\pm$ 19,1
	Noradrenalin ( $\mu$ g/kg/min.)	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>x</sup>	0,2 $\pm$ 0,1
	pO <sub>2</sub> (kPa)	8,1 $\pm$ 0,8	9,9 $\pm$ 0,9
	pCO <sub>2</sub> (kPa)	5,2 $\pm$ 0,5	4,4 $\pm$ 0,4
60 minut po endotoxinu/ fyziologickém roztoku	MAP (mmHg)	77,4 $\pm$ 2,2	77,8 $\pm$ 7,0
	Srdeční frekvence (min <sup>-1</sup> )	242,0 $\pm$ 3,7* <sup>#</sup>	220,5 $\pm$ 5,9 <sup>#</sup>
	Noradrenalin ( $\mu$ g/kg/min.)	0,6 $\pm$ 0,2 <sup>x,+</sup>	0,1 $\pm$ 0,1 <sup>+</sup>
	pO <sub>2</sub> (kPa)	9,1 $\pm$ 0,8	8,7 $\pm$ 0,8
	pCO <sub>2</sub> (kPa)	5,1 $\pm$ 0,5	5,5 $\pm$ 0,7

**Tab. 1 Hemodynamické, respirační a fyzické parametry před a po podání endotoxinu nebo fyziologického roztoku.**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM.

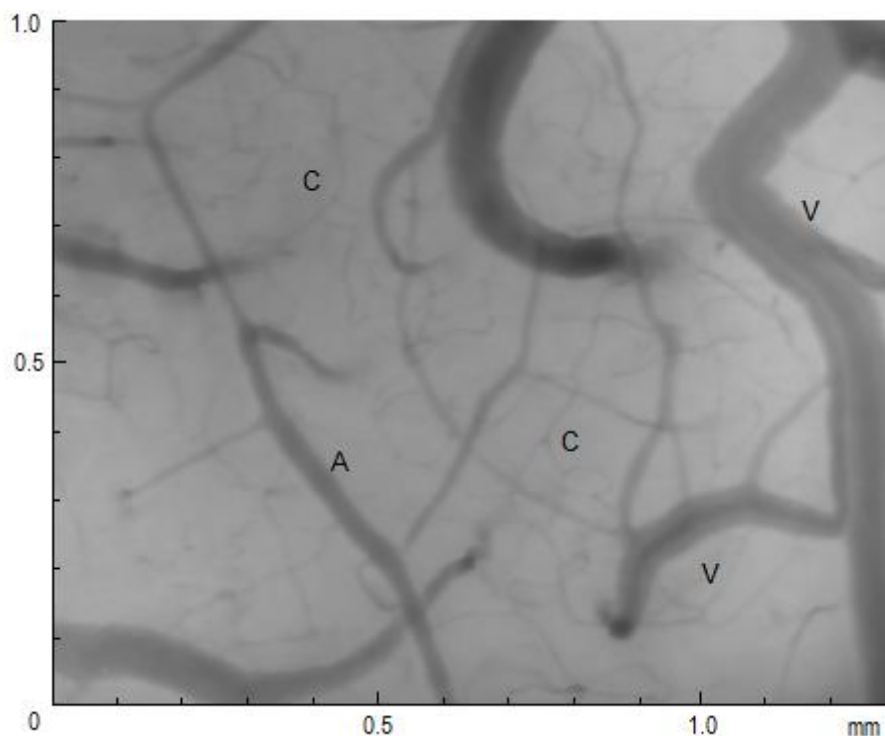
*Pozn.* Příjem tekutin je celkový příjem všech tekutin během celého experimentu. MAP – střední arteriální tlak.  $pO_2$  – parciální tlak kyslíku v arteriální krvi.  $pCO_2$  – parciální tlak oxidu uhličitého v arteriální krvi. Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM

\*trend k významnému rozdílu v srdeční frekvenci před a po podání endotoxinu ( $p=0,06$ ), <sup>x</sup>významný rozdíl v dávce noradrenalinu před a po podání endotoxinu ( $p=0,04$ ), <sup>#</sup>významný rozdíl v srdeční frekvenci mezi endotoxemickou a kontrolní skupinou po podání endotoxinu/fyziologického roztoku ( $p=0,01$ ), <sup>+</sup>trend k významnému rozdílu v dávce noradrenalinu mezi endotoxemickou a kontrolní skupinou po podání endotoxinu/fyziologického roztoku ( $p=0,09$ ).

Podání	Parametry	Endotoxemická skupina	Kontrolní skupina
před endotoxinem/ fyziologickým roztokem	SVD ( $mm/mm^2$ )	12,0 $\pm$ 1,2	12,8 $\pm$ 1,8
	TVD ( $mm/mm^2$ )	15,9 $\pm$ 1,1	16,5 $\pm$ 1,7
	DBS ( $mm^{-1}$ )	10,9 $\pm$ 0,6	10,5 $\pm$ 1,2
60 minut po endotoxinu/ fyziologickém roztoku	SVD ( $mm/mm^2$ )	14,7 $\pm$ 1,4	14,5 $\pm$ 1,0
	TVD ( $mm/mm^2$ )	18,1 $\pm$ 1,0	17,4 $\pm$ 1,1
	DBS ( $mm^{-1}$ )	11,9 $\pm$ 1,6	10,6 $\pm$ 0,9

**Tab. 2 Parametry mozkové mikrocirkulace před a po podání endotoxinu nebo fyziologického roztoku.**

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SEM. SVD – hustota malých cév, TVD – hustota všech cév, DBS – De Backerovo skóre.



**Obr. 1** Typický obraz mozkové mikrocirkulace králíká získaný *Sidestream dark-field* (SDF) technologií.

Objektiv 5×, na obrazovce 325×, velikost zobrazovaného pole 1280 μm x 960 μm. A – arteriola, V – venula, C – kapilára.

## Diskuze

Ve studii nebyla zjištěna signifikantní alterace mozkové mikrocirkulace králíků zobrazené SDF technologií v časném stádiu endotoxinového šoku. Výsledek naznačuje, že v časných stádiích endotoxinového šoku je mozková mikrocirkulace zachována, podobně jako u kardiogenního a hemoragického šoku (Wan 2009 a 2010). V takovém případě by patogeneze septické encefalopatie, přinejmenším v časném stádiu, zahrnovala jiné mechanismy, než alteraci mozkové mikrocirkulace. Vzhledem k výrazné komplexnosti dosud popsáných mechanismů septické encefalopatie je taková představa dobře přijatelná (Papadopoulos 2000).

Možná jsou však i alternativní vysvětlení našich výsledků.

Endotoxinový šok byl navozen úspěšně, pro což svědčí nárůst dávky noradrenalinu a srdeční frekvence po podání endotoxinu. Dávka endotoxinu a vyplývající intenzita šoku však nemusely nabýt dostatečné intenzity, aby vedly k detekovatelným změnám mozkové mikrocirkulace.

Rychlé podání vysoké dávky endotoxinu též není zcela realistickým modelem septického šoku, jak se obvykle projevuje v klinické praxi, kde je progresse sepse obvykle pomalejší, je přítomen infekční fokus a cytokinové spektrum je odlišné (Schultz 2002). Makrohemodynamické cirkulační selhání s rychlým rozvojem závažné hypotenze, spíše než progresivní alterace mikrocirkulace, je charakteristické pro takový model (Schultz 2002, Dyson 2009).

Konečně čas nezbytný pro rozvoj alterace mozkové mikrocirkulace může být delší než trvání našeho experimentu. Ve studii Nakajimy (Nakajima 2006) však byla zjištěna signifikantní alterace mikrocirkulace střevní mukózy již 60 minut po podání endotoxinu. Rovněž některé cytokiny (např. TNF- $\alpha$ , IL-6) dosahují vrcholových hodnot mezi 60. a 120. minutou po podání endotoxinu (Boogaard 2010, Carlsson 2009). Je možné spekulovat, že doba do rozvoje alterace mozkové mikrocirkulace může být delší než u jiných orgánů, vzhledem k "ochraně" před působením endotoxinu cestou hematoencefalické bariéry (Papadopoulos 2000). Na druhou stranu zhoršení vztahu průtoku a metabolismu mozku (*flow-metabolism coupling*) bylo popsáno již ve velmi časném stádiu závažné endotoxémie (Rosengarten 2007). Takové zhoršení však může být čistě funkčního původu a nemusí být důsledkem morfologické alterace mozkové mikrocirkulace, která zejména je metodou SDF studována.

I jiné faktory mohou limitovat naše výsledky.

Počet zařazených zvířat byl poměrně nízký. Nicméně rozdíly ve středních hodnotách parametrů mozkové mikrocirkulace (Tabulka 2) byly minimální, MFI byl spolehlivě 3,0 ve všech měřeních u všech zvířat a subjektivně jsme během „off-line“ analýzy nepostřehli žádné rozdíly či trendy mezi endotoxemickou a kontrolní skupinou. Na druhou stranu makrohemodynamická alterace byla signifikantní i přes malý rozsah souboru. Věříme proto, že pozorovaná absence alterace mozkové mikrocirkulace odpovídá její skutečné absenci a zvětšení rozsahu souboru by výsledky neovlivnilo.

Snažili jsme se vyloučit efekt hypotenze samotné, rozvíjející se během progresse šoku, titrací noradrenalinu na predefinovanou hodnotu středního arteriálního tlaku. Nemůžeme však vyloučit případný negativní efekt podávaného noradrenalinu, ačkoli jeho dávka nebyla vysoká.

Určitou technickou limitací, která komplikuje detekci drobných změn v mikrocirkulaci, je malý rozměr kraniotomie poskytující pouze omezený počet různých polí (často pouze dvě) dostupných pro konec SDF sondy. Podle doporučení pro SDF či OPS zobrazování by měly být zobrazeny a proměřeny nejméně tři různé oblasti tkáně pro adekvátní zachycení

heterogenity mikrocirkulace (Papadopoulos 2000). To bylo v našem experimentálním uspořádání většinou nemožné, protože provedení větší kraniotomie je komplikované a nebezpečné.

Studie je rovněž předmětem všech obecných limitací SDF metody a dalších kontaktních metoda, jako jsou tlakové artefakty, bočný pohyb tkáně apod., popsané v detailech jinde (Lindert 2002). Používali jsme velmi opatrnou techniku SDF záznamu, jak je uvedeno v metodické části, ve snaze minimalizovat tlakové artefakty. Bočný pohyb tkáně je limitací zvláště při měření rychlostí toku, netýká se tedy naší studie. Výhodou zobrazování povrchu mozku je poměrně stabilní pozice tkáně v hlavě, což dále omezuje bočný pohyb během zobrazení.

Artefakty jsou rovněž navozeny punkcí dura a arachnoidea mater. Ve studii Thomala (Thomale 2001) provedené na potkanech nebyla dura mater otvírána, SDF záznam byl pořízen transdurálně. V případě králíků přítomnost dury mater podstatně zhoršuje vizuální ostrost obrazu povrchové mikrocirkulace a prakticky znemožňuje transdurální SDF zobrazování. Po otevření arachnoidey byl povrch mozku zvlhčován fyziologickým roztokem o tělesné teplotě během celého experimentu. Nepříznivé důsledky takového zvlhčování, jako např. odstranění přirozeného mozkomíšního moku, na mozkové mikrocirkulační parametry nemůžeme zcela vyloučit. První záznam mikrocirkulace byl však pořízen velmi záhy po incizi dury mater, dříve, než se mohly nežádoucí efekty zvlhčování projevit. A v kontrolní skupině nebyl patrný rozdíl mezi záznamy na začátku a na konci experimentu. Nežádoucí efekty zvlhčování tedy pravděpodobně nejsou podstatné.

## **Závěr**

Nezjistili jsme signifikantní alteraci mozkové mikrocirkulace králíků zobrazené SDF technologií v časném stádiu endotoxinového šoku. Pro vyjasnění našich zjištění jsou zapotřebí další studie.

Studie byla podpořena Výzkumným záměrem MZO 00179906

Děkujeme společnosti Arrow International Czech Republic za konstrukci speciálního fixátoru SDF sondy.

ŠITINA, M., et al. Preserved cerebral microcirculation in early stages of endotoxemia in mechanically-ventilated rabbits. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. January 2011, vol. 47, no. 1, s. 37-44.

## Závěry

V průběhu doktorského studia jsme provedli 4 experimentální animální studie a jednu teoretickou studii pomocí matematického modelu.

Metodologickou studií indikátorové mikrodialyzační techniky na modelu hemoragického šoku u potkana jsme tuto techniku posoudili jako nepostačující k dostatečně přesnému posouzení tkáňové perfuze v animálním experimentu či v klinické praxi. Práce byla publikována v časopisu s Impact faktorem.

Neprokázali jsme negativní ovlivnění mozkové autoregulace prasete střední hypotermií. Podstatným nedostatkem práce byla skutečnost, že i při normotermii působila autoregulace velmi omezeně. Jednoznačné vysvětlení pro výsledek experimentu jsme nenalezli.

S pomocí matematického modelu THR testu jsme ukázali, že z „vnitřních“ faktorů THR testu je podstatný pouze efekt „fázového posunu“. Efekt průchodnosti Willisova okruhu a efekt setrvačnosti, t.j zrychlení a zpomalení toku krve, vyhodnotil matematický model jako efekt okrajový. Jedno z možných vysvětlení absence autoregulace při THR testu u prasete, totiž větší vliv setrvačnosti toku krve při odlišných anatomických poměrech oproti člověku, tím bylo vyvráceno. Při provádění THR testu lze doporučit změřit několik hodnot THRR a pro hodnocení autoregulace zvolit tu nejvyšší, případně pro výpočet THRR použít druhého maxima rychlosti toku v MCA po uvolnění ICA komprese.

Metodická studie zobrazení mikrocirkulace povrchu mozku králíka pomocí SDF techniky prokázala vysokou kvalitu zobrazení, změřené parametry mikrocirkulace odpovídaly jiným literárním údajům. Práce byla publikována v časopisu s Impact faktorem.

Aplikace výše uvedeného zobrazení SDF povrchu mozku neprokázala změny mozkové mikrocirkulace králíka při časně endotoxémii. Práce byla publikována v časopisu s Impact faktorem.

## Použitá literatura

- AASLID, R., et al. Cerebral autoregulation dynamics in humans. *Stroke*. January 1989, vol. 20, no. 1, s. 45-52.
- AIT-OUFELLA, H., et al. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Medicine*. August 2010, vol. 36, no. 8, s. 1286-1298.
- B. ROSENGARTEN, et al. Microcirculatory dysfunction in the brain precedes changes in evoked potentials in endotoxin-induced sepsis syndrome in rats. *Cerebrovascular Diseases*. 2007, vol. 23, no. 2-3, s. 140-147.
- BAEZ, S. Bayliss response in the microcirculation. *Federal Proceedings*. November-December 1968, vol. 27, no. 6, s. 1410-1415.
- BEDELL, E.A., et al. Cerebral pressure autoregulation is intact and is not influenced by hypothermia after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*. September 2004, vol. 21, no. 9, s. 1212-1222.
- BEIN, B., et al. A comparison of transcranial Doppler with near infrared spectroscopy and indocyanine green during hemorrhagic shock: a prospective experimental study. *Critical Care*. 2006, vol. 10, no. 1, s. R18.
- BELLANDER, B. M., et al. Consensus meeting on microdialysis in neurointensive care. *Intensive Care Medicine*, December 2004, vol. 30, no. 12, s. 2166-2169.
- BEN MIME, L., et al. Pharmacologic cerebral capillary blood flow improvement after deep hypothermic circulatory arrest: an intravital fluorescence microscopy study in pigs. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. September 2005, vol. 130, no. 3, s. 670-676.
- BERGFELD, G.R., FORRESTER, T. Release of ATP from human erythrocytes in response to a brief period of hypoxia and hypercapnia. *Cardiovascular Research*. January 1992, vol. 26, no. 1, s. 40-47.
- BERNARD, G.R., et al. Recombinant human protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *New England Journal of Medicine*. March 2001, vol. 344, no. 10, s. 699-709.
- BIBERTHALER, P., et al. In vivo assessment of colon microcirculation: comparison of the new OPS imaging technique with intravital microscopy. *European Journal of Medical Research*. December 2001, vol. 6, no. 12, s. 525-534.



- BOERMA, E.C., et al. Effects of nitroglycerin on sublingual microcirculatory blood flow in patients with severe sepsis/septic shock after a strict resuscitation protocol: a double-blind randomized placebo controlled trial. *Critical Care Medicine*. January 2010, vol. 38, no. 1, s. 93-100.
- BOERMA, E.C., et al. Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study. *Crit Care*. September 2005, vol. 9, s. R601-R606.
- BOERMA, E.C., VAN DER VOORT, P.H., INCE, C. Sublingual microcirculatory flow is impaired by the vasopressin-analogue terlipressin in a patient with catecholamine-resistant septic shock. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*. October 2005, vol. 49, no. 9, 1387-1390.
- BONNER, R., NOSSAL, R. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue. *Applied Optics*. June 1981, vol. 20, no. 12, s. 2097-2107.
- BORGSTROM, P., et al. Microvascular responses in rabbit skeletal muscle after fixed volume hemorrhage. *American Journal of Physiology*, July 1990, vol. 259, no 1, část 2, s. H190-196.
- CALVANO, S.E., et al. A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature*. October 2005, vol. 437, no. 7061, s. 1032-1037.
- CARLSSON, M., et al. Inflammatory and circulatory effects of the reduction of endotoxin concentration in established porcine endotoxemic shock - a model of endotoxin elimination. *Critical Care Medicine*. March 2009, vol. 37, no 3, s. 1031-1034.
- CAVILL, G., SIMPSON, E.J., MAHAJAN, R.P. Factors affecting assessment of cerebral autoregulation using the transient hyperaemic response test. *British Journal of Anaesthesia*. September 1998, vol. 81, no. 3, s. 317-321.
- ČERNÝ, V., TUREK, Z., PAŘÍZKOVÁ, R. Orthogonal polarization spectral imaging: A review. *Physiological Research*. 2007, vol. 56, no. 2, s. 141-147.
- ČERNÝ, V., ŠITINA, M. Assessment of regional tissue perfusion by indicator microdialysis technique. *Anesteziologie a intenzivní medicína*. 2006, vol. 17, s. 171-175.
- CRONER, R.S., et al. Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia. *Critical Care*. February 2006, vol. 10, no. 1, R15.
- CUI, X., et al. Neuronal nitric oxide synthase deficiency decreases survival in bacterial peritonitis and sepsis. *Intensive Care Medicine*. November 2007, vol. 33, no. 11, s. 1993-2003.

- CZOSNYKA, M., et al. Contribution of mathematical modelling to the interpretation of bedside tests of cerebrovascular autoregulation. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. December 1997, vol. 63, no. 6, s. 721-31.
- CZOSNYKA, M., et al. The hyperaemic response to a transient reduction in cerebral perfusion pressure: a modelling study. *Acta Neurochirurgica (Wien)*. 1992, vol. 115, no. 3-4, s. 90-97.
- DE BACKER, D., ORTIZ, J.A., SALGADO, D. Coupling microcirculation to systemic hemodynamics. *Current Opinion in Critical Care*. June 2010, vol. 16, no. 3, s. 250-254.
- DE BACKER, D., DONADELLO, K., FAVORY, R. Link between coagulation abnormalities and microcirculatory dysfunction in critically ill patients. *Current Opinion in Anaesthesiology*. April 2009, vol. 22, no. 2, s. 150-154.
- DE BACKER, D., et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Critical Care*. 2007, vol. 11, no. 5, s. R101.
- DE BACKER, D., et al. Effects of drotrecogin alfa activated on microcirculatory alterations in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine*. July 2006, vol. 34, no. 7, s. 1918-1924.
- DE BACKER, D. OPS techniques. *Minerva Anesthesiology*. May 2003, vol. 69, no. 5, s. 388-391.
- DE BACKER, D., et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. July 2002, vol. 168, no. 1, s. 98-104.
- DE BACKER, D, DUBOIS, M.J. Assessment of the microcirculatory flow in patients in the intensive care unit. *Current Opinion in Critical Care*. June 2001, vol. 7, no. 3, s. 200-203.
- DE WIT, C., et al . Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *Pflugers Archiv*. August 1997, vol. 434, no. 4, s. 354-361.
- DE WIT, C., et al. Nitric oxide opposes myogenic pressure responses predominantly in large arterioles in vivo. *Hypertension*. March 1998, vol. 31, no. 3, s. 787-794.
- DEN UIL, C.A., et al. Low-dose nitroglycerin improves microcirculation in hospitalized patients with acute heart failure. *European Journal of Heart Failure*. April 2009, vol. 11, no. 4, s. 386-390.
- DEN UIL, C.A., et al. The microcirculation in health and critical disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*. September-October 2008, vol. 51, no. 2, s. 161-170.

- DEN UIL, C.A., et al. The microcirculation in health and critical disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*. September-October 2008, vol. 51, no. 2, s. 161-170.
- DEWACHTER, P., et al. Anaphylactic shock: a form of distributive shock without inhibition of oxygen consumption. *Anesthesiology*, July 2005, vol. 103, no. 1, s. 40-49.
- DRAZENOVIC, R., et al. Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia. *Journal of Applied Physiology*. January 1992, vol. 72, no. 1, s. 259-265.
- DUEBENER, L.F., et al. Effects of hematocrit on cerebral microcirculation and tissue oxygenation during deep hypothermic bypass. *Circulation*. September 2001, vol. 104, suppl., s. I260-264.
- DULING, B.R., BERNE, R.M. Longitudinal gradients in periarteriolar oxygen tension. A possible mechanism for the participation of oxygen in local regulation of blood flow. *Circulation Research*. November 1970, vol. 27, no 5, 669-678.
- DYSON, A., SINGER, M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting?. *Critical Care Medicine*. January 2009, vol. 37, Suppl, S30-37.
- EBERSOLDT, M., SHARSHAR, T., ANNANE, D. Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Medicine*. June 2007, vol. 33, no. 6, s. 941-950.
- EDMARK, K.W. Continuous blood pH measurement with extracorporeal cooling. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*. December 1959, vol. 109, s. 743-749.
- ELBERS, P.W., INCE, C. Mechanisms of critical illness—classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Critical Care*. 2006, vol. 10, no. 4, 221.
- ELDRIDGE, F. L. Relationship between lactate turnover rate and blood concentration in hemorrhagic shock *Journal of Applied Physiology*. September 1974, vol. 37, no. 3, s. 321-323.
- ELLIS, C.G., et al. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O<sub>2</sub> extraction in sepsis. *American Journal of Physiology, Heart and Circulation Physiology*. January 2002, vol. 282, no. 1, s. H156-164.
- ELLIS, C.G., JAGGER, J., SHARPE, M. The microcirculation as a functional system. *Critical Care*. 2005, vol. 9, Supplementum 4, s S3-8.
- ELLSWORTH, M.L., et al. Erythrocytes: oxygen sensors and modulators of vascular tone. *Physiology (Bethesda)*. April 2009, vol. 24, s. 107-116.
- ELLSWORTH, M.L., et al. The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *American Journal of Physiology*. December 1995, vol. 269, no. 6, část 2, s. H2155-2161.

- ENEVOLDSEN, E.M., JENSEN, F.T. "False" autoregulation of cerebral blood flow in patients with acute severe head injury. *Acta Neurologica Scandinavica Supplementum*. 1977, vol. 64, s. 514-515.
- ENEVOLDSEN, E.M., JENSEN, F.T. Autoregulation and CO<sub>2</sub> responses of cerebral blood flow in patients with acute severe head injury. *Journal of Neurosurgery*. May 1978, vol. 48, no. 5, s. 689-703.
- FOLKOW, B., et al. Background of increased flow resistance and vascular reactivity in spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiologica Scandinavica*. September 1970, vol. 80, no. 1, s. 93-106.
- FORRESTER, T., et al. Effect of adenosine triphosphate and some derivatives on cerebral blood flow and metabolism. *Journal of Physiology*. November 1979, vol. 296, s. 343-355.
- FURCHGOTT, R.F., ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. November 1980, vol. 288, no. 5789, s. 373-376.
- GATTINONI, L., et al. A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. *New England Journal of Medicine*. October 1995, vol. 333, no. 16, s. 1025-1032.
- GEOCARDIN, R.G., et al. Intensive care for brain injury after cardiac arrest: therapeutic hypothermia and related neuroprotective strategies. *Critical Care Clinics*. October 2006, vol. 22, no. 4, 619-636.
- GEORGIADIS, D., et al. Cerebral autoregulation under moderate hypothermia in patients with acute stroke. *Stroke*. December 2002, vol. 33, no. 12, s. 3026 – 3029.
- GIERER, P., et al. Activated protein C reduces tissue hypoxia, inflammation, and apoptosis in traumatized skeletal muscle during endotoxemia. *Critical Care Medicine*. August 2007, vol. 35, no. 8, s. 1966-1971.
- GILLER, C. A. A bedside test for cerebral autoregulation using transcranial Doppler ultrasound. *Acta Neurochirurgica (Wien)*. 1991, vol. 108, no. 1-2, s. 7-14.
- GOEDHART, P.T., et al. Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation. *Optics Express*, November 2007, vol. 15, no 23, s. 15101-15114.
- GOLDMAN, D., BATEMAN, R.M., ELLIS, C.G. Effect of decreased O<sub>2</sub> supply on skeletal muscle oxygenation and O<sub>2</sub> consumption during sepsis: role of heterogeneous capillary spacing and blood flow. *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology*. June 2006, vol. 290, no. 1, s. 2277-2285.

- GOLUB, A.S., PITTMAN, R.N. Erythrocyte-associated transients in PO<sub>2</sub> revealed in capillaries of rat mesentery. *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology*. June 2005, vol. 288, no. 6, s. 2735-2743.
- 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. *Nature Medicine*. October 1999, vol. 5, no. 10, s. 1209-1212.
- GRONER, W., et al. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. *Nature Medicine*. October 1999, vol. 5, no. 10, s. 1209-1212.
- GUYTON, A.C., HALL, J.E. Textbook of medical physiology. 2000, Philadelphia and Sydney, WB Saunders, 10. vyd.
- HADEN, D.W., et al. Mitochondrial biogenesis restores oxidative metabolism during Staphylococcus aureus sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. October 2007, vol. 176, no. 8, s. 768-777.
- HARDER, D.R. Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circulation Research*. August 1984, vol. 55, no. 2, s. 197-202.
- HARRIS AG, SINITSINA I, MESSMER K: Quantitative analysis of orthogonal polarization spectral images: validation in the hamster dorsal skinfold chamber In: *Orthogonal Polarization Spectral Imaging*. MESSMER K (ed). Karger, Basel, vol 24, 2000a, s. 21-31.
- HARRIS, A.G., SINITSINA, I., MESSMER, K.: The Cytoscan Model E-II, a new reflectance microscope for intravital microscopy: comparison with the standard fluorescence method. *Journal of Vascular Research*. November-December 2000b, vol. 37, no. 6, s. 469-476.
- HARRIS, A.G., SINITSINA, I., MESSMER, K.: Validation of OPS imaging for microvascular measurements during isovolumic hemodilution and low hematocrits. *American Journal of Physiology*. April 2002, vol. 282, no. 4, s. H1502-H509.
- HAYES, M.A., et al. TIMMINS AC, Yau EH, Palazzo M, Hinds CJ, Watson D. Elevation of systemic oxygen delivery in the treatment of critically ill patients. *New England Journal of Medicine*. June 1994, vol. 330, no. 24, s. 1717-1722.
- HEMMEN, T.M., LYDEN, P.D. Induced hypothermia for acute stroke. *Stroke*. February 2007, vol. 38 (Suppl.), s. 794-799.
- HENDRIKSE, J., et al. Distribution of cerebral blood flow in the circle of Willis. *Radiology*. April 2005, vol. 235, no. 1, s. 184-189,
- HESTER, R.L. Venular-arteriolar diffusion of adenosine in hamster cremaster microcirculation. *American Journal of Physiology*. June 1990, vol. 258, no. 6, část 2, s. H1918-1924.

- HIBBS, J.B., TAINTOR, R.R., VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*. January 1987, vol. 235, s. 473-476.
- HICKNER, R. C., et al. Muscle blood flow in cats: comparison of microdialysis ethanol technique with direct measurement. *Journal of Applied Physiology*, August 1995, vol. 79, no. 2, s. 638-647.
- HICKNER, R. C., et al. Muscle blood flow in cats: comparison of microdialysis ethanol technique with direct measurement. *Journal of Applied Physiology*. August 1995, vol. 79, no. 2, s. 638-647.
- HILTON, S.M. A peripheral arterial conducting mechanism underlying dilatation of the femoral artery and concerned in functional vasodilatation in skeletal muscle. *Journal of Physiology*. December 1959, vol. 149, s. 93-111.
- HOLLENBERG, S.M., CINEL, I. Bench-to-bedside review: nitric oxide in critical illness--update 2008. *Critical Care*. 2009, vol. 13, no. 4, 218.
- HOLLENBERG, S.M., GUGLIELMI, M., PARRILLO, J.E. Discordance between microvascular permeability and leukocyte dynamics in septic inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Critical Care*. 2007, vol. 11, no. 6, R125.
- HONIG, C.R., ODOROFF, C.L., FRIERSON, J.L. Active and passive capillary control in red muscle at rest and in exercise. *American Journal of Physiology*. August 1982, vol. 243, no. 2, s. H196-206.
- HOTCHKISS, R.S., et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Critical Care Medicine*. July 1999, vol. 27, no. 7, s. 1230-1251.
- HUDETZ, A.G. Blood flow in the cerebral capillary network: a review emphasizing observations with intravital microscopy. *Microcirculation*. June 1997, vol. 4, no. 2, s. 233-252.
- HUDETZ, A.G. Percolation phenomenon: the effect of capillary network rarefaction. *Microvascular Research*. January 1993, vol. 45, no. 1, s. 1-10.
- HUDETZ, A.G., et al. Effects of hypoxia and hypercapnia on capillary flow velocity in the rat cerebral cortex. *Microvascular Research*. July 1997, vol. 54, no. 1, s. 35-42.
- HUDETZ, A.G., et al. Video microscopy of cerebrocortical capillary flow: response to hypotension and intracranial hypertension. *American Journal of Physiology*. June 1997, vol. 268, no. 6, s. H2202-2210.

- HUISSE, M.G., et al. Leukocyte activation: the link between inflammation and coagulation during heatstroke. A study of patients during the 2003 heat wave in Paris. *Critical Care Medicine*. August 2008, vol. 36, no. 8, s. 2288-2295.
- ICHINOSE, F., et al. Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 prevents myocardial dysfunction in murine models of septic shock. *Circulation Research*. January 2007, vol. 100, no. 1, s. 130-139.
- INCE, C. Sidestream dark-field (SDF) imaging: an improved technique to observe sublingual microcirculation. *Critical Care*. 2005, vol. 8, suppl, s. P72.
- IRIKURA, K., et al. Moderate hypothermia reduces hypotensive, but not hypercapnic vasodilation of pial arterioles in rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. December 1998, vol. 18, no. 12, s. 1294-1297.
- JACKSON, W.F. Arteriolar oxygen reactivity: where is the sensor? *American Journal of Physiology*. November 1987, vol. 253, no. 5, část 2, s. H1120-1126.
- JAGGER, J.E., et al. Role of erythrocyte in regulating local O<sub>2</sub> delivery mediated by hemoglobin oxygenation. *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology*. June 2001, vol. 280, no. 6, s. H2833-2389.
- JALAN, R., et al. Restoration of cerebral blood flow autoregulation and reactivity to carbon dioxide in acute liver failure by moderate hypothermia. *Hepatology*. July 2001, vol. 34, no. 1, 50-54.
- JÄRHULT, J., MELLANDER, S. Autoregulation of capillary hydrostatic pressure in skeletal muscle during regional arterial hypo- and hypertension. *Acta Physiologica Scandinavica*. May 1974, vol. 91, no. 1, s. 32-41.
- JIA, L., et al. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*. March 1996, vol. 380, s. 221-226.
- JIANG, J.Y., YANG, X.F. Current status of cerebral protection with mild-to-moderate hypothermia after traumatic brain injury. *Current Opinion in Critical Care*. April 2007, vol. 13, no. 2., s.153-155.
- JOHNSON, P.C. Autoregulation of blood flow. *Circulation Research*. November 1986, vol. 59, no. 5, s. 483-495.
- JOHNSON, P.C. Myogenic nature of increase in intestinal vascular resistance with venous pressure elevation. *Circulation Research*. November 1959, vol. 7, s. 992-999.
- JOHNSON, P.C., HANSON, K.M. Effect of arterial pressure on arterial and venous resistance of intestine. *Journal of Applied Physiology*. May 1962, vol. 17, s. 503-508.

- JOHANSSON, P., et al. Cerebral blood flow and autoregulation during hypothermic cardiopulmonary bypass. *Annals of Thoracic Surgery*. April 1987, vol. 43, no. 4, s. 386-390.
- KERNICK, D.P., TOPME, J.E., SHORE, A.C. The biological zero signal in laser Doppler fluximetry - origins and practical implications. *Pflugers Archiv*. March 1999, vol. 437, no. 4, s. 624-631.
- KIRSCHENBAUM, L.A., et al. Importance of platelets and fibrinogen in neutrophil-endothelial cell interactions in septic shock. *Critical Care Medicine*. September 2004, vol. 32, no. 9, s. 1904-1909.
- KISHI, K., et al. Hypothermia attenuates the vasodilatory response of pial arterioles to hemorrhagic hypotension in the cat. *Anesthesia and Analgesia*. July 2000, vol 91, no. 1, s. 140-144.
- KLAUS, S., et al. Biochemical tissue monitoring during hypoxia and reoxygenation. *Resuscitation*. March 2003, vol. 56, no. 3, s. 299-305.
- KOLLER, A., KALEY, G. Endothelium regulates skeletal muscle microcirculation by a blood flow velocity-sensing mechanism. *American Journal of Physiology*. March 1990, vol. 258, no. 3, část 2, s. H916-920.
- KONTOS, H.A., et al. Role of tissue hypoxia in local regulation of cerebral microcirculation. *American Journal of Physiology*. May 1978, vol. 234, no. 5, s. H582-591.
- KREJZA, J., et al. Carotid artery diameter in men and women and the relation to body and neck size. *Stroke*. April 2006, vol. 37, no. 4, s. 1103-1105.
- KROPPESTEDT, S.N., et al. Effects of early and late intravenous norepinephrine infusion on cerebral perfusion, microcirculation, brain-tissue oxygenation, and edema formation in brain-injured rats. *Critical Care Medicine*. August 2003, vol. 31, no. 8, s. 2211-2221.
- KUO, L., DAVIS, M.J., CHILIAN, W.M. Myogenic activity in isolated subepicardial and subendocardial coronary arterioles. *American Journal of Physiology*. December 1988, vol. 255, no. 6, část 2, s. H1558-1562.
- LAEMMEL E, TADAYONI R, SINITSINA I, BOCZKOWSKI J, VICAUT E: Using Orthogonal polarization spectral imaging for the experimental study of microcirculation: comparisons with intravital microscopy. V: *Orthogonal Polarization Spectral Imaging*. MESSMER K (ed). Karger, Basel, vol. 24, 2000, s. 50-60.
- LANGER S, VON DOBSCHUETZ E, HARRIS AG, KROMBACH F, MESSMER K: Validation of the orthogonal polarization spectral imaging technique on solid organs. V:



- Orthogonal Polarization Spectral Imaging*. MESSMER K (ed). Karger, Basel, vol. 24, 2000, s. 32-46.
- LANGER, S., et al. Orthogonal polarization spectral imaging as a tool for the assessment of hepatic microcirculation: a validation study. *Transplantation*. May 2001, vol. 71, no. 9, s. 1249-1256.
- LEVY, R.J., et al. Evidence of myocardial hibernation in the septic heart. *Critical Care Medicine*. December 2005, vol. 33, no. 12, s. 2752-2756.
- LINDERT, J., et al. OPS imaging of human circulation: a short technical report. *Journal of Vascular Research*. July-August 2003, vol. 39, no. 4, s. 368-372.
- LIPOWSKY, H.H. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation*. January-February 2005, vol. 12, no. 1, s. 5-15.
- LIPOWSKY, H.H., KOVALCHECK, S., ZWEIFACH, B.W. The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery. *Circulation Research*. November 1978, vol. 43, no. 5, s. 738-749.
- LIU, L., et al. Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. *Cell*. February 2004, vol. 116, no. 4, s. 617-628.
- LOOFT-WILSON, R.C., PAYNE, G.W., SEGAL, S.S. Connexin expression and conducted vasodilation along arteriolar endothelium in mouse skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*. September 2004, vol. 97, no. 3, s. 1152-1158.
- LOPEZ, A., et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Critical Care Medicine*. January 2004, vol. 32, no. 1, s. 21-30.
- LUCHETTE, F. A., et al. Hypoxia is not the sole cause of lactate production during shock. *Journal of Trauma*, March 2002, vol. 52, no. 3, s. 415-419.
- M.C. PAPADOPOULOS, et al. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Critical Care Medicine*. August 2000, vol. 28, no. 8, s. 3019-3024.
- MACKINTOSH, F.C., et al. Polarization memory of multiply scattered light. *Physical Review B*. November 1989, vol. 40, no. 13, s. 9342-9345.
- MANDŮK, J., et al. Changes in metabolism and blood flow in peripheral tissue (skeletal muscle) during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: the biochemical microdialysis study. *Perfusion*, January 2004, vol. 19, no. 1, s. 53-63.
- MATĚJOVIČ, M., et al. Effects of combining inducible nitric oxide synthase inhibitor and radical scavenger during porcine bacteremia. *Shock*. January 2007, vol. 27, no. 1, s. 61-68.

- MATHURA, K.R., et al. Comparison of OPS imaging and conventional capillary microscopy to study the human microcirculation. *Journal of Applied Physiology*. July 2001, vol. 91, no. 1, s. 74-78.
- MCCULLOUGH, W.T., COLLINS, D.M., ELLSWORTH, M.L. Arteriolar responses to extracellular ATP in striated muscle. *American Journal of Physiology*. April 1997, vol. 272, no. 4, část 2, s. H1886-1891.
- MEININGER, G.A. Responses of sequentially branching macro- and microvessels during reactive hyperemia in skeletal muscle. *Microvascular Research*. July 1987, vol. 34, no. 1, s. 29-45.
- MEININGER, G.A., TRZECIAKOWSKI, J.P. Vasoconstriction is amplified by autoregulation during vasoconstrictor-induced hypertension. *American Journal of Physiology*. April 1988, vol. 254, no. 4, část 2, č. H709-718
- MELKUMYANTS, A.M., BALASHOV, S.A., KHAYUTIN, V.M. Endothelium dependent control of arterial diameter by blood viscosity. *Cardiovascular Research*. September 1989, vol. 23, no. 9, s. 741-747.
- MENGER, M.D., LASCHKE, M.W., VOLLMAR, B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *European Surgical Research*. January – April 2002, vol. 34, no. 1-2, s. 83-91.
- MENGER, M.D., LEHR, H.A. Scope and perspectives of intravital microscopy – bridge over from in vitro to in vivo. *Immunology Today*. November 1993, vol. 14, no. 11, s. 519-522.
- METTING, P.J., et al. Systemic vascular autoregulation amplifies pressor responses to vasoconstrictor agents. *American Journal of Physiology*, January 1989, vol. 256, no. 1, část 2, s. R98-105.
- MOPPETT, I.K., MAHAJAN, R.P. Transcranial Doppler ultrasonography in anaesthesia and intensive care. *British Journal of Anaesthesia*. November 2004, vol. 93, no. 5, s. 710-724.
- MOPPETTI, K., HARDMAN, J. G. Development and validation of an integrated computational model of cerebral blood flow and oxygenation *Anesthesia and Analgesia*. October 2007, vol. 105, no. 4, s. 1094-1103.
- MORFF, R.J., GRANGER, H.J. Autoregulation of blood flow within individual arterioles in the rat cremaster muscle. *Circulation Research*. July 1982, vol. 51, no. 1, s. 43-55.
- MOSHER, P., et al. Control of coronary blood flow by an autoregulatory mechanism. *Circulation Research*. March 1964, vol. 14, s. 250-259.

- MURRANT, C.L., et al. Arteriolar dilations induced by contraction of hamster cremaster muscle are dependent on changes in endothelial cell calcium. *Acta Physiologica Scandinavica*. March 2004, vol. 180, no. 3, s. 231-238.
- NAKAJIMA, Y., et al. Effects of vasopressin, norepinephrine, and L-arginine on intestinal microcirculation in endotoxemia. *Critical Care Medicine*. January 2006, vol. 34, no. 6, s. 1752-1757.
- NEVIERE, R., et al. Antithrombin reduces mesenteric venular leukocyte interactions and small intestine injury in endotoxemic rats. *Shock*. March 2001, vol. 15, no. 3, s. 220-225
- NEWELL, D.W., et al. Comparison of flow and velocity during dynamic autoregulation testing in humans. *Stroke* **25**: 793-797, 1994.
- NEWMAN, J. M., et al. Nutritive blood flow affects microdialysis O/I ratio for ((14)C)ethanol and (3)H(2)O in perfused rat hindlimb. *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology*, December 2001, vol. 281, no. 6, s. H2731-2737.
- NOLTE, D., et al. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*. September-October 1995, vol. 15, no. 5, s. 244-249
- OLEARCZYK, J.J., et al. Nitric oxide inhibits ATP release from erythrocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. June 2004, vol. 309, no. 3, s. 1079-1084.
- PAHERNIK, S., et al. Orthogonal polarisation spectral imaging as a new tool for the assessment of antivasular tumour treatment in vivo: a validation study. *British Journal of Cancer*. May 2002, vol. 86, no. 10, s. 788-795.
- PALMER, R.M., MONCADA, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. January 1989, vol. 158, no. 1, s. 348-352.
- PANERAI, R. B. Assessment of cerebral pressure autoregulation in humans - a review of measurement methods. *Physiological Measurement*. August 1998, vol. 19, no. 3, 305-338.
- PAULSON, O. B., STRANDGAARD, S., EDVINSSON, L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovascular Brain Metabolism Reviews*. 1990, vol. 2, no. 2, 161-192.
- PENNINGS, F.A., BOUMA, G.J., INCE, C. Direct observation of the human cerebral microcirculation during aneurysm surgery reveals increased arteriolar contractility. *Stroke*. June 2004, vol. 35, no. 6, s. 1284-1288.
- PENNINGS, F.A., INCE, C., BOUMA, G.J. Continuous real-time visualization of the human cerebral microcirculation during arteriovenous malformation surgery using orthogonal polarization spectral imaging. *Neurosurgery*. July 2006, vol. 59, no. 1, s. 167-171.

- PÉREZ-BÁRCENA, J., et al. Study of a brain microcirculation in cranioencephalic trauma using the Side Stream Field (SDF) system. *Medicina Intensiva*. June-July 2009, vol. 33, no. 5, s. 256-259.
- POHL, U., DE WIT, C., GLOE, T. Large arterioles in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. *Acta Physiologica Scandinavica*. April 2000, vol. 168, no. 4, s. 505-510.
- PYTEL, P., ALEXANDER, J.J. Pathogenesis of septic encephalopathy. *Current Opinion in Neurology*. June 2009, vol. 22, no. 3, s. 283-287.
- RADEGRAN, G., et al. Microdialysis ethanol removal reflects probe recovery rather than local blood flow in skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, August 1998, vol. 85, no. 2, s. 751-757.
- RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M., MONCADA, S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. November 1987, vol. 148, no. 3, s. 1482-1489.
- REES, D.D., et al. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *British Journal of Pharmacology*. February 1989, vol. 96, no. 2, s. 418-424.
- RISTAGNO, G., et al. Effects of epinephrine and vasopressin on cerebral microcirculatory flows during and after cardiopulmonary resuscitation. *Critical Care Medicine*. September 2007, vol. 35, no. 9, s. 2145-2149.
- RISTAGNO, G., et al. Epinephrine reduces cerebral perfusion during cardiopulmonary resuscitation. *Critical Care Medicine*. April 2009, vol. 37, no. 4, s. 1408-1415.
- RIVERS, E., et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *New England Journal of Medicine*. November 2001, vol. 345, no. 19, s. 1368-1377.
- SAITO, Y., et al. Role of venular endothelium in control of arteriolar diameter during functional hyperemia. *American Journal of Physiology*. September 1994, vol. 267, No. 3, část 2, s. H1227-1231.
- SAKR, Y., et al. Persistent microvasculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Critical Care Medicine*. September 2004, vol. 32, no. 9, s. 1825-1831.
- SARRAFZADEH, A. S., et al. Bedside microdialysis: a tool to monitor cerebral metabolism in subarachnoid hemorrhage patients? *Critical Care Medicine*, May 2002, vol. 30, no. 5, s. 1062-1070.

- SEGAL, S.S. Regulation of blood flow in the microcirculation. *Microcirculation*. January-February 2005, vol. 12, no. 1, s. 33-45.
- SELKURT, E.E., JOHNSON, P.C. Effect of acute elevation of portal venous pressure on mesenteric blood volume, interstitial fluid volume and hemodynamics. *Circulation Research*. September 1958, vol. 6, no. 5, s. 592-599.
- SERBAN, D.N., NILIUS, B., VANHOUTTE, P.M. The endothelial saga: the past, the present, the future. *Pflugers Archiv*. May 2010, vol. 459, no. 6, s. 787-792.
- SHARAN, M., POPEL, A.S. A mathematical model of counter-current exchange of oxygen between paired arterioles and venules. *Mathematical Biosciences*. 1988, vol. 91, s. 17-34.
- SHARSHAR, T., et al. Science review: The brain in sepsis - culprit and victim. *Critical Care*. 2005, vol. 9, no. 1, s. 37-44.
- SHOEMAKER, W.C., et al. Clinical trial of survivors' cardiorespiratory patterns as therapeutic goals in critically ill postoperative patients. *Critical Care Medicine*. June 1982, vol. 10, no. 6, s. 398-403.
- SHORR, A.F., et al. Protein C: a potential biomarker in severe sepsis and a possible tool for monitoring treatment with drotrecogin alfa (activated). *Critical Care*. 2008, vol. 12, no. 2, s. R45.
- SCHIESSLER, C., et al. Orthogonal polarization spectral imaging - a new clinical method for monitoring of microcirculation. *Anaesthetist*. July 2002, vol. 51, no. 7, s. 576- 579.
- SCHMITT, J.M., et al. Use of polarized light to discriminate short-pass photons in a multiply scattering medium. *Applied Optics*. October 1992, vol. 30, no. 31, 6535-6546.
- SCHULTZ, M.J., VAN DER POLL, T. Animal and human models for sepsis. *Annals of Medicine*. 2002, vol. 34, no. 7-8, s. 573-581.
- SINGER M. Mitochondrial function in sepsis: acute phase versus multiple organ failure. *Critical Care Medicine*. September 2007, vol. 35 (9 Supplementum), s. S441-448.
- SINGER, M. Cellular dysfunction in sepsis. *Clinics of Chest Medicine*. December 2008, vol. 29, no. 4, s. 655-660.
- SINGER, M., et al. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*. August 2004, vol. 364, no. 9433, s. 545-548.
- ŠITINA, M., ČERNÝ, V. Evaluating tissue perfusion using labelled water indicator microdialysis in a rat model of haemorrhagic shock. *Physiological Measurement*. June 2007, vol. 28, No. 6, s. 689-696.

- SITZWOHL, C., et al. The arterial to end-tidal carbon dioxide gradient increases with uncorrected but not with temperature-corrected PaCO<sub>2</sub> determination during mild to moderate hypothermia. *Anesth Analg* **86**: 1131-1136, 1998.
- SMAJE, L., ZWEIFACH, B.W., INTAGLIETTA, M. Micropressures and capillary filtration coefficients in single vessels of the cremaster muscle of the rat. *Microvascular Research*. January 1970, vol. 2, no. 1, s. 96-110.
- SMIELEWSKI, P., CZOSNYKA, M., KIRKPATRICK, P. Assessment of cerebral autoregulation using carotid artery compression *Stroke*. December 1996, vol. 27, no. 12, s. 2197-2203.
- SMIELEWSKI, P., et al. Assessment of cerebral autoregulation using carotid artery compression. *Stroke* **27**: 2197-2203, 1996.
- SPRAGUE, R.S., et al. Reduced expression of G(i) in erythrocytes of humans with type 2 diabetes is associated with impairment of both cAMP generation and ATP release. *Diabetes*. December 2006, vol. 55, no. 12, s. 3588-3593.
- SPRONK, P.E., et al. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. *Lancet*. November 2002, vol. 360, no. 9343, s. 1395-1396.
- STAHLER, L. On mathematical models of microdialysis: geometry, steady-state models, recovery and probe radius. *Advanced Drug Delivery Reviews*, December 2000, vol. 45, no. 2-3, s. 149-167.
- STALLKNECHT, B., et al. Estimation of rat muscle blood flow by microdialysis probes perfused with ethanol, (14C)ethanol, and 3H<sub>2</sub>O. *Journal of Applied Physiology*, March 1999, vol. 86, no. 3, s. 1054-1061.
- STAMLER, J.S., et al. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*. June 1997, vol. 27, no. 276, s. 2034-2037.
- STARK, R., RODEN, M. Mitochondrial function and endocrine diseases. *European Journal of Clinical Investigation*. April 2007, vol. 37, no. 4, s. 236-248.
- STERN, M.D. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature*. March 1975, vol. 254, no. 5495, s. 56-58.
- STINGL, J., HILBELINK, D.R., RHODIN, J.A. Differences in microcirculatory bed arrangement in some skeletal muscles of the rat and golden hamster. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental*. January-February 1996, vol. 16, no. 1, s.1-7.
- STRANDGAARD, S., et al. Upper limit of autoregulation of cerebral blood flow in the baboon. *Circulation Research*. April 1974, vol. 34, no. 4, s. 435-440.

- SUN, D., KALEY, G., KOLLER, A. Characteristics and origin of myogenic response in isolated gracilis muscle arterioles. *American Journal of Physiology*. March 1994, vol. 266, no. 3, část 3, s. H1177-1183.
- SUNDRANI, R., et al. Nitric oxide synthase inhibition increases venular leukocyte rolling and adhesion in septic rats. *Critical Care Medicine*. August 2000, vol. 28, no. 8, s. 2898-2903
- TANAKA, H., et al. Relationship between variations in the circle of Willis and flow rates in internal carotid and basilar arteries determined by means of magnetic resonance imaging with semiautomated lumen segmentation: reference data from 125 healthy volunteers. *American Journal of Neuroradiology*. September 2006, vol. 27, no. 8, s. 1770-1775.
- TANAKA, J., et al. Cerebral autoregulation during deep hypothermic nonpulsatile cardiopulmonary bypass with selective cerebral perfusion in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* **95**: 124-132, 1998.
- TENLAND, T., et al. Spatial and tempoval variations in human skin blood flow. *International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental*. 1983, vol. 2, no. 2, s. 81-90.
- THOMALE, U.W., et al. Visualization of rat pial microcirculation using the novel orthogonal polarized spectral (OPS) imaging after brain injury. *Journal of neuroscience methods*. July 2001, vol. 108, no. 1, s. 85-89.
- TIBBLE, R. K., GIRLING, K. J., MAHAJAN, R. P. A comparison of the transient hyperemic response test and the static autoregulation test to assess graded impairment in cerebral autoregulation during propofol, desflurane, and nitrous oxide anesthesia. *Anesthesia and Analgesia*. July 1991, vol. 93, no. 1, s. 171-176.
- TIBBLE, R.K., GIRLING, K.J., MAHAJAN, R.P. A comparison of the transient hyperemic response test and the static autoregulation test to assess graded impairment in cerebral autoregulation during propofol, desflurane, and nitrous oxide anesthesia. *Anesth Analg* **93**: 171-176, 2001.
- TRZECIAK, S., et al. Microcirculatory Alterations in Resuscitation and Shock Investigators. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Annals of Emergency Medicine*. January 2007, vol. 49, no. 1, s. 88-98.
- TUGTEKIN, I.F., et al. Increased ileal-mucosal-arterial PCO<sub>2</sub> gap is associated with impaired villus microcirculation in endotoxic pigs. *Intensive Care Medicine*. April 2001, vol. 24, no. 7, s. 757-766.

- TYML, K., et al. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo. *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology*. September 2001, vol. 281, no. 3, s. H1397-1406.
- URSINO, M., LODI, C. A. A simple mathematical model of the interaction between intracranial pressure and cerebral hemodynamics. *Journal of Applied Physiology*. April 1997, vol. 82, no. 4, s. 1256-1269.
- VAN DEN BOOGAARD, M., et al. Endotoxemia-induced inflammation and the effect on the human brain. *Crit Care*. 2010, vol. 14, no 3, R81.
- VANHOUTTE, P.M., et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiologica (Oxford)*. June 2009, vol. 196, no. 2, s. 193-222.
- VERHAEGEN, M.J., et al. Cerebral autoregulation during moderate hypothermia in rats. *Stroke* **54**: 407-414, 1993.
- VINCENT, J.L., DE BACKER, D. Oxygen transport-the oxygen delivery controversy. *Intensive Care Medicine*. November 2004, vol. 30, no. 11, s. 1990-1996.
- VON DOBSCHUETZ, E., et al. Noninvasive in vivo assessment of the pancreatic microcirculation: orthogonal polarization spectral imaging. *Pancreas*. March 2003, vol. 26, no. 2, 139-143.
- WALLEY, K.R. Heterogeneity of oxygen delivery impairs oxygen extraction by peripheral tissues: theory. *Journal of Applied Physiology*. August 1996, vol. 81, no. 2, s. 885-894.
- WALLGREN, F., et al. A mathematical model for measuring blood flow in skeletal muscle with the microdialysis ethanol technique. *Journal of Applied Physiology*, August 1995, vol. 79, no. 2, s. 648-659.
- WAN, Z., et al. Preserved cerebral microcirculation during cardiogenic shock. *Critical Care Medicine*. August 2009, vol. 37, no. 8, s. 2333-2337.
- WAN, Z., et al. The cerebral microcirculation is protected during experimental hemorrhagic shock. *Critical Care Medicine*. March 2010, vol. 38, no. 3, s. 928-932.
- WANG, L., et al. ADP acting on P2Y<sub>13</sub> receptors is a negative feedback pathway for ATP release from human red blood cells. *Circulation Research*. February 2005, vol. 96, no. 2, s. 189-196.
- WARDELL, K., JAKOBSSON, A., NILSSON, G.E. Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. April 1993, vol. 40, no. 4, s. 309-316.



- WEIL, M.H., SHUBIN, H. Proposed reclassification of shock states with special reference to distributive defects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. October 1971, vol. 23, s. 13-23.
- WESTERHOF, N., STERGIOPULOS, N., NOBLE, M. Snapshots of hemodynamics: An aid for clinical research and graduate education. Kluver Academic Publishing, 2005
- WIEDEMAN, M.P., TUMA, R.F., MAYROVITZ, H.N. Defining the precapillary sphincter. *Microvascular Research*. July 1976, vol. 12, no. 1, s. 71-75.
- YAZICI, B., ERDOGMUS, B., TUGAY, A. Cerebral blood flow measurements of the extracranial carotid and vertebral arteries with Doppler ultrasonography in healthy adults. *Diagnostic and Interentional Radiology*. December 2005, vol. 11, no. 4, s. 195-198.
- ZWEIFACH, B.W. Factors Regulation Blood Pressure. New York: Josiah Macy, Jr., Foundation, 1950