

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

MUDr. Patrik Richtr

školitel: doc. MUDr. Josef Vodička, Ph.D.

ISCHEMIE VOLNÝCH LALOKŮ

Disertační práce

Oddělení plastické chirurgie

Fakultní nemocnice v Plzni

OBSAH	str.
Zkratky	4
1. Úvod	7
1.1 Oxidační stres	9
1.2. Ischemicko - reperfuzní syndrom	12
1.2.1 Ischemie	13
1.2.2 Reperfuze	14
1.2.3 No-reflow fenomén	15
1.3 Krevní průtok	16
1.3.1 Cévní spasmy	18
1.3.2a Cévní spasmy v neurochirurgii	18
1.3.2b Cévní spasmy v plastické chirurgii	19
1.3.2 Hyperdynamická terapie	20
1.4 Elektivní mikrochirurgická operace	20
2. Experimentální model ischemicko-reperfuzního poškození svalového laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího	23
2.1 Hypotéza a cíl práce	23
2.2 Metodika	25
2.3 Anestezie prasat	25
2.3.1 Používaná léčiva	26
2.3.2 Anesteziologický protokol	27
2.4 Operační technika	30
2.4.1 Odběr arteriálních krevních vzorků	30
2.4.2 Preparace musculus latissimus dorsi	32
2.4.3 Odběr žilních krevních vzorků	36
2.4.4 Odběr svalových vzorků	39
2.4.5 Simulace ischemie	39
2.4.6 Simulace reperfuze	40

2.5	Homogenizace vzorků tkání	42
2.6	Fáze optimalizace metodiky	44
2.7	Fáze studijních odběrů	45
2.8	Sledované parametry	45
2.9	Statistická analýza	46
2.10	Výsledky	47
2.11	Diskuze	73
2.12	Shrnutí výsledků	78
2.13	Přínos pro klinickou praxi	79
3.	Ošetrovatelský a léčebný protokol	82
3.1	Před operačním výkonem	82
3.2	V den operačního výkonu	82
3.3	Perioperační péče	83
3.4	Pooperační péče	83
4.	Užití volných laloků na našem pracovišti	85
4.1	Volný m. latissimus dorsi/m. serratus anterior	85
5.	Závěr	90
6.	Výsledky podpořené z projektu NT/11024-3	92
7.	Literatura	93
8.	Seznam obrázků	101
9.	Seznam grafů a tabulek	102
10.	Přednášková a publikační činnost	103

Zkratky

aa	- arteriální krev
a.	- arteria (tepna)
ACC	- arteria carotis communis
ANOVA	- statistická analýza rozptylu (Analysis of Variance)
AST	- aspartátaminotransferáza
AV	- arterio - venózní
CB	- celková bílkovina
cca	- asi, přibližně
ccm	- centimetr krychlový
CK	- kreatinkináza
cNOS	- konstitutivní NO syntáza
co	- kontrolní sval
CT AG	- angiografie, počítačová tomografie
Cu	- měď (chemická značka)
CŽK	- centrální žilní katetr
df	- dechová frekvence
DIEP	- deep inferior epigastric perforator (flap)
DNA	- deoxyribonukleová kyselina
EKG	- elektrokardiogram
ET CO ₂	- kapnometrie - obsah CO ₂ ve vzduchu na konci výdechu
Fe	- železo (chemická značka)
FiO ₂	- frakce kyslíku - procentuální podíl O ₂ v dýchací směsi
GSH	- glutathion
GSHP	- glutathionperoxidáza
H ₂ O	- molekula vody
H ₂ O ₂	- molekula peroxidu vodíku
Hb	- hemoglobin

HIT	- heparin-induced thrombocytopenia
HITT	- heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis
ICAM-1	- intercellular adhesion molecule 1
I/R	- ischemicko - reperfuční syndrom (poškození)
is	- ischemický sval
IU	- international units
KCl	- chlorid draselný
KO	- krevní obraz
LMWH	- low molecular weight heparin (nízkomolekulární heparin)
LF UK	- lékařská fakulta Univerzity Karlovy
MAP	- mean arterial pressure (střední arteriální tlak)
Mb	- myoglobin
MLD	- musculus latissimus dorsi
M/L	- morbidita/letalita
MSAP	- medial sural artery perforator (flap)
NO	- oxid dusnatý
NR	- no-reflow fenomén
$O_2^{\bullet-}$	- superoxid
$\bullet OH$	- hydroxilový radikál
p	- statistická významnost
P	- puls
p.o.	- per os (ústy)
PBS pufr	- fosfátový pufr
PF4	- platelet factor 4
PMK	- permanentní močový katetr
pyr	- pyruvát
Q	- průtok
RH	- organický substrát
ROH	- peroxidovaný organický substrát

ROS	- reactive oxygen species
SAK	- subarachnoideální krvácení
SpO ₂	- saturace krve kyslíkem (%)
SOD	- superoxid dismutáza
TBARS	- thiobarbituric acid reactive substances (produkty lipidové peroxidace)
t-i	- koncentrace látky v tkáňovém lyzátu ischemického laloku
t-c	- koncentrace látky v tkáňovém lyzátu kontrolního laloku
TK	- krevní tlak
TP	- time point
TR	- tracheální rourka
TT	- tělesná teplota
VCAM-1	- vascular cell adhesion molecule 1
VCV	- objemově řízená ventilace
VEGF	- vascular endothelial growth factor
V _t	- dechový objem za jeden dechový cyklus
v-c	- hodnoty v žilní krvi z kontrolního laloku
v-i	- hodnoty v žilní krvi z ischemického laloku
V _t	- objem vzduchu vdechnutý na jeden nádech
XO	- xantin oxidáza
3-H terapie	- hypervolémie, hemodiluce, hypertenze
#	- statistická významnost změn koncentrace

1. Úvod

Přenos volných laloků v plastické a rekonstrukční chirurgii zažívá v současné době výrazný rozvoj. Volný lalok je tkáň s definovanou vyživující cévní stopkou přenášená na vzdálené místo. Lalok tak má zajištěnu vlastní výživu nezávislou na prokrvení místa příjmu. Operace je založena na principu přenesení předem zvolené živé tkáně na těle s přesně definovanou cévní stopkou a jejího našití na cévy příjmového místa. Stopka laloku obsahuje artérii a zpravidla 1-2 žíly. Obvykle jsou cévy přenášených tkání tak malé, že k jejich suturám se používá operační mikrochirurgická technika za použití mikroskopu a speciálního instrumentaria i šicího materiálu. Metoda je například užívána k uzavření defektů, kde není dostatečné množství vhodné okolní tkáně (rozsáhlé tumory [85, 86], úrazy s devastací měkkých tkání [82, 83, 87, 88]). Při léčbě chronické osteomyelitidy, kdy se přenáší volný svalový lalok nejen jako mechanický kryt defektu, ale zároveň také jako výborně prokrvená svalová tkáň, která je nezbytným předpokladem cílené a účinné antibiotické léčby [47, 89]. K léčbě defektů kosti se zase užívají různé typy volných kostních laloků (např. volná fibula, volný radius [24], volný hřeben kosti kyčelní [67] atp.), kde se tento lalok může dle potřeby rozšířit i o svalovou tkáň či kožní lalok. Volně lze přenášet i sval z důvodu náhrady funkční (svalové) jednotky. Volný lalok se užívá i k rekonstrukci chybějící tkáně prsu (např. rekonstrukce prsu po ablaci pro karcinom), kdy je chybějící prs vytvořen nejčastěji tkání podbřišku [14, 84]. Veškeré tyto situace by bez možnosti mikrovaskulární techniky byly pouze velmi těžko řešitelné [84]. Rozvoj mikrochirurgie je dán technologickými možnostmi (operační mikroskop, instrumentarium, šicí materiál), neustále se rozvíjející operační technikou a poznatky o dějích probíhajících na intracelulární úrovni přenášené tkáně, které jsou následně užívány k optimalizaci peroperační péče. Tkáně volně přenášených laloků jsou obecně nejvíce ohrožené ischemií a následnou reperfuzí. Děje, které se ve tkáních volného laloku během ischemie-reperfuze uplatňují, mohou způsobit jejich poškození a tím výrazně prodloužit

morbidity pacienta [6]. Během ischemie dochází ke zvýšené tvorbě reaktivních kyslíkových radikálů a ty v průběhu reperfuze poškozují buněčné membrány, vyvolávají zánět, narušují permeabilitu cév. V konečném důsledku tyto děje mohou vést k poškození postižených tkání. Tyto negativní vlivy jsou v současné době podrobně studovány. Na základě výsledků těchto studií jsou pak vytvářeny postupy, které mají za úkol eliminovat důsledky jak ischemie, tak i reperfuze [3, 4, 5, 10].

V posledním desetiletí dochází k rozvoji studia biologického efektu vysoce reaktivních kyslíkových a dusíkatých působků v mechanismech vyvolávající různé nemoci. Tyto reaktivní působky, hlavně **volné kyslíkové radikály** se nacházejí v normálních fyziologických procesech a v malém množství mohou být užitečné [3, 51, 61]. Účastní se uvolňování a přeměny energie, která je nezbytná pro životní pochody, jsou mediátory signálních funkcí nebo imunitního systému.

Škodlivými se stávají ve vysokých koncentracích, když endogenní obranné mechanismy selžou (oxidační stres). Na základě tohoto základního schématu byly nalezeny souvislosti v mnoha patologických dějích účastnících se rozvoje např. atherosklerózy, hypertenze, diabetu a mnoha dalších [11, 23, 58]. I v plastické chirurgii se s těmito patologickými stavy setkáváme. Jedná se právě o případy kdy přenášíme **tzv. volný lalok**. Při tomto manévru dochází k přerušení proudění krve lalokem - ischemii, převaze tvorby vysoce reaktivních působků v buňkách laloku. Po obnovení krevního průtoku lalokem - provedení funkční anastomózy, dochází k jejich vyplavování z buněk do oběhu, kde mohou dále škodlivě působit na ostatní buňky laloku či přímo ovlivnit i reakci v celém organismu. Tento děj se souhrnně nazývá **ischemicko - reperfuční syndrom (I/R)** [60]. V některých případech nedochází k obnovení prokrvení ischemizované tkáně i přes bezchybně provedenou mikroanastomózu. Příčiny tohoto stavu jsou nejspíše na úrovni mikrocirkulace při poruše rovnováhy vasokonstrikce a

vasodilatace, vícečetné mikrotrombózy, které v konečném důsledku vedou k částečné či úplné ischemii tkáně - **no-reflow fenomén** [39, 92].

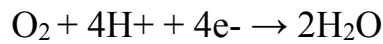
Základní biochemické a fyziologické mechanismy, které způsobují vznik volných kyslíkových radikálů a jejich následnou degradaci, se nazývají oxidace a redukce. Děj, při kterém během ischemie vznikají volné kyslíkové radikály, se nazývá **oxidační stres**.

1.1 Oxidační stres

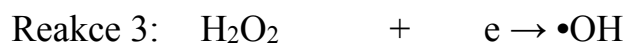
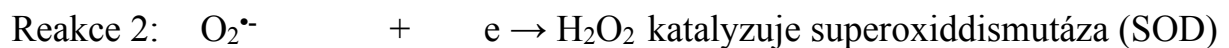
Proces, kdy převáží geneze kyslíkových radikálů nad jejich degradací (např. během ischemie), se nazývá oxidační stres. **Reaktivní kyslíkové radikály** (reactive oxygen species - **ROS**), jsou velmi reaktivní částice, které se ve snaze doplnit si párový elektron, pohotově váží na okolní molekuly nebo jim předávají či odebírají elektron. Reakcí dvou radikálů vzniká molekula bez nepárového elektronu, protože nepárové elektrony se spojí ve dvojici. Pokud však dojde k reakci radikálu s molekulou, která radikálem není, stává se tato „normální molekula“ radikálem a zahajuje řetězec dalších radikálových reakcí.

V aerobních organizmech jsou nezbytnou součástí řady důležitých dějů. Prvním radikálem, který byl objeven ve třicátých letech 20. století, byl superoxid - $O_2^{\bullet-}$ [57]. V té době se ještě nevědělo, že tento radikál může být produkován biologickými procesy, ani že může být příčinou mnohých chorobných procesů. Ve stejném desetiletí Mann a Keilin [48] z hovězí krve a jater purifikovali protein neznámé funkce, který ve své molekule vázal měď. Dnes jej nazýváme superoxid dismutáza (SOD) a jedná se o jeden ze základních ROS redukujících proteinů. Další objevy vedly k pochopení funkce volných kyslíkových radikálů, k mechanismu jejich vzniku i zjištění, že se jedná o působky běžně se vyskytujících prakticky ve všech savčích buňkách [3, 51].

Kyslíkové radikály vznikají fyziologicky při každém aerobním ději. Savci při fyziologických podmínkách metabolizují 95% kyslíku (O₂) na vodu bez vzniku toxických mediátorů.



Zbývajících 5% kyslíku je redukováno v následujících reakcích:



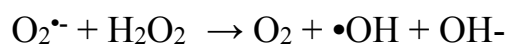
Výsledným produktem je opět voda. V průběhu těchto reakcí vznikají tři velmi toxické produkty: superoxid (O₂^{•-}), hydroxylový radikál (•OH) a peroxid vodíku (H₂O₂). První dva jsou **volné kyslíkové radikály**, protože v jejich molekule se nachází jeden nepárový elektron. Peroxid vodíku vzniká dismutací superoxidu (Reakce 2). Není sám o sobě volným radikálem, nicméně se jedná o velmi toxickou látku. V organismu totiž ihned reaguje s ionty přechodných kovů (nejčastěji Fe a Cu v nižším mocenství - Fe²⁺, resp. Cu⁺). Tato **reakce** se nazývá **Fentonova**. Vzniká hydroxylový radikál (•OH), hydroxidový anion (OH⁻) a přechodný kov se oxiduje (Fe³⁺, resp. Cu²⁺).



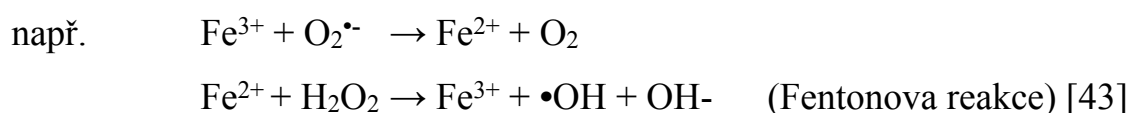
Hydroxidový anion není škodlivý na rozdíl od hydroxylového radikálu, jehož reaktivita je tak vysoká a jeho biologický poločas tak krátký (řádově nanosekundy), že neexistuje účinný mechanismus jeho likvidace. Organismus se proto snaží odstranit oba substráty Fentonovy reakce tak, aby k ní vůbec

nedošlo. Peroxid se odstraňuje pomocí enzymů kataláz a peroxidáz. Z nich nejdůležitější je glutathionperoxidáza (GSHPx). Přečodný kov se odstraňuje buď jeho oxidací, nebo pevnou vazbou na bílkovinu. Např. železo se v plazmě váže na transferin, ve tkáních na apoferritin. Měď se váže na albumin nebo ceruloplasmin. Ceruloplasmin navíc katalyzuje oxidaci železa, což je v organismu jeho hlavní funkcí [69].

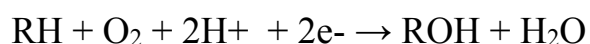
Další reakcí při níž v organismu může vznikat vysoce reaktivní a tím pádem i vysoce škodlivý radikál je **Haber - Weissova reakce**. Reakce mezi peroxidem vodíku a superoxidem dá vzniku hydroxylovému radikálu, hydroxidovému anionu a molekule kyslíku.



Tato reakce probíhá velmi pomalu a v kombinaci s Fentonovou reakcí. Superoxid nejprve redukuje ion přečodného kovu (např. Fe, Cu) a ten pak reaguje s peroxidem vodíku.



V dalších reakcích, při kterých mohou vznikat reaktivní kyslíkové radikály (ROS) a zvláště pak $\text{O}_2^{\bullet-}$, se uplatňují neméně významné enzymy: **xantin oxidáza** (XO) hrající významnou roli v katabolismu purinů, **NADP oxidáza** jakožto součást neutrofilů mající baktericidní funkci, **oxid dusný (NO) syntáza** (NOS) - tvorba hlavního vasodilatátoru [64], **Myeloperoxidáza** sloužící v neutrofilech jako zdroj baktericidních působků [31], **Cytochrom P450**, který se účastní oxidačně - redukčních pochodů a tím metabolismu některých endogenních metabolitů a biotransformace většiny xenobiotik - organických substrátů (RH) [13].



Tyto děje, při nichž vznikají a degradují se kyslíkové radikály, probíhají v mitochondriích při fyziologickém buněčném metabolismu. Během patologických stavů je hlavním zdrojem ROS mitochondriální dýchací řetězec, aktivace xantin oxidázy (XO) během I/R, aktivace neutrofilů a metabolismus kyseliny arachidonové [25, 27]. ROS hrají významnou roli v **buněčné destrukci** na různých úrovních. Zahrnují např. poruchy DNA řetězce, oxidaci bílkovin, peroxidaci lipidů - destrukci buněčných membrán [70].

1.2 Ischemicko - reperfuční syndrom (I/R)

Ischemie a následná reperfuze se souhrnně nazývají ischemicko-reperfuční syndrom. Obnova perfuze tkání po ischemii je sice žádoucí a pro přežití funkce orgánu i nezbytná, ale zároveň jde i o velmi kritické období. Některé studie prokázaly větší destrukční účinky tkáně vystavené ischemii a následně reperfuzi, než když stejná tkáň byla vystavena pouze kontinuální ischemii za stejný časový interval. I/R je soubor změn poškozující tkáň funkčně i morfologicky komplexem patofyziologických procesů. Spolupůsobí zde volné kyslíkové radikály, metabolické změny aktivující komplement a zánětlivé procesy. Dochází k endoteliálním změnám, které ovlivňují místní i celkové hemodynamické poměry. I/R se v současné době těší velkému zájmu prakticky všech vědeckých oborů [9, 41, 66, 74, 80, 93, 94].

Ischemicko - reperfuční poškození je dynamický a komplexní fenomén, který začíná ischemií a může skončit buněčným poškozením či přímo buněčnou smrtí. Buněčné poškození se logicky projeví jako poškození či nekróza tkáně [79].

1.2.1 Ischemie

Ischemie je místní nedokrevnost určité tkáně. Ischemií v chirurgii volných laloků rozumíme dobu, kdy dojde k oddělení tkáně laloku od původní cévní výživy a je přenášena na jiné místo, kde je poté cévní výživa obnovena po připojení na recipientní cévy. Tkáň volného laloku může obsahovat jeden druh tkáně, nebo může být kompozitní. To je důležité v rozhodování nebo pro plánování doby přenosu (ischémie) laloku. Zde pak musíme nejvíce zohledňovat vždy tu tkáň, která je na ischemii citlivá nejvíce.

Ischemie může vést k poškození tkáně laloku nebo jeho odumření. Poškození určitého množství tkáně je závislé na množství průtoku krve a čase, po který byl průtok touto tkání snížený či zcela zastavený. Během ischemie se reakce oxidačního stresu (viz výše) vymknou složité kontrole a geneze ROS převáží nad jejich redukcí. Patologické účinky kyslíkových radikálů se začnou projevovat. Na endoteliální úrovni se objevují formace drobných bul a endoteliální protruze, které vedou k obstrukci mikrocirkulace. Nekróza endoteliálních buněk vede k destrukci jejich těsných, adherujících spojení a tím i ke ztrátě vaskulární integrity. Tato situace vede k extravaskulární akumulaci tekutiny a krevních buněk [79]. Extravaskulární expanze způsobuje vaskulární kompresi a tím další zmenšení cévního lumen [40]. Během ischemie též vzrůstá množství intracelulárního vápníku, jež má za následek zvýšenou tvorbu oxidu dusného (NO) - tkáňového hormonu, hlavního vasodilatátoru. Vysoké množství intracelulárního vápníku, které vzniká v buňce během ischemie zapříčiní aktivaci enzymu konstitutivní NO syntázy (cNOS), díky čemuž začne vznikat velké množství NO z L-argininu (semiesenciální aminokyselina). L-arginin je výchozím metabolitem pro tvorbu NO. Tím postupně dojde k jeho spotřebování a následně i nedostatku NO ve tkáni. Spotřebování NO vede k vasokonstrikci na úrovni mikrocirkulace. Paradoxně tím dále klesá průtok ischemickou tkání [44, 77].

1.2.2 Reperfuze

Po obnovení normálního průtoku ischemickou tkání hovoříme o reperfuzi. V plastické chirurgii se jedná se o provedení patentní anastomózy volného laloku či odstranění obstrukce ve vyživujících cévách laloku. Reperfuze je stav, považující se dnes za příbuzný ischemii. Po obnovení průtoku do ischemické tkáně se vrátí krev s kyslíkem. Tkáň to sice z dlouhodobého hlediska zachrání, ale z krátkodobého hlediska dojde k jejímu dalšímu poškození. Dochází ke vzniku zánětu, mění se propustnost krevních cév a zvyšuje se počet zánětlivých buněk. Na poškození buněk v reperfuzi se podílejí volné kyslíkové radikály vzniklé během ischemie, se kterými si tkáň narušená předchozí ischemií neumí poradit. Dále iontová dysbalance, aktivace proteáz, indukce apoptózy a významnou roli hraje jistě také aktivace zánětlivých mechanismů. Náhlým obnovením normálního průtoku (oproti ischemii) může dojít k poškození cév mikrocirkulace, endoteliální disrupci a zánětlivé reakci [40]. V průběhu prvních minut po obnovení průtoku ischemickou tkání dochází ke zvýšené produkci ROS, které se též dále účastní na buněčném poškození [8]. Zvýšené množství ROS způsobuje peroxidaci lipidových membrán, oxidaci proteinů a i přímé poškození DNA. Tím zapříčiňují degradaci buněk. Dochází k destrukci tkáně (i vzdáleně), aktivované neutrofilů a destičky tvoří mikroagregáty, které jsou zodpovědné za mechanickou obstrukci lumen na úrovni mikrocirkulace [1, 20]. Poškozením buněk endotelu se zvyšuje permeabilita a vzniká intersticiální edém, dochází k aktivaci leukocytů, které kyslíkové radikály dále produkují [9, 59]. Objevuje se též dysfunkce autonomní nervové regulace, kdy vazokonstrikce způsobená působky reperfuze, může nakonec vést k no-reflow fenoménu [72]. Circulus vitiosus je uzavřen.

1.2.3 No-reflow fenomén

Reperfuzí vlastně vzniká v původně ischemické tkáni ložisko sterilního zánětu. Na no-reflow fenomén lze pohlížet jako na variantu zánětlivé reakce, která se projevuje přetrvávající ztrátou průchodnosti na úrovni mikrocirkulace v důsledku vystupňovaných interakcí mezi aktivovanými neutrofily a endotelovými buňkami během ischemicko-reperfuzní fáze. V některých případech tento stav vede k tomu, že i když je plně obnoven krevní průtok přes zcela průchodnou mikroanastomózu, nedojde nakonec k plnému prokrvení laloku [28, 30]. Porucha prokrvení vzniká na úrovni mikrocirkulace - **no-reflow (NR)** [59]. NR byl prvně popsán při ischemicko-reperfuzním poškození myokardu na experimentálním zvířecím modelu [39]. Začíná iniciální těžkou ischemií, která poškozuje endotelové buňky cév na úrovni mikrocirkulace. Během reperfuze se dále zvyšuje permeabilita endotelu cév a dochází k tvorbě mikrotrombů, které způsobují obstrukci lumen cév mikrocirkulace. Patofyziologie NR je složitá a není ještě plně prozkoumána. Non-reflow fenomén, nebo také **microvascular obstruction/reperfusion injury** je dynamický a komplexní proces na kterém se podílejí ischemie, zvýšená produkce ROS, reperfuze. Při všech těchto dějích může dojít k poruše permeability endotelu na úrovni cév mikrocirkulace. Toto poškození se v současnosti jeví jako hlavní faktor no-reflow fenoménu [9].

Hlavním regulátorem endoteliální integrity je **vascular endothelial growth factor (VEGF)**, který je exprimován v závislosti na hypoxii během fáze ischemie [15]. Za fyziologických podmínek tvoří VEGF-receptor komplex se **specifickým adhezivním proteinem**, který stabilizuje mezibuněčné spoje [71]. Ischemií indukovaný VEGF se váže na VEGF-receptor. Tím dochází k rozpadu vazby komplexu VEGF-receptor/specifický adhezivní protein, adheze mezibuněčných spojů se snižuje, permeabilita endotelu se zvyšuje [93]. V

dalším průběhu se snižuje produkce specifických adhezivních proteinů, endotelová bariéra se rozpadá, mikrocirkulace je poškozena [56].

1.3 Krevní průtok

Ukazuje se, že velmi důležitým, ne-li nejdůležitějším činitelem v operativě volných laloků, je dostatečný krevní průtok [16]. Protože proudění krve v cévě je laminární (tzv. newtonovská kapalina), řídí se fyzikálními zákonitostmi dle Hagen-Poiseuillova zákona. Ten říká, že průtok Q je přímo úměrný rozdílu tlaků na začátku a konci trubice (ΔP) a čtvrté mocnině jejího poloměru. Nepřímo úměrný pak délce trubice a koeficientu viskozity.

$$Q = \frac{\Delta P \pi r^4}{8L\eta}$$

V praxi tento zákon znamená, že malý nárůst periferní rezistence má za následek velký pokles krevního průtoku [95]. A i když v živé tkáni jsou zákonitosti krevního průtoku složitější, pro ilustraci a pochopení fyzikálních dějů proudící kapaliny je toto vysvětlení dostačující.

Hlavním určujícím parametrem krevního průtoku v cévě je systémový arteriální tlak. Vitalita přenášeného laloku závisí na těchto parametrech. Můžeme tvrdit, že nejdůležitějším požadavkem je zajištění dostatečného krevního průtoku v závislosti na arteriálním tlaku. Ten je možno nejlépe a nejjednodušeji ovlivňovat podáváním náhradních roztoků (krystaloidů) během operace či po ní. Krevní tlak má nejenom vliv na průtok krve v cévách, ale i na jejich průměr. V případě poklesu krevního tlaku (hypovolémie) pak následkem kompenzačních mechanismů dojde ke zmenšení průsvitu cévy a tím i k výraznému snížení

krevního průtoku. Jiným příkladem, kdy dochází ke snížení průtoku je příliš vysoký intersticiální edém (např. při přílišném podávání krystaloidů), který utlačí cévy laloku zvenčí, zmenší tím průměr cév a opět tím dojde ke snížení průtoku krve. Poslední determinantou ovlivňující krevní průtok je viskozita krve, která závisí na hematokritu a rychlosti krevního proudu. Platí, že čím vyšší hematokrit nebo čím nižší rychlost, tím vyšší viskozita. Naopak platí, že čím nižší hematokrit nebo čím vyšší rychlost, tím nižší viskozita. Doporučená hodnota hematokritu v operativě volných laloků je doporučována kolem 30 % [19].

1.3.1 Cévní spasmy

1.3.1a Cévní spasmy v neurochirurgii

Jak bylo zmíněno výše, tkáň volného laloku je též velmi ohrožena spasmy na cévní stopce. Tento jev je v současnosti asi nejvíce prostudován v neurochirurgii. Analogie s ischemií mozku při vazospasmu mozkových tepen při subarachnoideálním krvácení s výsledky studií na volných lalocích plastickými chirurgy jsou zřejmé. Vazospasmy jsou v léčbě subarachnoideálního krvácení jednou z nejnebezpečnějších a nejzákeřnějších nosologických jednotek vůbec. Nejnebezpečnější proto, že způsobují ischemii velmi citlivé mozkové tkáně (i velkého rozsahu) a nejzákeřnější proto, že jsou velmi špatně předvídatelné. Typicky se vyvinou s časovým odstupem až několika dnů a jsou velmi obtížně terapeuticky ovlivnitelné. Nejčastěji se vazospasmy objevují 6.-8. den, výjimečně až 17. den po krvácení. Odeznívají nejčastěji 12. den po krvácení. Jsou nejčastější příčinou morbiditu/letality u pacientů, kteří v první fázi přežijí subarachnoideální krvácení. Zjistilo se, že vznik a tíže cerebrálních vazospasmů má přímou souvislost s přítomností a množstvím krve v subarachnoideálním prostoru. Tedy prostoru, kde se nacházejí mozkové cévy. Zřejmě rozpadové produkty krve, resp. hemoglobinu (Hb) ovlivňují cévní stěnu, která pak reaguje spasmem. Histologicky se v cévní stěně nalézají 1.-8. den v adventicii zvýšený počet zánětlivých buněk (lymfocyty, plazmatické buňky, mastocyty). V medii je přítomna svalová nekróza a srašťování elastických vláken. V intimě pak zahušťování s endoteliálním otokem a vakuolizací, porušování těsných interendoteliálních spojení. V 9.-60. dni po krvácení pak lze v intimě nalézt proliferaci buněk hladké svaloviny, což má za následek progredující ztluštění intimální vrstvy. Jedná se tedy o chronický proces s trvalými a závažnými následky. O cerebrovaskulárních spasmech nemáme do této doby příliš validní poznatky, protože zvířecí modely jsou schopny zachytit pouze úvodní fázi

spasmů, ale již nezachycují dlouhodobý vývoj. Že se jedná o přímé působení rozpadových produktů na cévní stěnu, odpovídá i časovému intervalu od vzniku krvácení do objevení se spasmů [26].

1.3.1b Cévní spasmy v plastické chirurgii

V plastické chirurgii při vzniku vasospasmu a tedy ischemii laloku, nedochází k tak závažnému stavu pacienta jako u neurochirurgických pacientů. I zde se jedná o komplikaci způsobující ischemii přenášeného volného laloku a při dlouhodobém přetrvávání spasmu může způsobit nekrózu části či celého laloku a tím prodloužit morbiditu pacienta.

Průkopníky studia vasospasmů v plastické chirurgii na mezinárodní úrovni jsou u nás brněnští autoři. Již v roce 1987 popsali v experimentální práci jak segmentální spasmy, tak i spasmy celé cévy volného laloku, které následně vedly k jeho ischemii [90, 91]. Své zkušenosti s vasospasmy přenášeli a přenášejí do klinické praxe. Nejnověji mechanickým tahem vyvolávali spasmus na cévě a. epigastrica inferior superficialis vypreparovaného tříselného laloku u laboratorní krysy. Na tomto modelu spasmu cévy volného laloku poté zkoušeli různé postupy vasodilatační terapie a léčiv. V souladu s poznatky zabývající se vasospasmy v neurochirurgii nakonec dospěli k závěru, že vznik spasmu je snadný, jeho odeznění přetrvává nekonstantně dlouhou dobu a je navíc těžko ovlivnitelné. Jako nejúčinnější vasodilatans při vzniklém spasmu podávaný lokálně (intraadventiciálně) i celkově (i.v. infuze) se dle této studie ukázal 10% roztok magnéziu sulfátu. Vedle nalezené nejúčinnější látky k prevenci a odeznění vasospasmu je doporučeno udržování stálé tělesné teploty (zahříváním pacienta během operace), oplachování operačního pole teplým fyziologickým roztokem. Při preparaci volného laloku je třeba se vyvarovat především tahu za cévní stopku a provádět důslednou hemostázu [35].

1.3.2 Hyperdynamická terapie

Při hledání optimální léčby cerebrálních vasospasmů bylo vyzkoušeno mnoho léčebných postupů a léčiv. Nakonec se jako nejúčinnější ukázala hyperdynamická terapie, která zachovává dostatečný krevní průtok a tedy dostatečnou oxygenaci mozkové tkáně. Jako „hyperdynamickou terapii“ (známé též jako 3-H terapie) nazýváme postupy, které navozují: hypervolémii, hemodiluci, hypertenzi (v současnosti preferovanou normotenzi) [26, 53]. Tento postup a zásady jsme zařadili i do našeho protokolu operativy volných laloků.

1.4 Elektivní mikrochirurgická operace

Při elektivních operacích s využitím volných laloků je operace pečlivě naplánována, má svůj řád a lalok je do poslední chvíle připojen ke své původní výživě - cévní stopce laloku. Příjmové cévy jsou před odpojením laloku řádně vypreparované a připravené k následné cévní sutuře. Dobu ischemie tak vlastně představuje pouze doba potřebná k cévní mikrosutuře. Ta většinou nepřesáhne hranici 60 minut. Tedy doby, která je prakticky pro všechny druhy volných laloků z hlediska nevratného poškození ischemií bezpečná. Někteří autoři uvádí bezpečnou dobu teplé ischemie tkáně volného laloku (bez ohledu na druh tkáně) do 2 hodin [63].

Samotná ischemie, která je způsobena dočasným klipem na vyživujících cévách při přenosu laloku, tkáň volného laloku přímo neohrožuje. Ani naše experimentální studie zaměřená na zjištění poškození tkáně svalového volného laloku z hlediska ischemicko-reperfuzního poškození, neprokázala signifikantní poškození laloku. Protože však v klinické praxi dochází k nekrotickým volných laloků, ať už částečných nebo úplných, a tím i delší morbiditě pacienta, usuzuje se, že ke změnám ve tkáni volného laloku dochází až při **prolongované ischemii** [46, 62, 63]. Ta je způsobena nejčastěji dlouhým časem potřebným k

provedení cévní mikrosutury, trombózou v místě mikrosutury, prolongovanými vasospasmy nebo vícečetnými patologickými změnami na úrovni mikrocirkulace - souhrně tzv. **no-reflow fenoménem** (viz výše), které v konečném důsledku mohou vést k úplné ischemii tkáně laloku a jeho ztrátě [52].

K ohrožení laloku ischemickým insultem může docházet ve všech fázích operačního období.

1. Předoperační období: vždy je třeba přihlédnout k celkovému stavu pacienta nebo jeho návykům. Posoudit v jakém stavu se nalézají pacientovi tepny, protože aterosklerotická nemoc, zvláště je-li kombinována s diabetem, hypercholesterolémií, hypertenzí či abuzem tabáku, může zapříčinit nezdár celé operace. Dále to mohou být některé méně časté vaskulitidy či následky předchozí tromboembolické nemoci. To jsou kritéria, která je nutno vzít v úvahu při plánování volného laloku s ohledem na jeho prokrvení. Nelze opomenout ani stresovou reakci pacienta (strach z operace), hypotermii (pacient leží nahý v posteli či na operační sále), hypovolémií (nedostatečná hydratace pacienta před operací). Ve všech těchto situacích dochází k periferní vasokonstrikci, která zhoršuje prokrvení tkání užívaných při přenosech volných laloků [12].
2. Perioperačně je lalok ohrožen hypovolémií, která je způsobená krevní ztrátou, ztrátou tekutin (např. odpařováním tekutin z velké operační plochy), vasospasmy stopky laloku (nešetrná preparace, krvácení kolem cév stopky laloku, poškození adventicie cév stopky laloku). Denervací sympatické pleteně kolem cév při odpojení laloku dochází k prekapilární vasokonstrikci, při prolongovaném výkonu [65, 68].

3. Pooperační období: nejčastější příčinou ischemie laloku je trombóza žíly či tepny stopky laloku, která je způsobena buď nedokonalou mikrosuturou nebo útlakem zvenčí např. hematodem, přetrvávajícími vasospasmy, intersticiálním edémem při podávání nadbytku tekutin.

Přestože jsou poměrně dobře známy děje, které negativně ovlivňují tkáň volného laloku, nebyl dosud vytvořen a odbornou veřejností obecně přijat jednotný protokol pre-, peri- i pooperační péče, který by tyto negativní procesy maximálně eliminoval.

Cílem naší experimentální práce bylo vytvořit model ischemie izolovaného svalového laloku na velkém zvířeti, který by umožňoval studium patofyziologie dějů probíhajících v tomto laloku z hlediska oxidačního stresu. Výsledky pak aplikovat v klinické praxi operativy volných laloků.

2. Experimentální model ischemicko-reperfuzního poškození svalového laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího

2.1. Hypotéza a cíl práce

Cílem našeho projektu bylo především aplikací mezioborové spolupráce vytvořit co nejkompexnější a co nejrealnější experimentální model ischemie svalového volného laloku musculus latissimus dorsi (MLD) prasete domácího tak, aby co nejvíce odpovídal klinické praxi. Tento lalok je v rekonstrukční chirurgii jeden z nejužívanějších. Na tomto modelu jsme chtěli ozřejmit, zda změny probíhající během ischemicko-reperfuzní fáze mohou vést k částečnému či úplnému poškození tkáně.

Oxidační stres během ischemicko-reperfuzního poškození tkáně je v současnosti velmi studovaným jevem s perspektivou nalezení nových postupů a podávání látek, které by eliminovaly vliv metabolitů oxidačního stresu a tím i poškození tkání. Zvláště se jedná o praktické využití v onkochirurgii nebo transplantační chirurgii [66]. I z hlediska rekonstrukční chirurgie má takovýto výzkum smysl. Užívá se zde přenosu tkáňových celků či orgánů, které jsou logicky též ischemicko-reperfuzním syndromem postiženy. V experimentu jsme si vytyčili za cíl:

1. Vytvořit klinicky relevantní model volného svalového laloku.
2. Vypracovat metodiku, ve které by byly využity běžné, automatizované laboratorní postupy a metody, které by s jistotou změny probíhající během ischemie, resp. oxidačního stresu detekovaly.
3. Na základě zhodnocení výsledků (získaných z krevních vzorků a tkáňových homogenátů) zjistit, do jaké míry má ischemie a následná reperfuze vliv na svalovou tkáň volného laloku MLD z hlediska oxidačního stresu.

V případě, že bychom tento nepříznivý vliv I/R poškození na svalovou tkáň MLD potvrdili, chtěli jsme jev na takto vytvořeném modelu izolované a klinicky hojně využívané svalové tkáně dále studovat a zkoumat možnosti jeho ovlivnění.

Změny probíhající během I/R fáze byly hodnoceny na základě laboratorních hodnot získaných izolovaně z krevních vzorků a tkáňových homogenátů svalového laloku MLD. Odběr vzorků krve byl prováděn z arteria carotis communis (ACC) a z vena thoracodorsalis – drénující žíly cévní stopky laloku. Porovnávali jsme hodnoty získané z arteriální a žilní krve, tzv. arterio-venózní (AV) diferencí. Tímto postupem jsme obsáhli změny probíhající během I/R fáze pouze v daném svalovém laloku. Současně s krevními vzorky byly též odebrány svalové vzorky z tkáně MLD. Ty byly následně použity k tvorbě svalových homogenátů. V obou druzích vzorků se stanovovaly změny v hodnotách veličin měnících se během oxidačního stresu. Experiment byl prováděn na velkém experimentálním zvířeti tak, aby se co nejvíce přiblížil fyziologii lidského organismu [38, 75].

Takto komplexní, realistický a selektivní experimentální model konkrétního svalového laloku velkého zvířete nebyl při zahájení experimentální práce publikován.

2.2 Metodika a odběr vzorků, vlastní provedení

Celý projekt byl schválen Etickou komisí Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze.

Experiment, resp. odběr a sběr krevních i svalových vzorků během operace na praseti domácím, probíhal v letech 2010 až 2012. Celkem bylo operováno 24 prasat, do závěrečné analýzy byly zařazeny vzorky z 18 laboratorních zvířat. Prvních 6 zvířat bylo určeno k optimalizaci chirurgických postupů a metodiky. Zvířata byla během jednotlivých výkonů v celkové anestezii, endotracheální intubaci, řízené ventilaci, svalové relaxaci, za trvalé monitorace elektrokardiografem (EKG) a saturace krve kyslíkem.

2.3 Anestézie prasat

Anestézie byla vedena dle doporučení autora MVDr. Petra Raušera, Ph.D. z Kliniky malých zvířat Veterinární fakulty Veterinární a farmaceutické university Brno.

Premedikace: byla volena formou intramuskulární aplikace kombinace anticholinergika, trankvilizéru a disociačního anestetika. Konkrétně jsme používali kombinaci atropin + azaperon + ketamin. Po premedikaci byl zajištěn žilní vstup punkcí žíly na uchu a prase bylo v celkové anestézii intubováno. Byla zahájena monitorace EKG. Poté byla vypreparována vnitřní krkavice a zaveden arteriální katetr k monitoraci krevního tlaku.

Celková anestézie pak byla vedena kontinuálním podáním trankvilizéru (midazolam) a disociačního anestetika (ketamin). Při zahájení preparace svalů bylo podáno nedepolarizující myorelaxans.

Infúzní terapie byla podávána cestou periferního žilního vstupu, po dobu anestézie byl podáván náhradní roztok (Plasmalyte) se zvýšením dávky při operačním krvácení. Ke krytí větších krevních ztrát byl podáván koloidní roztok (Voluven).

Umělá plicní ventilace byla prováděna přístrojem ES 900C, v režimu objemové ventilace, ventilační parametry byly v průběhu anestézie upravovány dle aktuálních hodnot ET CO₂.

Celková anestezie byla ukončována smrtí pokusného zvířete. Na závěr celkové anestézie byl podán bolus barbiturátu (thiopental) s následným podáním vysoké dávky draslíku (KCl 7,5%).

O průběhu celkové anestézie byl veden standartní anesteziologický záznam.

2.3.1 Používaná léčiva:

<u>Název</u>	<u>Výrobce</u>	<u>Koncentrace</u>
Atropin Biotika	Biotika	0,5 nebo 1 mg/1ml
Stresnil	Janssen	40 mg/ml
Narkamon 50 mg/ml	Bioveta	50 mg/ml
Propofol	Fresenius	200 mg/20 ml nebo 500 mg/50 ml
Midazolam Torrex	Torrex	5 mg/ml
Pavulon	Organon	4 ml/2 ml
Thiopental	Valeant	0,5 nebo 1 g v lah.
Plasmalyte	Fresenius	1000 ml
Voluven	Fresenius	500 ml
Kaliumchlorid	Braun	20 nebo 100 ml

2.3.2 Anesteziologický protokol:

Zvíře do 35 kg:

- Premedikace: Atropin 1 mg + Stresnil 5 ml (200 mg) + Ketamin 6 ml (300 mg). Po 20-25 min.: vážení, přenesení na operační stůl, zavedení periferního žilního katetru do žíly na uchu;
- Úvod do celkové anestézie: Diprivan 50 mg i.v. bolus;
- Intubace: tracheální rourka (TR) Portex. č. 6,5, fixace TR, napojení na ventilátor, nastavení;
- Ventilace: režim VCV, Vt 350 ml, df 12/min., FiO₂ 50%, napojení monitorace ET CO₂,
Diprivan bolus 50 mg + Ketamin 100 mg, Plazmalyte 1000 ml 280 ml/h,
Napojení elektrod k monitoraci EKG, upevnění snímače SpO₂;
- Vedení celkové anestézie:
Podávání kontinuální lineomatem: Diprivan 200 mg 3-8 ml/h,
Narkamon 50 ml + Dormicum 10 mg 10 ml/h,
Vyprevavování vnitřní krkavice, zavedení arteriálního katetru, monitorace přímého arteriálního tlaku,
Přetočení do operační polohy. Po stabilizaci hodnot ev.úprava ventilace a infuzní léčby,
Při zahájení preparace svalů: Pavulon 4 mg i.v., následně bolusy 2 mg i.v. po 30 min.,
Rychlost infuze dle oběhových parametrů a krevních ztrát. Při velké krevní ztrátě Voluven bolus do celkové dávky 500 ml;
- Závěr anestézie: Thiopental bolus 1 g + Stresnil 200 mg + KCl 7,45% 100ml.

Po vyhasnutí srdeční aktivity ukončení ventilace, odpojení od ventilátoru.

Zvíře 35-45 kg:

- Premedikace: Atropin 1 mg + Stresnil 5 ml (200 mg) + Ketamin 8 ml (400 mg)
Po 20-25 min.: vážení, přenesení na operační stůl, zavedení periferního žilního katetru do žíly na uchu;
- Úvod do celkové anestézie: Diprivan 50mg i.v. bolus;
- Intubace: TR Portex. č. 6,5-7,0, fixace TR, napojení na ventilátor, nastavení Ventilace: režim VCV, Vt 350 ml, df 12/min., FiO₂ 50%, napojení monitorace ET CO₂,
Diprivan bolus 50 mg + Ketamin 100 mg, Plazmalyte 1000 ml 300 ml/h,
Napojení elektrod k monitoraci EKG, upevnění snímače SpO₂;
- Vedení celkové anestézie:
Podávání kontinuální lineomatem: Diprivan 200mg 8-12 ml/h,
Narkamon 50 ml + Dormicum 10 mg 15 ml/h,
Vyprepavování vnitřní krkavice, zavedení arteriálního katetru, monitorace přímého arteriálního tlaku,
Přetočení do operační polohy. Po stabilizaci hodnot ev. úprava ventilace a infúzní léčby,
Při zahájení preparace svalu: Pavuon 4 mg i.v., následně bolusy 2 mg i.v. po 30 min.,
Rychlost infuze dle oběhových parametrů a krevních ztrát. Při velké krevní ztrátě Voluven bolus do celkové dávky 500 ml;
- Závěr anestézie: Thiopental bolus 1,5 g + Stresnil 200 mg + KCl 7,45% 100-150 ml.

Po vyhasnutí srdeční aktivity ukončení ventilace, odpojení od ventilátoru.

Zvíře nad 45 kg:

- Premedikace: Atropin 1 mg + Stresnil 7 ml (240 mg) + Ketamin 8-14 ml (400-700 mg),
Po 20-25 min.: vážení, přenesení na operační stůl, zavedení periferního žilního katetru do žíly na uchu;
- Úvod do celkové anestézie: Diprivan 80 mg i.v. bolus;
- Intubace: TR Portex. č. 6,5-7,0, fixace TR, napojení na ventilátor, nastavení Ventilace: režim VCV, Vt 350 ml, df 12/min., FiO₂ 50%, napojení monitorace ET CO₂,
Diprivan bolus 50 mg + Ketamin 200 mg, Plazmalyte 1000 ml 300 - 350 ml/h,
Napojení elektrod k monitoraci EKG, upevnění snímače SpO₂,
- Vedení celkové anestézie:
Podávání kontinuální lineomatem: Diprivan 200 mg 8-12 ml/h,
Narkamon 50 ml + Dormicum 10 mg 15 ml/h,
Vyprepavování vnitřní krkavice, zavedení arteriálního katetru, monitorace přímého arteriálního tlaku,
Přetočení do operační polohy. Po stabilizaci hodnot ev. úprava ventilace a infuzní léčby,
Při zahájení preparace svalu: Pavuon 4 mg i.v., následně bolusy 2 mg i.v. po 30 min.,
Rychlost infuze dle oběhových parametrů a krevních ztrát. Při velké krevní ztrátě Voluven bolus do celkové dávky 500 ml;
- Závěr anestézie: Thiopental bolus 1,5 g + Stresnil 200 mg + KCl 7,45% 100-150 ml.

Po vyhasnutí srdeční aktivity ukončení ventilace, odpojení od ventilátoru.

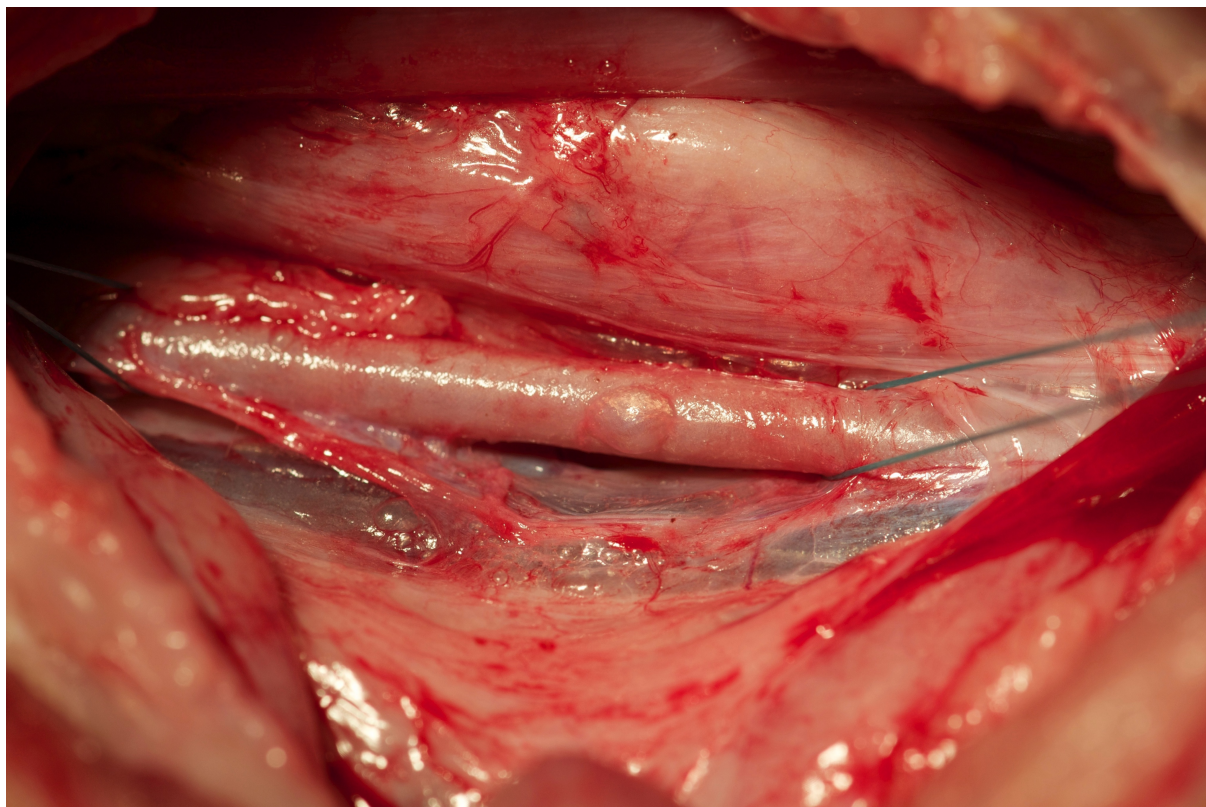
2.4 Operační technika

Na experimentálním operačním sále byl každému pokusnému zvířeti, po účinné premedikaci, nejprve zaveden žilní katetr do ušní žíly k podávání celkových anestetik a náhradních roztoků k doplnění tekutin během operace (v poloze na břiše).

2.4.1 Odběr arteriálních krevních vzorků

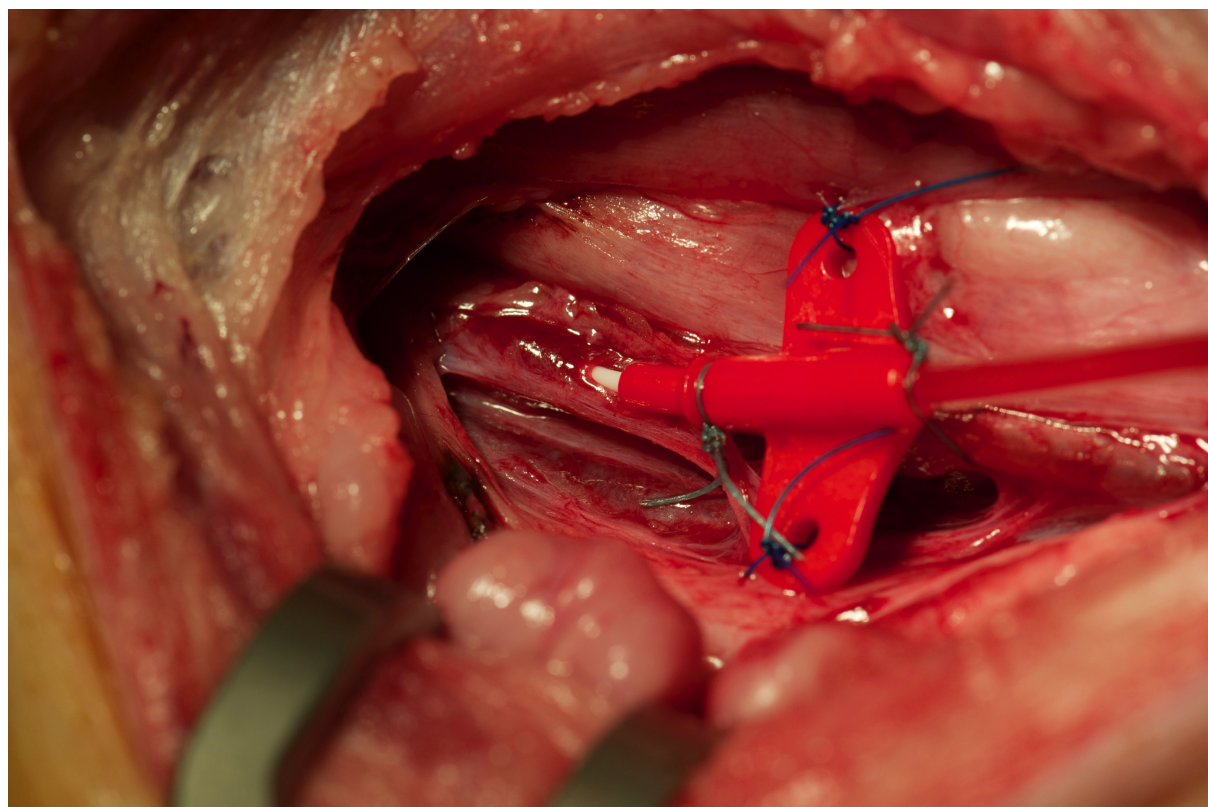
Zvíře bylo následně přetočeno na záda a na krku prasete vypreparována arteria carotis communis (obr. 1).

Obr. 1 - Arteria carotis communis (ACC)



Do ní byl zaveden arteriální katetr (obr. 2) Seldingerovou metodou k invazivnímu měření arteriálního tlaku. Katetr též sloužil k odběru arteriálních krevních vzorků.

Obr. 2 - Katetr v ACC



2.4.2 Preparace musculus latissimus dorsi

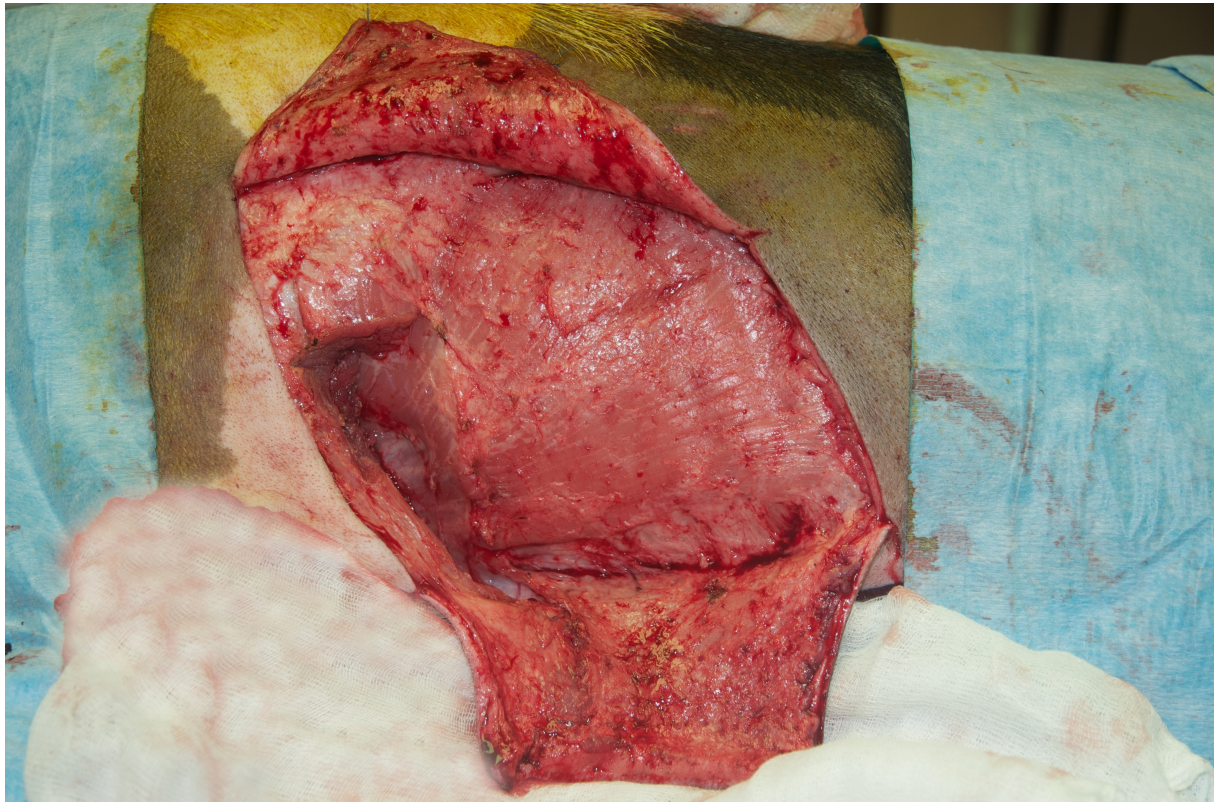
Po opětovném přetočení zvířete na břicho jsme odklopili kožní kryt nad MLD pomocí dvou protilehlých laloků oboustranně (obr. 3).

Obr. 3 - Prase domácí v operační poloze



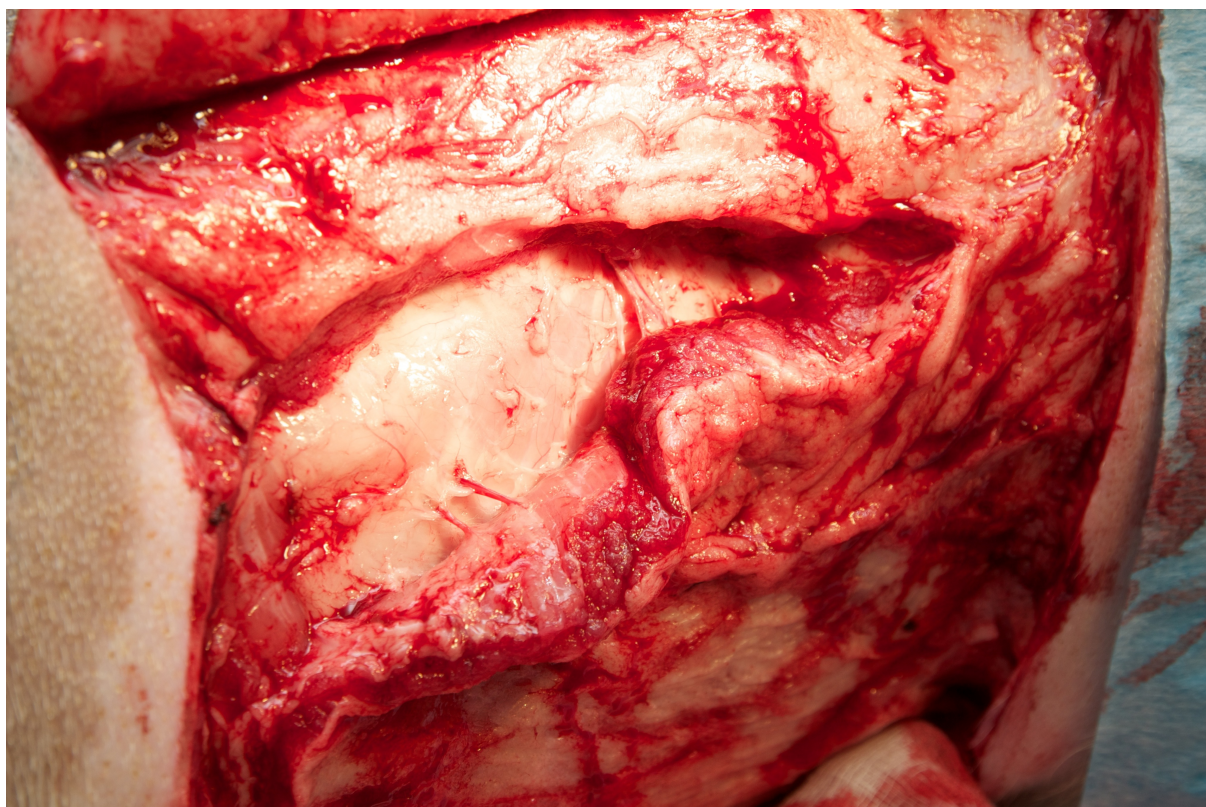
Touto technikou jsme dosáhli kompletní vizualizace MLD (obr. 4).

Obr. 4 - Odklopené kožní laloky a vizualizace MLD

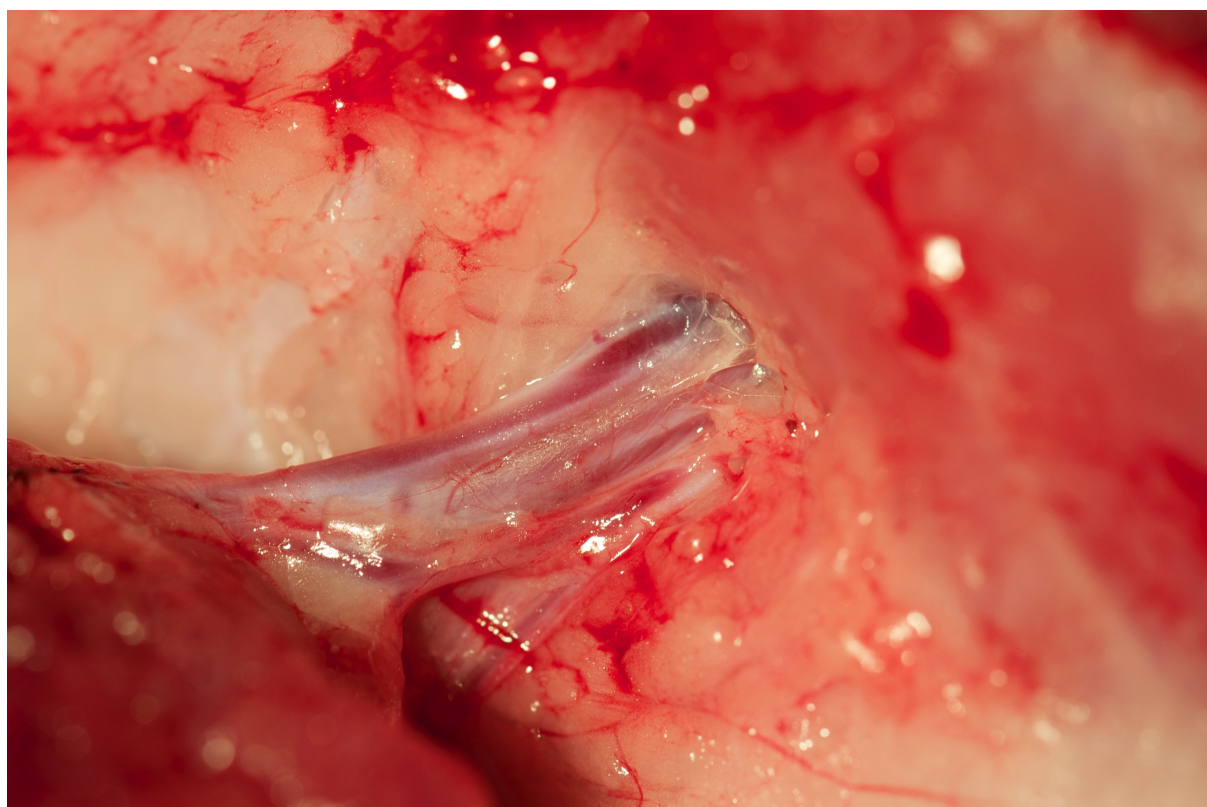


Pokračovala preparace musculus latissimus dorsi. Po celém obvodu byly odpojeny jeho paravertebrální a žeberní úpony. Dále jsme pokračovali směrem k hlavě, postupně jsme přerušovaly paravertebrální i interkostální vyživující perforátory (obr. 5).

Obr. 5 - Interkostální perforátory

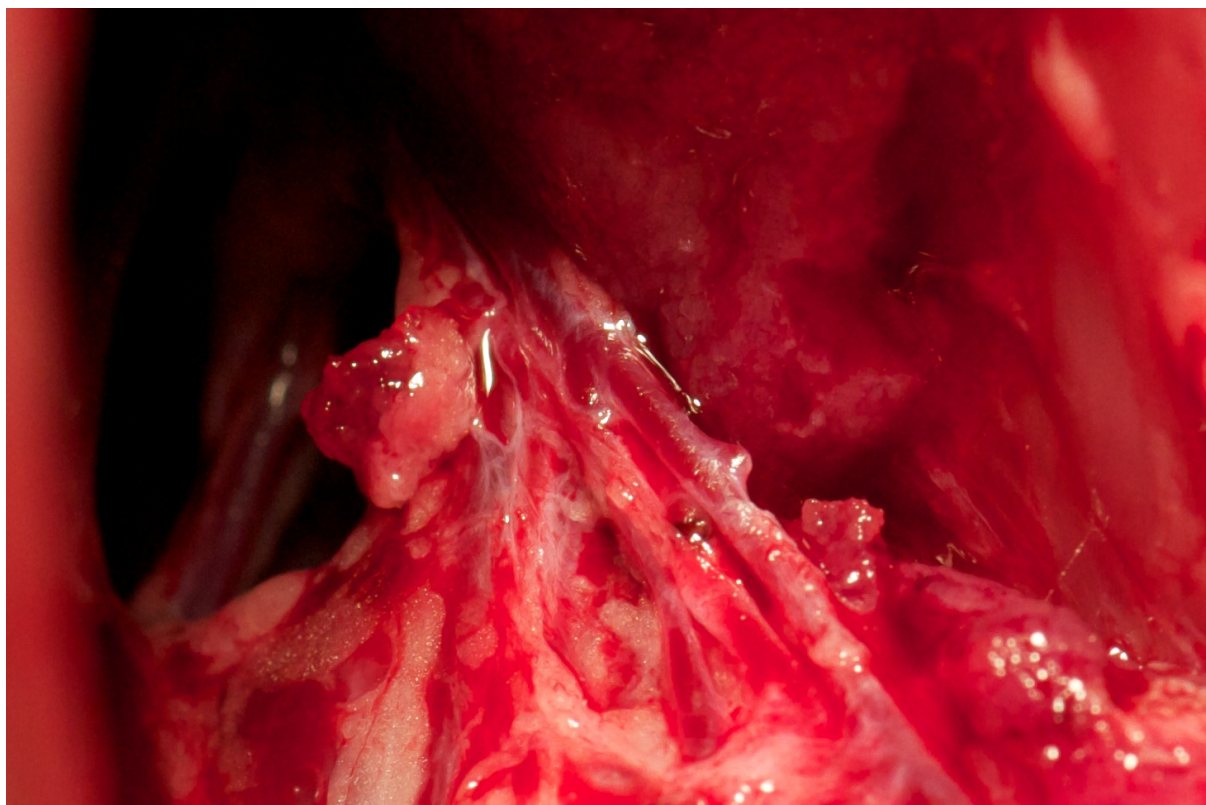


Obr. 5a - Detail interkostálního perforátoru



Preparace pokračovala až do míst, kdy se na vnitřní straně svalového laloku objevila cévní stopka (výživa svalu). Jednalo se přibližně o úroveň křížení MLD a musculus triceps přední nohy zvířete. V této úrovni byla transverzálně přerušena všechna zbývající svalová vlákna (úpon MLD na přední nohu). Tím bylo zajištěno prokrvení svalového laloku pouze cévami thorakodorzálního svazku (obr. 6).

Obr. 6 - Stopka thorakodorzálního svazku (detail)

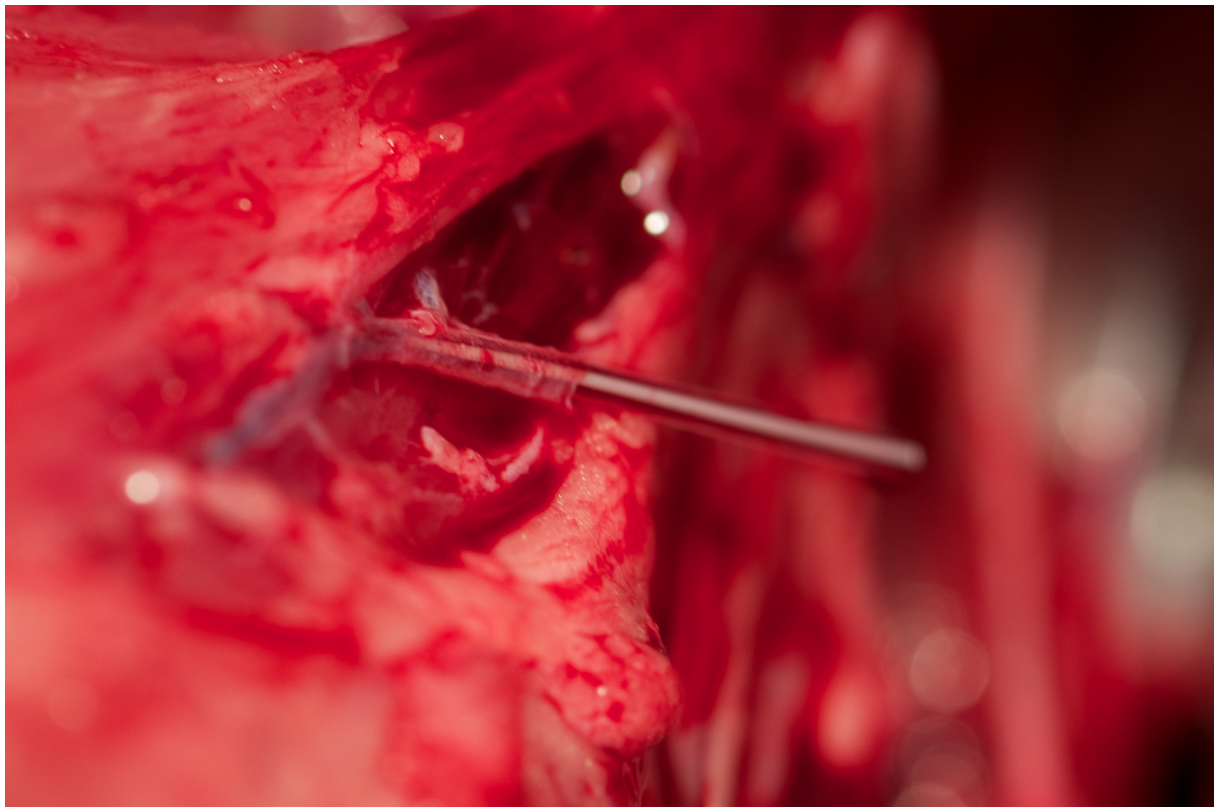


Uvedený postup byl proveden simultánně na obou stranách. Byl tedy připraven jak svalový lalok referenční, tak i svalový lalok zkoumaný. Z obou stran byl proveden odběr referenčních krevních vzorků z arteria carotis communis (dále jen ACC).

2.4.3 Odběr žilních krevních vzorků

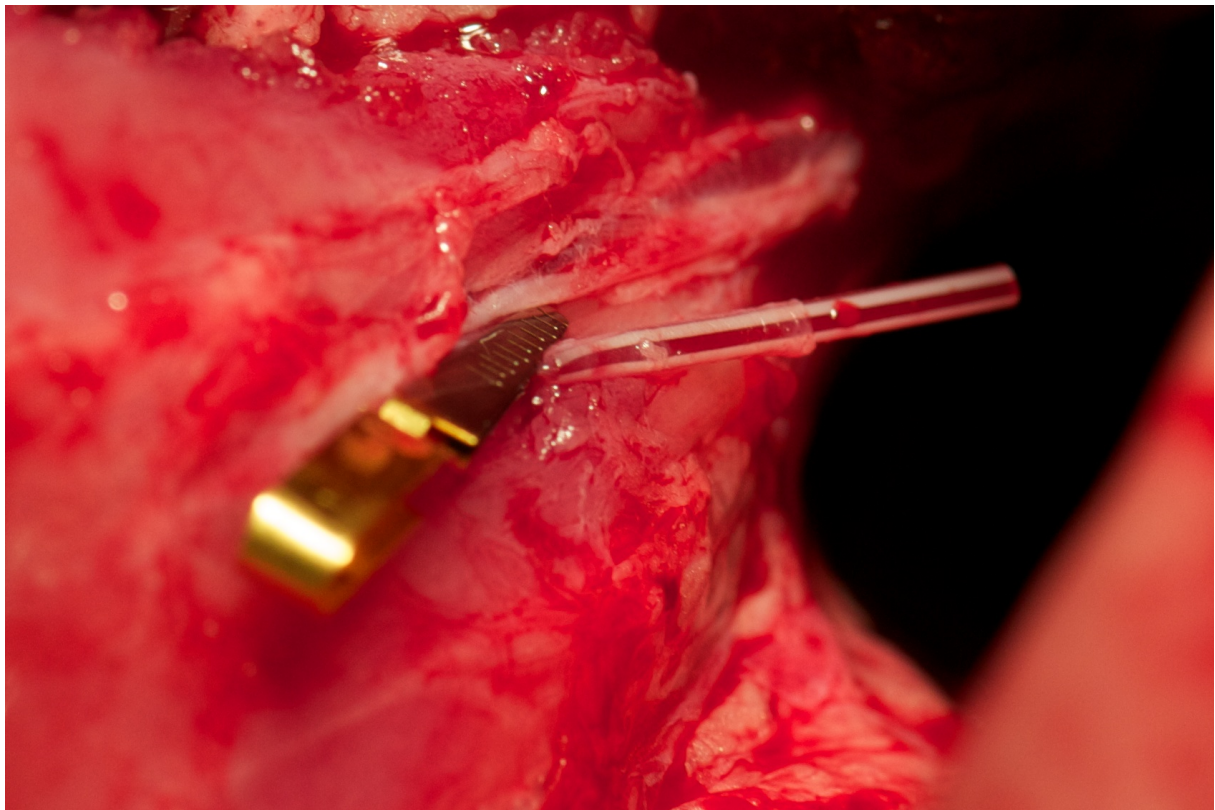
Vzorky žilní krve jsme odebírali tak, že jsme přetřali jednu ze dvou drénujících žil (venae thoracodorsales) cévní stopky a do ní zavedli upravený žilní katetr. Ten byl v žíle ponechán během celého experimentu (obr. 7).

Obr. 7 - Odběrový katetr zavedený v drénující žíle



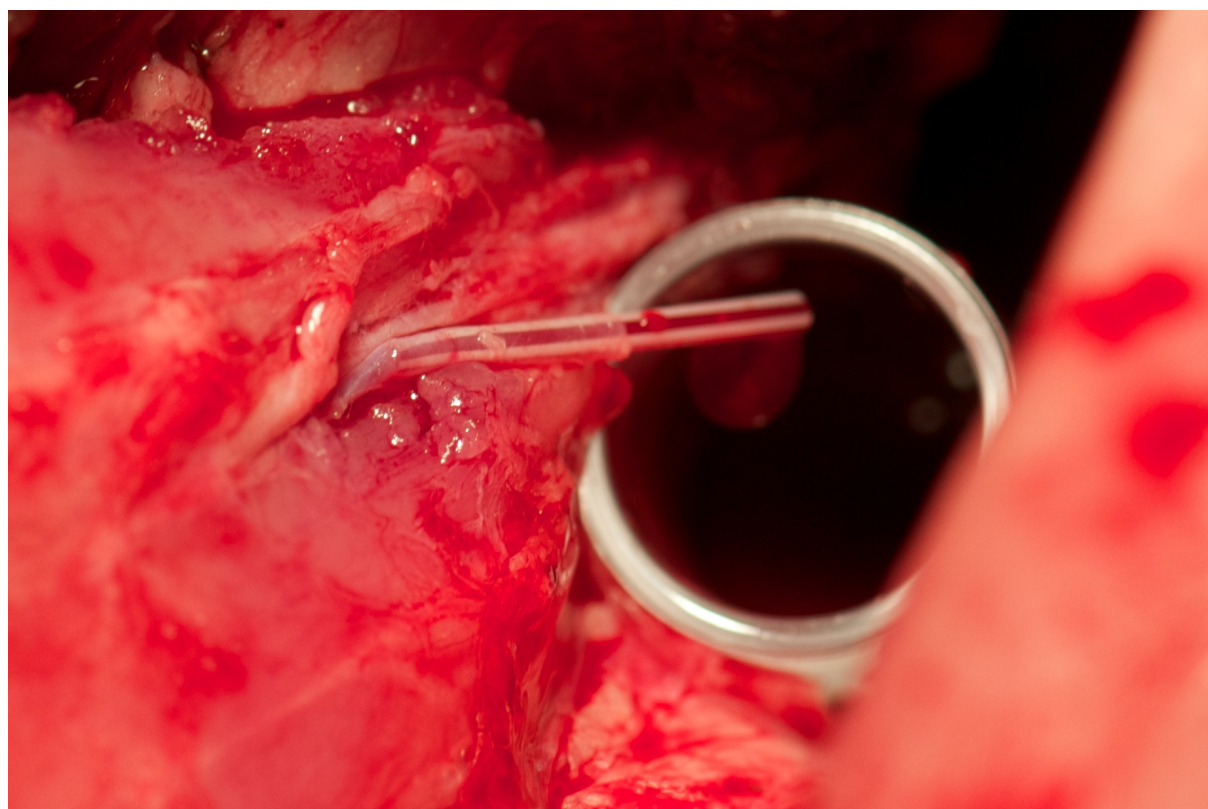
Později, v době ischemie a v průběhu simulované reperfuze, byla mezi jednotlivými odběry žíla vždy před katetrem zasvorkována (obr. 8)

Obr. 8 - Mikrosvorkou uzavřená drénující žíla v mezidobí odběru vzorků



a uvolňovala se pouze v době odběru. Žíla s takto zavedeným katetrem nekolabovala a odběr krve tak byl kontinuální a mohl být přesně směřován do odběrové zkumavky (obr. 9).

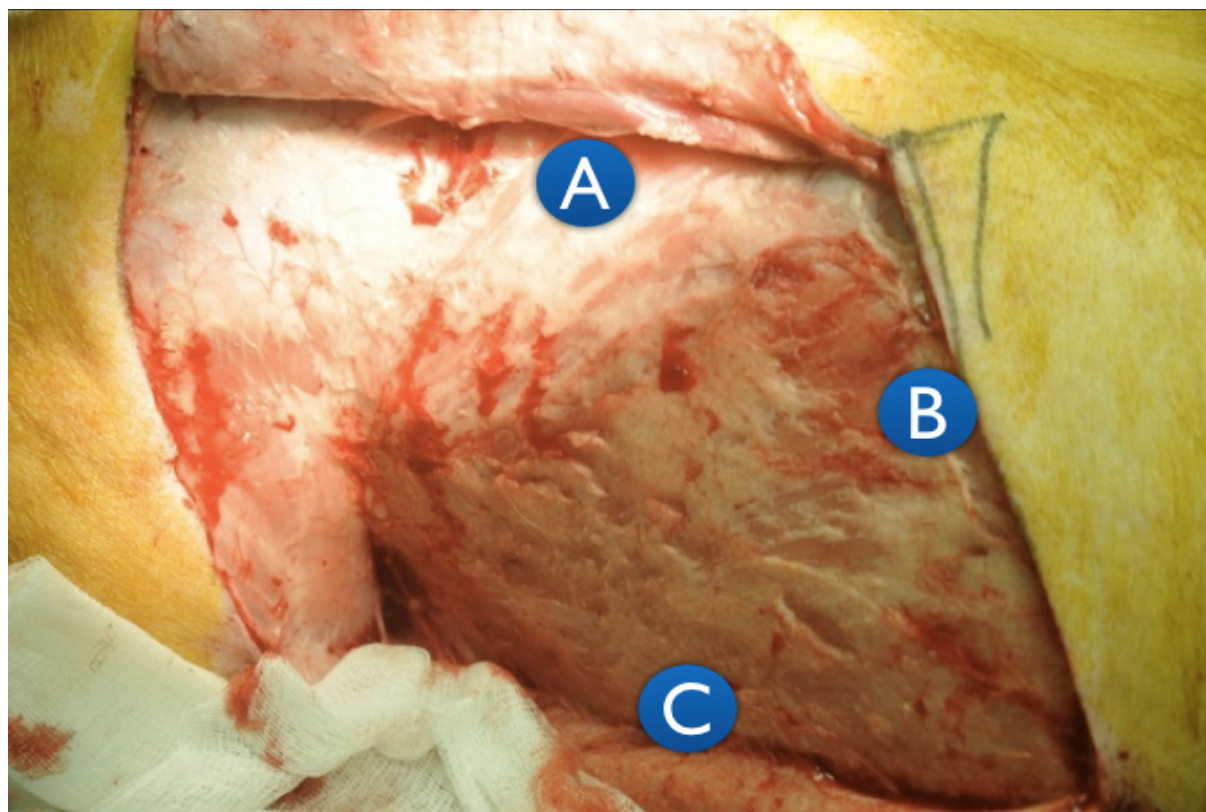
Obr. 9 - Odběr krevních vzorků z drénující žíly pomocí zavedeného katetru



2.4.4 Odběr svalových vzorků

Odběr svalových vzorků byl prováděn ze třech různých částí svalu (obr. 10),

Obr. 10 - Odběrová místa svalových vzorků z MLD



abychom zjistili, zda existují rozdíly v intenzitě oxidativního stresu v různých částech svalového laloku. Každý takový vzorek obsahoval cca 1 cm svalové tkáně.

2.4.5 Simulace ischemie

Před simulovanou ischemií byla zvířeti podána dávka heparinu dle hmotnosti (až 10000 IU - international units) a po 5 minutách cévní mikrosvorkou uzavřena cévní stopka zkoumaného laloku na 60 minut - reálný model simulace ischemie při odpojení laloku od donorských cév (obr. 11).

Obr. 11 - Dočasně zasvorkovaná cévní stopka thorakodorzálního svazku



Účinnost zasvorkování stopky laloku jsme kontrolovali povolením svorky na drénující žíle. Pokud nedocházelo k odtoku krve, bylo zasvorkování dostatečné a naopak.

2.4.6 Simulace reperfuze

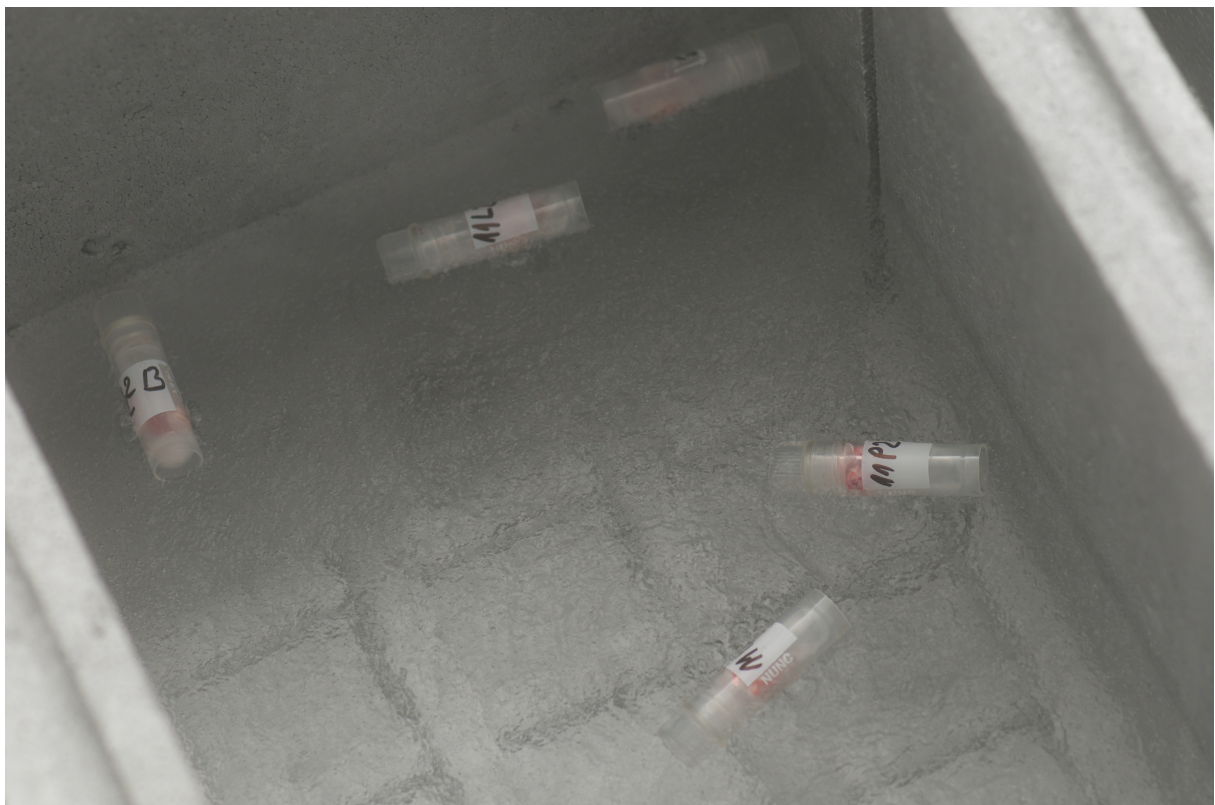
Po sejmutí svorky - reálný model simulace obnovení výživy laloku krví po provedení patentní mikrosutury na recipientní cévy - byly opět odebrány krevní i svalové vzorky výše popsaným způsobem a dále pak v určených časových intervalech během dalších 60 minut - simulace reperfuze.

Oba druhy vzorků byly odebírány v předem určených časových intervalech:

- 1. minuta - těsně před zasvorkováním cévní stopky jednoho svalu MLD - timepoint 1;
- 60. minuta (60. minuta ischemie) - těsně po sejmutí svorky ze stopky - timepoint 2;
- 90. minuta (30. minuta reperfúze) - timepoint 3;
- 105. minuta (45. minuta reperfúze) - timepoint 4;
- 120. minutě (60. minuta reperfúze) - timepoint 5.

Krevní vzorky byly ihned zpracovávány laborantkou přímo na operačním sále. Vzorky ze svalové tkáně byly, po mechanickém očištění od zbytků tukové a pojivové tkáně, okamžitě hluboce zmrazeny v tekutém dusíku (obr. 12).

Obr. 12 - Zmrazení vzorků v tekutém dusíku



Takto zpracované svalové vzorky byly transportovány do laboratoře, uskladněny a použity k dalšímu zpracování a analýze.

2.5 Homogenizace vzorků tkání

Abychom mohli sledované parametry stanovit i ve svalové tkáni, musely se tyto vzorky nejprve upravit na homogenáty:

- Odebrané tkáně jsme po odběru okamžitě zmrazili v tekutém dusíku a uschovali do dalšího zpracování v Eppendorfových zkumavkách při cca - 78 °C;
- Pro vlastní homogenizaci jsme ze zmražené tkáně vytnuli cca 0,3–0,4 g do nerezové homogenizační patrony a přidali jednu nerezovou kuličku;
- Dokonale zavřenou patronu jsme poté celou ponořili na 3 minuty do tekutého dusíku. Současně jsme zpracovávali dvě tkáně, levou a pravou stranu odběru. Tím byly zaručeny stejné podmínky zpracování tkání, které jsme srovnávali a obě dvě patrony v homogenizátoru byly vyvážené;
- Homogenizátor (obr. 13) byl nastaven na provoz na 3 minuty, frekvence 30 kmitů za minutu. Po této době jsme zkontrolovali, zda probíhá homogenizace správně a pokračovali jsme za stejných podmínek ještě 6 minut;

Obr. 13 - Homogenizátor



- Po této době byla tkáň dokonale rozbita a prováděli jsme extrakci pomocí PBS pufru. Množství přidaného pufru záviselo na navážce tkáně. Počet μl pufru odpovídal dvojnásobné hmotnosti v mg. Např. 0,3 g tkáně = 600 μl pufru. Extrakci jsme prováděli v homogenizátoru za stejných podmínek (3 minuty / 30);
- Po této době jsme pufr odtáhli a opakovali ještě jednou se stejným množstvím pufru;
- Po stažení jsme na závěr přidali poloviční množství pufru, v našem případě 300 μl ;

- Pufry ze všech extrakcí se spojily. Pro náš případ: 0,3 g tkáně 2x600 µl + 1x300 µl = 1500 µl.
- Po odstředění jsme stažený supernatant zvážili, rozdělili do tří alikvotů a dali zamrazit na cca -78°C k analýzám.
- Po rozmražení jsme alikvot dokonale promíchali, odstředili a analyzovali.

S takovýmto alikvotem se následně při analýze pracovalo jako se sérovým vzorkem.

2.6 Fáze optimalizace metodiky

Projekt jsme dle plánu nejprve zahájili optimalizací operativy, sběru vzorků a metodiky koncem roku 2010. Bylo operováno 5 zvířat (prasat domácích, 34-40 kg). Na tomto základě byla poprvé optimalizována a korigována metodika pokusu: bylo prováděno lalokové odklopení kožního krytu pro lepší přehlednost operačního pole (obr. 3 a obr. 4), arteriální krev byla odebírána pouze z ušní arterie či ACC - přitékající krev do laloku je pro oba MLD vždy stejná a bylo tedy zbytečné odebírání arteriální krve z cévní stopky laloku. Tento postup byl též technicky snadný a zároveň nehrozila trombóza přívodné arterie laloku opakovanými odběry. Preparace laloku probíhala od počátku mikrochirurgicky pomocí lupových brýlí se 4-násobným zvětšením. To vedlo k eliminaci poškození struktur cévní stopky laloku MLD. Standardně jsme zavedli podávání heparinu zvířeti před zasvorkováním jedné cévní stopky MLD k eliminaci trombózy intraarteriální i intravenózní krve během ischemické fáze. Během roku 2011 byl na základě dalších praktických zkušeností a dílčích laboratorních výsledků zrušen odběr vzorků v 5. a 15. minutě reperfuze a byla též modifikována metodika odběru vzorků ze svalové tkáně. Ty byly nově

odebírány ze třech různých oblastí svalového laloku (obr. 8) ke zjištění, zda je některá část laloku ischemií postižena více. Celkem bylo během této fáze operováno 12 prasat.

2.7 Fáze studijních odběrů

Po zvládnutí a zautomatizování operačních postupů bylo operováno dalších 12 prasat. I z této skupiny jsme museli vyloučit 2 zvířata. A sice prase č. 12 pro přerušení vyživující arterie laloku a prase č. 15, kde jsme vzhledem k anatomické anomálii nebyli schopni odebírat arteriální krev. Celkem během experimentu bylo operováno 24 prasat.

2.8 Sledované parametry

V obou dvou druzích vzorků (krevních i svalových) jsme stanovovali množství různých veličin a aktivitu enzymů oxidativního stresu, abychom zachytili aktivitu procesů účastnících se oxidativního stresu při I/R poškození na různých úrovních [18]. Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) samostatně laboratorně stanovit nelze. Jejich produkce, resp. množství se zjišťuje nepřímo metodou ELISA [21] - stanovením aktivity enzymů, které ROS v organismu redukují [33, 66, 75]:

- krevní obraz (KO) + diferenciální rozpočet leukocytů (rutinní metody);
- laktát, pyruvát (ukazatel ischemie);
- aktivita enzymů účastnících se oxidativního stresu - glutathionperoxidáza, glutathion, carbonyl, superoxid-dismutáza;
- stupeň lipidové peroxidace - TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances), isoprostany;

- svalové enzymy - kreatinkináza, aspartátaminotransferáza (CK, AST) a myoglobin (poškození svalu);
- D-dimery (aktivace koagulace) a PF4 (Platelet factor 4 - aktivace destiček);
- ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) a VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) - endothelová dysfunkce.

Zároveň byla stanovena tzv. arterio-venózní (AV) diference krevních vzorků - rozdíl hodnot naměřených v arteriální a žilní krvi v daném časovém intervalu v ischemickém a kontrolním svalu. Tímto jsme obsáhli změny probíhající během ischemie pouze v daném svalovém laloku .

2.9 Statistická analýza

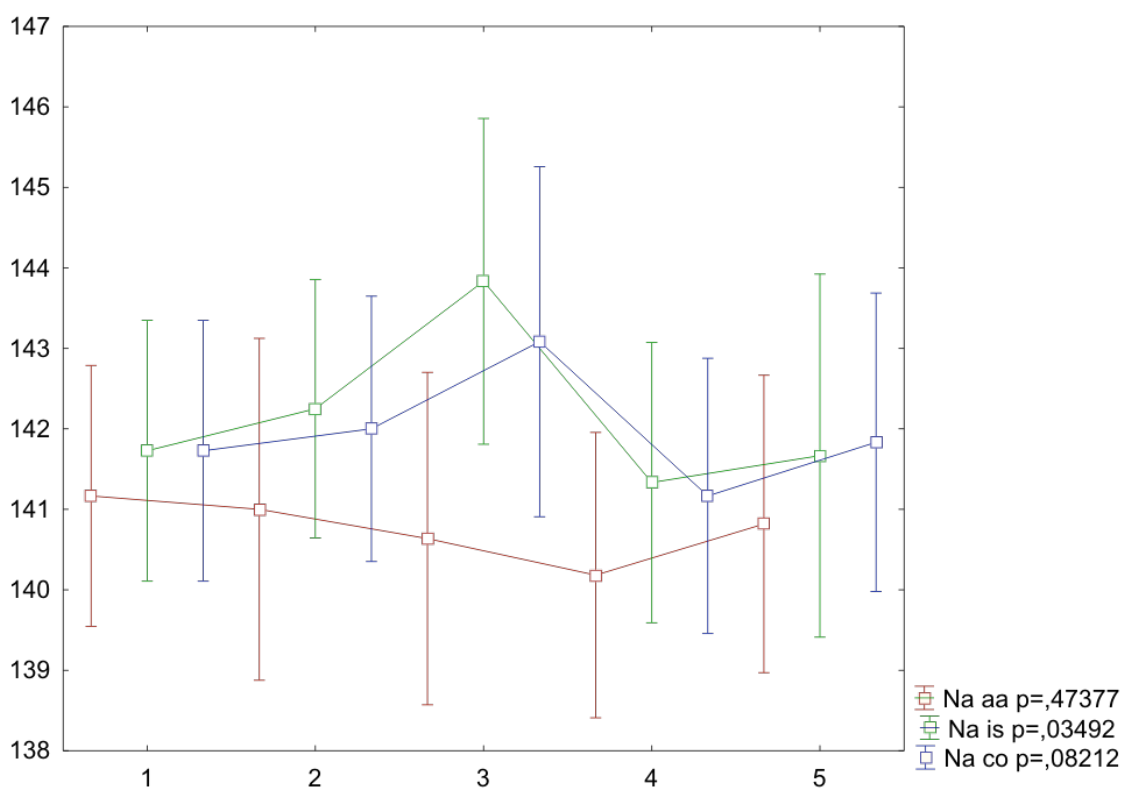
Sérové parametry oxidačního stresu byly korigovány na hemodiluci přepočtem na výchozí koncentraci celkové bílkoviny. Tkáňové parametry oxidačního stresu byly přepočítány na gram celkové bílkoviny obsažený ve výchozím vzorku. Lokální změny sérových parametrů oxidačního stresu byly posuzovány na základě rozdílu koncentrace příslušné látky v tepenné krvi a žilní krvi opouštějící lalok (arteriovenózní diference). Srovnání parametrů oxidačního stresu mezi oběma laloky v rámci jednoho pokusného subjektu bylo realizováno párovým t-testem. Srovnání vývoje parametrů oxidačního stresu v čase v rámci jednoho laloku bylo realizováno **analýzou variance - ANOVA** (Analysis of Variance). Všechna data jsou prezentována jako aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

2.10 Výsledky

Číselné hodnoty byly statisticky zpracované a zanesené do grafů. Grafy 1 - 3 vycházejí z neupravených sérových koncentrací, kdy na ose x jsou jednotlivé časové intervaly 1 až 5. Pro každý je vždy uvedený průběh v arteriální krvi (aa = systémová hodnota), a v žilní krvi z ischemického svalu (is) a kontrolního svalu (co). Statistické významnosti (p) charakterizují změnu v průběhu času.

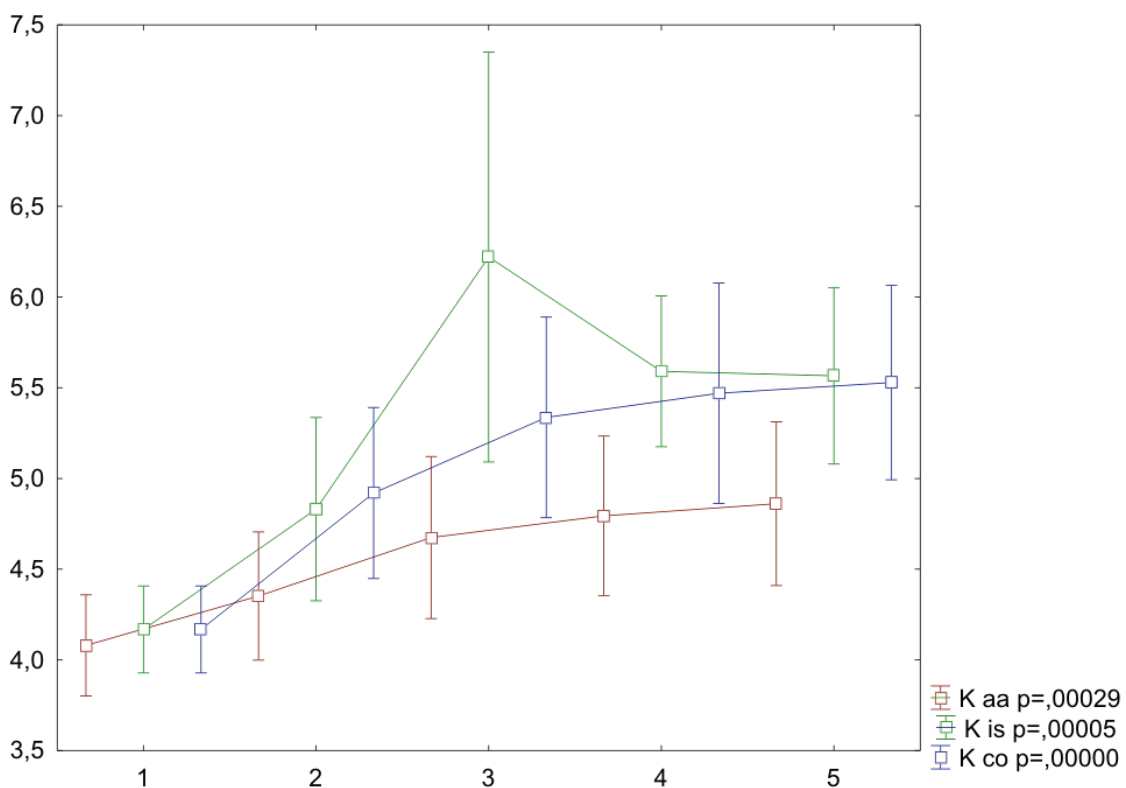
Systémové **natrium** se nemění, lokálně přechodně stoupne koncentrace v žíle z ischemizovaného i kontrolního svalu.

Graf 1 - Systémové natrium



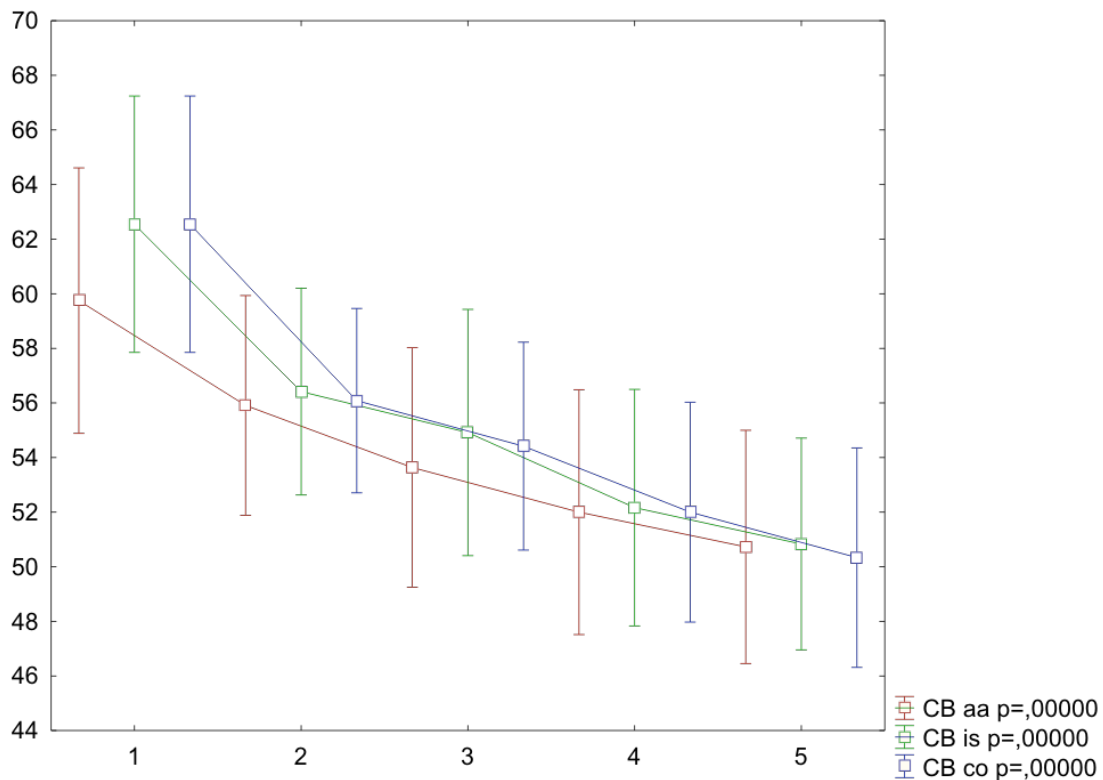
Graf 2 ukazuje velmi významný nárůst systémového **kalia** (arteriální krev). Výraznější změna je navíc viditelná v žilní krvi obou laloků současně oproti systémové, arteriální – tedy stoupá především lokální produkce kalia v obou preparovaných svalech (spekulativně lýza buněk) a tento efekt je významný i na systémové úrovni (množství uvolněného draslíku je tak vysoké, že vede k nárůstu systémové hladiny).

Graf 2 - Systémové kalium



Celková bílkovina klesá velmi významně v tepenné i žilní krvi, přitom není výrazný rozdíl mezi koncentracemi v tepně a žilách - graf 3 (zřejmě v důsledku substituce objemu náhradním roztokem).

Graf 3 - Celková bílkovina

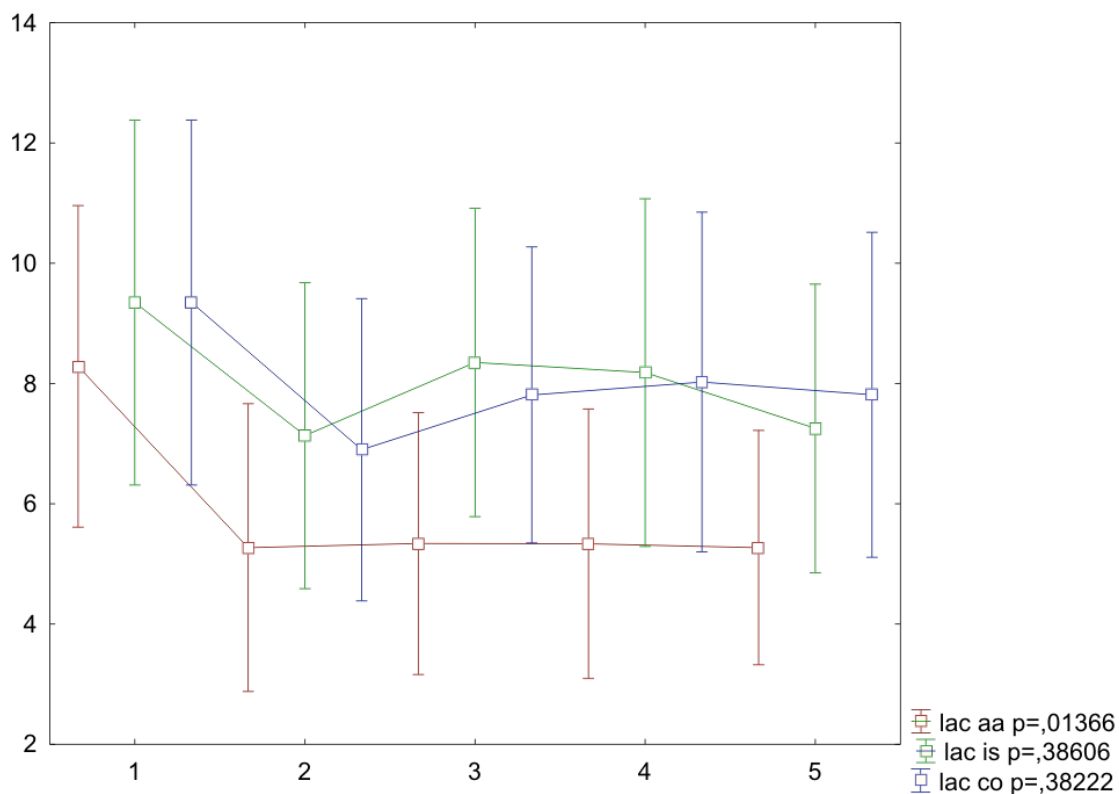


Vzhledem k této skutečnosti je dále proto nutné, pro ostatní látky kromě iontů, počítat s hodnotami korigovanými na výchozí celkovou bílkovinu.

Následující grafy vycházejí z hodnot korigovaných na výchozí koncentraci celkové bílkoviny. Ostatní parametry jsou stejné jako u předchozích grafů.

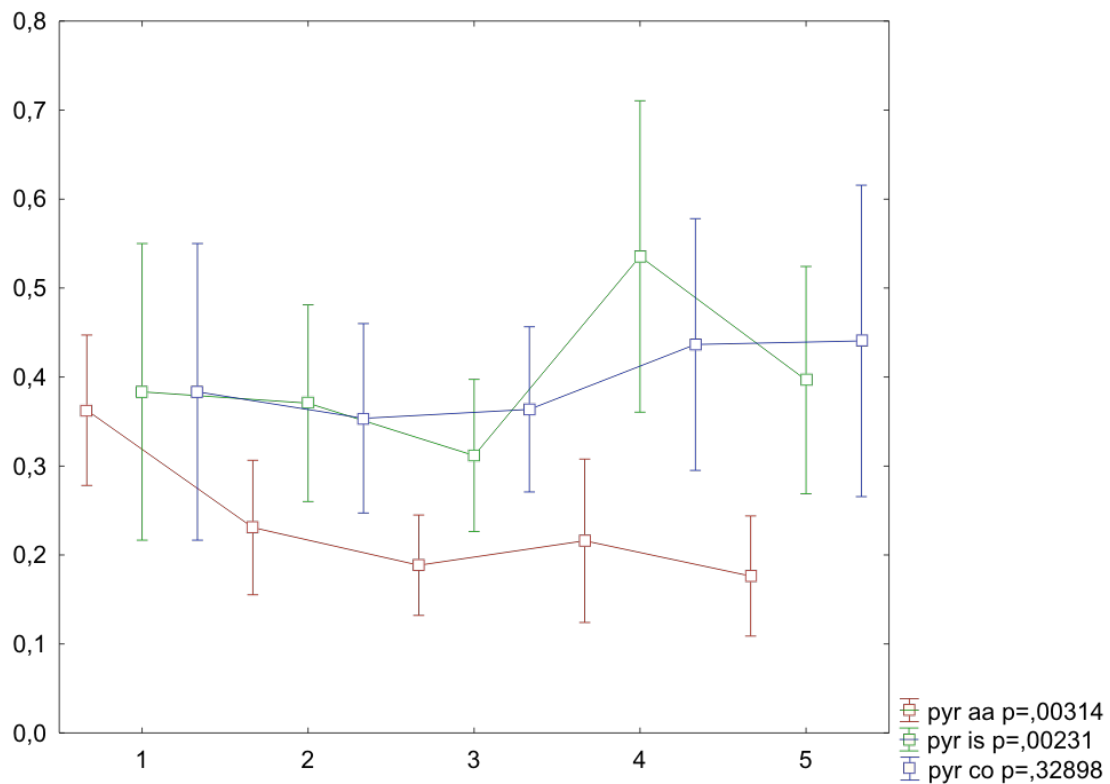
Systemový **laktát** v čase klesá, lokální laktát stagnuje - graf 4. Systemová koncentrace laktátu v čase klesá – tento trend lze interpretovat jako zvýšenou clearance po úvodu do anestezie. Přitom preparované svaly se na této clearance nepodílí.

Graf 4 - Systemový laktát



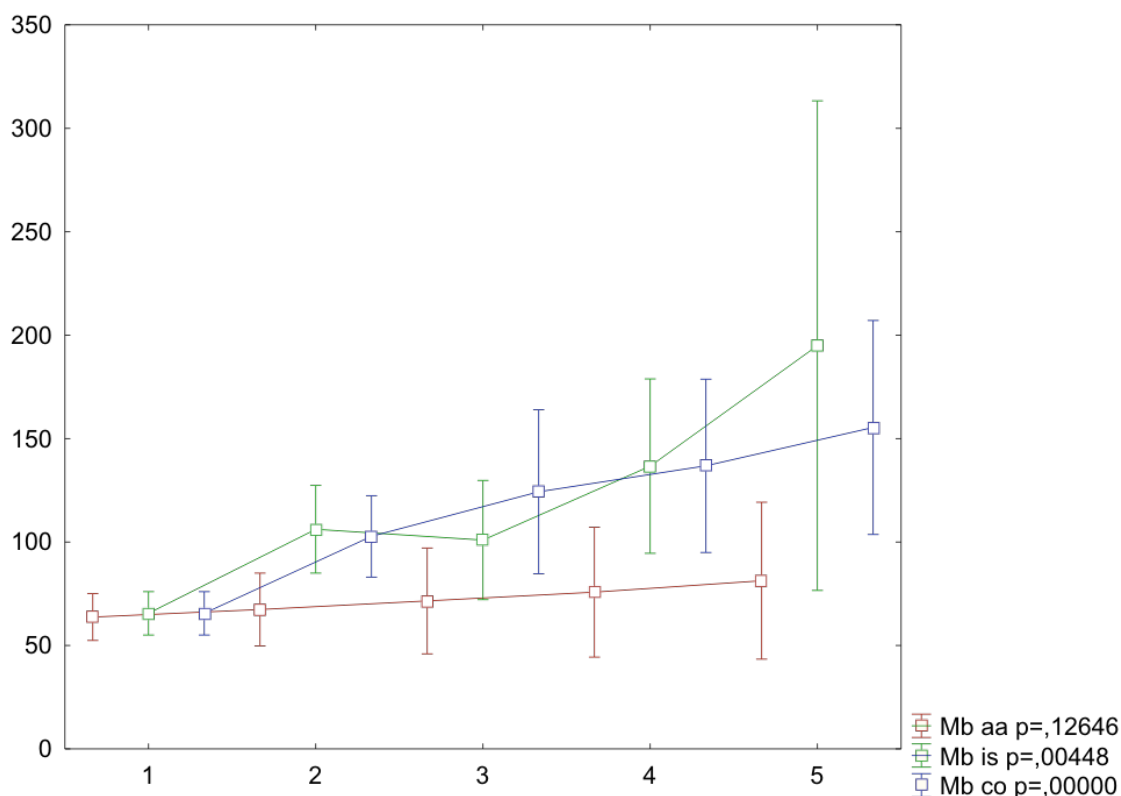
Hladina **pyruvátu** mírně stoupala v obou preparovaných svalech a ještě výrazněji v ischemickém svalu (graf 5). Systémový pyruvát v čase klesá (clearance po úvodu do anestezie, analogicky k laktátu), lokální produkce v kontrolním svalu se nemění, zatímco v ischemickém stoupá.

Graf 5 - Pyruvát



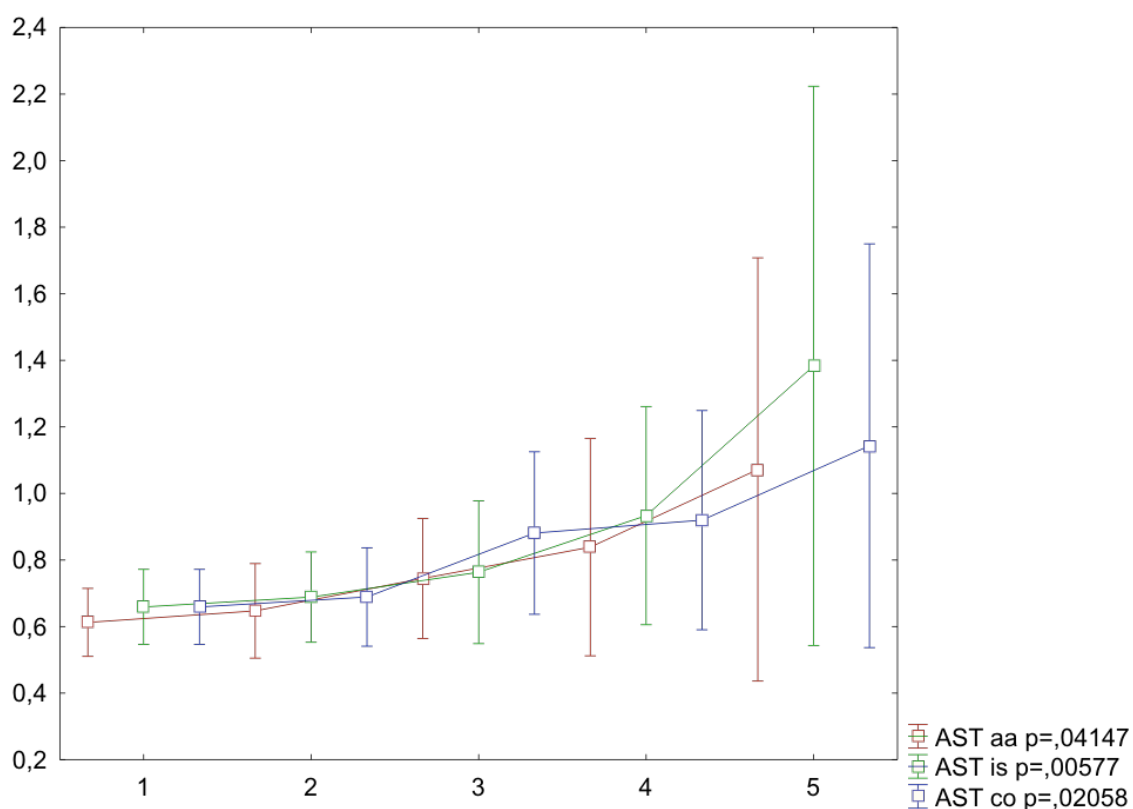
Systémový **myoglobin** (Mb) se významně nemění, ale v žilní krvi z preparovaných svalů shodně narůstá - graf 6. Přitom není jednoznačné, že by se víc uvolňoval z ischemického svalu. Výsledky jsou však ovlivněny vysokou variabilitou v posledním timepointu. Tj. zvýšená úroveň lokální produkce se neodráží v nárůstu systémové hladiny (např. proto, že renální clearance je dostatečná).

Graf 6 - Systémový myoglobin

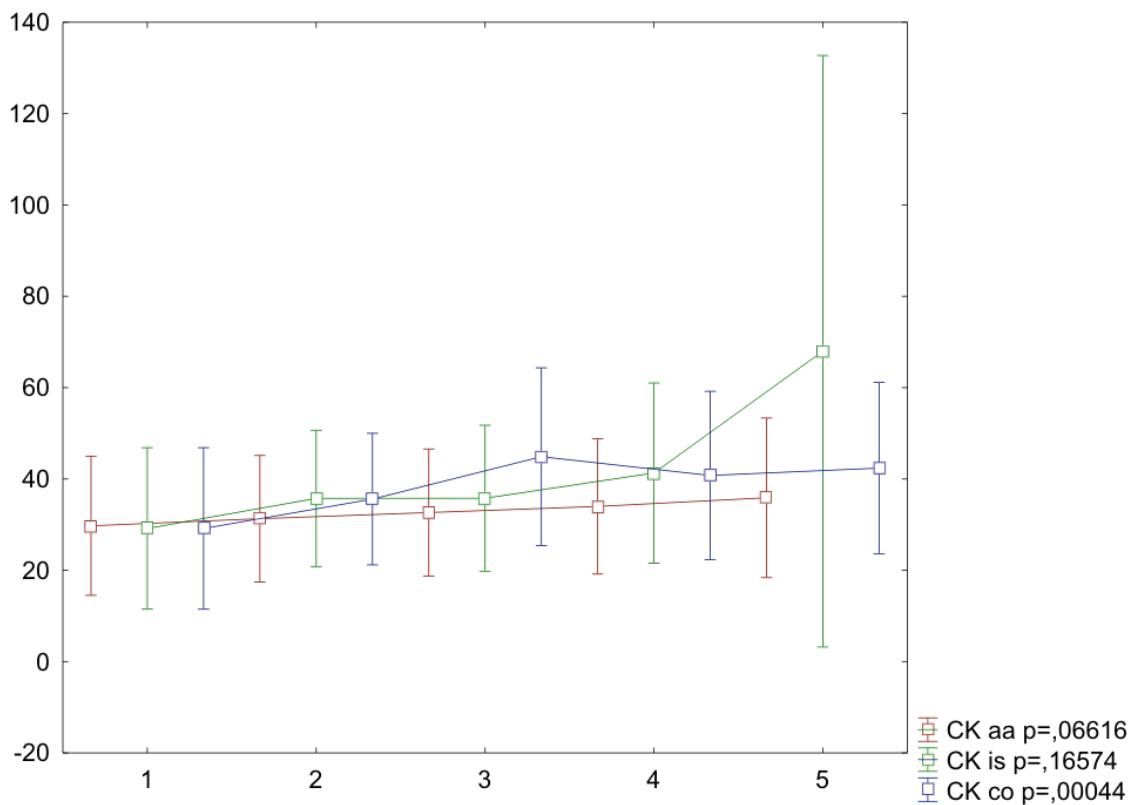


V případě **aspartátaminotransferázy (AST)** - graf 7, a **kreatinkinázy (CK)** - graf 8, narůstá jak systémová tak lokální hladina – v žádném časovém intervalu se však arteriální a venózní hladiny neliší, tj. zdrojem AST zřejmě nejsou preparované svaly.

Graf 7 - Aspartátaminotransferáza

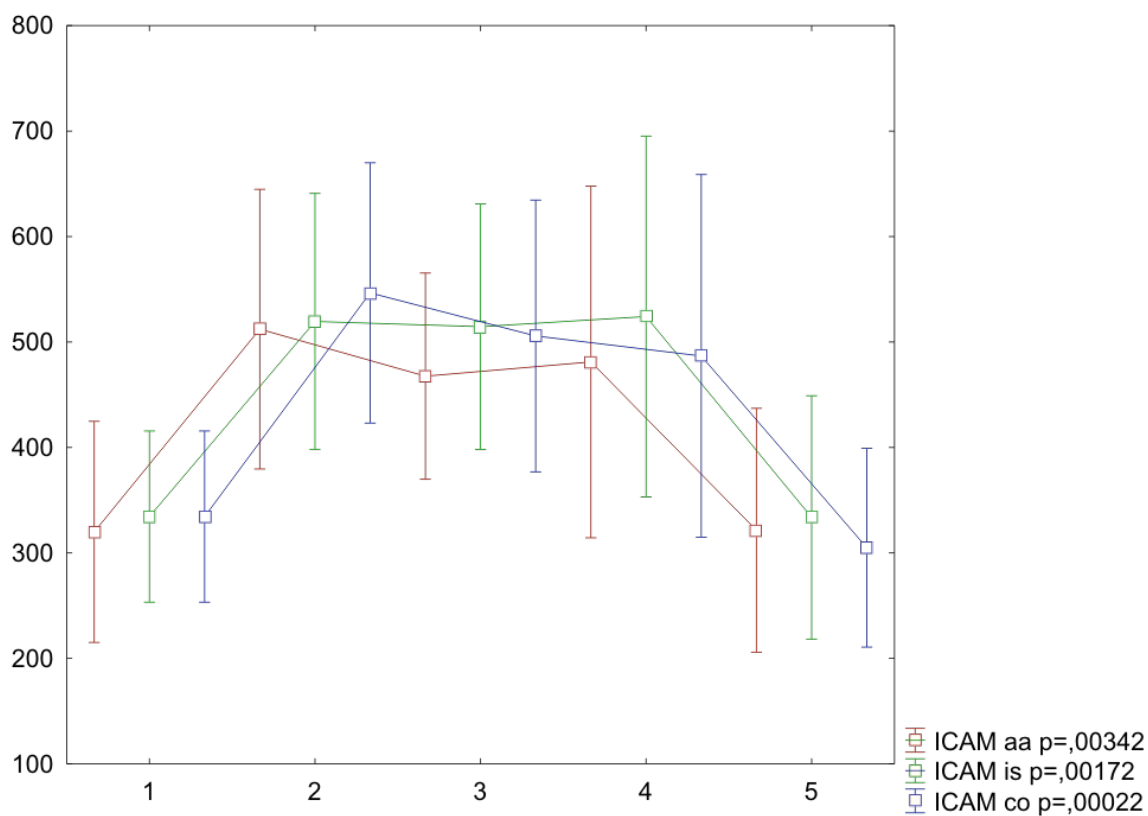


Graf 8 - Kreatinkináza

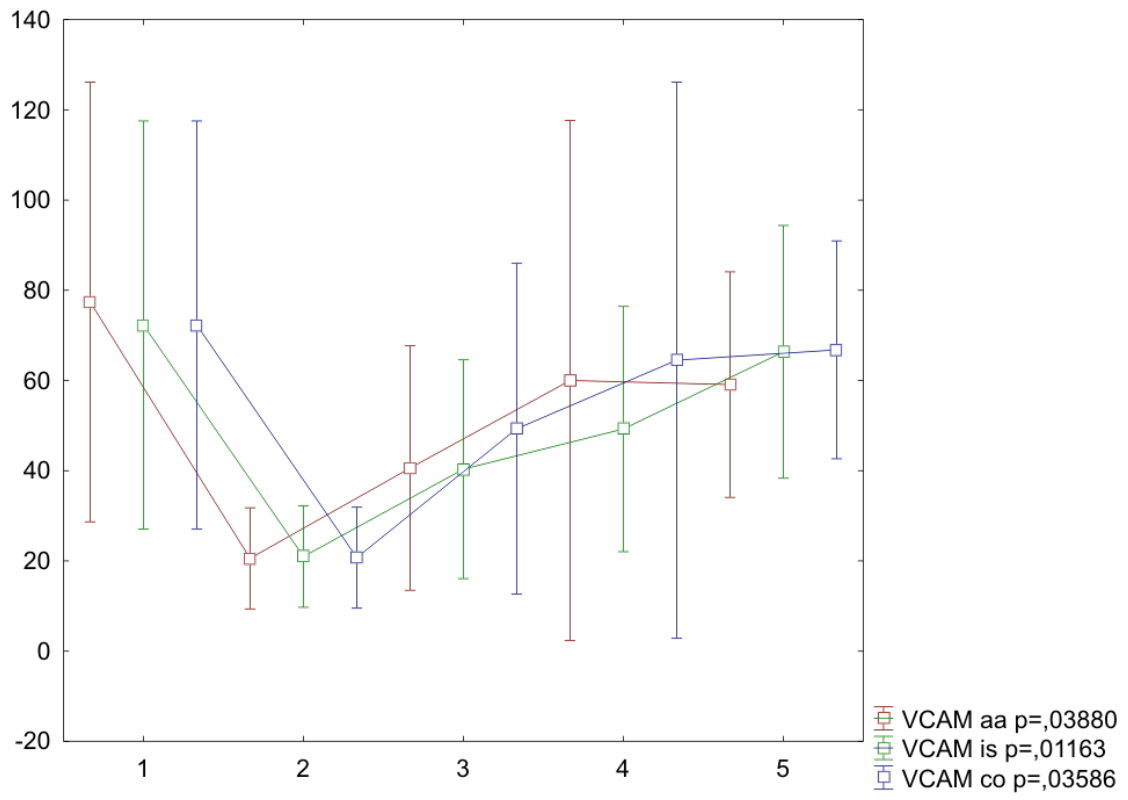


ICAM (graf 9) a **VCAM** (graf 10) stoupá, resp. klesá v identickém trendu ve všech vzorcích, nicméně systémová a lokální hladina se nemění, takže zdrojem ICAM a VCAM nejsou preparované svaly.

Graf 9 - ICAM

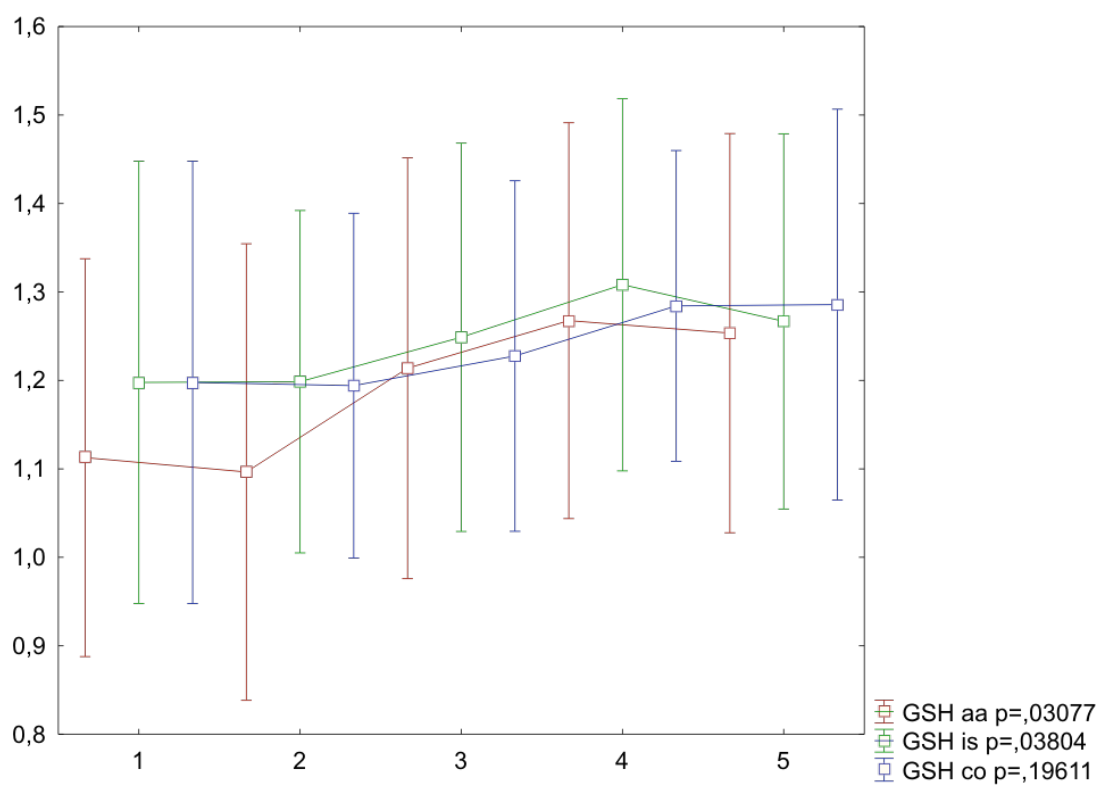


Graf 10 - VCAM

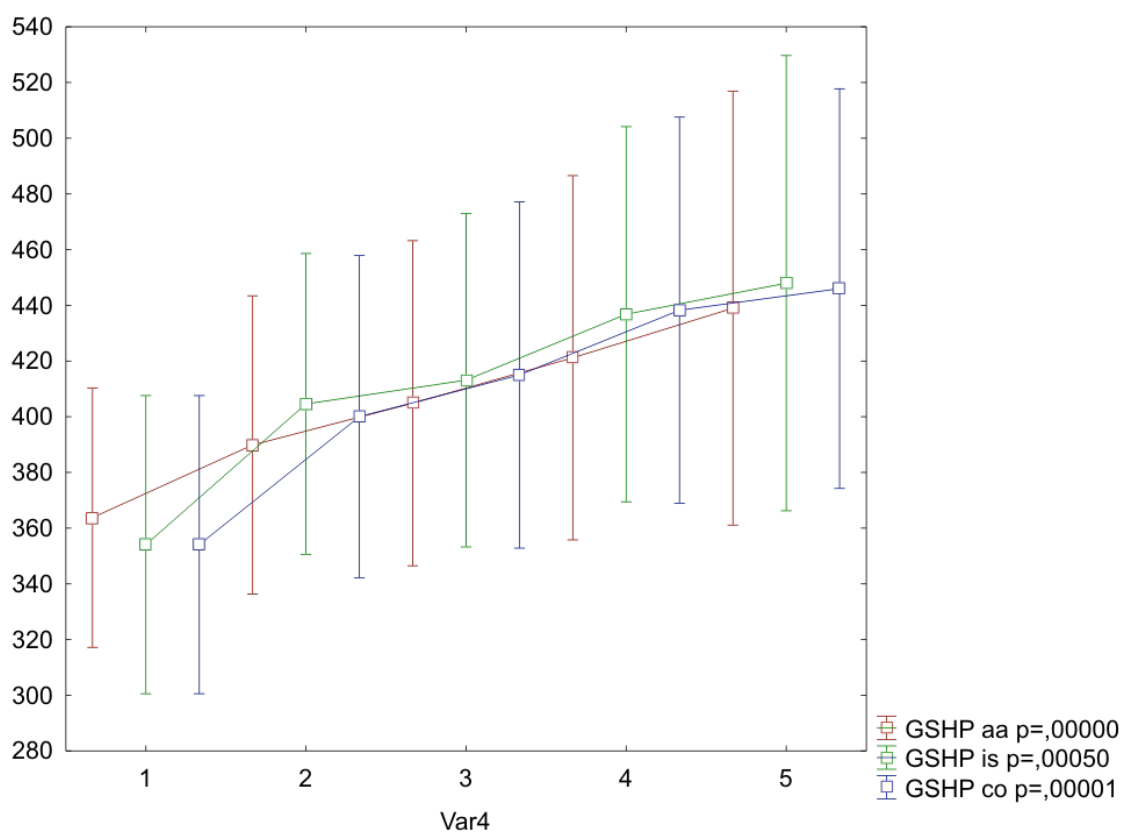


Gluthathion (graf 11) a **gluthathionperoxidáza** (graf 12) stoupají uniformě ve všech vzorcích, opět zdrojem nejsou preparované svaly.

Graf 11 - Gluthathion

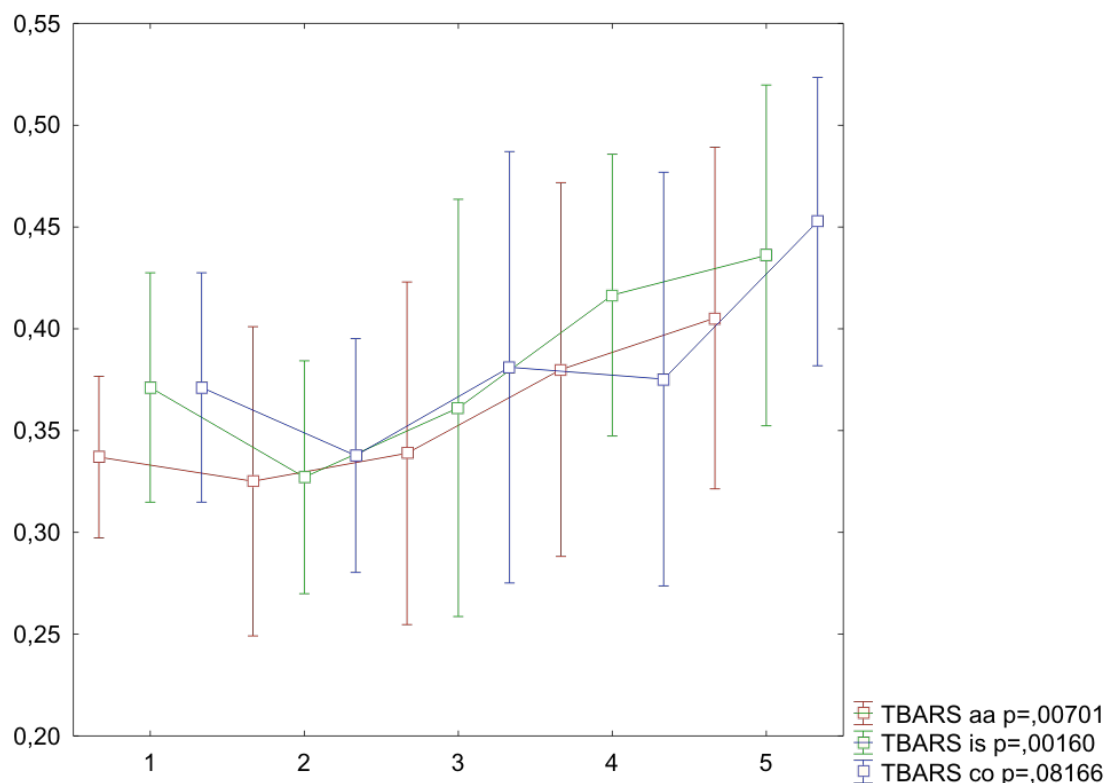


Graf 12 - Gluthathionperoxidáza



Identický průběh **TBARS** (graf 13) ve všech vzorcích.

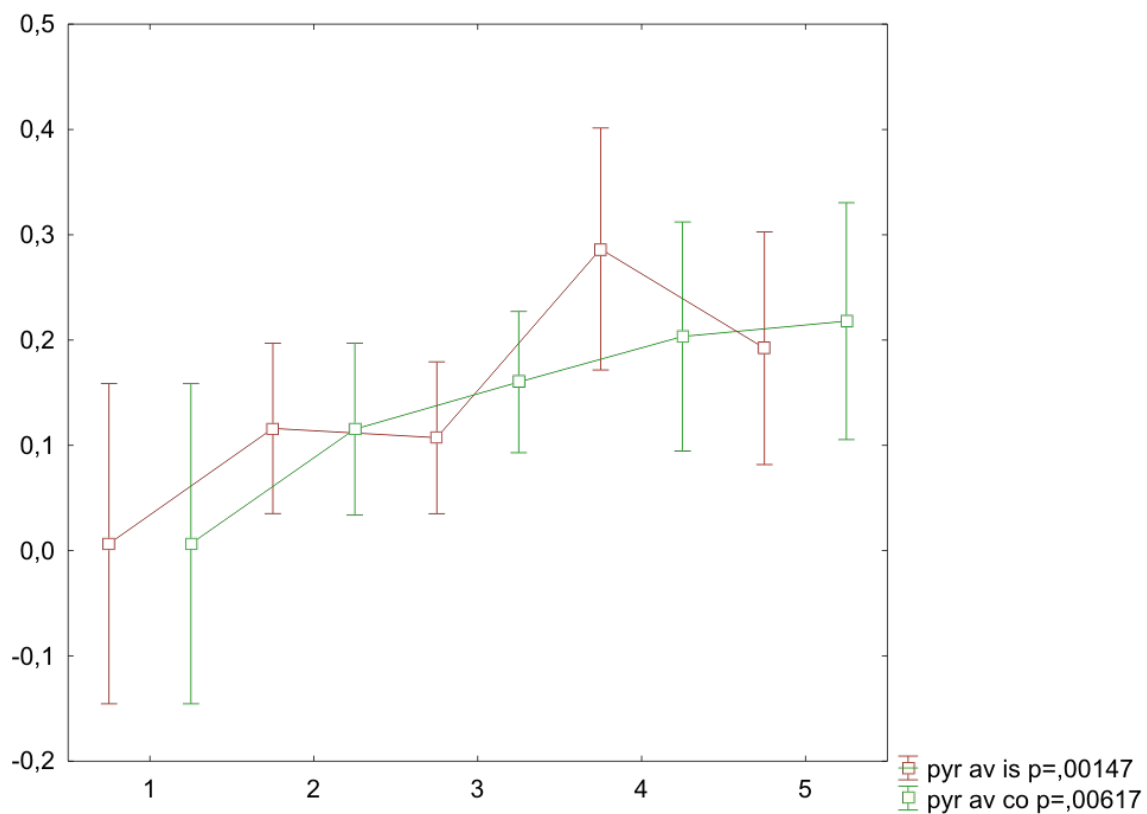
Graf 13 - TBARS



Následující grafy ukazují časový vývoj arterio-venózní diference měřených látek, tj. zda se během experimentu mění lokální produkce této látky. Statistické hladiny vedle grafu ukazují významnost časových změn v žilní krvi z ischemického, resp. kontrolního svalu. Ve čtyřech případech je ještě uvedena hladina přímo v grafu, která charakterizuje rozdíl v AV diferenci (tedy produkci látky v tom kterém svalu) mezi ischemickým a kontrolním svaem.

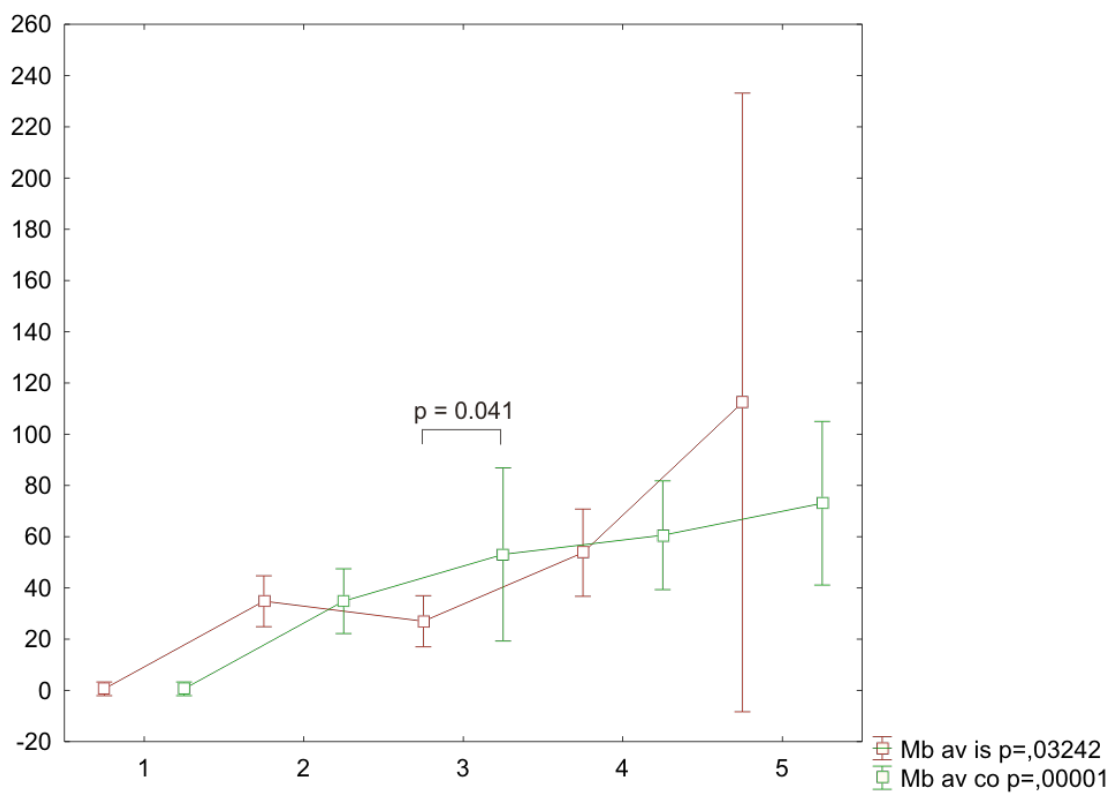
Produkce **pyruvátu** stoupá shodně v obou svalech (graf 15).

Graf 14 - Pyruvát (arterio-venózní diference)

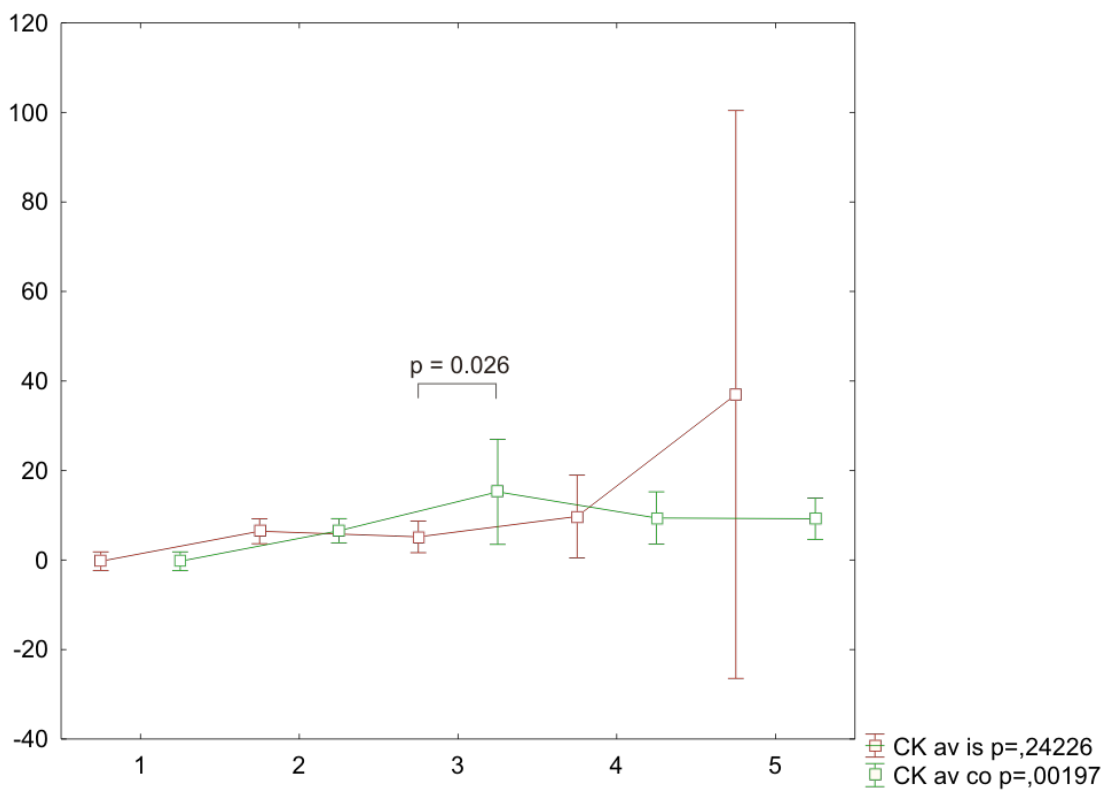


Podobně produkce **Mb** (graf 16), **CK** (graf 17) a **AST** (graf 18) narůstá, ale jednoznačný rozdíl mezi oběma svaly není patrný.

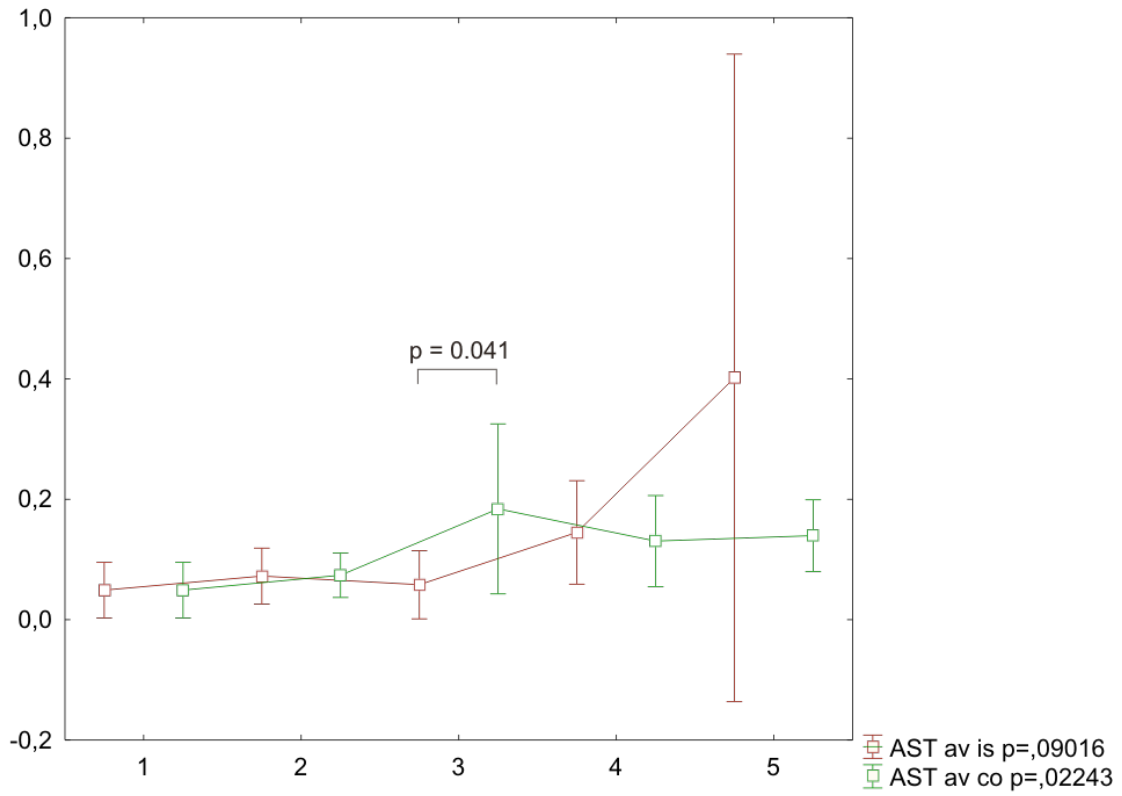
Graf 15 - Myoglobin (arterio-venózní diference)



Graf 16 - Kreatinkináza (arterio-venózní diference)



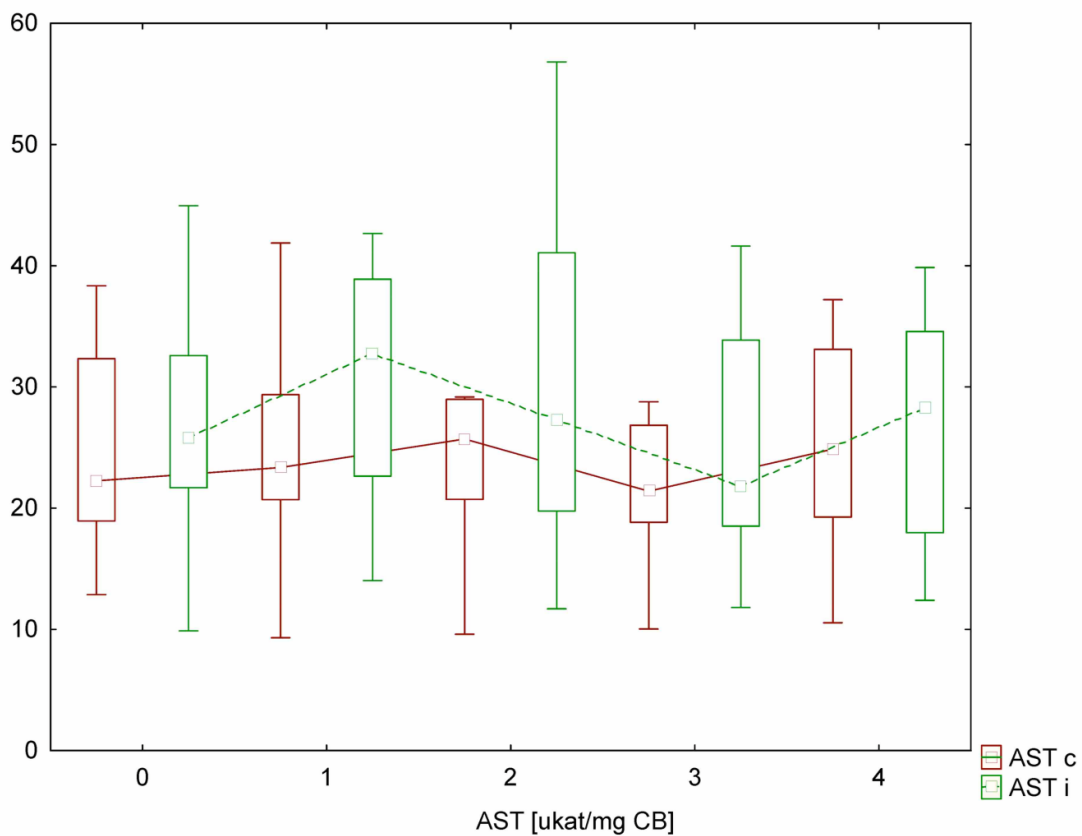
Graf 17 - AST (arterio-venózní diference)



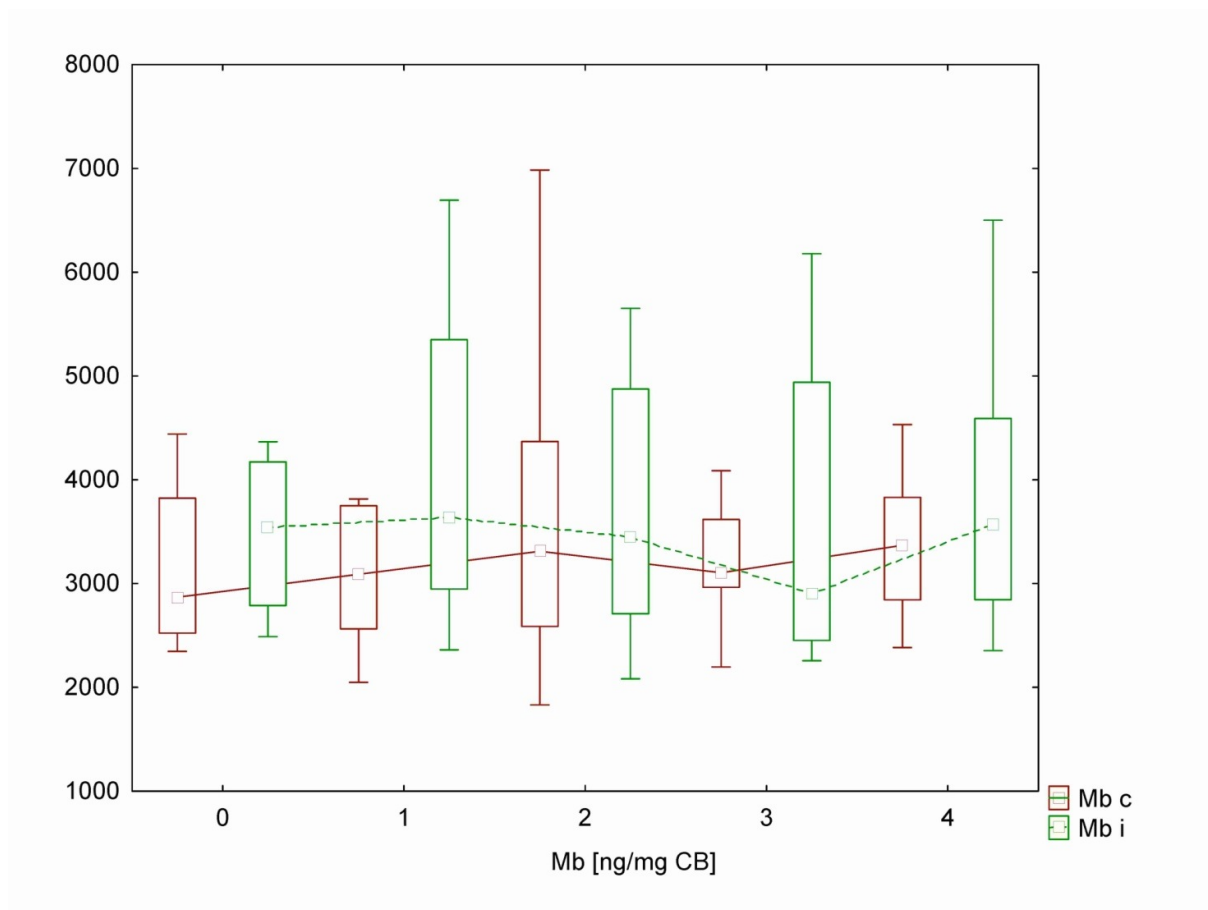
Výsledky z analýzy tkáňových vzorků ukazují grafy 19 až 24.

Hodnoty **AST** (graf 19), **myoglobinu** (graf 20) a **železa** (graf 21) nevykazují statisticky významný rozdíl v porovnávaných lalocích ani v čase, tzn. jednotlivých timepointech.

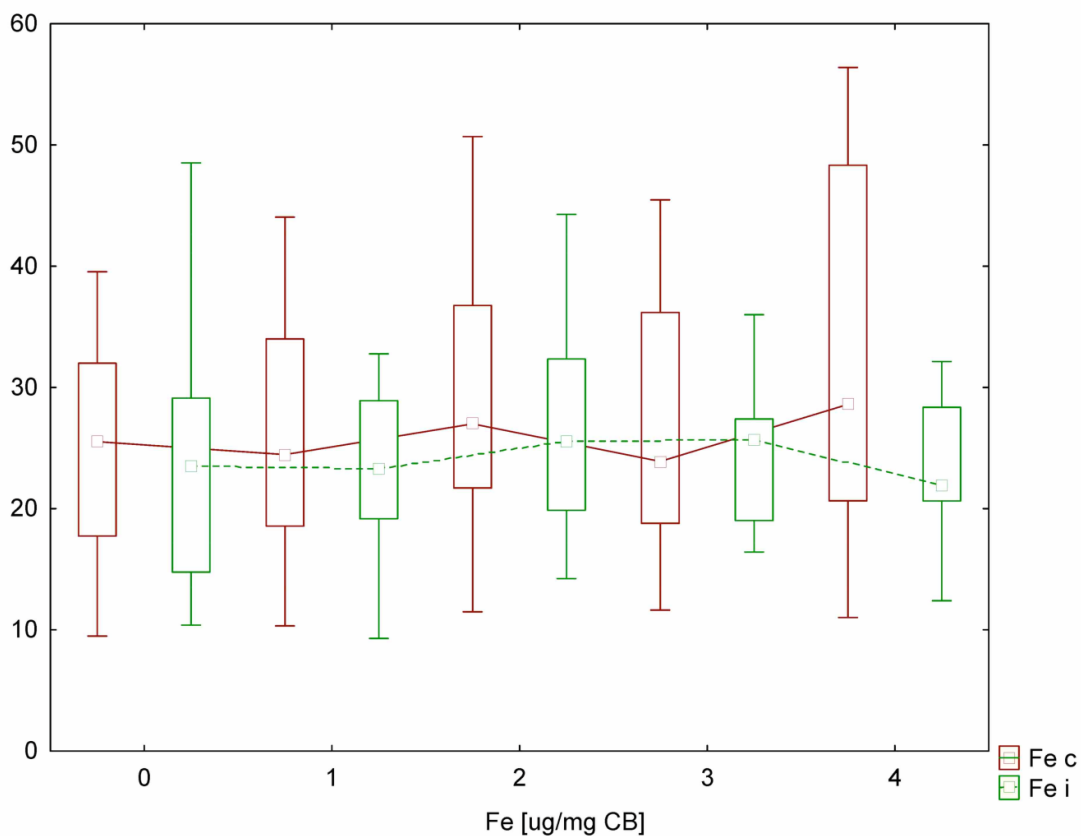
Graf 18 - AST



Graf 19 - Myoglobin

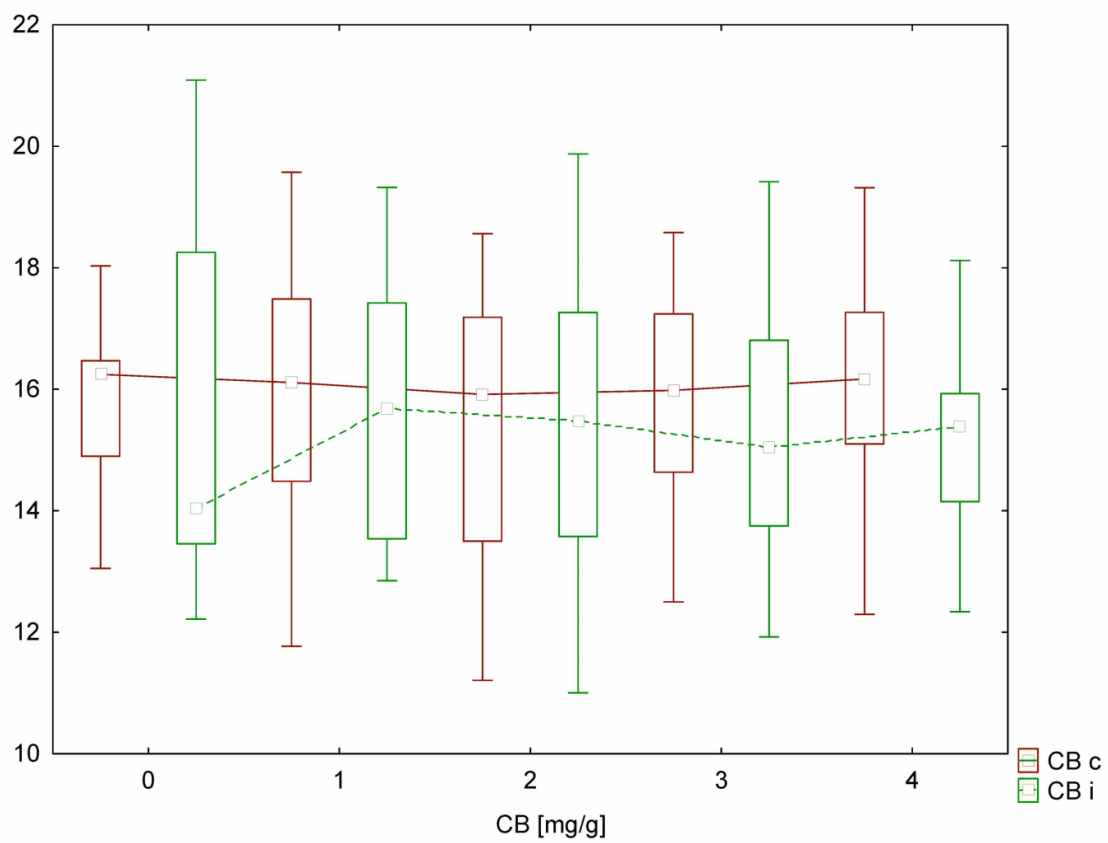


Graf 20 - Železo

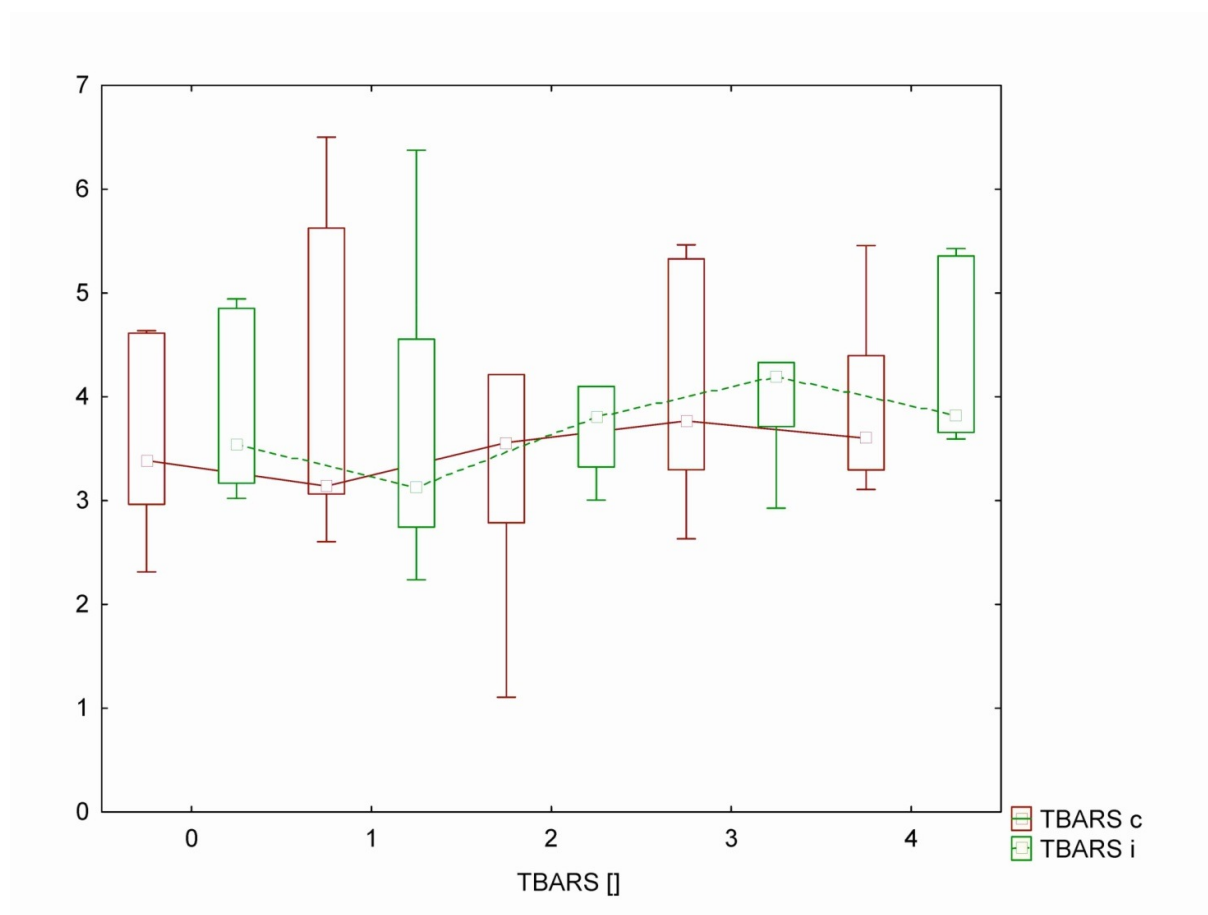


V grafu 22 je možné zaznamenat velmi lehký pokles koncentrace **celkové bílkoviny (CB)** v obou lalocích v čase, vztažené na výchozí hodnoty v TP 0.

Graf 21 - Celková bílkovina

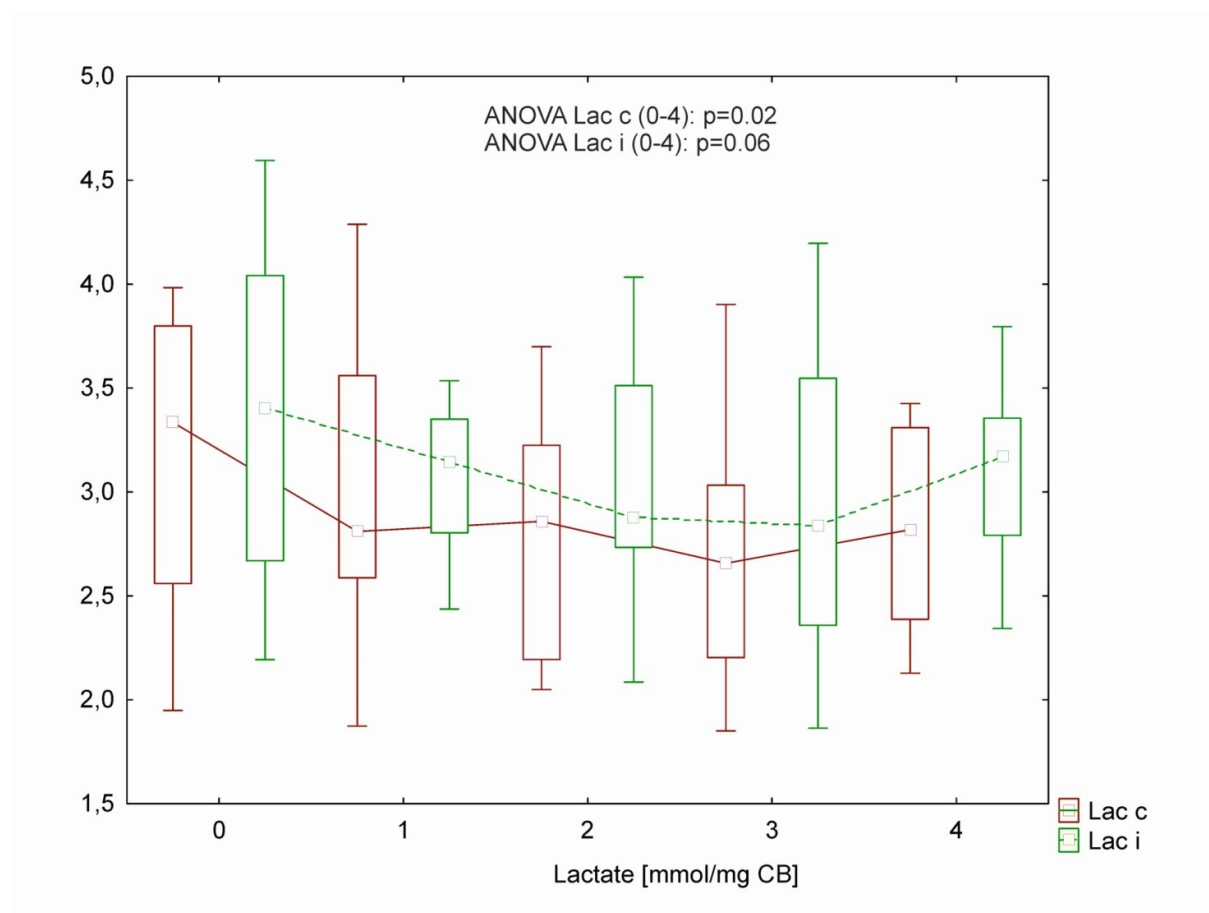


Graf 22 - TBARS



V hladině **laktátu** v ischemickém svalu je patrný pokles v TP 1 a 2.

Graf 23 - Laktát



Číselné hodnoty zkoumaných parametrů v jednotlivých timepointech jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1 - Časový průběh koncentrace měřených parametrů v arteriální krvi a žilní krvi resp. tkáňovém lyzátu z ischemického a kontrolního svalového laloku.

parametr	čas odběru - timepoint					p [#]
	1	2	3	4	5	
natrium (aa) [mmol/l]	141±0.74	141±0.95	141±0.93	140±0.80	141±0.83	0.47
natrium (v-i)	142±0.73	142±0.73	144±0.92	141±0.79	142±1.02	0.04
natrium (v-c)	142±0.73	142±0.75	143±0.99	141±0.78	142±0.84	0.08
kaliium (aa) [mmol/l]	4.08±0.127	4.35±0.159	4.67±0.201	4.79±0.198	4.86±0.202	<0.001
kaliium (v-i)	4.17±0.108	4.83±0.229	6.22±0.513	5.59±0.189	5.57±0.221	<0.001
kaliium (v-c)	4.17±0.108	4.92±0.214	5.34±0.251	5.47±0.276	5.53±0.244	<0.001
chloridy (aa) [mmol/l]	101±0.75	103±0.99	103±0.97	103±0.84	103±0.73	<0.001
chloridy (v-i)	101±0.62	103±0.77	102±1.07	102±0.98	102±0.94	0.35
chloridy (v-c)	101±0.62	102±1.00	102±0.86	102±0.99	103±1.00	0.07
celková bílkovina (aa) [g/l]	60±2.2	56±1.8	54±2.0	52±2.0	51±1.9	<0.001
celková bílkovina (v-i)	63±2.1	56±1.7	55±2.1	52±2.0	51±1.8	<0.001
celková bílkovina (v-c)	63±2.1	56±1.5	54±1.7	52±1.8	50±1.8	<0.001
laktát (aa) [mmol/l]	8.29±1.200	5.27±1.074	5.34±0.978	5.33±1.006	5.27±0.875	0.014
laktát (v-i)	9.35±1.341	7.14±1.156	8.35±1.164	8.18±1.314	7.25±1.089	0.39
laktát (v-c)	9.35±1.341	6.90±1.142	7.81±1.118	8.02±1.283	7.81±1.228	0.38
laktát (t-i) [mmol/g]	3.60±0.249	3.20±0.147	3.06±0.136	2.91±0.151	3.05±0.137	0.009
laktát (t-c)	3.35±0.227	3.04±0.177	2.80±0.118	2.72±0.133	2.85±0.125	0.005
pyruvát (aa) [mmol/l]	0.363±0.038	0.231±0.034	0.188±0.025	0.216±0.041	0.176±0.030	0.003
pyruvát (v-i)	0.383±0.074	0.371±0.050	0.312±0.039	0.536±0.080	0.397±0.058	0.002
pyruvát (v-c)	0.383±0.074	0.354±0.048	0.364±0.042	0.437±0.064	0.441±0.080	0.33

CK (aa) [μ kat/l]	30 \pm 6.9	31 \pm 6.2	33 \pm 6.2	34 \pm 6.7	36 \pm 7.8	0.06
CK (v-i)	29 \pm 7.9	36 \pm 6.8	36 \pm 7.3	41 \pm 9.0	68 \pm 29.4	0.17
CK (v-c)	29 \pm 7.9	36 \pm 6.5	45 \pm 8.8	41 \pm 8.4	42 \pm 8.5	<0.001
AST (aa) [μ kat/l]	0.61 \pm 0.04 6	0.65 \pm 0.06 4	0.74 \pm 0.08 1	0.84 \pm 0.14 6	1.07 \pm 0.28 5	0.04
AST (v-i)	0.66 \pm 0.05 1	0.69 \pm 0.06 2	0.76 \pm 0.09 8	0.93 \pm 0.14 9	1.38 \pm 0.38 2	0.006
AST (v-c)	0.66 \pm 0.05 1	0.69 \pm 0.06 7	0.88 \pm 0.11 1	0.92 \pm 0.15 0	1.14 \pm 0.27 6	0.02
AST (t-i) [μ kat/g]	26 \pm 2.3	28 \pm 2.5	28 \pm 3.0	25 \pm 2.0	26 \pm 2.1	0.54
AST (t-c)	24 \pm 2.1	25 \pm 3.0	25 \pm 2.3	23 \pm 2.3	27 \pm 2.9	0.72
myoglobin (aa) [μ g/l]	64 \pm 5.2	67 \pm 7.9	72 \pm 11.5	76 \pm 14.1	81 \pm 17.0	0.12
myoglobin (v-i)	66 \pm 4.7	106 \pm 9.6	101 \pm 13.1	137 \pm 19.1	195 \pm 53.8	0.005
myoglobin (v-c)	66 \pm 4.7	103 \pm 8.9	124 \pm 18.0	137 \pm 19.0	155 \pm 23.5	<0.001
myoglobin (t-i)	3635 \pm 333	3830 \pm 314	3976 \pm 414	3540 \pm 323	3762 \pm 285	0.79
myoglobin (t-c)	3294 \pm 326	3579 \pm 426	3434 \pm 293	3133 \pm 193	3571 \pm 268	0.46
ICAM (aa) [μ g/l]	320 \pm 48	512 \pm 60	468 \pm 44	481 \pm 75	321 \pm 52	0.003
ICAM (v-i)	334 \pm 36	520 \pm 55	514 \pm 53	524 \pm 78	334 \pm 52	0.002
ICAM (v-c)	334 \pm 36	547 \pm 56	506 \pm 59	487 \pm 78	305 \pm 43	<0.001
VCAM (aa) [μ g/l]	77 \pm 22	21 \pm 5	41 \pm 12	60 \pm 26	59 \pm 11	0.04
VCAM (v-i)	72 \pm 20	21 \pm 5	40 \pm 11	49 \pm 12	66 \pm 13	0.01
VCAM (v-c)	72 \pm 20	21 \pm 5	49 \pm 17	64 \pm 28	67 \pm 11	0.04
železo (t-i) [μ mol/l]	24 \pm 2.5	26 \pm 2.2	25 \pm 2.0	24 \pm 1.4	29 \pm 5.8	0.71
železo (t-c)	25 \pm 1.9	26 \pm 2.5	29 \pm 3.6	27 \pm 2.6	30 \pm 3.5	0.37
GSHP (aa) [U/g Hb]	364 \pm 21	390 \pm 24	405 \pm 26	421 \pm 29	439 \pm 35	<0.001
GSHP (v-i)	354 \pm 23	405 \pm 25	413 \pm 27	437 \pm 31	448 \pm 37	<0.001
GSHP (v-c)	354 \pm 23	400 \pm 26	415 \pm 28	438 \pm 32	446 \pm 33	<0.001
GSH (aa) [mmol/l]	1.11 \pm 0.10 1	1.10 \pm 0.11 6	1.21 \pm 0.10 7	1.27 \pm 0.10 0	1.25 \pm 0.10 1	0.03
GSH (v-i)	1.20 \pm 0.10 8	1.20 \pm 0.08 8	1.25 \pm 0.10 0	1.31 \pm 0.09 6	1.27 \pm 0.09 6	0.04
GSH (v-c)	1.20 \pm 0.10 8	1.19 \pm 0.08 9	1.23 \pm 0.09 0	1.28 \pm 0.08 0	1.29 \pm 0.10 0	0.2
TBARS (aa) [μ mol/l]	0.34 \pm 0.01 8	0.33 \pm 0.03 4	0.34 \pm 0.03 8	0.38 \pm 0.04 1	0.41 \pm 0.03 8	0.007
TBARS (v-i)	0.37 \pm 0.02 4	0.33 \pm 0.02 6	0.36 \pm 0.04 7	0.42 \pm 0.03 1	0.44 \pm 0.03 8	0.001
TBARS (v-c)	0.37 \pm 0.02 4	0.34 \pm 0.02 6	0.38 \pm 0.04 8	0.38 \pm 0.04 6	0.45 \pm 0.03 2	0.08

TBARS (t-i)	3.85±0.28 1	3.73±0.45 2	4.18±0.38 4	4.13±0.25 7	4.37±0.26 9	0.66
TBARS (t-c)	3.55±0.30 7	4.07±0.47 7	3.78±0.56 2	4.10±0.35 2	3.97±0.38 6	0.77

Legenda k tabulce

Koncentrace látek v tkáňovém lyzátu jsou přepočteny na g celkové bílkoviny přítomné ve vzorku (korekce na ev. otok tkáně). Data jsou prezentována jako aritmetický průměr ± střední chyba.

aa = arteriální krev, v-i = žilní krev z ischemického laloku, v-c = žilní krev z kontrolního laloku, t-i = koncentrace v tkáňovém lyzátu ischemického laloku, t-c = koncentrace v tkáňovém lyzátu kontrolního laloku

Statistická významnost změn koncentrace v průběhu času byla testována pomocí párové (repeated measures) ANOVA

2.11 Diskuze

Cílem projektu bylo vytvořit co nejrealnější a nejkompexnější experimentální model svalového volného laloku a v něm probíhající změny během I/R fáze z hlediska oxidačního stresu. Výsledky předchozích prací ukazují na potřebu takovýchto experimentálních modelů jako standardů k dalšímu hledání možností ovlivnění nepříznivých dějů probíhajících během I/R v různých odvětvích transplantační a rekonstrukční chirurgie [1, 2, 8, 20, 23, 32, 36, 41, 45, 80, 81].

V našem experimentu jsme vytvořili klinicky relevantní model peroperační ischemie volného svalového laloku u prasete. Během něj jsme měřili:

- 1) časový vývoj systémových hladin vybraných parametrů
- 2) časový vývoj lokální arteriovenózní difference vybraných parametrů
- 3) tkáňové koncentrace vybraných parametrů v homogenátech bioptických vzorků.

Přestože bylo možné dokumentovat řadu dynamických změn na systémové úrovni (nárůst hladiny kália a pyruvátu, pokles hladiny laktátu a celkové bílkoviny), odrážel lokální vývoj především tyto systémové procesy změny, zatímco specifické změny odpovídající ischemicko-reperfúznímu poškození v operovaných svalech byly pouze diskrétní (vzestup hladiny kália, laktátu, pyruvátu a myoglobinu).

V experimentálních pracích zabývajících ischemicko-reperfúzním poškozením, se většinou uvádějí modely volných svalových laloků převážně na myších [2, 17, 22, 29, 34, 35, 59, 73, 78, 92]. Ojedinele se provádějí experimenty na větších zvířatech [8, 20, 39, 75, 79]. Tyto modely většinou nezohledňují komplexnost dějů probíhajících během anestezie a operace tak, jak je známe z humánní

medicíny. Potkan je na rozdíl od člověka, resp. prasete anestetizován intraperitoneálně pentobarbitalem, není intubován, uměle plicně ventilován. Dále nelze prakticky izolovat pouze svalový lalok a z jeho žíly pak odebírat krev k dalšímu hodnocení. Na těchto modelech malých zvířat je pak problematická i následná extrapolace výsledků do humánní medicíny, metodika nekoreluje s reálnými podmínkami běžné praxe [38]. Hlavní předností naší práce je charakter experimentálního modelu, zejména použití velkého zvířete (prase domácí). Výhodou tohoto modelu je příbuznost člověku na anatomické i fyziologické úrovni a možnost bez větších modifikací aplikovat postupy (chirurgické, anesteziologické) rutinně používané v praxi. Díky tomu náš přístup velice věrně simuluje reálnou klinickou situaci a zajišťuje přesnou přenositelnost výsledků. Další předností je relativně velký počet zařazených subjektů navíc způsobem, v němž každé zvíře poskytuje zároveň i kontrolu, takže je potlačena interindividuální variabilita.

Jsme si vědomi, že jsme nebyli schopni stanovit všechny laboratorní ukazatele I/R [10, 18, 33, 41]. Naší snahou byla komplexnost, tedy stanovení ukazatele I/R na co možná nejvíce úrovních. Abychom co nejvíce objektivizovali i ischemické poškození svalu samotného, odebírali jsme též vzorky svalové tkáně a vytvářeli z nich homogenáty. V nich jsme pak následně stanovovali stejné laboratorní hodnoty jako v krevních vzorcích. Odebírali jsme vždy 3 vzorky svalu z různé části svalu v čase stanoveném k odběru biopsie. Srovnáním variability výsledků jsme provedli analýzu, zda stanovení uvedených ukazatelů je vypovídající o svalovém poškození během I/R. Z analýzy všech sebraných dat během experimentu jsme zhodnotili chování modelu volného svalového laloku MLD.

Jako hlavní nedostatek naší práce se ukazuje relativně krátká doba arteficiální ischemie a také krátké sledování reperfučních dějů. Lze namítat, že pokud bychom prodloužili ischemii nebo dobu sledování po obnovení krevního průtoku, zaznamenali bychom výraznější lokální změny odpovídající I/R poškození. Nicméně námi zvolené podmínky velmi přesně kopírují skutečnou

klinickou situaci, tj. běžně dosahované operační časy. Významně delší sledování by navíc bylo technicky obtížné.

Při sledování časového vývoje vybraných parametrů bylo možno vysledovat několik možných trendů:

1. sledovaný parametr podléhal systémovým změnám, přitom změny na úrovni operovaných volných svalových laloků tyto změny pouze kopírovaly, např. docházelo k setrvalému poklesu celkové bílkoviny v arteriální krvi, arteriovenózní diference však byla minimální. Tento konkrétní nálezn odpovídá hemodiluci v důsledku objemově hrazené (náhradním roztokem) krevní ztráty. V kontextu tohoto zjištění jsme všechny ostatní parametry korigovali na stupeň hemodiluce. Podobné chování jsme zachytili v případě některých markerů oxidačního stresu, ICAM, VCAM, jejichž arteriální koncentrace setrvale narůstala, opět při minimální arteriovenózní diferenci. Tento nálezn interpretujeme jako důsledek celkového oxidačního stresu v průběhu anestezie, zatímco příspěvek případného lokálního stresu v operovaných svalech byl v porovnání s celkovými změnami zanedbatelný;
2. sledovaný parametr podléhal systémovým změnám, přitom změny při průchodu krve operovanými volnými svalovými laloky byly významné. Tento trend byl patrný např. v případě sérového draslíku, jehož systémová koncentrace v průběhu experimentu narůstala (a to dokonce do hodnot výrazně patologických), a to (vzhledem k významné arteriovenózní diferenci) se zřetelným příspěvkem operovaných svalových laloků. Tento nálezn lze s vysokou pravděpodobností přisoudit uvolňování intracelulárních zásob kálie při rozpadu svalových buněk – ať už přímo v důsledku chirurgického traumatu, nebo ischemie;

3. pokles systémového laktátu, při stagnaci hladin v obou zkoumaných svalech (oba laloky produkují relativně stejné množství laktátu), zřejmě odpovídá určité míře ischemie obou svalových laloků a je nejspíše zapříčiněný preparací - odpojením svalu od vyživujících paravertebrálních a interkostálních perforátorů. MLD je totiž typickým zástupcem tzv. V. kategorie cévní výživy svalového laloku dle Mathese-Nahaie [50], která je charakterizována jednou dominantní cévní stopkou (vasa thoracodorsalis) a několika segmentálními větvemi zastoupených v tomto případě paravertebrálními a interkostálními perforátory. Po jejich odpojení, pro potřeby přenosu svalu jako volného laloku, je tkáň vyživována pouze torakodorzálními arteriemi. Dochází k určité redistribuci krevní výživy svalu, která se zpočátku projevuje přetrvávajícími relativními ischemiemi. To má za následek zvýšenou koncentraci laktátu, který vzniká při anaerobní svalové práci. Laktát je v organismu odbouráván oxidací za vzniku pyruvátu, který lze pak v citrátovém cyklu přímo využít jako zdroj energie.

Protože jsme zjistili zvýšenou hladinu pyruvátu v obou preparovaných svalech a ještě výrazněji v ischemickém svalu, vytvořili jsme **hypotézu**, že je tento stav způsoben dostatečným přísunem kyslíku (hyperémie v reperfuční fázi po uvolnění svorky, kdy je plně obnoven přísun okysličené krve do svalu). Z těchto výsledků lze usuzovat, že jsme ve zkoumaném orgánu navodili stav, který se podobá praktické operativě volných svalových laloků a který by mohl být detekovatelný standardními laboratorními metodami. Věříme, že se nám tedy, dle zadání a s použitou metodikou, podařilo vytvořit funkční experimentální model ischemicko-reperfuční fáze operace.

4. sledovaný parametr se během experimentu významně neměnil. Tak tomu bylo např. u sérového nátria a logickým závěrem je, že tento parametr není podmínkami experimentu významně ovlivňován. V případě TBARS,

gluthathionu, glutathionperoxidázy, I-CAM, V-CAM, isoprostanů však připadá v úvahu i jiné vysvětlení – zatímco v prvních timepointech celkem přesvědčivě k žádné změně nedochází, je v posledním timepointu patrný výrazný nárůst variability. V souboru se tedy ke konci objevují jedinci s výrazně odlišným chováním. Možným vysvětlením je např. vznik trombózy mikrocirkulace většího rozsahu nebo jiný proces vedoucí k výraznějšímu I/R poškození. To však zůstává pouze spekulativní, blíže se nelze z dostupných dat k příčině vyjádřit.

Výsledky ze svalové tkáně ukazují mírný pokles hladiny celkové bílkoviny (graf 22), který by mohl znamenat otok svalových laloků. Pokles koncentrace laktátu v 1. resp. 30. minutě reperfuze (timepoint 2 a timepoint 3) oproti původní hladině před ischemií (timepoint 1), bychom mohli hodnotit tak, že během reperfuze dochází k vymývání laktátu z tkáně. V souladu s výsledky získaných z krevních vzorků. V obou případech však změny nejsou statisticky významné.

Hodnoty hladin myoglobinu (graf 20) a železa (graf 21) ve tkáni se nemění v jednotlivých lalocích v čase, ani v porovnání mezi ischemickými a kontrolními laloky.

2.12 Shrnutí výsledků

Prezentované výsledky v souhrnu znamenají, že oxidační stres není pro svalový volný lalok významný ani po 60-ti minutové ischemii. Změny v markerech oxidačního stresu spíše odrážejí celkové změny organismu v souvislosti s celkovou anestézií. Zdá se, že i izolovaná a relativně malá svalová tkáň je k dlouhé ischemii velmi rezistentní. S největší pravděpodobností se na této skutečnosti podílí i zvýšený podíl kyslíku ve vdechované směsi při umělé plicní ventilaci ($FiO_2 = 50 \%$). Ta sice zvyšuje celkovou zátěž organismu oxidačním stresem (graf 9 až 13), ale zároveň vytváří vhodné podmínky pro plánovanou ischemii přenášeného laloku. O výsledcích operace tak zřejmě rozhoduje spíše eventuální žilní nebo tepenná trombóza než vlastní přechodná ischemie. Vytvořily jsme experimentální, klinicky relevantní model přenosu volného svalového laloku musculus latissimus dorsi na zvířecím modelu. Simulovali jsme ischemii a následnou reperfúzi tak, jak k tomu dochází v reálných podmínkách rekonstrukční chirurgie při mikrochirurgickém přenosu volného svalového laloku musculus latissimus dorsi. Tím jsme plně splnili zadání experimentu. Na tomto modelu jsme oproti předpokladu zjistili, že pro samotnou tkáň volného svalového laloku je, z hlediska oxidačního stresu, nejkritičtější fáze preparace (odpojení části výživy) a nikoliv fáze úplné ischemie. Domníváme se, že tato vysoká rezistence svalové tkáně na oxidační stres a ischemii je dána i vedením celkové anestezie.

2.13 Přínos pro klinickou praxi

Standardní přenos volného svalového laloku nepředstavuje pro tuto izolovanou tkáň, z hlediska oxidačního stresu, výrazný inzult. Oproti původnímu předpokladu není tedy nutné zavádět do protokolů operativity těchto typů laloků podávání antioxidantních látek [2, 3, 32, 34, 55, 76] ke snížení rizika morbiditativy či letality (M/L) laloku. Tato případná M/L laloku je nejspíše dána jinými procesy, které nebyly v experimentu zkoumány: prolongovaná ischemie cévní stopky laloku při trombóze v místě anastomózy, idiopatické mikrotrombotizaci na úrovni mikrocirkulace apod. [52]. Tím, že efekt hodinové ischemie, resp. oxidačního stresu na lokální úrovni byl malý a zjistili jsme naopak významné změny celkové, měla by být snaha (v klinické praxi) spíše o ovlivnění celkových parametrů. Z našeho pohledu má pro zmenšení rizika M/L volných laloků vedení celkové anestezie [19, 53, 54, 65, 68].

Z výsledků naší experimentální práce vyplývá i další možné zkoumání vlivů, které by v chirurgii volných laloků pozitivně ovlivnily M/L přenášené tkáň. Především by bylo vhodné zhodnocení vlivu: dostatečné oxygenace v preparační fázi operace - FiO_2 70-100 %; dostatečného, ale zároveň přiměřeného množství (z hlediska hemoreologických vlastností krve) hemoglobinu jakožto kyslíkového přenašeče; arteficiálního ovlivnění krevní srážlivosti jakožto prevence trombotizace nejen na úrovni mikrosutury, ale i na úrovni mikrocirkulace [1, 22, 30, 37].

Na základě výsledků našeho experimentu, postupných empirických zkušeností a sběrem literárních dat, jsme zavedli standardizované preoperační, perioperační a postoperační postupy péče o nemocné podstupující operaci s využitím volného laloku na našem oddělení. Poznatky, které jsme získali experimentem na izolovaném svalovém laloku jsme aplikovali i na ostatní druhy volných laloků

(fasciokutánní), které užíváme na našem pracovišti - DIEP (deep inferior epigastric artery perforator) a MSAP (medial sural artery perforator).

Příjem nemocného, indikovaného k elektivní operaci pomocí volného laloku na oddělení je s dostatečným časovým předstihem - 48 až 72 hod. před operací. V tomto období, v součinnosti s anesteziologem, kontrolujeme všechna požadovaná předoperační vyšetření, ev. opakujeme či doplňujeme ta, kde se vyskytují nejasnosti či nesrovnalosti. Již v tomto období zakazujeme kuřákům kouřit. Vzhledem k tomu, že v současnosti považujeme za nejdůležitější činitel úspěšnosti operace krevní perfuzi lalokem, kontrolujeme krevní tlak, ev. jej upravujeme ve spolupráci s internistou. Při plánovaných operacích s předpokládanou větší krevní ztrátou, objednáme na spádové transfuzní stanici odběr autotransfuzí. V případě nemožnosti odběru vlastní krve, rezervujeme patřičnou suspenzi erytrocytů. V 18:00 hod., den před výkonem, též podáme s.c. preventivní dávku nízkomolekulárního heparinu (nejčastěji 0,4 ml Fraxiparinu). Premedikace (v den operace) je standardní na základě doporučení anesteziologa (nejčastěji Morfium 5-10 mg i.m., ev. Dipidolor 10-15 mg i.m.). Operace je zahájena úvodem do anestezie. Během operace anesteziolog, z hlediska dostatečného prokrvení přenášeného laloku, monitoruje krevní ztrátu, hodinovou diurézu, saturaci krve kyslíkem, střední arteriální tlak (MAP). Dle těchto parametrů pak řídí další postup. Na základě publikovaných studií, podáváme nyní antikoagulancia „pouze“ v preventivních dávkách. Kvalitně provedenou mikroanastomózu považujeme za záruku prevence trombózy a v případě špatně provedené mikroanastomózy antikoagulační léčba trombóze v místě mikroanastomózy nezabrání.

Důležitým faktorem je též časový interval od zjištění příznaků poruchy prokrvení laloku do operační revize. Samozřejmě platí, že čím dřívější operační revize, tím dřívější nalezení příčiny poruchy prokrvení a tím větší šance na přežití laloku při odstranění příčiny patologického stavu. Při delších časových

prodlevách mohou nastat nevratné stavy, které i přes odstranění příčiny trombózy nevedou k obnově krevní cirkulace lalokem a zapříčiní tak nekrózu laloku - no-reflow fenomén.

Po operaci dbáme hlavně na dostatečný perfuzní tlak lalokem. Monitorujeme krevní tlak kontinuálně, hodinovou diurézu, saturaci krve kyslíkem. Všechny tyto parametry v současnosti považujeme, vedle technicky správně provedené mikroanastomózy, za nejdůležitější jakožto prevenci proti trombóze a spazmům v místě a okolí mikroanastomózy. Jsme přesvědčeni, že kontinuální podávání heparinu v pooperačním období nemá smysl. Při technicky špatně provedené mikroanastomóze heparin trombóze v tomto místě stejně nezabrání.

Zároveň se v současnosti nejnověji objevují důkazy o ne zcela bezproblémovém celkovém podávání heparinu (myšleno i.v. kontinuálně či s.c. frakcionovaně) ve vyšších dávkách než 5000 IU za den. Jedná se o tzv. **HIT (heparin-induced thrombocytopenia)** nebo též **HITT (heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis)**. Což je reakce organismu na heparin. Imunitní systém vytváří protilátky typu IgG namířené proti heparinu navázaného na bílkovinu platelet factor 4 (PF4). To má za následek aktivaci erytrocytů, které se začnou seskupovat v mikročástice. Tento stav vede ke snížení počtu kolujících jednotlivých trombocytů (trombocytopenii) a též k periferním trombózám se všemi důsledky [42], které mohou být nepoznanou či nediagnostikovanou příčinou selhání laloku.

V současné době tedy heparin po operaci celkově kontinuálně nepodáváme. Nahrazujeme jej frakcionovaným podáváním preventivních dávek LMWH u kterých byl HIT (HITT) prokázán v daleko menší míře než u heparinu samotného [49]. Heparin podáváme pouze jednorázově v případě nutnosti dle konkrétní situace vzniklé při operaci, ev. po ní [37].

3. Ošetrovatelský a léčebný protokol - mikrochirurgický výkon

3.1 Před operačním výkonem:

1. Příjem na oddělení (obvykle 2-3 dny před výkonem)
2. Zákaz kouření
3. Vyšetření chirurgem
4. Vyšetření anesteziologem
5. Ev. doplnění požadovaných vyšetření
6. Farmakoterapie - preventivní dávka LWMH v 18:00 hod. den před výkonem
 - ev. úprava krevního tlaku
 - ev. úprava glykémie
7. Zavedení centrálního žilního katetru (CŽK) – u výkonů s předpokládanou významnou krevní ztrátou – DIEP)
8. Objednání krve (rezerva)
9. Příprava operačního pole (mechanické očištění, oholení)

3.2 V den operačního výkonu:

1. Celková koupel
3. Premedikace
3. Antibiotická profylaxe společně s premedikací (obvykle 2 g cefazolinu i.v. ve 20 minutové infuzi)
4. Zavedení permanentního močového katetru (PMK) – k měření hodinové diurézy

3.3 Perioperační péče:

ANESTEZIE: celková anestezie s orotracheální intubací a řízenou ventilací.

Anestetika: úvod: propofol 1%, svalová relaxace atrakurium nebo rocuronium dle přidružených chorob pacienta, poté intubace. Analgezie - sufentanyl. Inhalační anestetikum - sevofluran - MAC 0,8. O₂ + Air, FiO₂ 0,4-0,5. Relaxace během výkonu dle potřeb operátora. Antiemetikum ondansetron 4 mg před úvodem a 4 mg i.v. na konci operace. Asi 30 min. před koncem operace ketoprofen 100 mg i.v. Krevní tlak udržován takový, jaký má pacient v klidu před operací - **normotenze**. Případně krevní tlak korigujeme aplikací objemu krystaloidů nebo aplikací noradrenalinu kontinuálně v nízké dávce. MAP dle situace 70-85 mm Hg. Diuréza kolem 1 ml na 1 kg. Během výkonu kontrola KO, hemokoagulace, arteriální Astrup. Udržování teploty - aplikace ohřátých roztoků a ohřívání pacienta ohřívací , elektrickou podložkou. Kontrola tělesné teploty měřením rozdílu hodnot tělesné teploty z povrchu těla (v blízkosti operačního pole) a sondou zavedenou do jícnu. Rozdíl nesmí přesáhnout 1 stupeň Celsia.

3.4 Pooperační péče:

1. Monitorace fyziologických funkcí á 1hod. (TK, TT, P, df, SpO₂) – kontinuálně
2. Nebulizace (polomaska/kyslíkové brýle)
3. Kompresivní bandáže – trvale
4. Bilance tekutin á 1hod. – PMK (Tensamin 1amp./20 ml F1/1, Furosemid 20 mg/20 ml F1/1)
5. Monitorace prokrvení laloku á 15 min./4 hod., dále každých 30 min. po dobu min. 4 dní (barva, teplota, Dopplerometrická kontrola flow cév laloku – zápis á 1 hod.)
6. Aplikace LMWH frakcionovaně (2x denně) na základě hodnot anti-Xa

7. Podávání preparátů kyseliny acetylsalicylové p.o. - antiagregace trombocytů
8. Záznam bolesti á 1hod. – analgosedace (morfin kontinuálně)
9. Fyzioterapie: operační den – klid na lůžku
 1. oper. den – dechová rehabilitace
 2. oper. den – první postavení u lůžka, postupná mobilizace
 3. oper. den – rehabilitace, mobilizace
 4. oper. den – celková koupelDále dle stavu nem.
9. Péče o CŽK
10. Převaz operačních ran
11. Poloha nemocného v polosedě s podloženými koleny a DK
12. Infúzní terapie
13. Kontrola odvodu drénů
14. Kontrolní laboratorní vyšetření
15. Psychoterapie, edukace
16. Realimentace

4. Užití volných laloků na našem pracovišti

V rámci chirurgické léčby s využitím volných laloků jsme od listopadu 2010, kdy jsme tuto metodu na našem pracovišti zvládli a zavedli do praxe, do konce prosince 2015 operovali celkem 26 pacientů. U nich jsme užili 26 volných laloků. Laloky jsme užívali k rekonstrukci prsu po mastektomii pro karcinom, k uzávěru chronického defektu – léčbě osteomyelitidy kosti dolní končetiny, ke korekci jizevnaté kontraktury, ke krytí protruze titanové dlahy ve spolupráci se stomatochirurgy.

4.1 Volný m. latissimus dorsi / m. serratus anterior

Volný svalový lalok musculus latissimus dorsi (eventuálně musculus serratus anterior). Jedná se o jeden z nejčastěji užívaných laloků v plastické rekonstrukční chirurgii. Lalok musculus latissimus dorsi může být užit samostatně jako čistě svalový lalok, či se svalem můžeme přenášet i kožní ostrov (obr. 28). Lalok musculus serratus anterior má shodnou stopku jako musculus latissimus dorsi a užíváme jej pouze jako svalový lalok. Svalové laloky jsme užili do této doby ve dvou případech. Ke krytí defektů na končetinách s chronickou osteomyelitidou tibie (obr. 27). Dobře prokrvená tkáň svalového laloku slouží nejen ke krytí defektu (obr. 30), ale též jako zdroj velmi dobře prokrvené tkáně, která je schopna do poškozeného (ischemického) místa zajistit dostatečný přísun antibiotik. Stopka laloku je tvořená **arteria thoracodorsalis** odstupující z arteria axillaris (obr. 28). Příjmové cévy v našem případě tvořila arteria et vena tibialis anterior. V případě, že odebíráme lalok tvořený pouze svalem, kryjeme jej meshovaným dermo-epidermálním kožním štěpem o síle 0,4 mm (obr. 31). Přihojený lalok je vidět na obr. 33.

Souhrn:

Počet laloků: 2

Sval: 1x - m. latissimus dorsi

1x - m. serratus anterior

Způsob užití: 2x - uzávěr defektu bérce po sanaci chronického osteomyelitického ložiska

Recipientní cévy: 2x - a. tibialis anterior

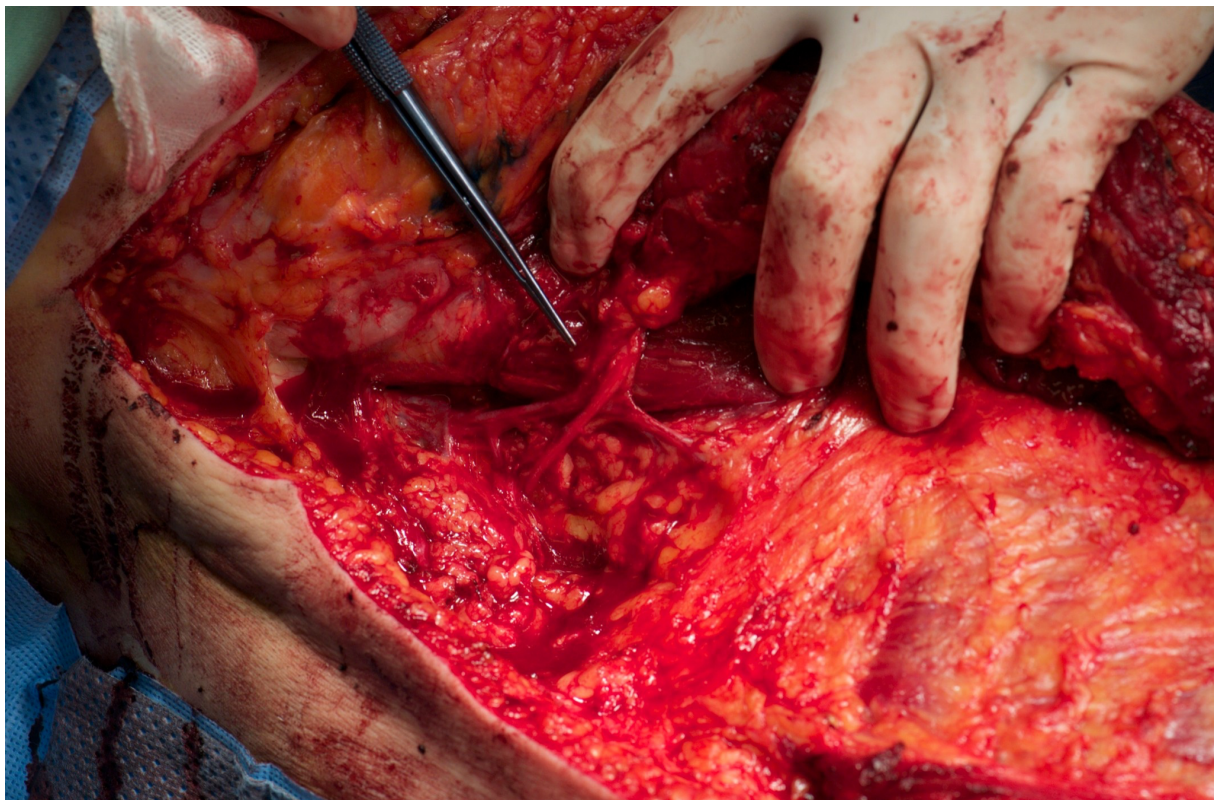
Komplikace: 0

Revize: 0

Obr. 14 - Chronická osteomyelitis bérce



Obr. 15 - Stopka laloku MLD - a. thoracodorsalis



Obr. 16 - Zakrytý defekt pomocí volného svalového laloku MLD



Obr. 17 - Volný lalok MLD krytý meshovaným dermoepidermálním



Obr. 18 - Téměř zhojený, volný lalok MLD



5. Závěr

Experimentem jsme exaktně prokázali, že oxidační stres není pro volný svalový lalok významný ani po 60-ti minutové ischemii. Výsledky vědecké práce tedy potvrdily klinická pozorování. Změny hodnot v markerech oxidačního stresu odrážejí celkové změny organismu v souvislosti s celkovou anestézií. Prokázali jsme, že i izolovaná a relativně malá svalová tkáň je k dlouhé ischemii velmi rezistentní. S největší pravděpodobností se na této skutečnosti podílí i zvýšený podíl kyslíku ve vdechované směsi při umělé plicní ventilaci ($FiO_2 = 50 \%$). Ta sice zvyšuje celkovou zátěž organismu oxidačním stresem, ale zároveň vytváří vhodné podmínky pro plánovanou ischemii přenášeného laloku. O výsledcích operace tak rozhoduje spíše špatně provedená mikroanastomóza a eventuální žilní nebo tepenná trombóza, než vlastní přechodná ischemie.

Na základě výsledků experimentální práce jsme standardizovali dílčí postupy a vytvořili protokol léčby pacientů podstupující mikrochirurgický výkon na našem pracovišti. Zjistili jsme, že naprosto zásadním a neoddělitelným členem týmu je anesteziolog (zasvěcený do specifické problematiky operativy volných laloků) a jeho pečlivé vedení anestezie při tomto výkonu.

Neméně důležitým faktorem úspěšného výsledku operativy volných laloků je časový interval teplé ischemie laloku během samotné operace a především při eventuální revizní operaci. Hodina je průměrná doba od odpojení laloku od donorských cév do provedení mikrosutury a obnovení krevní perfuze lalokem z příjmových cév. Tento interval se však výrazně prodlužuje při komplikované anastomóze či při revizní operaci, kdy je perfuze krve lalokem snížena či zastavena i několik hodin.

Nenalezli jsme univerzální látku či postup, po které by byla úspěšnost operativy volných laloků vyšší. I přes veškeré složitosti, které provázejí mikrochirurgické operace postupně zjišťujeme, že úspěch závisí na komplexní syntéze známých, relativně jednoduchých a běžných opatření. Jemná preparace laloku a jeho stopky, dokonale technicky provedená mikroanastomóza, udržování stálé tělesné teploty, udržování normotenze, vyrovnané bilance tekutin a příznivých reologických vlastností krve jsou právě ta běžná opatření, které lze neustálým opakováním a tréninkem velmi dobře zautomatizovat. Technická opatření a postupy však samy od sebe nestačí. K tomu, aby procento úspěšnosti každé složité operace bylo co nejvyšší, je nezbytná operátérova neustálá sebereflexe a pokora.

6. Výsledky podpořené z projektu NT/11024-3

Richtr Patrik: *Experimental model of ischemia-reperfusion injury (I/R) of a muscular free flap of the musculus latissimus dorsi (MLD) of domestic swine, 1st Chinese - European Congress of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Beijing, China, 27.-29.10.2011.*

Richtr Patrik: *Experimentální model ischemicko-reperfuzního poškození svalového volného laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího, Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 14.-16.2.2012.*

Skalický Adam: *Experimentální model ischemicko-reperfuzního poškození svalového volného laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího, 52. studentská vědecká konference, Plzeň, 3.5.2012.*

Richtr Patrik: *Experimentální model ischemicko-reperfuzního poškození svalového volného laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího, Mezinárodní sympozium Společnosti plastické chirurgie 2012, Plzeň, 17.-19.5.2012.*

Patrik Richtr: *Experimental model of ischemia-reperfusion injury (I/R) of a muscular free flap of the musculus latissimus dorsi (MLD) of domestic swine, 10th Annual Meeting of International Federation for Adipose Therapeutics and Science, Québec City, Canada, 5.-7.10.2012.*

Richtr P., Liška V., Racek J., Trefil L., Lavička P. *Experimentální model ischemicko-reperfuzního poškození laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího. Ortopedie, ročník 8, 1/2014:31-37.*

7. Literatura:

1. Ambrosio, G., Weisman, HF., Mannisi, JA., Becker, LC. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation*. 1989, 80, 1846-61.
2. Armstrong, DM., Armstrong, Ada C., Figueiredo, RC., Florentino, JE. et al. Sildenafil citrate protects skeletal muscle of ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical study in rat model. *Acta Cir Bras* 2013, 28(4), 282-7.
3. Askar, I., Bozkurt, M. Protective effects of immunosuppressants and steroids against ischemia-reperfusion injury in cremaster muscle flap at microcirculatory level. *Microsurgery* 2002, 22(8), 361-6.
4. Babior, BM., Kipnes, RS., Curnutte, JT. Biological defence mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest*. 1973, 52, 741-4.
5. Bezuhly, M., Liwski, R., West, K., Morris, S. Activated Protein C: An Emerging Therapeutic Agent in the Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 2008, 24(5), 361-7.
6. Blaisdell, FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc. Surg.* 2002, 10(6), 620-30.
7. Blondeel, PN. One hundred free DIEP flap breast reconstructions: a personal experience. *Br J Plast Surg*. 1999, 52(2), 104-11.
8. Bolli, R., Jeroudi, MO., Patel, BS. et al. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989, 86, 4695-9.
9. Bouleti, C., Mewton, N., Germain, S. The no-reflow phenomenon: State of the art. *Archives of Cardiovascular Diseases*. 2015, 108, 661-74.
10. Brueggemann, A., Noltze, A., Lange, T., Kaun, M. et al. Significant C3a Increase in Free Flaps After Prolonged Ischemia. *Journal of Surgical Research* 2008, (150), 125-130.

11. Ceriello, A., Giugliano, D. et al. Metabolic control may influence the increase superoxide generation in diabetic serum. *Diab Med.* 1991, 8, 540-2.
12. Cigna, E., Lo Torto, F., Parisi, P. et al. Management of microanastomosis in patients affected by vessel diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014, 18(22), 3399-405.
13. Davydov, DR. Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling? *Trends Biochem Sci.* 2001, 26, 155-60.
14. Dražan, L., Měšťák, J. *Rekonstrukce prsu po mastektomii.* 1. vyd. Praha: Grada, 2006, 166 s. ISBN 80-247-1123-0.
15. Dvorak, HF. Discovery of vascular permeability factor (VPF). *Exp Cell Res.* 2006, 312, 522-6.
16. Dusseldorp, JR., Pennington, DG. Quantifying Blood Flow in the DIEP Flap: An Ultrasonographic Study. *Plast Reconstr Surg Glob Open.* 2014, 7, 2(10), :e228.
17. Edmunds, MC., Wigmore, S., Kluth, D. In situ transverse rectus abdominis myocutaneous flap: a rat model of myocutaneous ischemia reperfusion injury. *J Vis Exp.* 2013, 8;(76).
18. Eisenhardt, S., Schmidt, Y., Karaxha, G. et al. Monitoring Molecular Changes Induced by Ischemia/Reperfusion in Human Free Muscle Flap Tissue Samples. *Annals of Plastic Surgery* 2012, 68(2), 202-8.
19. Eley, K., Young, D., Watt-Smith, S. Epinephrine, Norepinephrine, Dobutamine and Dopexamine Effects on Free Flap Skin Blood Flow. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2012, 564-70.
20. Engler, RL., Schmid-Schonbein, GW, Pavelec, RS. Leukocyte capillary pluggins in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol.* 1983, 111, 98-111.
21. Engvall, E., Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971, 8(9), 871-4.

22. Ersoy, B., Çevik, Ö., Çilingir, ÖT. Etanercept protects myocutaneous flaps from ischaemia reperfusion injury: An experimental study in a rat tram flap model. *J Plast Surg Hand Surg*. 2016, 7, 1-8.
23. Galle, J., Wanner, C. Oxidative stress and vascular injury-relevant for atherogenesis in uraemia patients? *Nephron Dial Transplant*. 1997, 12, 2480-3.
24. Gonzalez-Castro, J., Petrisor, D., Ballard, D., Wax, MK. The double-barreled radial forearm osteocutaneous free flap. *Laryngoscope* 2016, 126(2), 304-4.
25. Granger, DN. Role of xantine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1988, 255, 1269-75.
26. Greenberg, M. *Vasospasm*. In: Handbook of Neurosurgery. Thieme, New York 2001, 763-70.
27. Grisham, MB., Hernandez, LA., Granger. Xantine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol*. 1986, 251, 567-74.
28. Gurlek, A., Kroll, SS., Schustermann, MA. Ischemic time and free flap success. *Ann Plast Surg*. 1997, 38(5), 503-5.
29. Gurlek, A., Celik, M., Parlakpinar, H., Aydogan, H., Bay-Karabulut, A. The protective effect of melatonin on ischemia-reperfusion injury in the groin (inferior epigastric) flap model in rats. *J Pineal Res*. 2006, 40(4), 312-7.
30. Hataya, Y., Matsuo, K., Ishigaki, M. et al. Retrograde intra-arterial infusion of prostaglandin E1 and heparin for the no-reflow phenomenon after oromandibular reconstruction with a free fibular flap. *Ann Plast Surg*. 1999, 42(1), 92-5.
31. Heinecke, JW., Li, W., Francis, GA., Goldstein, JA. Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J Clin Invest*. 1993, 91, 2866-72.
32. van den Heuvel, MG., Bast, A., Haenen, GR. et al. The role of antioxidants in ischaemia-reperfusion in a human DIEP flap model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012, 65(12), 1706-11.

33. Hirigoyen, M.B., Manasia, A., Zhang, W., Greenstein, A.S. et al. Gluthathione disulphide as a marker of reperfusion injury in ischaemic skin flaps. *British Journal of Plastic Surgery* 1995, 48, 77-82.
34. Hosseinzadeh, H., Taiari, S., Nassiri-Asl, M. Effect of thymoquinone, a constituent of *Nigella sativa* on ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012, 385(5), 503-8.
35. Hýža, P., Streit, L., Schwarz, D., Kubek, T., Veselý, J. Vasospasm of the flap pedicle: the effect of 11 of the most often used vasodilating drugs. Comparative study in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* 2014, 134(4), 574e-84e.
36. John, R., Panch, S., Hrabe, J. et al. Activation of endothelial and coagulation systems in left ventricular assist device recipients. *Ann Thorac Surg.* 2009, 88(4), 1171-9.
37. Keith, J., Chong, T., Davar, D., Moore, A., Morris, A., Gimbel, M. The Timing of Preoperative Prophylactic Low-Molecular-Weight Heparin Administration in Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2013, 279-84.
38. Klein MB, Chan PH, Chang J. Protective effects of superoxide dismutase against ischemia-reperfusion injury: development and application of a transgenic animal model. *Plast Reconstr Surg.* 2003 Jan;111(1):251-5; discussion 256-7.
39. Kloner, RA., Ganote, CHE., Jennings, RB. The "No-Reflow" Phenomenon after Temporary Coronary Occlusion in the Dog. *J Clin Invest.* 1974, 54(6), 1496-1508.
40. Kloner, RA., Rude, RE., Carlson, N. et al. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation.* 1980, 62, 945-52.
41. Li, P., Ogino, K., Hoshikawa, Y., Morisaki, H. et al. AMP deaminase 3 plays a critical role in remote reperfusion lung injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013, 434(1), 131-6.

42. Linkins, LA., Dans, AL., Moores, LK., et al. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis. *Chest*. 2012, 141, e495S-530S.
43. Liochev, SI., Fridovich, I. The Haber-Weiss cycle - 70 years later: an alternative view. *Redox report*. 2002, 7, 55-7.
44. Liu, X., Miller, MJS., Joshi, MS., Thomas, DD., Lancaster, JR. Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Aca Sci USA*. 1998, 95, 2175-9.
45. Lee, A., Dupin, Ch., Colen, L. et al. Microvascular Free Tissue Transfer in Organ Transplantation Patients: Is It Safe? *Plast Reconstr Surg*. 2008, 1986-92.
46. Lee, K-T., Lee, J., Nam, S., Mun, G-H. Ischaemic time and fat necrosis in breast reconstruction with a free deep inferior epigastric perforator flap. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* 2013, 66, 174-81.
47. Le Thua, Boeckx, WD., Zirac, C., De Mey, A. Free intra-osseous muscle transfer for treatment of chronic osteomyelitis. *J Plast Surg Hand Surg*. 2015, 10, 1-5.
48. Mann, T., Keilin, D. Haemocuprein and hepatocuprein, copper protein compounds of blood and liver in mammals. *Proc R Soc Ser B*. 1938, 126, 303-15.
49. Masayoshi, K., Yoshiharu, T., Kenji, M. et al. A case of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) following aortic surgery for acute type A aortic dissection. *Jpn J Cardiovasc Surg*. 2006, 35, 222-5.
50. Mathes, SJ., Nahai, F. Classification of the vascular anatomy of muscles: experimental and clinical correlation. *Plast Reconstr Surg*. 1981, 67(2), 177-87.
51. McCord, JM. Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*. 1974, 185, 529-31.

52. Menger, MD., Lashke, MW., Amon, M. et al. Experimental models to study microcirculatory dysfunction in muscle ischemia-reperfusion and osteomyocutaneous flap transfer. *Langenbecks Arch. Surg.* 2003, 388(5), 281-90.
53. Menger, MD., Sack, FU., Barker, JH. et al. Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle: therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res Exp Med* 1988, 188, 151-65.
54. Nolte, D., Bayer, M., Lehr, HA. et al. Attenuation of postischemic microvascular disturbances in striated muscle by hyperosmolar saline dextran. *Am J Physiol* 1992, 263, 1411-16.
55. Nolte, D., Lehr, HA., Messmer, K. Adenosine inhibits postischemic leukocyte – endothelium interaction in postcapillary venules of the hamster. *Am J Physiol* 1990, 261, 651-55.
56. Orsenigo, F., Giampietro, C., Ferrari, A. et al. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun.* 2012, 3, 1208.
57. Pauling, L. The discovery of the superoxide radical. *Trends Biochem Sci.* 1979, 4, 270-1.
58. Perticone, F., Ceravolo, R., Pujia, A. et al. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. *Circulation.* 2001, 104, 191-6.
59. Reffelmann, T., Kloner, RA. Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002, 283, H1099-107.
60. Russell, RC., Roth, AC., Kucan, JO., Zook, EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. *J Reconstr Microsurg.* 1989, 5(1), 79-84.

61. Salin, ML., McCord, JM. Free radicals and inflammation: protection of phagocytosing leukocytes by superoxide dismutase. *J Clin Invest.* 1975, 56, 1319-23.
62. Saltzman, D., Kerger, H., Jimenez, JZ. et al. Microvascular changes following four-hour single arteriole occlusion. *Microsurgery.* 2013, 33(3), 207-15.
63. Shaw, W., Ko, C., Ahn, Ch., Markowitz, B. Safe Ischemia Time in Free-Flap Surgery: A Clinical Study of Contact-Surface Cooling. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 1996, 12 (7), 421-24.
64. Schulz, E., Jansen, T., Wenzel, P. et al. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2008, 10, 1115-26.
65. Sigurdsson, G. Perioperative Fluid Management in Microvascular Surgery. *Journal of Reconstructive Microsurgery* 1995, 11(1), 57-65.
66. Singh, K. *Oxidative Stress, Disease and Cancer.* Imperial College Press, London, UK: 2006; 1-356, ISBN 1-86094-609-7.
67. Sosin, M., Sinada, GG., Rodriguez, ED., Dorafshar, AH. Intraoral Microvascular Anastomosis of an Iliac Free Flap for Maxillary Fibrous Dysplasia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015, 73 (10).
68. Steinbauer, M., Harris, AG., Messmer, K. Effects of dextran on microvascular ischemia–reperfusion injury in striated muscle. *Am J Physiol* 1997, 272, 1710-16.
69. Stohs, SJ., Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions. *Free Rad Biol Med.* 1995, 18, 321-36.
70. Spiteller, G. Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with disease? *Med Hypotheses.* 2003, 60, 69-83.

71. Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A. et al. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat Cell Biol.* 2008, 10, 923-34.
72. el-Tamimi, H., Davies, GJ., Sritara, P. et al. Inappropriate constriction of small coronary vessels as a possible cause of a positive exercise test early after successful coronary angioplasty. *Circulation.* 1991, 84, 2307-12.
73. Tenekeci, G., Bilen, BT., Tutkoz, Y. et al. The Effect of Selenium on Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study on a Transverse Rectus Abdominis Musculocutaneous Flap Model. *J Craniofac Surg.* 2016, 27(1), 242-6.
74. Toro, J., Rodrigo, R. *Oxidative Stress: Basic Overview.* In: Rodrigo R, ed. Oxidative Stress and Antioxidants - Their Role in Human Disease. Nova Biomedical Books, New York, NY: 2009, 1-24, ISBN 978-1-60741-554-1.
75. Tamas, R., Nemeth, N., Brath, E. et al. Hemorheological, morphological, and oxidative changes during ischemia-reperfusion of latissimus dorsi muscle flaps in a canine model. *Microsurgery* 2010, 30(4), 282-8.
76. Tatlidede, SH., Murphy, AD., McCormack, MC. et al. Improved survival of murine island skin flaps by prevention of reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 2009, 123(5), 1431-9.
77. Thomas, DD., Liu, X., Kantrow, SP., Lancaster, JR. Biological life-time of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proc Natl Aca Sci USA.* 2001, 98, 355-60.
78. Tomur, A., Etlik, O., Gundogan, NU. Hyperbaric oxygenation and antioxidant vitamin combination reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin-flap model. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2005;16(4), 275-85.
79. Tranum-Jensen, J., Janse, MJ. et al. Tissue osmolality, cell swelling and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circ Res.* 1998, 49, 364-81.

80. Třeška, V., Kobr, J., Hasman, D. et al. Ischemicko-reperfúzní poškození ledvin transplantovaných z nebijícího dárce (NHBD) – mají antioxidanty nebo protizánětlivé léky význam v jeho prevenci? *Rozhl. Chir.* 2009, 88(2), 65-8.
81. Tsuchida, Y., Aoki, N., Fukuda, O., Nakano, M., Igarashi, H. Changes in hemodynamics in jejunal flaps of rabbits due to ischemia, venous congestion, and reperfusion as measured by means of colored microspheres. *Plast Reconstr Surg.* 1998,101(1),147-54.
82. Veselý 3, J., Bařinka, L., Ziegelbauer, Z., Ostřížek, D. Krytí kožních defektů v krajině Achillovy šlachy. *Acta chir. orhtop. traumat. Czech.* 1992,59,2,81-6.
83. Vesely 4, J., Amadeo, G., Colona, M., Cavallaro, G. Los colgajos libres en la reparacion post-oncologica del scalp. Presentacion de un caso de colgajo libre de serrato mayor. *Chir. plast. Ibero-Latinoamerica.* 1993,19,1,43-6.
84. Veselý, J. et al. Plastická chirurgie pro lékařské fakulty a postgraduální výchovu. *Tisk centrum*, Brno: 2007.
85. Veselý, J., Procházka, V., Válka, J., Mrázek, T., Santi, P, Berrino, P. Use of two microsurgical flaps in one stage reconstructive surgery. *Acta chir. plast.* 1994, 36,4, 99-103.
86. Veselý, J. Užití volných laloků v oblasti hlavy a krku. *Scripta medica.* 1994, 67, 205-8.
87. Veselý, J., Procházka, V., Válka, J., Kučera, J. Microsurgical reconstruction of traumatic defects on the lower extremities. *Acta chir. plast.* 1994, 36, 4, 104-6.
88. Veselý, J., Kučera, J. Immediate free flaps reconstructions on traumatic defects. *Acta chir. plast.* 1995, 37, 1, 7-11.
89. Veselý, J., Bařinka L., Ziegelbauer, Z., Ostřížek, D. Krytí kožních defektů v krajině Achillovy šlachy, *Acta chir. orhtop. traumat. Czech.*,1992,59,2,81-6

90. Veselý, J., Samohýl, J., Bařinka, L., Němec, A. Gewebeschock bei freien Lappen in Experiment an der Ratte. Bedeutung, Klassifikation, Beeinflussung. *Hand-Mikro-Plastische Chir.*, 1987, 19, 269-72.
91. Veselý, J., Samohýl, J., Bařinka, L., Němec, A., Smrčka, V. Spastické komplikace u volných lalokových přenosů. *Rozhl. chir.*, 1990, 69, 10, 682-8.
92. Wang, WZ., Anderson, G., Maldonado, C., Barker, J. Attenuation of vasospasm and capillary no-reflow by ischemic preconditioning in skeletal muscle. *Microsurgery*. 1996;17(6), 324-9.
93. Weis, SM., Cheresh, DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*. 2005, 437, 497-504.
94. Zimmermann, JJ. Defining the role of oxyradicals in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care Med*. 1995, 32, 616-17.
95. Zhang, B., Sun, Y., Xia, L., Gu, J. Time-dependent flow velocity measurement using two-dimensional color Doppler flow imaging and evaluation by Hagen-Poiseuille equation. *Australas Phys Eng Sci Med*. 2015, 38(4), 755-66.
96. Zoltie, N., Young, C., Faris, I., Tan, E. The veno-arteriolar reflex in free skin flaps. *Clin Physiol*. 1989, 9(2), 183-8.

8. Seznam obrázků

	str.
Obr. 1 - Arteria carotis communis (ACC)	30
Obr. 2 - Katetr v ACC	31
Obr. 3 - Prase domácí v operační poloze	32
Obr. 4 - Odklopené kožní laloky a vizualizace MLD	33
Obr. 5 - Interkostální perforátory	34
Obr. 5a - Detail interkostálního perforátoru	34
Obr. 6 - Stopka thorakodorzálního svazku (detail)	35
Obr. 7 - Odběrový katetr zavedený v drénující žíle	36
Obr. 8 - Mikrosvorkou uzavřená drénující žíla v mezidobí odběru vzorků	37
Obr. 9 - Odběr krevních vzorků z drénující žíly pomocí zavedeného katetru	38
Obr. 10 - Odběrová místa svalových vzorků z MLD	39
Obr. 11 - Dočasně zasvorkovaná cévní stopka thorakodorzálního svazku	40
Obr. 12 - Zmrazení vzorků v tekutém dusíku	41
Obr. 13 - Homogenizátor	43
Obr. 14 - Chronická osteomyelitis bérce	87
Obr. 15 - Stopka laloku MLD - a. thoracodorsalis	87
Obr. 16 - Zakrytý defekt pomocí volného svalového laloku MLD	88
Obr. 17 - Volný lalok MLD krytý meshovaným dermoepidermálním štěpem	88
Obr. 18 - Téměř zhojený, volný lalok MLD	89

9. Seznam grafů a tabulek

	str.
Graf 1 - Systémové natrium	47
Graf 2 - Systémové kalium	48
Graf 3 - Celková bílkovina	49
Graf 4 - Systémový laktát	50
Graf 5 - Pyruvát	51
Graf 6 - Systémový myoglobin	52
Graf 7 - Aspartátaminotransferáza	53
Graf 8 - Kreatinkináza	54
Graf 9 - ICAM	55
Graf 10 - VCAM	56
Graf 11 - Gluthathion	57
Graf 12 - Gluthathionperoxidáza	58
Graf 13 - TBARS	59
Graf 14 - Pyruvát (arterio-venózní diference)	60
Graf 15 - Myoglobin (arterio-venózní diference)	61
Graf 16 - Kreatinkináza (arterio-venózní diference)	62
Graf 17 - AST (arterio-venózní diference)	63
Graf 18 - AST	64
Graf 19 - Myoglobin	65
Graf 20 - Železo	66
Graf 21 - Celková bílkovina	67
Graf 22 - TBARS	68
Graf 23 - Laktát	69
 Tab. 1 - Časový průběh koncentrace měřených parametrů v arteriální krvi a žilní krvi resp. tkáňovém lyzátu z ischemického a kontrolního svalového laloku.	 70

10. Přednášková a publikační činnost

Přednášky

1. Richtr P., Lavička P, Choc M: *Akutní řešení těžkého stavu u nemocného s cystou III. komory*. Večer neurochirurgického oddělení, Plzeň 22.března 2000 pracovní schůze ČSJEP
2. Mraček J., Richtr P.: Chirurgická léčba stenóz art. carotis interna. Seminář cévní neurochirurgie a invazivní neuradiologie, Plzeň, 24. listopadu 2002
3. Choc M., Šlauf F., Richtr P., Holečková I., Herejková I., Lavička P.: Interdisciplinární spolupráce při diagnostice a léčbě cévních lézí mozkových. Kongres klinické neurologie, Praha 5. – 7. prosinec 2002
4. Šlauf F., Choc M., Richtr P.: Endovaskulární a neurochirurgická léčba AV malformace čelní krajiny a orbity. Seminář cévní neurochirurgie a invazivní neuradiologie, Kaprun, Rakousko, 18. listopadu 2002
5. Mraček J., Richtr P., Bludovský D: Karotická mikroendarterektomie. Postgraduální lékařské dny. Plzeň 13. a 14. února 2003
6. Mraček J., Richtr P.: Historický pohled na diagnostiku a léčbu obliterace krkavic. Večer neurochirurgického oddělení , Plzeň , 19. března 2003 – pracovní schůze ČSJEP.
7. Choc M., Šlauf F., Richtr P., Holečková I., Herejková I., Lavička P.: Interdisciplinární spolupráce při diagnostice a léčbě cévních lézí mozkových. Večer neurochirurgického oddělení , Plzeň , 19. března 2003 – pracovní schůze ČSJEP.
8. Mraček J., Richtr P.: Poranění periferních nervů. Seminář chirurgického kolegia Poohří, Cheb, 11.prosinec 2003

9. Richtr P., Rohan V., Bludovský D., Lavička P., Kovařík R., Šrogl J.: Tracheostomie v neurochirurgické praxi. Postraduální lékařské dny Plzeň, 2004 12.- 13.2.2004
10. Richtr P., Mraček J.: Možnosti chirurgické léčby uzávěru art. carotis interna. Večer neurochirurgického oddělení – pracovní schůze ČSJEP, Plzeň 24.3.2004
11. Richtr P., Mraček J., Bludovský D., Lavička P., Holečková I.: Perioperační péče o pacienty podstupující karotickou mikroendarterektomii na neurochirurgii v Plzni. XI. Minářovy dny , Plzeň, 13 .- 14.5. 2004
12. Richtr P., Mraček J., Herejková I.: Úprava řeči po karotické endarterektomii – kazuistika. XXXII. česko- slovenské neurovaskulární sympozium, 10. – 11. června 2004 , Zlín
13. Mraček J., Choc M., Richtr P.: Hyperperfusion syndrom. Two causes of cerebral hyperperfusion with different clinical symptomatology. 3rd Congress of the Slovak Neurosurgical Society with International Participation, Stará Lesná, High Tatras, 14.-16.October 2004
14. Mraček J., Richtr P.: Timing karotické endarterektomie. Pracovní dny české neurochirurgické společnosti 2004, 2. – 4 . prosince 2004, Liberec
15. Richtr P., Mraček J., Herejková I.: Úprava poruchy řeči po karotické endarterektomii. Večer neurochirurgického oddělení – pracovní schůze ČSJEP, Plzeň 16.3.2005
16. Richtr P., Runt V.: Expanzivně se chovající malacie mozečku. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16.-17. 2. 2006, Plzeň
17. Richtr P., Runt V: Expanzivně se chovající malacie mozečku. Kuncův memoriál 2006, 16.-17. 3. 2006, Praha
18. Mraček J., Choc M., Richtr P.: Hyperperfúzní syndrom. Kuncův memoriál 2005, Praha 24. -25. března 2005

19. Mraček J., Richtr P., Holečková I.: Neurochirurgický pohled na léčbu stenózy krkavice. 5. Chebská neurologická konference, Cheb, 21. – 22. října 2005
20. Runt V., Choc M., Mraček J., Richtr P., Lavička P., Holečková I., Herejková I., Šlauf F., Novák M.: Naše současné postupy při řešení mozkových aneurysmat. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16. -17. 2. 2006, Plzeň
21. Mraček J., Richtr P., Choc M.: Extra-intrakraniální anastomóza. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16. -17. 2. 2006, Plzeň
22. Holečková I., Mraček J., Bludovský D., Richtr P.: Úloha elektrofyziologického monitorování při karotické endarterektomií. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16. -17. 2. 2006, Plzeň
23. Mraček J., Richtr P., Holečková I., Choc M.: Nové pohledy na indikace a timing karotické endarterektomie. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16. -17. 2. 2006, Plzeň
24. Mraček J., Richtr P., Holečková I., Choc M.: Léčba stenózy krkavice z pohledu neurochirurga. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16. -17. 2. 2006, Plzeň
25. Mraček J., Richtr P., Holečková I., Choc M.: Nové názory na indikace a timing karotické endarterectomie. Kuncův memoriál 2006, 16.-17. 3. 2006, Praha
26. Runt V., Choc M., Mraček J., Richtr P., Lavička P., Holečková I., Herejková I., Šlauf F., Novák M.: Naše současné postupy při řešení mozkových aneurysmat. Večer neurochirurgického oddělení – pracovní schůze ČSJEP, Plzeň 22.3.2006
27. Mraček J., Richtr P., Holečková I., Choc M.: Nové úhly pohledu na benefit karotické endarterektomie. XXXIV. Mezinárodní česko-slovenské neurovaskulární sympozium., 15.-16. 6. 2006, Zlín

28. Richtr P.: Microsurgery training - cheap, real, tasty. International Congress of Plastic Surgery, 17 - 19 May, 2007, Brno
29. Richtr P.: Kranioplastika. Pravidelné národní sympozium Společnosti plastické chirurgie, 23. - 25. října 2008, Praha
30. Richtr P.: Kranioplastika. V. Plzeňské pracovní dny maxilo-faciální chirurgie, 14.-15. listopadu 2008, Plzeň
31. Richtr P., Třešková I.: Syndrom karpálního tunelu - operační léčba na plastické chirurgii v Plzni. VII. slovenský kongres chirurgie ruky s mezinárodní účastí, 27. - 28. November 2008, Rajecké Teplice, Slovensko
32. Richtr P.: Experimental model of ischemia-reperfusion injury (I/R) of a muscular free flap of the musculus latissimus dorsi (MLD) of domestic swine, 1st Chinese - European Congress of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Beijing, China, 27.-29.10.2011.
33. Richtr P.: Experimentální model ischemicko-reperfúzního poškození svalového volného laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího, Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 14.-16.2.2012.
34. Richtr P., Hýža P., Sviták M., Dolejš M.: Rekonstrukce prsu po mastektomii pomocí mikrochirurgického přenosu břišního laloku – DIEA. Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 14.-16.2.2012.
35. Richtr P.: Tkáňová expanze jako součást léčby synoviálního sarkomu – kazuistika. Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 14.-16.2.2012.
36. Skalický A., Richtr P.: Experimentální model ischemicko-reperfúzního poškození svalového volného laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího, 52. studentská vědecká konference, Plzeň, 3.5.2012.
37. Richtr P.: Experimentální model ischemicko-reperfúzního poškození svalového volného laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího, Mezinárodní sympozium Společnosti plastické chirurgie 2012, Plzeň, 17.-19.5.2012.

38. Richtr P.: Experimental model of ischemia-reperfusion injury (I/R) of a muscular free flap of the musculus latissimus dorsi (MLD) of domestic swine, 10th Annual Meeting of International Federation for Adipose Therapeutics and Science, Québec City, Canada, 5.-7.10.2012.
39. Richtr P, Andrlé P, Hrusak D, Treskova I, Bursa V. Free MSAP flap (Medial Sural Artery Perforator) used for covering protrusion of reconstructive plate after partial resection of the mandible. XXII Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Prague, 23-26 Sept 2014

Publikace

1. Mracek J., Richtr P., Bludovský D.: Karotická mikroendarterektomie. Postgraduální lékařské dny, Plzeň 13. a 14. února 2003, Civilizační choroby II. -sborník přednášek str. 16
2. Mracek J., Richtr P., Bludovský D., Holečková I.: Karotická mikroendarterektomie. Časopis lékařů českých, 9/2003 ISSN 0008-7335, 142-2003 str. 541-544, (vydává České lékařská společnost J.E. Purkyně)
3. Mráček J., Holečková I., Richtr P., Bludovský D.: Epileptický záchvat a karotická endarterektomie . Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Praha, 6 - . 8. listopadu 2003, sborník přednášek – poster č. 60
4. Richtr P., Mráček J., Herejková I.: Úprava řeči po karotické endarterektomii – kazuistika. XXXII. česko – slovenské neurovaskulární sympozium, 10- 11. června 2004, Zlín, Česká a slovenská neurologie, 67/100, suppl. str. 36-37

5. Mraček J., Richtr P.: Timing karotické endarterektomie. XXXII. česko-slovenské neurovaskulární sympozium, 10. – 11. června 2004 , Zlín, Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, 67/100, suppl. str. 42
6. Mraček J., Choc M., Richtr P.: Hyperperfusion Syndrom – Two Causes of Cerebral Hyperperfusion with Different Clinical Symptomatology. 3rd CENS Meeting, Ljubljana, Slovenia, September 1-4, 2004, P-20, str.135
7. Mraček J., Choc M., Richtr P.: Hyperperfusion syndrom. Two causes of cerebral hyperperfusion with different clinical symptomatology. 3rd Congress of the Slovak Neurosurgical Society with International Participation, Stará Lesná, High Tatras, 14.-16.October 2004, Sborník přednášek
8. Mraček J., Richtr P.: Timing karotické endarterektomie. Pracovní dny české neurochirurgické společnosti 2004, 2. – 4 . prosince 2004, Liberec, Sborník přednášek str. 48-49
9. Mraček J., Choc M., Richtr P.: Hyperperfúzní syndrom. Kuncův memoriál 2005, Praha 24. -25. března 2005, sborník přednášek str. 33
- 10.Richtr P., Runt V.: Expanzivně se chovající malacie mozečku. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16.-17. 2. 2006, Plzeň, sborník abstrakt str. 14
- 11.Holečková I., Mraček J., Bludovský D., Richtr P.: Úloha elektrofyziologického monitorování při karotické endarterektomií. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16. -17. 2. 2006, Plzeň, sborník abstrakt str..5
- 12.Mraček J., Richtr P., Holečková I., Choc M.: Léčba stenózy krkavice z pohledu neurochirurga. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16. -17. 2. 2006, Plzeň, sborník abstrakt str. 11
- 13.Mraček J., Richtr P., Holečková I., Choc M.: Nové pohledy na indikace a timing karotické endarterektomie. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16. -17. 2. 2006, Plzeň, sborník abstrakt str. 12

14. Mraček J., Richtr P., Choc M.: Extra-intrakraniální anastomóza. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16. -17. 2. 2006, Plzeň, sborník abstrakt str. 12
15. Runt V., Choc M., Mraček J., Richtr P., Lavička P., Holečková I., Herejková I., Šlauf F., Novák M.: Naše současné postupy při řešení mozkových aneuryzmat. Postgraduální lékařské dny Plzeň, 16. -17. 2. 2006, Plzeň, sborník abstrakt str. 15
16. Richtr P., Runt V.: Expanzivně se chovající malacie mozečku. Kuncův memoriál 2006, 16.-17. 3. 2006, Praha, sborník přednášek str. 10
17. Mraček J., Richtr P., Holečková I., Choc M.: Nové názory na indikace a timing karotické endarterektomie. Kuncův memoriál 2006, 16.-17. 3. 2006, Praha, sborník přednášek str. 9
18. Mraček J., Richtr P., Holečková I., Choc M.: Nové úhly pohledu na benefit karotické endarterektomie. XXXIV. Mezinárodní česko-slovenské neurovaskulární sympozium., 15.-16. 6. 2006, Zlín, Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie, Suppl. 2, 2006, 69/102 str. 19, ISSN 1210-7859
19. Kacerovska D., Michal M., Sosna B., Cempirkova D., Ambrus M., Richtr P., Danis D., Zelger B., Kazakov DV.: Carcinoid-like pattern in melanoma: report of 4 cases. Am J Dermatopathol. 2009 Aug;31(6): 542-50. **IF 1,295**
20. Richtr P.: Experimentální model ischemicko-reperfúzního poškození svalového volného laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího. Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 14.-16.2.2012, sborník abstrakt str. 19.
21. Richtr P., Hýža P., Sviták M., Dolejš M.: Rekonstrukce prsu po mastektomii pomocí mikrochirurgického přenosu břišního laloku – DIEA. Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 14.-16.2.2012, sborník abstrakt str. 19.

22. Richtr P.: Tkáňová expanze jako součást léčby synoviálního sarkomu – kazuistika. Postgraduální lékařské dny, Plzeň, 14.-16.2.2012, sborník abstrakt str. 19.
23. Richtr P, Andrlé P, Hrusak D, Treskova I, Bursa V. Free MSAP flap (Medial Sural Artery Perforator) used for covering protrusion of reconstructive plate after partial resection of the mandible. XXII Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Book of Abstracts, Prague, 23-26 Sept 2014. p88
24. Richtr P., Liška V., Racek J., Trefil L., Lavička P. Experimentální model ischemicko-reperfuzního poškození laloku musculus latissimus dorsi prasete domácího. Ortopedie, ročník 8, 1/2014:31-37. **Recenzovaný časopis**
25. Mracek J, Hommerova J, Mork J, Richtr P., Prihan V.: Complications of cranioplasty using a bone flap sterilised by autoclaving following decompressive craniectomy. Acta Neurochir (Wien). 2015 Mar;157(3): 501-6. doi: 10.1007/s00701-014-2333-0. Epub 2015 Jan 15. **IF 1,766**

Postery

1. Mraček J., Holečková I., Richtr P., Bludovský D.: Epileptický záchvat a karotická endarterektomie. Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Praha, 6 - . 8. listopadu 2003
2. Mraček J., Richtr P.: Timing karotické endarterektomie. XXXII. česko-slovenské neurovaskulární sympozium, 10. – 11. června 2004 , Zlín
3. Mraček J., Choc M., Richtr P.: Hyperperfusion Syndrom – Two Causes of Cerebral

4. Hyperperfusion with Different Clinical Symptomatology. 3rd CENS Meeting, Ljubljana, Slovenia, September 1-4, 2004
5. Mraček J., Choc M., Richtr P.: Hyperperfusion syndrom. Two causes of cerebral hyperperfusion with different clinical symptomatology. 3rd Congress of the Slovak Neurosurgical Society with International Participation, Stará Lesná, High Tatras, 14.-16.October 2004
6. Mraček J., Richtr P.: Timing karotické endarterektomie. Pracovní dny české neurochirurgické společnosti 2004, 2. – 4 . prosince 2004, Liberec
7. Mraček J., Richtr P., Holečková I., Bludovský D.: Karotická endarterektomie a její postavení v prevenci a terapii ischemické CMP. Český a Slovenský neurologický sjezd Brno, 30.11.- 1.12. 2004
8. Mraček J., Choc M., Richtr P.: Hyperperfúzní syndrom. Kuncův memoriál 2005, Praha 24. -25. 3. 2005
9. Richtr P. Meningomyelokéla. Diagnostika, léčba a prevence závažných civilizačních onemocnění, Plzeň, 25. 11. 2010.