

Univerzita Karlova v Praze - 2. lékařská fakulta

**Aproximační střevní anastomóza u novorozenců
nízké porodní hmotnosti - experimentální model**

**Postgraduální doktorské studium biomedicíny
Disertační práce z oboru experimentální chirurgie**

As. MUDr. Michal Rygl

Praha 2007

Univerzita Karlova v Praze - 2. lékařská fakulta
Postgraduální doktorské studium biomedicíny
Disertační práce z oboru experimentální chirurgie

**Téma: Aproximační střevní anastomóza u novorozenců
nízké porodní hmotnosti - experimentální model**

Uchazeč: As. MUDr. Michal Rygl
Klinika dětské chirurgie UK Praha 2.LF a FN Motol
V úvalu 84, Praha 5

Školitel: Prof. MUDr. Richard Škába CSc.
Klinika dětské chirurgie UK Praha 2.LF a FN Motol
V úvalu 84, Praha 5

Konsultant: Prof. MUDr. Jan Herget DrSc
Ústav fyziologie UK Praha 2.LF
Plzeňská 130/221, Praha 5

Oborová rada: Experimentální chirurgie
Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Živný DrSc

Poděkování

Prof. MUDr. Jiří Šnajdaufovi DrSc. přednostovi Kliniky dětské chirurgie 2.LF UK Praha. za umožnění kombinovaného postgraduálního studia

Prof. MUDr. Richardu Škábovi CSc. za odborné vedení a podporu v průběhu celého studijního programu

Prof. MUDr. Jan Hergetovi DrSc. za odborné konzultace a poskytnutí zázemí experimentálních laboratoří v Ústavu fyziologie 2.LF UK Praha

RNDr. Janě Novotné CSc. z Ústavu lékařské chemie a biochemie 2.LF UK Praha za spolupráci při hodnocení kolagenolytické aktivity vzorků

Olze Hnilíčkové a Květe Venclíkové za technickou pomoc při experimentální studii

Obsah

1. Úvod	
1.1. Nezralý novorozenec nízké porodní hmotnosti...	4
1.2. Novorozenecká nekrotizující enterokolitida.....	6
1.2.1. Možnosti operační léčby NEC.....	9
1.2.2. Léčba při víceložiskové nebo totální NEC.....	12
1.3. Syndrom krátkého střeva.....	14
2. Cíle disertační práce	16
3. Materiál a metody	
3.1. Experimentální studie	17
3.1.1. Vlastní experiment	19
3.1.2. Měření pevnosti anastomózy.....	21
3.1.3. Stanovení aktivity MMP-2, MMP-9	23
4. Výsledky	
4.1.1. Operační nálezy	26
4.1.2. Pevnost anastomózy	26
4.1.3. Aktivita MMP-2 a MMP-9	30
4.2. Klinická aplikace - kasuistika	37

5. Diskuse	41
5.1. Mechanické vlastnosti aproximační anastomózy	42
5.2. Aktivita kolagenolytických MMP.....	46
5.3. Klinické aplikace aproximační anastomózy	49
6. Závěry	51
7. Souhrn	52
8. Teze v anglickém jazyce	60
9. Literatura	56
10. Seznam použitých zkratk	63
11. Přílohy	64

1. Úvod

1.1. Nezralý novorozenec nízké porodní hmotnosti

Klasické chirurgické postupy nejsou plně aplikovatelné pro operace nezralých novorozenců nízké porodní hmotnosti. Hranice životaschopnosti předčasně narozeného novorozence je dnes stanovena na 24. gestační týden, a za nezralé považujeme všechny novorozence narozené před 37. gestačním týdnem. Počet nezralých novorozenců nízké porodní hmotnosti se během posledních let pohybuje kolem 6% z celkového počtu živě narozených dětí (Tab. 1).

	< 999g	1000-1499g	1500-2499g	>2499g
2001	296	517	4532	85255
2002	303	543	4756	87207
2003	359	575	5189	87624
2004	377	660	5549	91085
2005	336	606	5797	95429

Tab.1.: Počty živě narozených dětí podle porodní hmotnosti v letech 2001-2005. Zpracováno z údajů UZIS.

Ve vztahu k mortalitě je nejsledovanějším ukazatelem porodní hmotnost, podle které se děti narozené předčasně dělí na 3 základní skupiny: novorozenci s nízkou porodní hmotností, tj. pod 2500g, novorozenci s velmi nízkou porodní hmotností, tj. pod 1500g a novorozenci s extrémně nízkou porodní hmotností, tj. pod 1000g (Tab.2.).

1.	novorozenci s nízkou porodní hmotností (NNPH)	< 2500g
2.	novorozenci s velmi nízkou porodní hmotností (NVNPH)	< 1500g
3.	novorozenci s extrémně nízkou porodní hmotností (NENPH)	< 1000g

Tab. 1: Rozdělení předčasně narozených dětí do skupin podle porodní hmotnosti

Nejvyšší morbidita je u dětí narozených před 26. gestačním týdnem a porodní hmotností do 1000g (Obr.1.). Nezralé novorozence charakterizuje nezralost jejich orgánových systémů a řada specifických onemocnění: pneumopatie, cirkulační nestabilita, střevní hypomotilita a snížená obranyschopnost. V oblasti střevních onemocnění pak dominuje novorozenecká nekrotizující enterokolitida, která patří mezi časté a závažné komplikace a která velmi často vyžaduje chirurgické řešení. Při kvalitní specializované péči v neonatologických centrech se zvyšuje počet přežívajících nezralých novorozenců [1] a je nutné optimalizovat i chirurgické intervence u této skupiny pacientů.



Obr.1. Nezralý novorozenec – gestační stáří 26 týdnů, porodní hmotnost 610 gramů, nezralost orgánových systémů

1.2. Novorozenecká nekrotizující enterokolitida (NEC)

Novorozenecká nekrotizující enterokolitida (NEC) je progresivní zánětlivé onemocnění střev, které postihuje převážně nezralé novorozence s porodní hmotností pod 1500g. NEC charakterizuje zánětlivé poškození střevní stěny nejčastěji v oblasti terminálního ilea a kolon. Příčina onemocnění zůstává i přes množství teorií nejasná. Mezi nejčastěji zmiňované teorie patří spolupůsobení umělé výživy, infekce a hypoxie na nezralý gastrointestinální trakt [2,3]. V rozvoji onemocnění je velmi důležitá nezralost imunitního systému (výrazná hypogamaglobulinemie, nepřítomnost IgA a IgM, snížené hladiny komplementu a snížená fagocytární funkce) a hlavně bakteriální infekce.



Obr.2. Nekróza střevní stěny v oblasti ilea s rozpadem a perforací u novorozence s porodní hmotností 700g ve stáří 11 dní po porodu.

Rozsah poškození je variabilní od slizničních změn (edém, hemorrhagie, ulcerace) po gangrenózní zánět a koagulační nekrózu celé stěny (Obr.2.).

Onemocnění může postihovat jeden izolovaný úsek střeva (lokální NEC), více úseků (víceložisková NEC) a nebo může být postiženo více než 75% střeva (totální NEC). NEC je ve skupině NENPH novorozenců doprovázena mortalitou 35-80% [4-7].

Nekrotizující enterokolitida se vyskytuje v různých klinických formách. Mírná forma onemocnění se při stabilním celkovém stavu projeví distenzí břicha, zvýšeným žaludečním residuem, poruchou střevní peristaltiky a mírnou alterací biochemických a hematologických hodnot. Fulminantní forma NEC naopak rychle progreduje k masivní střevní gangréně, zhoršení ventilačních parametrů, metabolické acidóze a rozvoji diseminované intravaskulární koagulace (DIC). Pro usnadnění diagnózy i pro volbu přiměřené léčby slouží Bellova kritéria z roku 1978, modifikovaná v roce 1986 Kliegmannem [8]. 1. stupeň je definován jako podezření na NEC, 2. stupeň odpovídá prokázané NEC, 3. stupeň pokročilé NEC.

Při klinických známkách NEC se zahajuje konzervativní léčba: zastaví se GIT příjem, zavede se nasogastrická sonda k dekompresi žaludku, aplikují se kombinace antibiotik a intravenosní výživa. Intenzita a délka konzervativní léčby závisí na stupni NEC. Fulminantní forma NEC je spojena s vysokou mortalitou a vyžaduje léčbu na úrovni resuscitační péče při septickém šoku. Konzervativní léčba vede ke stabilizaci asi u 50% nemocných.

Chirurgickou léčbu vyžaduje 30-50% postižených novorozenců, buď v akutním stadiu, nebo později při výskytu pozdních komplikací, zejména striktur. Operace v akutním stadiu je vyhrazena pro děti se střevní gangrénou nebo perforací. Perforace je jedinou absolutní indikací k chirurgické intervenci, zhoršování klinického stavu při konzervativní terapii je indikací relativní. Rozhodnutí operovat kriticky nemocného novorozence je založeno na vlastních zkušenostech indikujícího lékaře, protože objektivní kritéria jsou často nedostatečná [9]. Kosloske považuje za platné indikace k operaci pneumoperitoneum, pozitivní paracentézu a plyn v portální žíle [5]. Také Rowe se domnívá, že plyn v portálním řečišti je vhodnou indikací k časně intervenci.

Přítomnost plynu nalezl u 71% dětí s panintestinálním postižením [6]. Molik naopak nalezl plyn v portální žíle i u pacientů s úspěšnou konzervativní léčbou, a proto jej u stabilních pacientů považuje jen za relativní indikaci k operaci [10]. Pneumatosis intestinalis - plyn ve střevní stěně, přetrvávající lokalizovaná distenze střevní kličky, břicho bez plynu, zarudnutí břišní stěny a hmatná rezistence jsou časté i u dětí s úspěšnou konzervativní léčbou a jejich význam pro indikaci operace je proto jednotlivými lékaři hodnocen různě (Obr.3.).



Obr.3. Distenze s erytémem břišní stěny a hmatná rezistence jsou časté i u dětí s úspěšnou konzervativní léčbou a jejich význam pro indikaci operace je jednotlivými lékaři hodnocen různě.

1.2.1. Možnosti operační léčby NEC

Cílem chirurgické léčby je vyřešení intestinální patologie, zachování největší možné délky střev a obnovení střevní kontinuity. Obecně přijaté jsou dnes tyto možnosti chirurgického řešení - resekce postižených úseku a založení stomií, resekce postižených úseků a primární anastomóza nebo peritoneální drenáž. Léčba nezralých novorozenců s rozsáhlou víceložiskovou nebo totální NEC zůstává kontroverzní [6,11-17]. V případě nezralých novorozenců s NEC se jedná o operace novorozenců v septickém šoku a kritickém celkovém stavu, který vyžaduje kontinuální respirační a oběhovou podporu. Součástí přípravy na operaci je tedy léčba šoku, hypoxie a infekce. Je nutné optimalizovat ventilaci, korigovat acidózu, hypovolémii, anémii a trombocytopenii. Úkolem předoperační přípravy je maximální možná stabilizace novorozence, aby se zvýšila jeho schopnost zvládnout operační stres. Nezbytné je proto provedení operace přímo na lůžku JIP, aby se tak vyloučila rizika spojená s transportem nestabilního, nezralého novorozence na operační sál.

Resekce a založení stomie. Za bezpečné řešení akutního stadia NEC se považuje resekce postižených úseků a založení stomií [4,5]. Toto klasické řešení s sebou přináší nutnost další operace a riziko komplikací [18]. Častými komplikacemi jsou striktura nebo prolaps stomie a macerace kůže. Založení vysokých nebo vícečetných stomií je navíc komplikováno ztrátami tekutin a další ztrátou délky střeva při uzávěru stomií. Weber u stomií uvádí 34% reoperací a 44% komplikací při jejich uzávěru [19]. Fasoli dokonce zaznamenal nižší přežití (50%) ve skupině dětí řešených stomií ve srovnání s dětmi řešenými resekci a primární anastomózou (85%) [12].

Resekce a primární anastomóza. Další možností léčby je resekce postižených úseků a primární anastomóza. Předpokládá se, že resekce a primární anastomóza je vhodná jen pro izolované formy onemocnění a pro novorozence ve velmi dobrém celkovém stavu. U novorozenců NENPH je primární anastomóza považována za riskantní pro délku výkonu a pro riziko dehiscence, striktury a zalomení

anastomózy. Vaughan udává 16% riziko komplikací po primární anastomóze a doporučuje ji jen u stabilních dětí s lokalizovanou formou onemocnění [20]. Chandler primární anastomózu u novorozenců pod 1000g nedoporučuje ani u izolované formy NEC [4]. Fasoli naopak ve své studii 46 dětí operovaných pro víceohniskovou NEC zaznamenal vyšší přežití po resekci a primární anastomóze (85%) ve srovnání se založením stomií (50%) [12]. Jednalo se však o retrospektivní studii a je možné, že k založení stomií byly indikovány děti s horším onemocněním. Jako alterantivu k výše zmíněným metodám jsme v případech izolované perforace u NENPH novorozenců úspěšně použili T-drén ve formě iloestomie [21]. Tato metoda kombinuje výhody stomie (střevní dekomprese, možnost časného krmení, rychlost operačního výkonu) i primární anastomózy (obnovení střevní kontinuity, definitivní výkon).

Peritoneální drenáž. Při peritoneální drenáži se bodovou incisí v pravém podbřišku zavede do peritoneální dutiny drén, který odvádí střevní obsah a zánětlivý exudát. Během 24 hodin by mělo dojít ke zlepšení celkového stavu dítěte. Drén se ponechává po 7-10 dní, dokud odvádí mekonium nebo hnis. V některých případech je možné provést předrenování nebo zavést další peritoneální drén vlevo. Metodu jako resuscitační postup pro léčbu nestabilních novorozenců s komplikovanou NEC zavedl v roce 1977 Ein [22]. Za metodu bezprostřední resuscitace ji považuje také Ahmed, v jeho souboru 23 dětí s NEC léčených peritoneální drenáží si 19 dětí (83%) vyžádalo další operaci [23]. Naopak Morgan ji na základě svých zkušeností doporučuje i jako metodu definitivní léčby [24]. Peritoneální drenáž použil v souboru 29 dětí a dosáhl přežití 79% - pro 17 dětí (58%) byla peritoneální drenáž i definitivní léčbou, 6 dětí si vyžádalo další operaci. Cass použil peritoneální drenáž u 10 dětí s izolovanou perforací a u 11 dětí s NEC [25]. Ve skupině s izolovanou perforací dosáhl přežití 90% a jen dvě děti si vyžádaly další operaci. Naopak ve skupině s NEC si následnou laparotomii vyžádalo 8 dětí tj. 72% a dlouhodobé přežití bylo jen 27%. Podle našeho názoru může peritoneální drén přispět k předoperační stabilizaci v šokovém stadiu.

Vzhledem k rozsahu nekrotizací u rozsáhlých NEC, jak je nalézáme při operacích, je málo pravděpodobné, že by peritoneální drenáž mohla být definitivním řešením k obnovení kontinuity střeva.

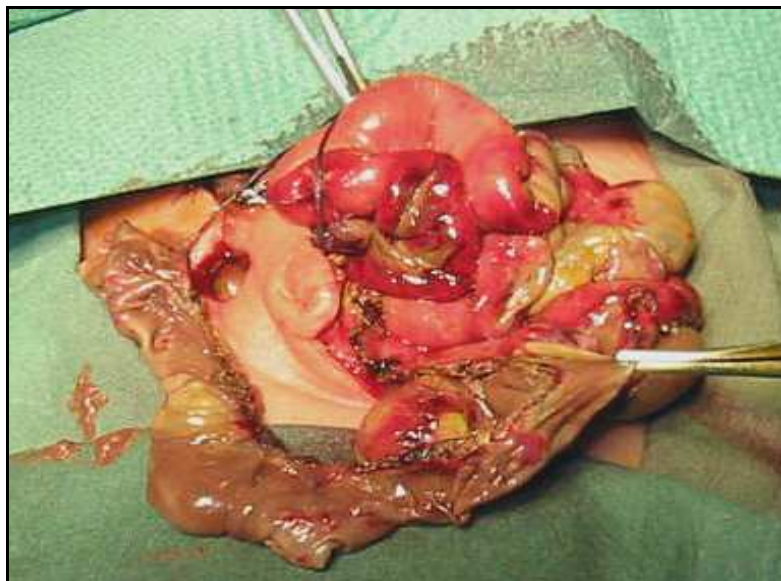
1.2.2. Léčba nezralých novorozenců s rozsáhlou víceložiskovou nebo totální NEC.

Klasická řešení (založení vícečetných stomií nebo provedení více anastomóz) jsou časově a technicky náročná a u nestabilního novorozence prakticky kontraindikované operační výkony. Cílem chirurgické léčby je prevence akutního břišního kompartmentu, odstranění nekrotických úseků střeva, zachování co největší délky střev a obnovení střevní kontinuity. Při rozsáhlé ischemii střeva se primárně neprovádí subtotální střevní resekce, neboť nekrotizace střeva nejsou dobře ohraničené a rozsah poškození se může dále měnit. V některých případech víceložiskové NEC zůstávají krátké úseky tenkého střeva vitální a o prognóze těchto pacientů rozhoduje zachování co největší délky tenkého střeva. S definitivním výkonem se vyčkává přibližně 48 hodin (second look operace). Prokrvení střeva se v té době může zlepšit a výsledná ztráta střeva bude v druhé době menší. Z těchto základních principů vychází většina v současnosti používaných operačních řešení: výše uvedená peritoneální drenáž [26,27], proximální derivační jejunostomie [27], metoda „provizorně ošetřít, zadrenovat a čekat“ („patch, drain and wait“) [28], metoda „zaklíp a vrať zpátky“ („clip and drop back“) [20] a metoda „laparotomie sledující průběh poškození“ („damage control laparotomy“) [29].

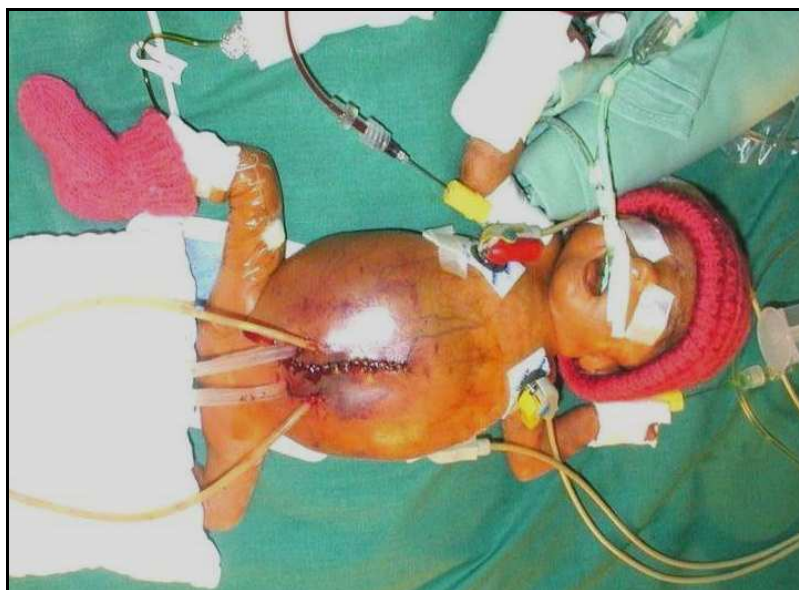
Při založení proximální derivační jejunostomie se ponechávají distální nekrotické segmenty in situ s výhledem dalších chirurgických intervencí po stabilizaci. Sugarman tímto postupem dosáhl přežití pěti z deseti dětí s rozsáhlým postižením [27]. Baniengbal naopak použití proximální jejunostomie odmítá pro velké ztráty tekutin a vysoký výskyt stomických komplikací [29]. Při rozsáhlém postižení s více perforacemi doporučuje Moore metodu „patch, drain and wait“

[28]. Při operační revizi se přešijí perforace a založí nitrobřišní drény. Metoda je spojena se vznikem píštělí a většina případů vyžaduje po úspěšné stabilizaci další operace. Vaughan doporučuje techniku „clip and drop-back“ kdy pomocí klipů nebo stapleru zresekuje nekrotické segmenty a uzavřené „vitální“ segmenty ponechá v peritoneální dutině [20]. Při druhé operaci za 48-72 hodin obnoví střevní kontinuitu anastomózami mezi vitálními úseky. Obdobnou možností je adaptační napojení krátkých vitálních segmentů na intubační sondě, Lessin uvádí dokonce spontánní autoanastomózu intestinálních segmentů na zavedené sondě [30]. Banieghbal a Davis popsali v roce 2004 techniku „Damage control laparotomy“ [29]. Po dvanácti hodinové předoperační stabilizaci resekovali nekrotické střevní segmenty, ostatní části střeva buď anastomozovali nebo podvázali jako izolované slepé úseky střeva. K second look operaci přistupovali až za 48-72 hodin, kdy byl rozsah poškození střeva zřejmý a umožnil dokončit excizi nekróz a obnovení kontinuity střeva.

Při totální NEC - postižení většiny střeva od Treitzova vazy po střední tlusté střevo je naděje na úspěšné chirurgické řešení a přežití pacienta velmi omezená (Obr.4.) a přežití je spojeno se syndromem krátkého střeva. Rowe udává úmrtnost 93% a Voss dokonce 100% [6,31]. Rozsáhlá ztráta tenkého střeva při difuzní či totální NEC je spolu s volvulem středního střeva, jejunoileálními atreziemi a vrozenými defekty stěny břišní nejčastější příčinou syndromu krátkého střeva (SBS – short bowel syndrom) v dětském věku [32-34].



Obr.4. Operační nález při víceložiskové NEC. Při rozsáhlé ischemii střeva se primárně neprovádí subtotální střevní resekce, neboť nekrózy střeva nejsou dobře ohraničené a rozsah poškození se může dále měnit.



Obr.5. Totální NEC - postižení většiny střeva od Treitzova vazů po střední kolon. Pacient po operaci ve smyslu "patch, drain and wait". Naděje na přežití pacienta je omezená a přežití bývá spojeno se syndromem krátkého střeva.

1.3. Syndrom krátkého střeva

Syndrom krátkého střeva (vžitá zkratka SBS z anglického short bowel syndrom) je obecně definován jako rozsáhlá ztráta tenkého střeva vedoucí k nedostatečné absorpci enterálních živin. SBS je sdružen s vysokou morbiditou a mortalitou 15-40% [33,35]. Wilmore v roce 1972 uvedl, že pro přežití novorozence se SBS je nezbytných minimálně 40 cm tenkého střeva pokud nemá zachovanou ileocékální chlopeň (IC), nebo 15cm střeva a zachovaná IC chlopeň. Přežití při zachování méně než 15 cm tenkého střeva je nepravděpodobné [36]. Zachování ileocékální chlopně je významné pro rychlejší adaptaci zbylého tenkého střeva [32] a pro snížení výskytu enterogenních sepsí. Přesnějším parametrem než absolutní délka zachovaného střeva je % délky. Délka střeva se v průběhu intrauteriního vývoje plodu zvětšuje více než 2x [37] a délku zbylého střeva je tedy nutné vztáhnout ke gestačnímu věku. U donošeného novorozence lze za SBS považovat zachování méně než 40% (70 – 75 cm) tenkého střeva. Spencer při analýze souboru 80 dětí se SBS zjistil, že děti se zachováním >10% střeva přežily v 88%, naopak děti s méně jak 10% střeva přežily jen ve 21% [32].

Prevence vzniku SBS tedy začíná již při prvotní operaci novorozenců s rozsáhlým postižením NEC, při které je nutné zachovat každý potenciálně vitální úsek tenkého střeva [38-40]. Prevence vzniku SBS spočívá v rychlém odstranění jednoznačně nekrotických střevních úseků, v zachování všech vitálních i potencionálně vitálních úseků tenkého střeva a v jejich spojení mnohočetnými střevními anastomózami (SA). Standardní SA je v těchto případech časově náročná a pro nevyzrálé a zánětem postižené střevo zatěžující technika. Rychlé zhotovení primární střevní anastomózy pomocí staplerů, jak jej známe z dospělé chirurgie, je u novorozenců nízké porodní hmotnosti limitováno malým průměrem střeva a nedostupností komerčně vyráběných staplerů odpovídající velikosti [41,42].

2. Cíle disertační práce

Hypotéza

Použití standardní střevní anastomózy (SA) u nezralých novorozenců o velmi nízké a extrémně nízké porodní hmotnosti je limitováno kritickým celkovým stavem a rozsahem střevního postižení. Navržená technika aproximační střevní anastomózy (ASA) umožní definitivní a časově nenáročný výkon vhodný pro obnovení integrity střeva u těchto novorozenců a pro prevenci SBS u pacientů s rozsáhlou NEC.

Technika aproximační anastomózy používá k obnovení kontinuity střevního lumen a k zajištění integrity anastomózy minimální množství jednotlivých stehů. K úspěšnému zhojení aproximační anastomózy přispěje zachování adekvátní perfuze okrajů rány a specifické reparační schopnosti nezralých novorozenců.

Cíle

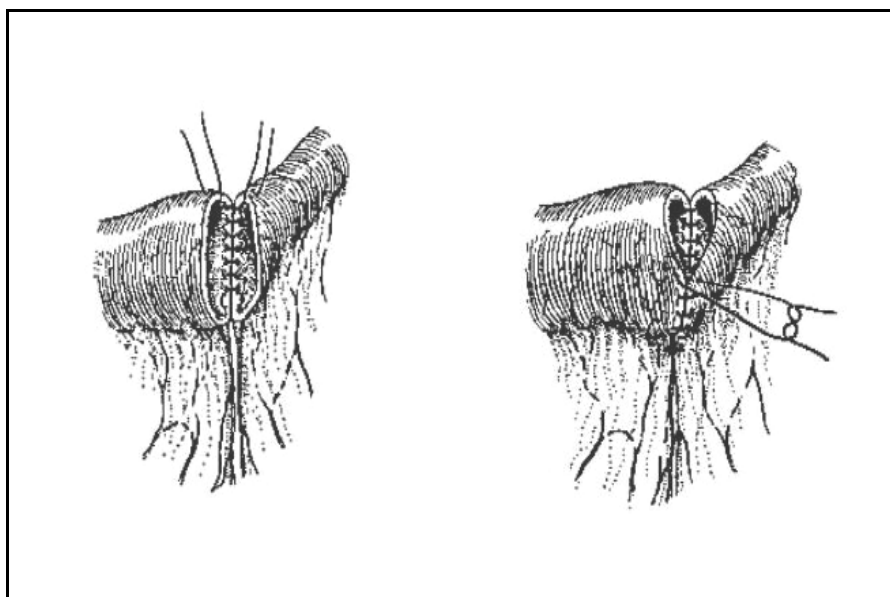
1. Experimentální ověření techniky aproximační střevní anastomózy (ASA), při které je integrita a kontinuita střeva zajištěna redukováným množstvím seromuskulárních stehů. .
2. Stanovení mechanických vlastností aproximační střevní anastomózy.
3. Stanovení aktivity kolagenolytických enzymů při použití aproximační střevní anastomózy.
4. Porovnání výsledků mezi aproximační a standardní střevní anastomózou.

3. Materiál a metody

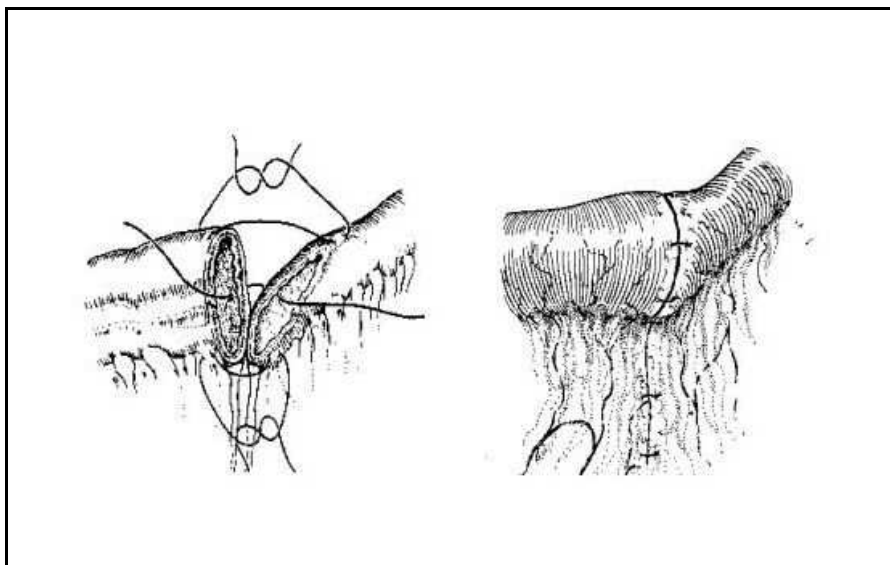
3.1. Experimentální studie

Experiment byl proveden na skupině 22 krysích samců (Wistar) o hmotnosti 194-256g. Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin. Ve skupině SA byla zvířata s konvenční střevní anastomózou (Obr.5.), ve skupině ASA byla zvířata s aproximační střevní anastomózou (Obr.6.). Obě skupiny byly porovnány podle operačního času, klinického průběhu po operaci, váhového přírůstku, zhojení anastomózy, výskytu adhezí, pevnosti anastomózy vůči zvyšujícímu se intraluminálnímu tlaku a aktivity kolagenolytických enzymů. Měření byla prováděna první a sedmý den po zhotovení anastomózy.

Experiment byl proveden v souladu s Helsinskou konvencí a směrnicemi Evropské unie pro používání experimentálních zvířat. Projekt pokusů byl schválen Komisí pro výzkum na zvířatech 2.LF UK.



Obr.5. Schéma standardní jednovrstevné anastomózy jednotlivými stehy



Obr.6. Schéma aproximační anastomózy ušité pomocí redukovaného množství stehů

3.1.1 Vlastní experiment

Zvíře bylo lačné 12 hodin před operací a 12 hodin po operaci. Přístup k tekutinám byl bez omezení. K celkové anestézii byl použit thiopental v dávce 5mg na 100g tělesné hmotnosti podaný intraperitoneálně. Po vyholení kůže na břicho a po dezinfekci pole následovala 3cm dlouhá incize ve střední čáře. Do rány byl luxován ileocékální (IC) přechod, další operační postup se lišil podle typu anastomózy.

Aproximační střevní anastomóza: Po skeletizaci byl resekován 3 cm úsek tenkého střeva 15cm proximálně od IC přechodu (Obr.9.). Kontinuita střeva byla obnovena anastomózou end to end v jedné vrstvě, která obsahovala pět seromuskulárních stehů. Šicím materiálem byl Prolene 7.0 (polypropylene, fa Ethicon) (Obr.7.).

Standardní střevní anastomóza: Po skeletizaci byl resekován 3 cm úsek tenkého střeva 15cm proximálně od IC přechodu. Kontinuita střeva byla obnovena běžnou anastomózou end to end v jedné vrstvě seromuskulárními stehy Prolene 7.0 (polypropylene, fa Ethicon). Celkový počet stehů kolísal mezi 9-10. (Obr.8.).

Po uzavření defektu v mesenteriu, byly kličky střevní u obou typů anastomózy uloženy do dutiny břišní a operační rána byla uzavřena ve dvou vrstvách nevstřebatelným materiálem Prolene 4.0 (polypropylene, fa Ethicon).

Časem operace se rozumí doba od založení prvního stehu po dokončení střevní anastomózy posledním stehem.

Klinický stav

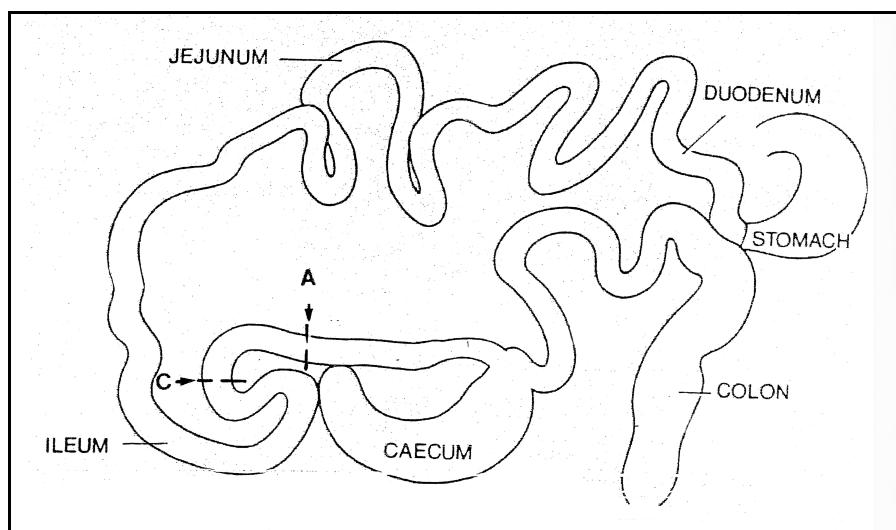
Po operaci byl denně hodnocen celkový stav zvířat, pasáž stolice a váhový přírůstek. Šest zvířat bylo reoperováno první a dvanáct zvířat sedmý den po zhotovení anastomózy byla zvířata reoperována opět v anestézii thiopentalem. Dutina peritoneální byla otevřena původní jizvou a bylo zhodnoceno množství nitrobřišních abscesů, počet srůstů a makroskopický vzhled zhojené střevní anastomózy. Počet srůstů udával počet adhesí jednotlivých orgánů (okolní střevo, gonády, omentum, k anastomóze). Za dilataci byl označen poměr průměru střeva před a za anastomózou > 2:1.



Obr.7. Peroperační snímek aproximační střevní anastomózy, zhotovené s použitím 5 seromuskulárních stehů



Obr.8. Peroperační snímek standardní střevní anastomózy, zhotovené s použitím 10 seromuskulárních stehů

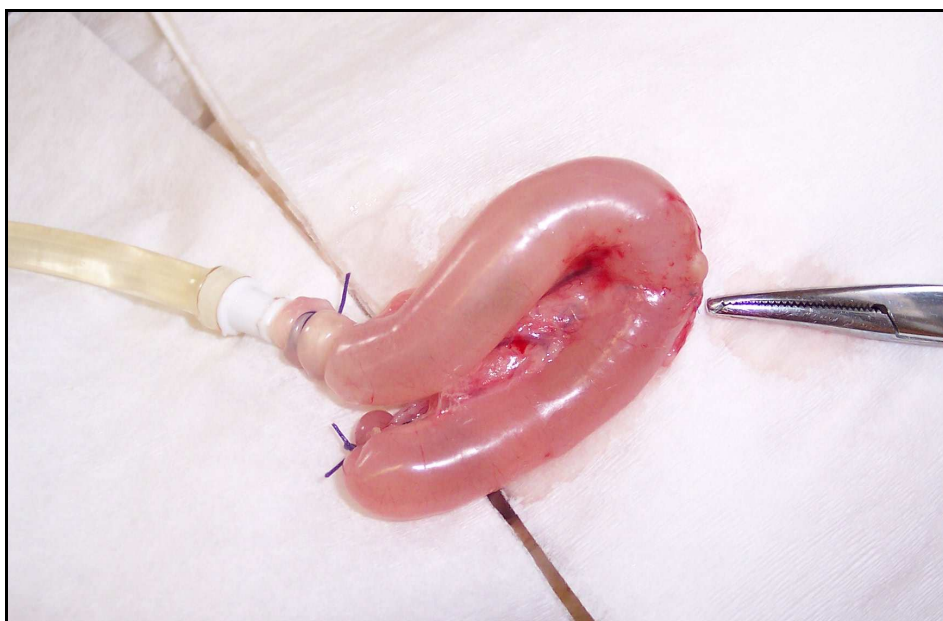


Obr.9. Schéma gastrointestinálního traktu laboratorního potkana. Šipkami označena místa: A - místo resekce terminálního ilea a následné anastomózy, C – místo neoperovaného ilea pro kontrolní měření a odběr kontrolního vzorku.

3.1.2. Stanovení pevnosti anastomózy

Pevnost zhojení anastomózy byla určována změřením intraluminálního tlaku při kterém nastane porušení integrity střevní stěny v oblasti anastomózy. Bez uvolnění adhezí a s minimální manipulací bylo střevo 3cm pod anastomózou dvojitě podvázáno stehem Ethibond 3.0 (polyester, fa Ethicon). Ve vzdálenosti 3 cm nad anastomózou byl do střeva zaveden a dvojitým stehem Ethibond fixován katétr pro měření tlaku (Obr.10.). Katétrems jsme plnili střevní lumen fyziologickým roztokem rychlostí 1 ml/min a katétr současně sloužil k kontinuálnímu registraci intraluminálního tlaku (ADInstruments PowerLab Systems). Za pevnost anastomózy byl považován vrcholový intraluminální tlak záznamové křivky (Obr.13.), při kterém se objevil únik tekutiny v oblasti anastomózy (dehiscence anastomózy) nebo tlak při kterém došlo k makroskopickému poškození střevní stěny mimo anastomózu, která zůstávala

pevná. U každého zvířete se obdobným postupem změnila pevnost stěvné stěny vůči intraluminálnímu tlaku na střešním segmentu proximálně od anastomózy (Obr.9. místo C) a tato měření sloužila jako kontrolní skupina. Měření probíhala totožně první i sedmý den po zhotovení anastomózy.



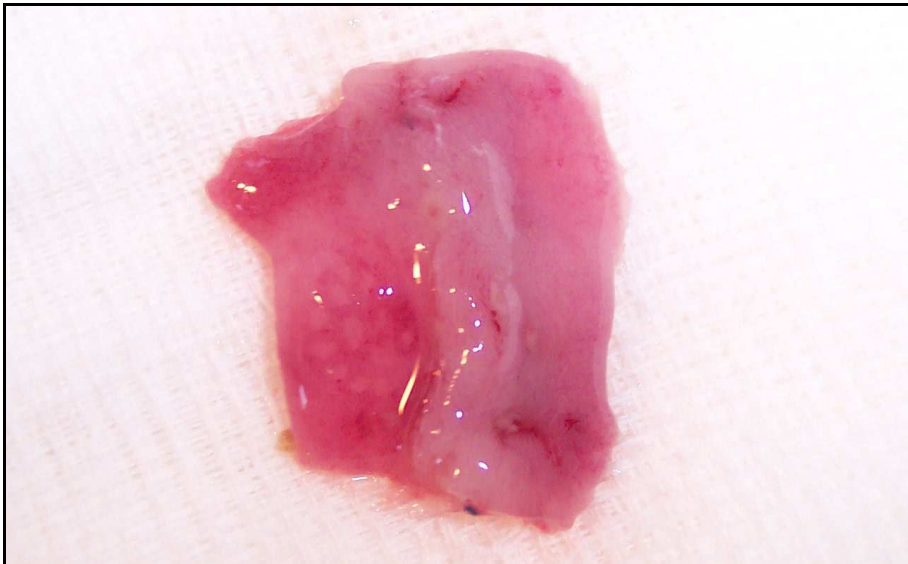
Obr.10. Měření pevnosti anastomózy. Ve vzdálenosti 3 cm nad anastomózou byl do střeva zaveden a dvojitým stehem Ethibond fixován katétr pro měření tlaku. Katérem jsme plnili střešvní lumen fyziologickým roztokem rychlostí 1 ml/min a katétr současně sloužil k kontinuálnímu registraci intraluminálního tlaku. Oblast zhojené aproximační anastomózy je označen nástrojem

3.1.3. Stanovení aktivity kolagenolytických enzymů

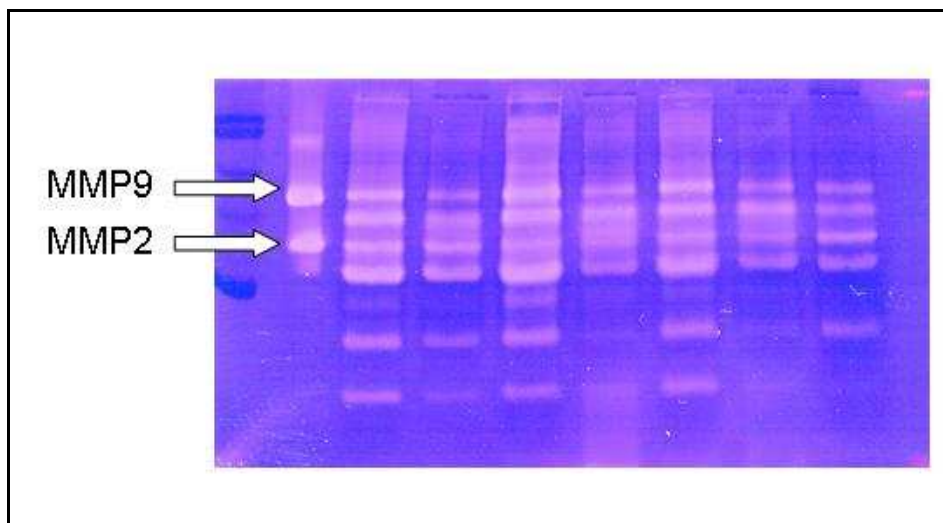
Pro měření aktivity kolagenolytických enzymů jsme použili techniku zymografie, která je odvozená od techniky SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel elektroforéza). SDS-PAGE se používá v biochemii, genetice a molekulární biologii k separaci proteinů podle jejich elektroforetické mobility. Použití SDS (sodium dodecyl sulfate) linearizuje proteiny, které tak mohou být separovány striktně podle molekulové hmotnosti. Od SDS-PAGE je odvozená zymografie, při které se substrát kopolymerovaný s polyacrylamid gelem používá pro detekci enzymové aktivity. Pro průkaz aktivity želatin-degradujících proteáz se jako substrát používá želatina.

Po změření pevnosti anastomózy vůči intraluminálnímu tlaku se resekoval 5mm dlouhý úsek střeva s centrálně umístěnou anastomózou (Obr.9. Místo A). Od každého zvířete se odebral kontrolní vzorek z neoperovaného střeva z oblasti proximálně od anastomózy (obr.9. místo. C). Odebrané vzorky střeva byly podélně rozstříženy a 3x propláchnuty ve fyziologickém roztoku pro odstranění zbytků stravy a střevního hlenu (Obr.11.). Následně byly vzorky zmrazeny a až do stanovení aktivity kolagenolytických enzymů metodou zymografie byly skladovány při teplotě -40°C . Vzorky střevní stěny (15 objemových jednotek/suché váhy) byly homogenizovány a extrahovány do pufru pro SDS-PAGE elektroforézu (0,5M Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% glycerol, 0,05% bromfenolová modř) a inkubovány 24 hodin v 4°C . Poté byly nanесeny na 10% SDS-PAGE gel se želatinou (1 mg/ml) a bylo provedeno elektroforetické dělení. Pro odstranění SDS byl gel 2x promyt 10 minut ve 2,5% Triton X-100. Triton byl poté odstraněn promytím gelu v destilované vodě a s inkubačním pufrem (50mM Tris-HCl, pH 7,8, 10mM CaCl_2 , 10mM NaCl). Následovala inkubace gelu 17 hodin při teplotě 37°C v inkubačním pufru. Gely byly obarveny pomocí 0,25% Coomassie Brilliant Blue R v roztoku metanol, kyselina octová, voda (40:10:50 v/v/v) a odbarvení bylo provedeno stejným roztokem. Kit vysoké molekulové hmotnosti (fa. Pharmacia Biotech) byl použit jako standard pro kalibraci.

Želatinázy MMP2 a MMP9 (Human recombinant, fa. Oncogene research products)) byly elektroforezovány na každém gelu jako interní standard. Proteolytická aktivita byla vizualizovaná jako čisté zóny odpovídající lyze želatiny (Obr.12.). Lytické zóny byly analyzovány densitometricky s použitím 1d software ElfoMan 2,0 pro měření elektroforeogramové density navrženého ing. Jiřím Semeckým (Praha CR) (Obr.15,16). Kvantifikace různé enzymové aktivity, která byla vyjádřena jako arbitrážní jednotky na základě lyzované plochy.



Obr.11: Vzorek ilea s centrálně umístěnou linií stehu připravený k dalšímu zpracování pro určení aktivity želatinám v oblasti anastomózy.



Obr.12. Aktivita MMP2 a MM-9 je zobrazena jako zóny projasnění pozadí zymografického gelu. V prvním sloupci jsou šipkami označeny aktivity standardů MMP2 a MMP9 (Human recombinant, fa. Oncogene research products).

Statistické metody:

Ke statistickému zhodnocení výsledků byl pro hodnocení průměrů použitý jednostranný test ANOVA. Pro zhodnocení želatinové zymografie byl použitý v návaznosti na software Elfoman test Fischer PSLD. Ve skupinách s malým počtem dat a v případech výrazného rozptylu byl použitý neparametrický test Kruskal Wallis. Jako statisticky významnou jsme používali hodnotu $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1.1. Operační nálezy

Žádné zvíře neuhynulo na komplikace spojené s ušitím anastomózy. Dvě zvířata uhynula po operaci na útlum dechového centra způsobený anestézií. Pasáž stolice se obnovila v průběhu 1. pooperačního dne. U žádného zvířete jsme při 2. operaci nenalezli nitrobřišní absces, ani jiné známky dehiscence anastomózy. Při měření 7. den byly anastomózy u všech zvířat zhojeny a průchozí.

Průměrný čas operace hodnocený v souboru všech 22 zvířat byl signifikantně kratší ve skupině s aproximační anastomózou než ve skupině s konvenční anastomózou ($16 \pm 7,1$ minut oproti $23,6 \pm 6,2$ minut, $p=0,016$). V průběhu experimentu byl zřejmý vliv získaných zkušeností (learning curve) na celkovou délku operace, významné zkrácení operačního času bylo zaznamenáno u obou typů anastomóz (ASA i SA). Při odděleném vyhodnocení operačního času u prvních 12 zvířat a následných 10 zvířat byl čas ve skupině ASA vždy signifikantně kratší než ve skupině SA ($22,5 \pm 3,2$ oproti $28,2 \pm 1,5$, $p=0,007$ v první skupině, resp $9,7 \pm 1,3$ oproti $16,7 \pm 2,7$, $p=0,01$ v druhé operované skupině).

Průměrný váhový přírůstek 7. den po operaci byl 41 ± 9 g ve skupině s aproximační anastomózou a 22 ± 33 g ve skupině s konvenční. Pokles váhy (max do 4%) typický pro 1.pooperační den odpovídá omezení příjmu potravy v souvislosti s operací a nebyl proto podroben statistické analýze.

Srůsty k oblasti anastomózy se vyskytly u 72% zvířat s aproximační anastomózou a u 77% zvířat s konvenční anastomózou. Rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Rozdíl v počtu srůstů mezi oblastí anastomózy a jednotlivými orgány také nebyl mezi ASA a SA signifikantní ($1,4 \pm 0,8$ oproti $1,4 \pm 1,1$, $p=0,9$).

Preanastomotickou dilataci (poměr průměru střeva před anastomózou a za anastomózou větší než 2:1 hodnocený ve skupině 7 den po operaci.) jsme našli u 1 zvířete (16%) ve skupině s aproximační anastomózou a u 2 zvířat (33%) ve skupině s konvenční anastomózou. Data z experimentu na zvířatech je v tabulkách 4 a 5.

4.1.2. Pevnost anastomózy

Pevnost aproximační anastomózy hodnocená vrcholovým intraluminálním tlakem první den po operaci (Obr.13.) byla 55 ± 15 torr, pevnost konvenční anastomózy byla 55 ± 42 torrů ($p = 1$). Pevnost obou typů anastomózy byla 1. den po operaci signifikantně nižší než pevnost neoperovaného střeva.

Pevnost aproximační anastomózy hodnocená vrcholovým intraluminálním tlakem sedmý den po operaci (Obr.14.) byla 249 ± 39 torr, pevnost konvenční anastomózy 218 ± 23 torr ($p = 0,118$). Pevnost obou typů anastomózy byla 7. den po operaci nižší než pevnost neoperovaného střeva, rozdíl nebyl signifikantní.

	ASA	SA	P
Čas operace (min)	$16 \pm 7,1$	$23,6 \pm 6,2$	0,016
Pevnost anastomózy 1.den (torrů)	55 ± 15	55 ± 42	1,00
Pevnost anastomózy 7.den (torrů)	249 ± 39	218 ± 23	0,118
Pevnost střeva (torrů)	299 ± 56	241 ± 33	0,070
Váhový přírůstek (g)	41 ± 9	22 ± 33	0,198
Počet adhezí	$1,4 \pm 0,8$	$1,4 \pm 1,1$	0,9

Tabulka 3.: Porovnání výsledků mezi aproximační (ASA) a standardní střevní (SA) anastomózou. Pro hodnocení je použitý test Anova, při hladině statistické významnosti $P < 0,05$, (data jsou uvedena jako průměr \pm SD)

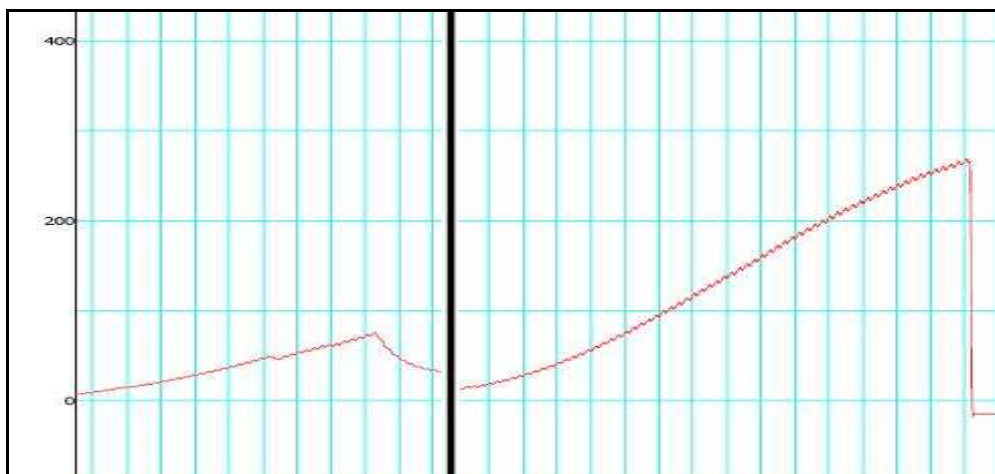
	zvíře-kód	anastomóza	adhese	dilatace	tlak S	tlak A	čas	přírůstek
1	281102	SA	1	0	n	252	27	62
2	281100	SA	1	0	235	199	27	38
3	291101	SA	0	1	270	198	27	-2
4	291102	ASA	1	0	222	220	22	44
5	291100	ASA	0	1	244	207	18	42
6	301101	ASA	0	0	327	304	25	48
7	301100	ASA	2	0	368	264	27	44
8	11202	ASA	1	0	307	280	23	44
9	11200	SA	2	0	253	242	30	48
10	41201	SA	3	0	261	211	28	10
11	41202	SA	3	1	186	204	30	-26
12	41200	ASA	2	0	328	221	20	24

Tabulka 4: Data ze skupiny – měření 7. den po operaci

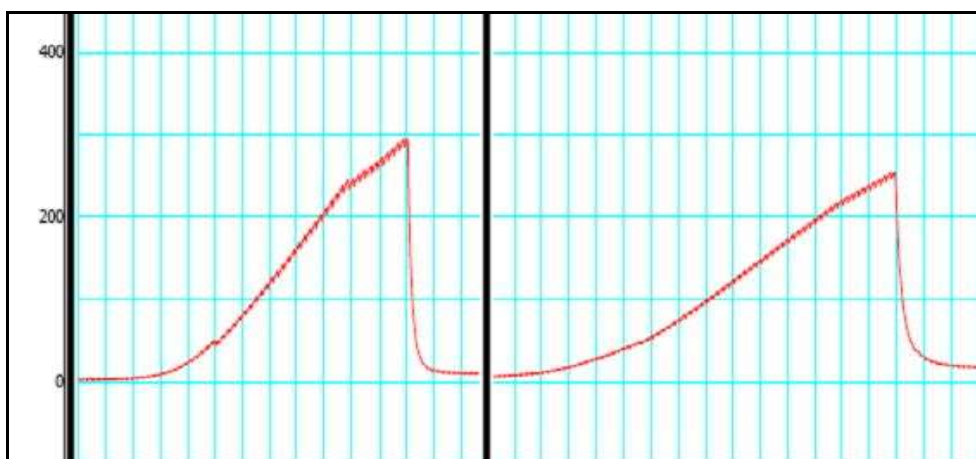
	zvíře-kód	anastomóza	adhese	dilatace	tlak S	tlak A	čas	přírůstek
13	220501	SA	2	0	212,4	96,7	20	-6
14	220502	ASA	n	n	n	n	9	n
15	220503	ASA	2	0	n	n	10	-2
16	220504	SA	0	0	176	54,7	18	-6
17	220505	ASA	2	0	229,3	38,1	9	+4
18	220506	ASA	2	0	249	51	12	-6
19	240501	SA	n	n	n	n	15	n
20	240502	ASA	2	0	268	74,3	10	-4
21	240503	SA	1	0	179	12,9	14	+2
22	240500	ASA	1	0	242	56,7	8	-8

Tabulka 5: Data ze skupiny – měření 1. den po operaci

Společná legenda tabulky 4. a 5.: SA = standardní anastomóza, ASA = aproximační anastomóza, adhese = počet adhesí jednotlivých orgánů k anastomóze, dilatace = poměr průměru střeva před a za anastomózou > 2:1, tlak S – intraluminální tlak v místě neoperovaného střeva, tlak A = intraluminální tlak v místě anastomózy, čas = čas od naložení prvního stehu po dokončení posledního stehu anastomózy, přírůstek = váhový přírůstek od operace po den měření (1. nebo 7. den).



Obr.13. Pevnost aproximační anastomózy 1. den po operaci při zvyšujícím se intraluminálním tlaku První křivka zobrazuje vrcholový tlak v oblasti anastomózy, který je významně menší než tlak v oblasti proximálního neoperovaného střeva na druhé křivce. Prudký pokles tlaku odpovídá okamžiku porušení integrity střevní stěny.



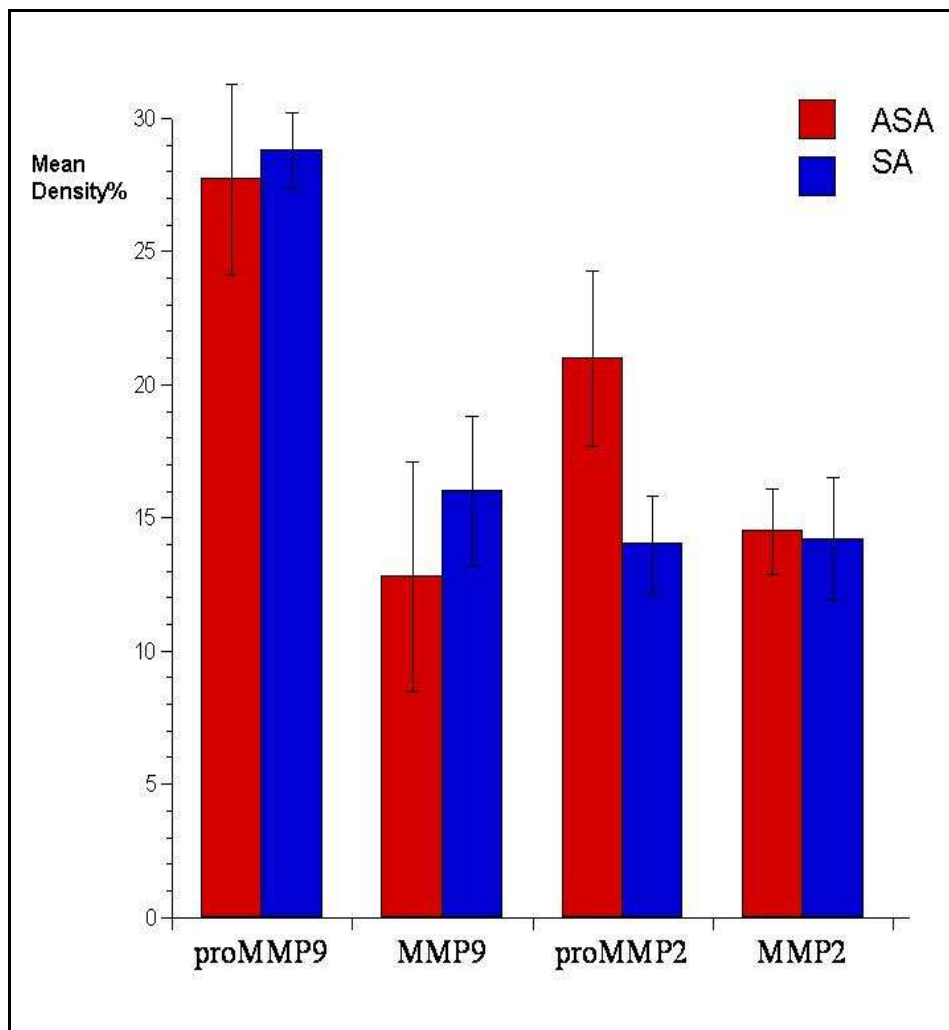
Obr.14. Pevnost aproximační anastomózy 7. den po operaci při zvyšujícím se intraluminálním tlaku. První křivka je kontrolním záznamem z oblasti proximálního neoperovaného střeva, druhá křivka zobrazuje tlak v oblasti anastomózy. Prudký pokles tlaku odpovídá okamžiku porušení integrity střevní stěny.

4.1.3. Aktivita kolagenolytických enzymů

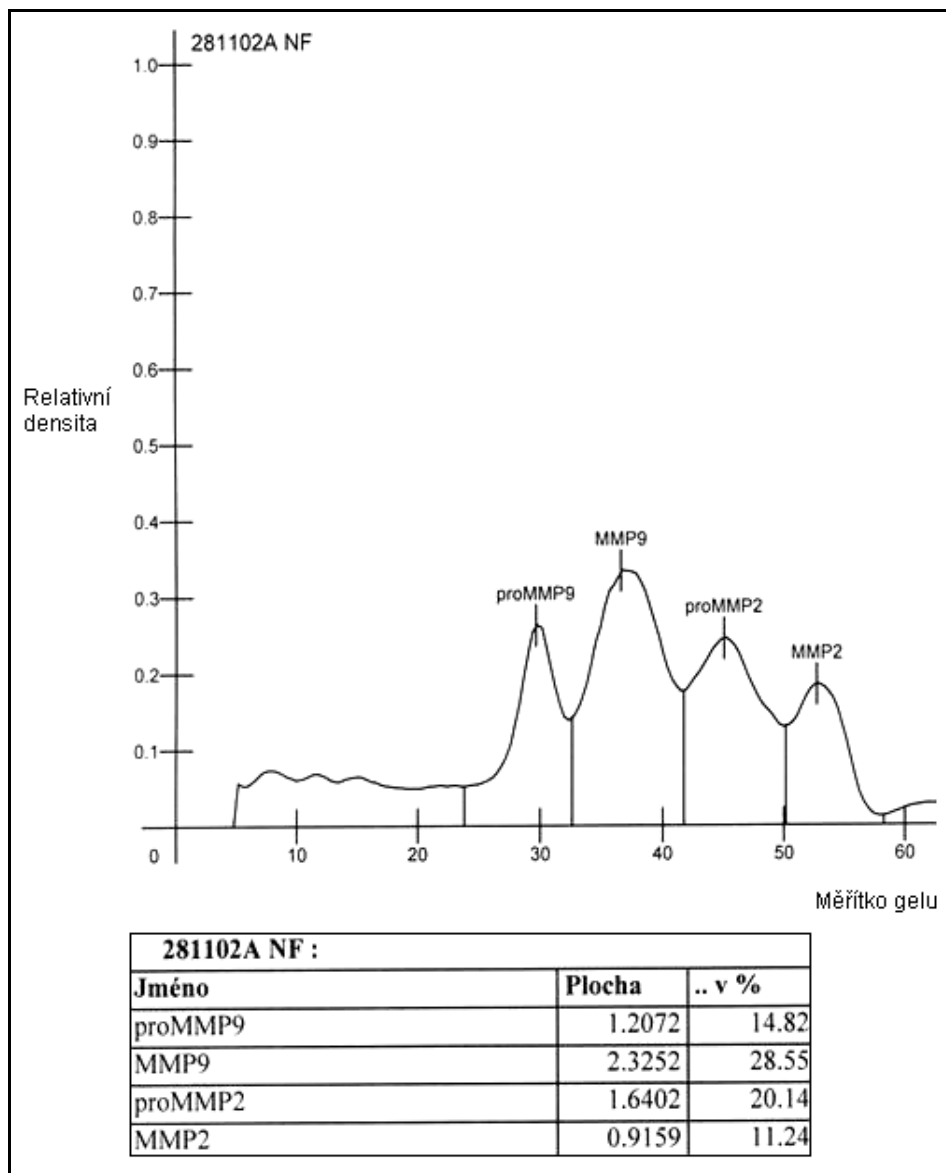
Ve vzorcích střevní stěny z místa anastomózy byl 1. den po operaci prokázán signifikantní vzestup enzymatické aktivity proenzymu MMP9 ve srovnání se vzorky z proximálního neoperovaného střeva ($p=0,022$ pro ASA a $p=0,025$ pro SA). Rozdíly v aktivitě enzymů mezi anastomózami SA a ASA nebyly signifikantní (Graf.1). Aktivita enzymů MMP9, MMP2 a proMMP2 byla ve vzorcích z oblasti anastomózy i v kontrolních vzorcích stejná.

Ve vzorcích 7. den po operaci byl prokázán signifikantní vzestup enzymatické aktivity MMP2 a proMMP9 v oblasti obou typů intestinální anastomózy ve srovnání s proximálním neoperovaným střevem ($p=0,01$ resp. $0,03$). Rozdíly v aktivitě MMP2 MMP9 a jejich proenzymů mezi anastomózami SA a ASA nebyly signifikantní. Nárůst aktivity byl zaznamenán pouze v oblasti střevní stěny blízké anastomóze, v kontrolních vzorcích z oblasti neoperovaného střeva se aktivita enzymů nezvýšila.

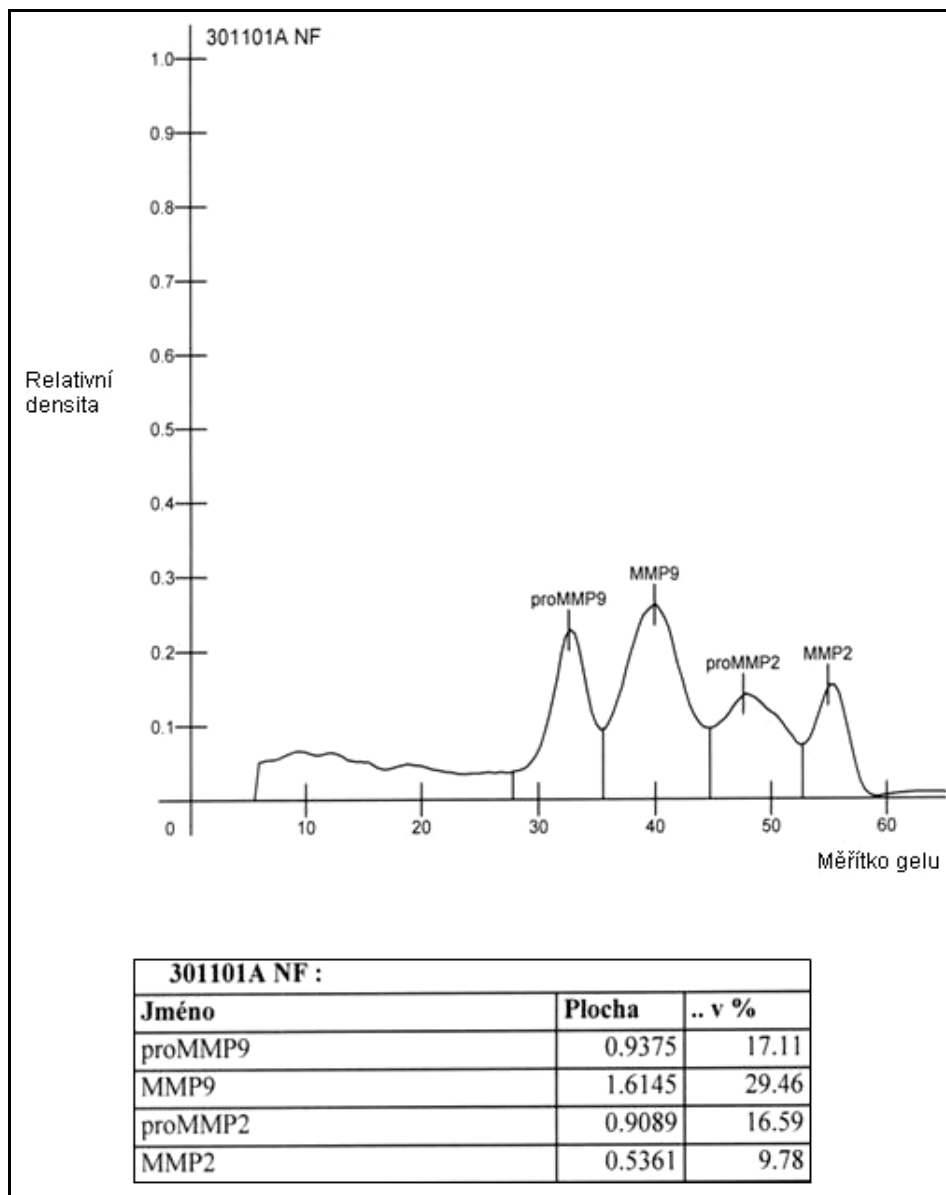
Křivky densitometrického zpracování želatinové zymografie jsou na obr. 15.16. Statistické zpracování výsledků želatinové zymografie a statisticky významné výsledky při $< 0,05$ jsou ve grafech ve grafech 2 - 4.



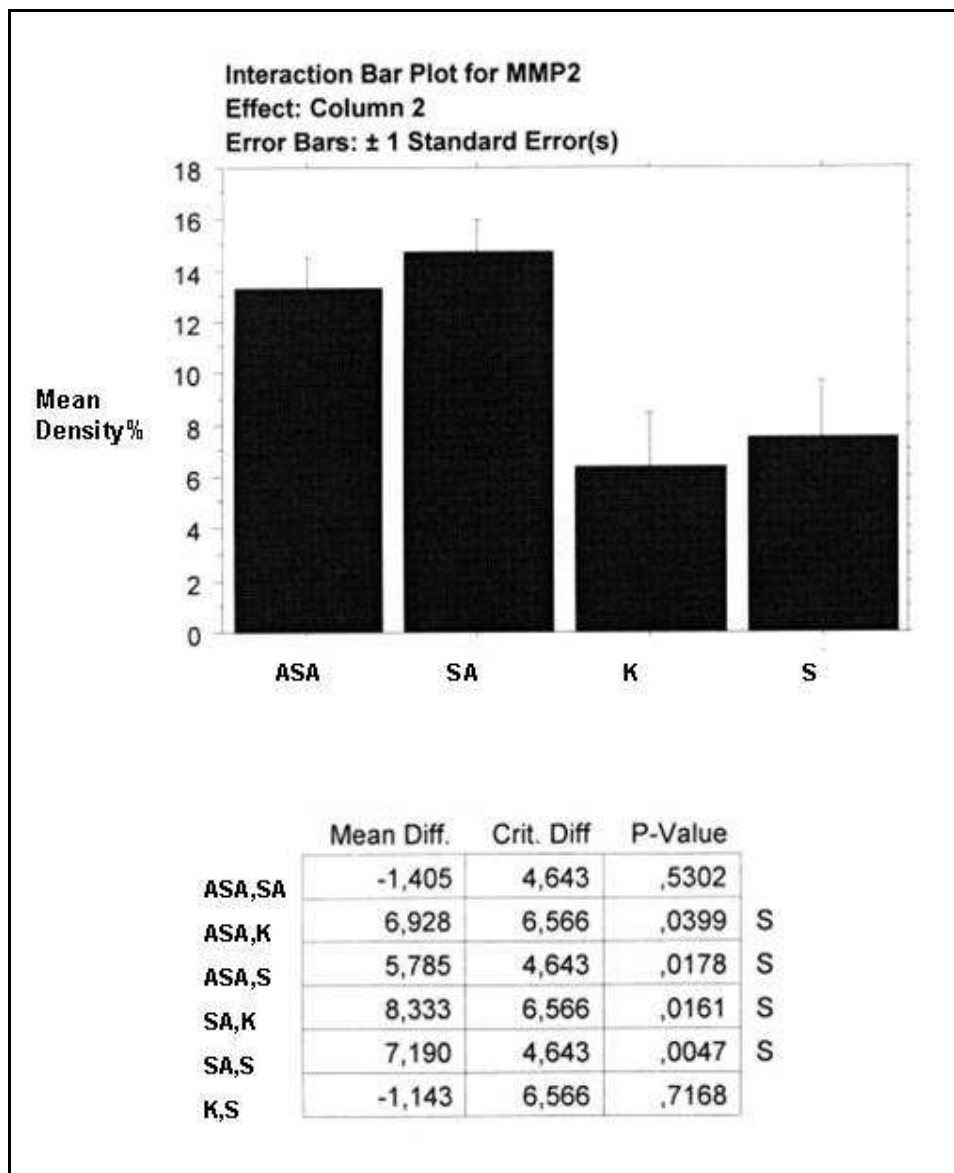
Graf 1: Porovnání aktivity želatináz(MMP9, MMP2) a jejich proenzymů (proMMP9 a proMMP2) ve vzorcích stěvní stěny z oblasti aproximační anastomozy ASA a standardní anastomozy SA. Rozdíly v aktivitě nejsou .1 den po operaci signifikantní



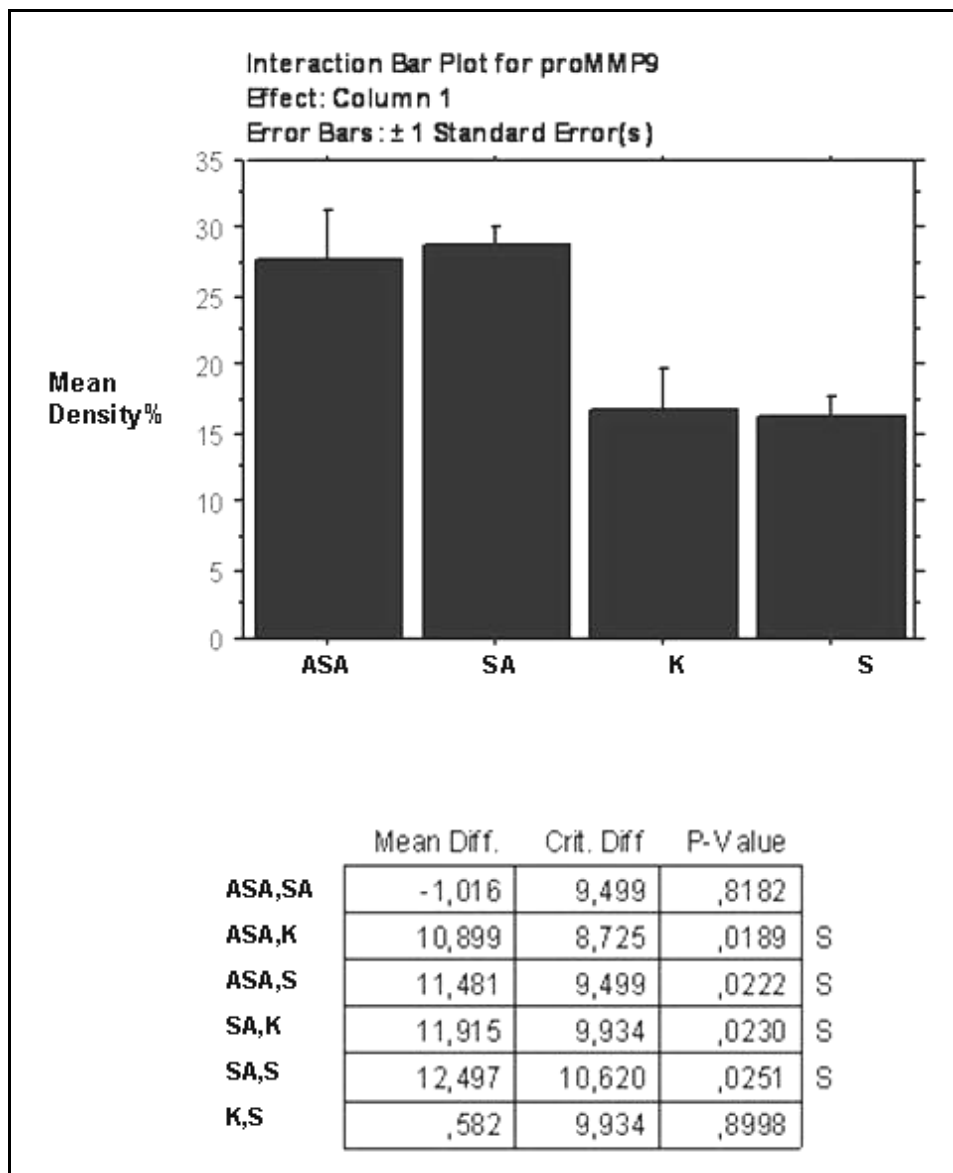
Obr15. Křivka densitometrického vyhodnocení zymografie – aktivita želatináz MMP2, MMP9 a jejich proenzymů (proMMP2 a proMMP9) ve střevní stěně v místě standardní anastomózy 7.den po operaci (281102A)



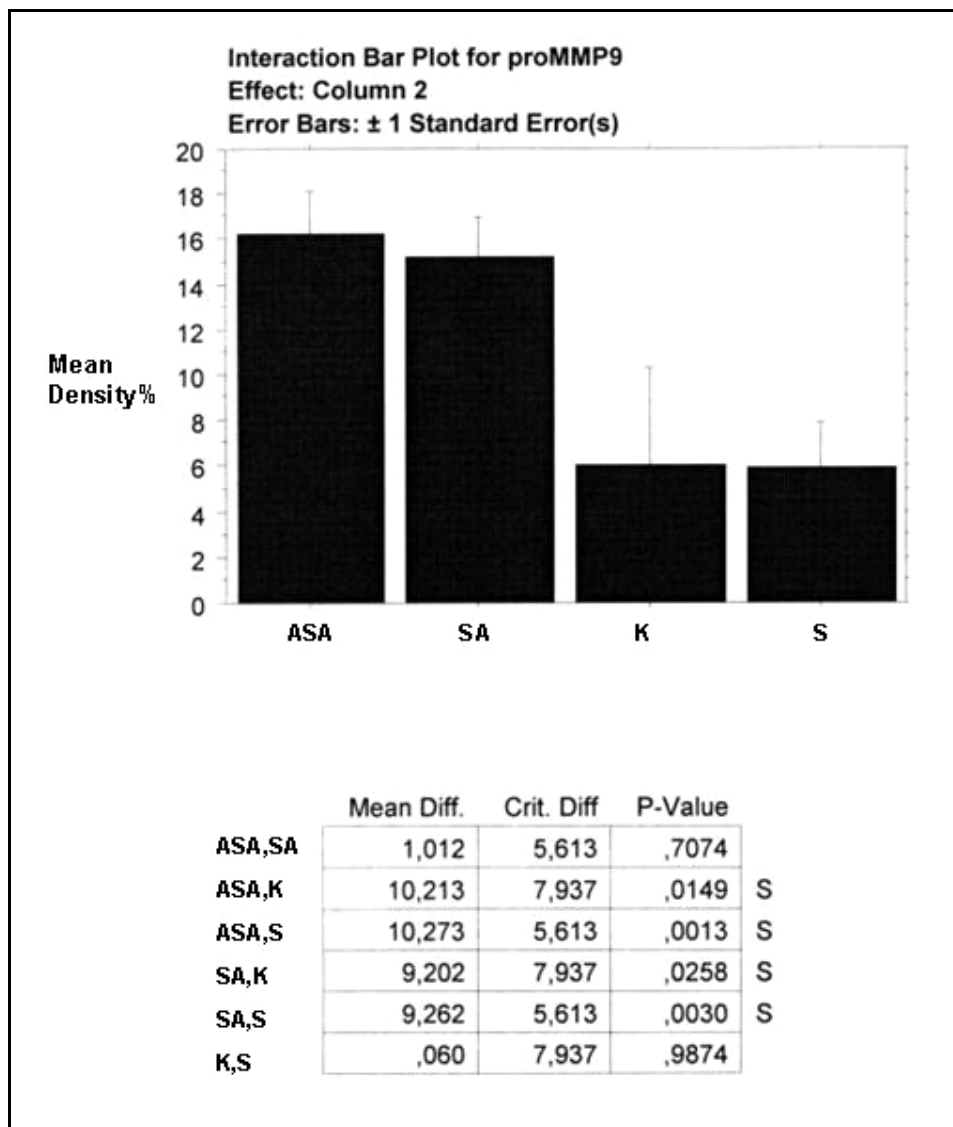
Obr.16. Křivka densitometrického vyhodnocení zymografie – aktivita želatináz MMP2, MMP9 a jejich proenzymů proMMP2 a proMMP9 ve střešní stěně v místě aproximační střešní anastomózy 7 den po operaci (vzorek 301101A)



Graf 2. Statistické vyhodnocení aktivity želatinázy MMP2 7 den po operaci ve vzorcích: ASA=aproximační anastomóza, SA=standardní anastomóza, S=kontrolní vzorek střevní stěna mimo oblast anastomózy, K=kontrolní vzorek střevní stěny neoperovaného zvířete. Aktivita želatinázy proMMP2 je signifikantně zvýšena ve vzorcích z míst anastomózy (ASA,SA) oproti vzorkům mimo oblast anastomózy (S,K). Mezi jednotlivými typy anastomóz(ASA,SA) není signifikantní rozdíl v aktivitě želatinázy proMMP2.



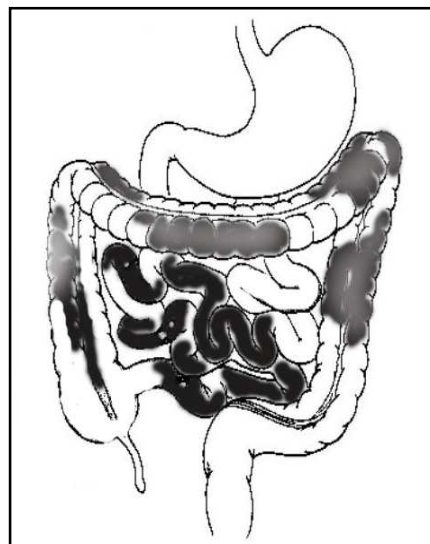
Graf 3: Statistické vyhodnocení aktivity želatinázy proMMP9 1. den po operaci ve vzorcích: ASA = aproximační anastomóza, SA = standardní anastomóza, S=kontrolní vzorek střevní stěna mimo oblast anastomózy, K=kontrolní vzorek střevní stěny neoperovaného zvířete. Aktivita želatinázy proMMP9 je signifikantně zvýšena ve vzorcích z míst anastomózy (ASA, SA) oproti vzorkům mimo oblast anastomózy (S,K). Mezi jednotlivými typy anastomóz ASA a SA není signifikantní rozdíl v aktivitě proenzymu želatinázy MMP9



Graf 4: Statistické vyhodnocení aktivity želatinázy proMMP9 7. den po operaci ve vzorcích: ASA=aproximační anastomóza, SA= standardní anastomóza, S=kontrolní vzorek střevní stěna mimo oblast anastomózy, K=kontrolní vzorek střevní stěny neoperovaného zvířete. Aktivita želatinázy proMMP9 je signifikantně zvýšena ve vzorcích z míst anastomózy (ASA,SA) oproti vzorkům mimo oblast anastomózy (S,K). Mezi jednotlivými typy anastomóz(ASA,SA) není signifikantní rozdíl v aktivitě proenzymu želatinázy MMP9.

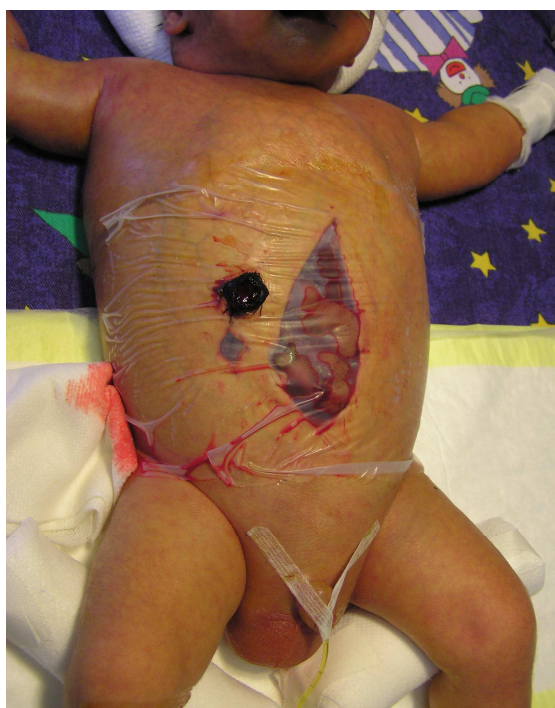
4.2 Klinická aplikace- kasuistika

Chlapec, dvojče A (porodní hmotnost 1700g, gestační stáří 30+ 6, Apgar 7-9-9) se narodil císařským řezem pro předčasný odtok plodové vody, nepravidelnou polohu dvojčat a neúspěšnou tokolýzu. Pro známky mírné dechové tísně byl první den života na distenční dechové podpoře (nCPAP). V dalších dnech probíhala poporodní adaptace přiměřeně. Od prvního dne života byl chlapec krmen stravou a od 12. dne byl na plné perorální výživě. 25. den života se objevily klinické i laboratorní známky nekrotizující enterokolitidy: enterorrhagie, distenze břicha, zbarvení břišní stěny, leukocytóza, trombocytopenie, vysoké zánětlivé parametry a na RTG snímcích byla zřejmá střevní pneumatóza. Byla zahájena konzervativní léčba – nic per os, oběhová podpora, umělá plicní ventilace (UPV). Podána kombinace antibiotik (Targocid, Meronem, Metronidazol). 27. den byla provedena operační revize pro zhoršení celkového stavu a RTG známky pneumoperitonea. Po otevření dutiny břišní byla nalezena hemoragická nekrotizující enterokolitida v rozsahu od proximálních 28 cm jejunum po lienální ohbí kolon (Obr.17).



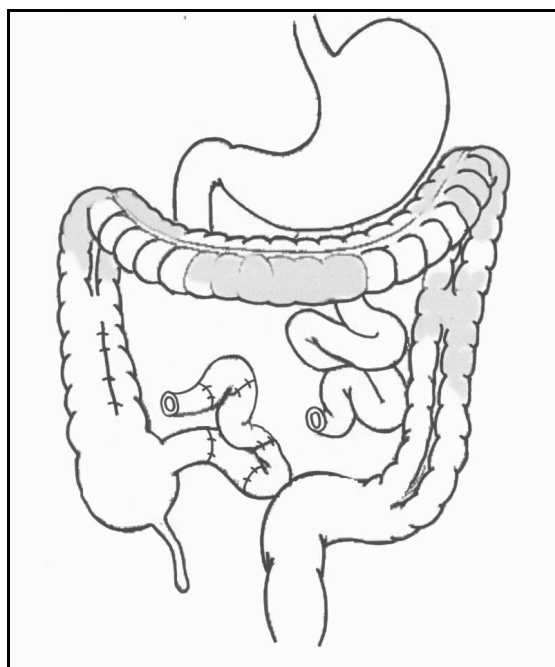
Obr.18. Rozsah vícečetného postižení NEC, černě je zobrazena hemoragická nekróza střevní stěny, šedě místa neohrazeného zánětu.

Vzhledem k rozsahu poškození střeva byla ve zdravé části jejunu založena odlehčující proximální jejunostomie a poškozené tenké střevo bylo ponecháno in situ k dalšímu řešení při second-look operaci. Pooperační průběh byl komplikován opakovaným krvácením do GIT, multiorgánovým selháním a rozvojem břišního kompartment syndromu, který byl řešen krytím střevních kliček folií Steri – Drape (fa 3M Health Care) a přechodným neuzavřením laparotomie (Obr.18).



Obr.19. Řešení břišního kompartmentu dočasným použitím folie steridrape

Po 48 hodinách byly resekovány ohraničené nekrózy tenkého střeva. Při měření délky střeva zůstalo vitálních proximálních 28 cm jejunu a 5 oddělených úseků na hranici jejunu a ilea v celkové délce 12 cm. Ve snaze zabránit syndromu krátkého střeva bylo 5 oddělených, ale vitálních úseků spojeno technikou aproximační anastomózy s redukovaným množstvím 4-6 stehů Vicryl 5/0 (polyglactin, fa. Ethicon) (Obr.20.).



Obr.20: 5 oddělených úseků na hranici jejunu a ilea v celkové délce 12 cm bylo spojeno technikou aproximační anastomózy

Bauhinská chlopeč a ileocekální přechod zůstaly zachovány, nekrotická část colon ascendens byla podélně resekována a též aproximačně sešita. V dalším týdnu života byl chlapec 2x revidován pro krvácení z omenta a břišní stěny a pro přetrvávající břišní kompartment syndrom byla stěna břišní zvětšena a střevní kličky kryty pomocí záplaty z GORE-TEX (polytetrafluoretylen, fa W.L. Gore & Association). Po operaci byla po dobu 21 dní nutná podpora UPV a totální parenterální výživa (TPV). Od 45. dne byl opět zahájen enterální příjem. Pro velké ztráty ze stomie převažovala v následujících týdnech parenterální výživa s hrazením minerálů a jen zvolna se dařilo zvyšovat dávky enterální výživy (kombinace mateřského mléka a preparátu Neocate). Při dlouhodobé parenterální výživě se postupně rozvinula cholestatická hepatopatie.

Devět týdnů po první operaci bylo přistoupeno k zanoření stomíí a obnovení kontinuity GIT. Při operaci bylo nutné pro pozánětlivou strikturu resekovat tlusté střevo od hepatálního ohbí po sigmoideum. U pacienta zůstala zachována Bauhinská chlopeň a vzestupný tračník, proximální jejunum a vitální byl také úsek tenkého střeva rekonstruovaný z 5 segmentů (aproximační anastomózy se zhojily bez známek striktury či dehiscence). Kontinuitu GIT se zdařilo obnovit anastomózami na tenkém střevě a ascendo-sigmoideoanastomózou. Tenké střevo z původních vitálních 28 cm a 12 cm rekonstruovaných při second look operaci narostlo na celkem 50 cm. Čtvrtý den po výkonu byla nutná další revize břišní dutiny pro spontánní perforaci na colon ascendens. Po operaci pokračovala TPV a postupně se zvyšoval perorální příjem potravy. Před propuštěním bylo střevo adaptováno na dávku 30 ml preparátu Neocate v rýžovém odvaru podávaný po 3 hodinách.

Pacient byl propuštěn domů v pěti měsících věku v uspokojivém celkovém stavu s váhou 4145 g. Doma pokračovala kombinace domácí TPV a enterální výživy. V 8 měsících věku chlapec vážil 7,5 kg a při režimu intermitentní parenterální výživy byl jeho střevní trakt adaptovaný na dávky 60ml stravy po 4 hodinách. V dlouhodobém výhledu je pravděpodobné úspěšné převedení chlapce na plný enterální příjem.

5. Diskuse

Přes opakované experimentální i retrospektivní klinické studie zůstávají názory na optimální techniku střevní anastomózy kontraverzní [43-46]. Dehiscence v oblasti anastomózy je stále nejčastější příčinou morbidity a mortality v gastrointestinální chirurgii [44,45,47]. Pevnost intestinální anastomózy je do 3. pooperačního dne výlučně závislá na fixaci stehů v submukózní vrstvě kolagenu střevní stěny tkáně. Od 3 dne je kolagenolýza nahrazována syntézou kolagenu de novo a význam stehů pro pevnost anastomózy je postupně eliminován pevností zajištěnou nově syntetizovaným kolagenem. Hojení anastomózy je tedy závislé na kontinuálním procesu degradace a novotvorby kolagenové sítě v submukózní vrstvě. Průběh hojení je ovlivněn řadou celkových a lokálních faktorů. Z celkových, negativně působících vlivů je možné zmínit hypoxii, šok, sepsi, poruchu výživy a podávání steroidů [43,44]. Z negativních lokálních vlivů se pak nejčastěji uvádí porucha místní cirkulace - perfuze a opoždění zánětlivé reparační reakce. Steh u střevní anastomózy je tedy kompromisem mezi soudržností a perfuzí okrajů, který v prvních dnech po operaci zajišťuje integritu anastomózy avšak strangulací okrajů rány negativně ovlivňuje proces hojení. Zachování adekvátní perfuze okrajů rány a dostatečná integrita anastomózy s minimálním počtem strangulujících stehů jsou základními principy optimální chirurgické techniky střevní anastomózy [48].

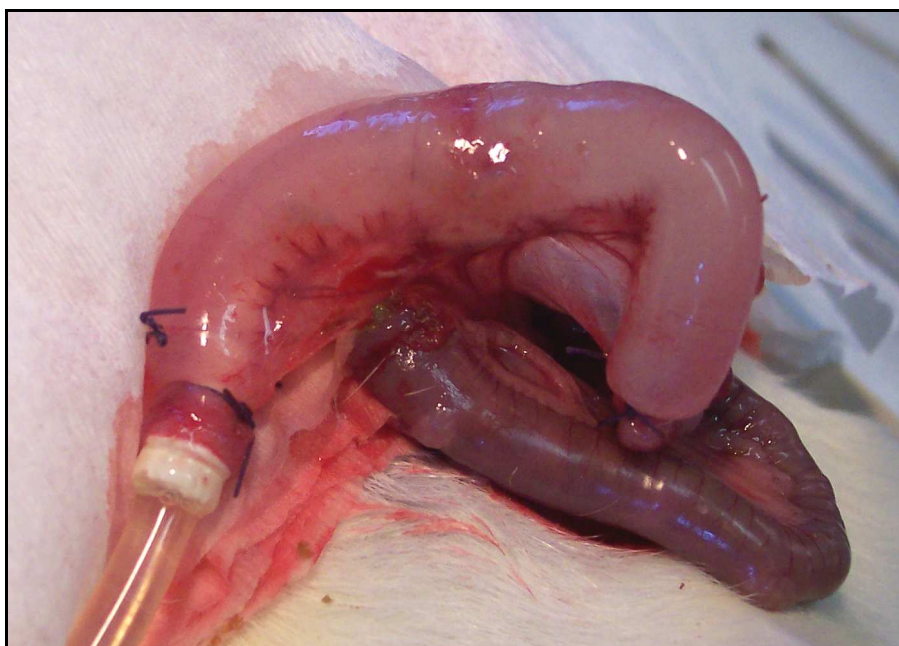
5.1. Mechanické vlastnosti intestinální anastomózy

Základním parametrem pro hodnocení střevní anastomózy je stanovení mechanické pevnosti anastomózy. Pro tento účel se používají dva typy měření. První typ měření určuje pevnost v protlačení (bursting strength), která je vyjádřena jako odolnost střevní stěny vůči intraluminálnímu tlaku. Druhý typ určuje pevnost v tahu (breaking strength), která udává odolnost střevní stěny vůči síle aplikované v dlouhé ose střeva. Podle většinového názoru měření pevnosti v protlačení

(bursting strength, bursting pressure) lépe zobrazuje fyziologické napětí ve střevě a lépe odpovídá silám působícím na hojící se anastomózu [45,49,50]. Získané výsledky jsou dobře porovnatelné v rámci vlastního experimentu, porovnávání absolutních hodnot mezi jednotlivými studiemi je prakticky nemožné. Jednotlivé experimentální práce se odlišují výběrem místa anastomózy, metodikou měření tlaku i dalšími podmínkami pokusu. Například Schier udává pro anastomózu 8 jednotlivými stehy na ileu 3 cm od IC chlopně první den po operaci bursting pressure 47 mmHg v oblasti anastomózy a 455 mmHg v segmentu neoperovaného střeva [49]. Kuzu udává pro anastomózu 8-10 jednotlivými stehy na ileu 10 cm od IC chlopně sedmý den po operaci bursting pressure 250 mmHg [51], ale neuvádí hodnoty na neoperovaném střevě. Bundy ve své studii porovnal tři rozdílné techniky anastomózy na tlustém střevě: biofragmentabilní prstenec, šitou anastomózu a anastomózu šitou staplery [50]. Anastomóza biofragmentabilním prstencem byla nejpevnější v den operace, šitá anastomóza třetí den po operaci, a sedmý den po operaci byly výsledky u všech typů srovnatelné.

V disertační práci se pevnost anastomózy určovala měřením bursting pressure první a sedmý den po operaci. Cílem měření bylo porovnání obou typů anastomóz v době, kdy je pevnost určována převážně stehy (1.den) a v době, kdy je zajištěna převážně novým kolagenem (7.den).

V naší studii jsme vytvořili model aproximační střevní anastomózy, která omezuje strangulující efekt stehů. Ke zhotovení aproximační anastomózy jsme používali 5 seromuskulárních stehů. Těmito pěti stehy bylo možné na střevě malého průměru obnovit kontinuitu střevního lumen a zajistit dostatečnou integritu anastomózy. (Obr.21.).



Obr. 21. Zhojená aproximační anastomóza 7.den po operaci zhotovená 5 jednotlivými stehy

Standardní anastomózou používanou v experimentální chirurgii na krysích modelech je konvenční jednovrstevná invertovaná anastomóza. Anastomóza bývá šita jednotlivými seromuskulárními stehy, nejčastěji nevstřebatelným šicím materiálem (polypropylen 6.0-8.0), počet stehů (8-12 stehů) se liší podle pracoviště [52-56]. Tento typ anastomózy s 9-10 stehy byl použit jako standard u kontrolní skupiny i v experimentu disertační práce.

Oba typy anastomózy (aproximační i standardní) se v našem experimentu makroskopicky zhojily dobře, bez dehiscence. Čas ke zhotovení aproximační anastomózy byl statisticky významně kratší ($16 \pm 7,1$ minut oproti $23,6 \pm 6,2$ minut, $p=0,016$). Statisticky významný časový rozdíl se z pohledu absolutních čísel nezdá veliký, jeho význam narůstá v případě většího počtu anastomóz jak jsou potřebné v případech s multifokální NEC. Kratší operační čas při plně srovnatelných parametrech hojení je významným přínosem pro snížení operační

zátěže u nestabilních novorozenců nízké porodní hmotnosti v kritickém celkovém stavu. V průběhu experimentu byl zřejmý vliv získaných zkušeností (learning curve) na celkovou délku operace, zkrácení operačního času bylo zaznamenáno u obou typů anastomóz (ASA i SA), časový rozdíl mezi nimi však zůstával stejný.

Aproximační anastomóza byla i ve všech dalších hodnocených parametrech srovnatelná s konvenční anastomózou, zjištěné rozdíly nedosáhly požadované hladiny statistické významnosti. Pevnost aproximační anastomózy se první den po operaci nelišila od pevnosti konvenční anastomózy (55 ± 15 torrů oproti 55 ± 42 torrů, $p = 1$). Pevnost obou typů anastomózy byla 1. den po operaci signifikantně nižší než pevnost neoperovaného střeva. Pevnost aproximační anastomózy sedmý den po operaci byla 249 ± 39 torr, pevnost konvenční anastomózy 218 ± 23 torr ($P = 0,118$). Pevnost oproti intraluminálnímu tlaku nebyla 7. den po operaci u obou typů anastomóz signifikantně nižší než pevnost neoperovaného střeva.

Model aproximační anastomózy byl srovnatelný se standardní anastomózou i z hlediska výskytu komplikací (adheze, preanastomotická dilatace), rozdíly ve výsledcích nebyly statisticky signifikantní. Vyšší výskyt adhezí u konvenční anastomózy je možné hypoteticky zdůvodnit větším poškozením serózy konců střeva v oblasti anastomózy při zakládání většího počtu stehů. Také častější nález preanastomotické dilatace u konvenční anastomózy může být způsobem výraznějším zmenšením vnitřního průměru střeva v oblasti invertované anastomózy při použití většího počtu stehů.

Jonsson zkoumal vliv umístění a utažení stehů na hojení anastomózy [52]. Ve své experimentální práci prokázal, že pevnost anastomózy vůči tahu byla nejvíce snížena ve skupině s těsně dotaženými stehy. Domnívá se, že volnější stehy méně omezily cévní zásobení v oblasti okraje rány oproti těsně dotaženým, které strangulací tkáně s omezením lokální perfuze snížily přístup k cirkulujícím inhibitorům proteináz a tím zvýšily degradaci tkáně v místech stehů.

Jediná technika dostupná pro vytvoření střevní anastomózy bez strangulace tkáně je lepení. Zhotovení lepené anastomózy je ale technicky obtížnější a časově delší výkon. Hjortrup ve své práci na prasatech používal při lepení anastomózy fibrinovým lepidlem založené stehy, které po slepení odstranil. Pevnost anastomózy byla srovnatelná s klasicky šitou anastomózou [57]. Naopak Haukipuro který použil obdobnou techniku lepené anastomózy u potkanů, udává menší pevnost lepené anastomózy od 30. minuty do sedmého dne po operaci [53]. Tkáňová lepidla se dnes v novorozenecké chirurgii používají spíše k zajištění anastomózy šité stehy. Fibrinovým lepidlem zajištěná konvenční anastomóza je pevnější a má nižší výskyt dehiscence anastomózy [48,58].

Vhodnou alternativou k aproximační anastomóze by mohla být technika mechanické střevní anastomózy staplery jako rychlá metoda střevní anastomózy. Techniku rychlé anastomózy s použitím jednotlivých neperforujících klipů popsal Holland-Cunz [59]. V experimentu na potkanech byl operační čas klipované anastomózy signifikantně menší a klipovaná anastomóza měla po 14 dnech pevnost srovnatelnou s neoperovaným střevem. Klinickému použití popsané metody brání aplikace nevstřebatelných klipů a jejich postupné odhojení a vyloučení do střevního lumen. Technika staplerů, jak ji známé z dospělé chirurgie, není v současnosti přizpůsobena pro novorozence, zejména pro novorozence nízké porodní hmotnosti s NEC. Komerčně vyráběné staplery standardních velikostí jsou vzhledem velikosti použitelné jen ve velmi omezeném spektru novorozeneckých operací [41,60,61].

5.2. Aktivita kolagenolytických MMP

Základní fáze hojení střevní anastomózy jsou totožné pro všechny dosud popsané techniky: iniciační zánětlivá reakce, časná kolagenolýza, syntéza a ukládání nového kolagenu a maturace jizvy. V prvních 3 dnech po operaci pevnost anastomózy klesá v důsledku místní degradace podpůrného kolagenu enzymy ze skupiny matrixových metaloproteináz (MMPs). Matrixové MMPs

zahrnují enzymy degradující extracelulární základní hmotu. Tyto enzymy mají stěžejní úlohu v remodelaci a hojení tkání stejně jako v embryonálním vývoji a růstu [62]. MMPs obsahují na aktivním místě zinek a pro plnou aktivitu vyžadují ionty Ca^{2+} a neutrální pH. MMPs jsou secernovány buňkami pojivové tkáně (např. fibroblasty, myoblasty, chondrocyty) a buňkami zánětlivé reakce (mikrofágy, monocyty a neutrofilny) jako inaktivní proenzymy a pro zahájení procesu přestavby extracelulárního matrixu je nutná jejich proteolytická aktivace. Do široké skupiny MMPs mimo jiné patří kolagenázy (MMP1, MMP8, MMP13), želatinázy (MMP2, MMP9) a stromelysiny (MMP3, MMP10). Želatinázy MMP2 (molekulová hmotnost 72 kDa) a MMP9 (molekulová hmotnost 92 kDa) jsou schopné degradovat řadu komponent podpůrného matrixu střešní stěny, mezi jinými intersticiální fibrilární kolagen. Aktivita želatinázy MMP9 je spojována s průběhem akutní fáze hojení zatímco aktivita želatinázy MMP2 je významnější ve fázi pozdější remodelace [63].

Přítomnost MMPs ve střešní anastomóze byla prvně rozpoznána Hawleyem v roce 1970 [64,65]. Pooperační změny kolagenolytické aktivity prokázal také Stapen [65]. Kolagenolytickou aktivitu 12-36hodin po operaci měřil uvolněním radioaktivního materiálu z roztoku kolagenu I typu. Na ileu kolagenolytická aktivita signifikantně stoupla (v průměru 2,7x) 12 hodin po operaci a následoval trvalý pokles k normálním hodnotám. Čtyři týdny po operaci byla kolagenolytická aktivita stále zvýšená. Kolagenolytická aktivita kontrolního vzorku se na ileu nikdy nelišila od předoperační kontroly. Také experimentální práce Chowcata, Savage a Shapera prokázaly signifikantní zvýšení kolagenáz a želatináz v oblasti anastomózy krátce po operaci [66-68]. Použitím kvalitativní imunohistochemie prokázal Shaper zvýšení kolagenáz MMP13 a želatináz MMP2 a MMP9 [66-68].

Hingh et al. se ve své studii zaměřil na kvantifikaci změn v aktivitě želatináz ve střevě po zhotovení anastomózy na ileu či rektu [69]. Vzorky byly analyzovány první a třetí den po ušití anastomózy. U kontrolních zvířat byla

zřetelná želatinázová aktivita na 80 kDa, reprezentující nspecifickou proteolytickou aktivitu a na 60 a 50 kDa reprezentující proformu a aktivní MMP-2. Zhotovení anastomózy vedlo ke zvýšení aktivity 105 kDa a diméru považovanému za aktivitu MMP9. Matrixové MMP2 zůstaly beze změny. MMP9 aktivita byla nejvyšší první pooperační den na ileu a to v místě anastomózy a přilehlém střevě. Konstrukce anastomózy nevedla ke změnám v MMP aktivitě dále od anastomózy. Změny ve stěně jsou způsobeny nárůstem aktivity želatinázy MMP-9 a jsou lokální.

Význam aktivity MMPs pro hojení střevní anastomózy byl ověřen ve studiích, které hodnotily pevnost anastomózy při použití inhibitorů MMP. Kiyama prokázal, že podání inhibitoru BE1662 matrixových MMP posílilo hojení anastomózy tlustého střeva. To se projevilo vyšší odolností anastomózy vůči plnicímu intraluminálnímu tlaku [70]. Histologické vyšetření střevní stěny prokázalo zachování mnohvrstevné struktury kolon, zvětšení sítě kolagenu mezi oběma konci kolon a zesílení submukozní vrstvy. Test prokázal že inhibice matrixových MMP pozitivně ovlivňuje hojení anastomózy.

Také po aplikaci inhibitoru metaloproteináz BB-94 se významně zvýšila pevnost v oblasti anastomózy [69,71]. Aktivita MMP v oblasti anastomózy, měřená metodou želatinové zymografie byla při použití BB-94 významně nižší. Použití specifických inhibitorů MMP aktivity by tedy mohlo přispět k ochraně střevní anastomózy.

Při posuzování techniky aproximační anastomózy jsme vedle mechanických vlastností porovnali vliv různé techniky střevní anastomózy na proteolytickou aktivitu v místě anastomózy. Srovnávali jsme zda technika stehu anastomózy může, například snížením lokální perfuze místa anastomózy, ovlivnit průběh aktivity želatináz MMP2 a MMP9 a tedy průběh degradace a nosyntézy kolagenu. Pokud je degradace kolagenu zvýšená nebo je opožděna nebo zmenšena syntéza kolagenu, může být obnova kolagenové sítě příliš dlouhá a může zvyšovat riziko dehiscence anastomózy.

V naší studii jsme potvrdili pooperační nárůst aktivity želatináz v oblasti anastomózy. Nárůst aktivity byl prokazatelný pouze v oblasti blízko anastomózy a byl tedy lokální reakcí organismu na poranění. Ve vzorcích z oblasti anastomózy byl první den po operaci prokázán signifikantní vzestup enzymatické aktivity u proMMP9 ve srovnání s neoperovaným střevem. Vzestup aktivity se signifikantně nelišil u obou typů anastomózy.

Ve vzorcích z oblasti obou typů intestinální anastomózy byl sedmý den po operaci prokázán signifikantní vzestup enzymatické aktivity MMP-2 a proMMP-9 ve srovnání s neoperovaným střevem ($p=0,01$ $p=0,03$ resp.). Rozdíly v aktivitě MMP-2 MMP-9 a jejich proenzymů opět nebyly mezi standardní a aproximační anastomózou signifikantní.

Měření aktivity želatináz v průběhu hojení anastomózy potvrdila srovnatelný průběh hojení aproximační a standardní anastomózy. Technika stehu anastomózy neovlivnila průběh aktivity želatináz MMP-2 a MMP-9 v místě operace a tedy průběh degradace a novosyntézy kolagenu. Proto lze předpokládat i stejné riziko komplikací i obou typů anastomózy.

5.3. Klinické aplikace aproximační anastomózy

Aproximační anastomóza může nalézt své uplatnění zejména při střevních resekcích a anastomózách u novorozenců velmi nízké porodní hmotnosti s víceložiskovým a totálním postižením NEC, kteří jsou v důsledku rozsáhlých střevních resekcí ohroženi syndromem krátkého střeva. U těchto novorozenců v kritickém celkovém stavu jsou mnohočetné konvenční anastomózy a modelace střeva obtížně proveditelné pro časovou náročnost a celkovou operační zátěž. Při sporné vitalitě residuálních úseků střeva je redukován množství stehů u aproximační anastomózy minimální zátěží pro mikrocirkulaci v místě sutury. Kontinuita střeva je obnovena v krátkém operačním čase, je maximálně zachována jeho délka a minimálně porušena jeho mikrocirkulace.

Rozsáhlé formy onemocnění typu „víceložisková NEC nebo totální NEC“ mají i podle našich skutečností velmi špatnou prognózu. Domníváme se, že chirurgický výkon má u těchto případů v první řadě zabezpečit derivaci obsahu dutiny břišní jako prevenci oběhové a ventilační nestability a derivaci gastrointestinálního traktu jako prevenci progresu NEC. K resekčním výkonům se má přistoupit s odstupem nejméně 24 hodin. V uvedené kasuistice jsme zvolili taktiku second – look operace s proximální derivační jejunostomií. Po demarkaci střevních nekróz zůstalo vitálních 28 cm proximálního jejunum a izolované krátké segmenty v oblasti ilea. Ve snaze o záchranu co nejdelší části tenkého střeva jsme při second-look operaci a přetrvávajícím nestabilním celkovém stavu novorozence použili navrženou techniku rychlé aproximační anastomózy. Technikou aproximační anastomózy jsme z pěti izolovaných segmentů rekonstruovali dalších 12 cm tenkého střeva. Podkladem pro použití techniky aproximační anastomózy byly jednak literární kasuistiky [30] a také slibné výsledky s touto technikou z naší experimentální práce na potkanech. K obnovení střevní kontinuity izolovaných segmentů ilea jsme použili aproximační anastomózy s redukovaným množstvím stehů (4-6 stehů vicryl 5/0). Předpokládali jsme, že malé množství použitých stehů způsobí menší strangulaci tkáně v místě anastomózy a přitom bude dostatečné pro obnovení střevní kontinuity a pro integritu anastomózy.

Z hlediska hojení anastomózy v době celkové cirkulační nestability může být zachování místní cirkulace v oblasti anastomózy dokonce výhodnější než snaha o konvenční vodotěsnou anastomózu. Aproximačními anastomózami mezi 5 izolovanými segmenty jsme získali dalších 12 cm ilea a vzhledem k zachované ileocékální chlopni tak výrazně vzrostla naděje pacienta na úspěšnou léčbu SBS adaptací vlastního střeva. Náš předpoklad o možnosti použití ASA získaný z experimentální práce se v tomto případě potvrdil.

6. Závěr

Na základě dosažených výsledků lze vzhledem ke stanoveným cílům disertační práce konstatovat:

1. V experimentu na laboratorních potkanech jsme úspěšně použili techniku aproximační střevní anastomózy. Aproximační anastomóza se u všech pokusných zvířat zhojila bez komplikací.
2. Pevnost aproximační anastomózy byla první i sedmý den po operaci srovnatelná s pevností standardní anastomózy. Pevnost obou anastomóz se sedmý pooperační den signifikantně nelišila od pevnosti neoperovaného střeva.
3. Ve střevní stěně v místě anastomózy se po operaci signifikantně zvýšila aktivita kolagenolytických želatinám proMMP9 a MMP2. Nárůst aktivity enzymů a tedy průběh hojení anastomózy byl stejný u aproximační i standardní anastomózy a nebyl tedy ovlivněn chirurgickou technikou anastomózy.
4. Aproximační střevní anastomóza se v experimentálním modelu ukázala jako časově výhodnější alternativa ke standardní anastomóze, při zachování stejných parametrů pevnosti, aktivity kolagenolytických enzymů, výskytu adhezí a pooperačního klinického průběhu. Kratší operační čas při plně srovnatelných parametrech hojení je významným přínosem pro snížení operační zátěže u nestabilních novorozenců nízké porodní hmotnosti v kritickém celkovém stavu. Aplikace aproximační anastomózy se osvědčila i v klinické kasuistice.

Aproximační anastomóza může být vhodnou alternativou pro obnovení integrity střeva u novorozenců o nízké až extrémně nízké porodní hmotnosti a pro prevenci syndromu krátkého střeva (SBS) u pacientů s rozsáhlou NEC.

7. Souhrn

Úvod: Operace nezralých novorozenců nízké porodní hmotnosti patří mezi velmi obtížné výkony v dětské chirurgii. Předčasně narození novorozenci mají významně snížené rezervy energie, imunologické reaktivity, cirkulační a respirační regulace. Zvláště v případech extrémní nezralosti (porodní hmotnost < 1000g, gestační stáří pod 26.týden) zvyšuje jakákoli další zátěž riziko úmrtí. Novorozenecká nekrotizující enterokolitida (NEC) s mortalitou 35-50% patří mezi časté a závažné komplikace u těchto novorozenců. Chirurgická léčba NEC spočívající v odstranění odumřelého střeva a obnovení střevního traktu anastomózou má být navržena tak, aby přinášela minimální riziko reoperací, minimální chirurgickou zátěž a zajistila zachování maximální délky tenkého střeva. Pro posouzení střevních anastomóz u nezralých novorozenců neexistují dostatečně velké soubory pacientů ani prospektivní a randomizované studie.

Cíl: Experimentální ověření techniky aproximační střevní anastomózy, při které je integrita a kontinuita střeva zajištěna redukováným množstvím seromuskulárních stehů a která by byla vhodná pro obnovení integrity střeva u novorozenců o nízké až extrémně nízké porodní hmotnosti. Porovnání aproximační anastomózy se standardní anastomózou.

Materiál a metody: Experiment byl proveden na skupině 22 krysích samic (Wistar) o hmotnosti 194-256g. Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin. Ve skupině SA byla zvířata se standardní střevní anastomózou ve skupině ASA byla zvířata s aproximační střevní anastomózou. Obě skupiny byly porovnány podle operačního času, podle klinického průběhu po operaci, váhového přírůstku, zhojení anastomózy, výskytu adhezí, pevnosti anastomózy vůči zvyšujícímu se intraluminálnímu tlaku a aktivity kolagenolytických enzymů. Měření byla prováděna první a sedmý po zhotovení anastomózy. Pevnost anastomózy byla stanovena měřením vrcholového intraluminálního tlaku. Kolagenolytická aktivita

želatináz MMP2 a MMP9 a jejich proenzymů byla stanovena metodou zymografie. Ke statistickému zhodnocení výsledků byl použitý test Anova.

Výsledky: Anastomózy byly u všech zvířat zhojeny a průchozí. Průměrný čas operace byl signifikantně kratší ve skupině s aproximační anastomózou ($16 \pm 7,1$ minut) oproti $23,6 \pm 6,2$ minut, $p=0,016$). Pevnost aproximační anastomózy hodnocená vrcholovým intraluminálním tlakem první den po operaci byla 55 ± 15 torrů, pevnost standardní anastomózy byla 55 ± 42 torrů ($p = 1$). Sedmý den byla pevnost aproximační anastomózy 249 ± 39 torrů, pevnost standardní anastomózy 218 ± 23 torrů ($p = 0,118$). Ve vzorcích z oblasti anastomózy byl první i sedmý den po operaci prokázán signifikantní vzestup enzymatické aktivity proenzymu želatinázy MMP-9 ve srovnání s neoperovaným střevem ($p=0,01$ resp. $p=0,03$). Rozdíly v aktivitě MMP2 MMP9 a jejich proenzymů mezi standardní a aproximační anastomózou nebyly signifikantní. Oba typy anastomózy byly v ostatních hodnocených parametrech srovnatelné, rozdíly nedosáhly požadované hladiny statistické významnosti.

Závěr: Aproximační střevní anastomóza byla v experimentálním modelu časově výhodnější alternativou ke standardní anastomóze, při zachování stejných parametrů pevnosti, aktivity kolagenolytických enzymů, výskytu adhezí a pooperačního klinického průběhu. Aproximační anastomóza by mohla být vhodnou alternativou pro obnovení integrity střeva u novorozenců o nízké až extrémně nízké porodní hmotnosti a jedním z faktorů pro prevenci syndromu krátkého střeva u pacientů s rozsáhlou NEC.

9. Teze v anglickém jazyce

Method of approximative intestinal anastomosis in experimental model

Background: Operation in low birth weight infant presents an extraordinary challenge. These most fragile patients have considerably limited reserves of energy, immunologic reactivity, circulation, and respiratory regulation. In the situation of extreme immaturity, any additional problem carries a great risk. Necrotising enterocolitis (NEC) is a devastating complication for these babies. The optimal treatment for NEC remains controversial. The surgical tactics should be devised so that it carries a minimal risk of reoperation, a minimal surgical stress and ensures maximum intestine sparing.

Aim: A technique of approximative anastomosis in which integrity and continuity of bowel is achieved with limited number of interrupted seromuscular stitches was evaluated in experimental study.

Material and methods: Small bowel anastomosis were performed in twenty two rats (Wistar, male) with weight range 194-256g. An approximative anastomosis in the ileum of twelve rats was performed with five seromuscular-interrupted sutures only; in the second study group anastomosis was performed with conventional technique of interrupted sutures. The rats equally from each group were killed and analyzed on day 1 and on day 7 after surgery. The approximative anastomosis was evaluated concerning operating time, anastomotic healing, anastomotic strength, and changes in gelatinase activity in comparison to the conventional anastomosis. Test of bursting pressure was performed to measure the anastomotic strength. Tissue samples containing the suture line and control samples from nonoperated sites were analyzed by quantitative gelatin zymography. Statistics was calculated with ANOVA test.

Results: All anastomosis in both group healed well without obstruction. The median operating time needed for approximative anastomosis was shorter ($16 \pm$

7,1 min versus $23,6 \pm 6,2$ min, $p=0,016$). The strength of approximative anastomosis after 1 day was 55 ± 15 torr; strength of standard anastomosis was 55 ± 42 torr ($p = 1$). The strength of approximative anastomosis after 7 days was 249 ± 39 torr; strength of standard anastomosis was 218 ± 23 torr ($p = 0,118$). Changes in gelatinase activity of MMP2 and MMP9 enzymes and their proform did not differ significantly between both types of anastomosis. Activity of MMP2 and proform of MMP9 in anastomotic area in both types of anastomosis significantly increase in comparison with activity in samples of nonoperated bowel ($p=0,01$ resp $0,03$). There were no significant differences in the others evaluated parameters between two study groups.

Conclusion: In the animal model presented, the approximative anastomosis shows time saving alternative to standard anastomosis, with the same parameters of anastomotic healing, anastomotic strength, changes in gelatinase activity, and adhesions.

Key words: aproximative anastomosis – gelatinize activity – matrix metalloproteinases – MMP2- MMP9- conventional anastomosis – anastomotic strength – multifocal necrotizing enterocolitis

9. Literatura

1. Marková: Postgraduální medicína 2007;9;25-32.
2. Nowicki PT: Ischemia and necrotizing enterocolitis: where, when, and how. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:152-158.
3. Warner BW, Warner BB: Role of epidermal growth factor in the pathogenesis of neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:175-180.
4. Chandler JC, Hebra A: Necrotizing enterocolitis in infants with very low birth weight. *Semin Pediatr Surg* 2000;9:63-72.
5. Kosloske AM: Indications for operation in necrotizing enterocolitis revisited. *J Pediatr Surg* 1994;29:663-666.
6. Rowe MI, Reblock KK, Kurkchubasche AG, Healey PJ: Necrotizing enterocolitis in the extremely low birth weight infant. *J Pediatr Surg* 1994;29:987-990; discussion 990-981.
7. Rygl M, Cunat V, Pycha K, Skaba R, Melichar J, Snajdauf J, Stranak Z: [Necrotizing enterocolitis in extremely immature newborns. The surgical treatment potential]. *Rozhl Chir* 2004;83:629-634.
8. Walsh MC, Kliegman RM: Necrotizing enterocolitis: treatment based on staging criteria. *Pediatr Clin North Am* 1986;33:179-201.
9. Tam AL, Camberos A, Applebaum H: Surgical decision making in necrotizing enterocolitis and focal intestinal perforation: predictive value of radiologic findings. *J Pediatr Surg* 2002;37:1688-1691.
10. Molik KA, West KW, Rescorla FJ, Scherer LR, Engum SA, Grosfeld JL: Portal venous air: the poor prognosis persists. *J Pediatr Surg* 2001;36:1143-1145.

11. Blakely ML, Tyson JE, Lally KP, McDonald S, Stoll BJ, Stevenson DK, Poole WK, Jobe AH, Wright LL, Higgins RD: Laparotomy versus peritoneal drainage for necrotizing enterocolitis or isolated intestinal perforation in extremely low birth weight infants: outcomes through 18 months adjusted age. *Pediatrics* 2006;117:e680-687.
12. Fasoli L, Turi RA, Spitz L, Kiely EM, Drake D, Pierro A: Necrotizing enterocolitis: extent of disease and surgical treatment. *J Pediatr Surg* 1999;34:1096-1099.
13. Hall NJ, Curry J, Drake DP, Spitz L, Kiely EM, Pierro A: Resection and primary anastomosis is a valid surgical option for infants with necrotizing enterocolitis who weigh less than 1000 g. *Arch Surg* 2005;140:1149-1151.
14. Hofman FN, Bax NM, van der Zee DC, Kramer WL: Surgery for necrotising enterocolitis: primary anastomosis or enterostomy? *Pediatr Surg Int* 2004;20:481-483.
15. Singh M, Owen A, Gull S, Morabito A, Bianchi A: Surgery for intestinal perforation in preterm neonates: anastomosis vs stoma. *J Pediatr Surg* 2006;41:725-729; discussion 725-729.
16. Butter A, Flageole H, Laberge JM: The changing face of surgical indications for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2002;37:496-499.
17. Cunat V, Stranak Z, Rygl M, Melichar J, Miletin J, Pycha K: [Are there any new procedures for treating necrotising enterocolitis in neonates with very low birth weight?]. *Ceska Gynekol* 2004;69 Suppl 1:121-126.
18. Chwals WJ, Blakely ML, Cheng A, Neville HL, Jaksic T, Cox CS, Jr., Lally KP: Surgery-associated complications in necrotizing enterocolitis: A multiinstitutional study. *J Pediatr Surg* 2001;36:1722-1724.
19. Weber TR, Tracy TF, Jr., Silen ML, Powell MA: Enterostomy and its closure in newborns. *Arch Surg* 1995;130:534-537.
20. Vaughan WG, Grosfeld JL, West K, Scherer LR, 3rd, Villamizar E, Rescorla FJ: Avoidance of stomas and delayed anastomosis for bowel

- necrosis: the 'clip and drop-back' technique. *J Pediatr Surg* 1996;31:542-545.
21. Rygl M, Pycha K, Stranak Z, Skaba R, Brabec R, Cunat V, Snajdauf J: T-tube ileostomy for intestinal perforation in extremely low birth weight neonates. *Pediatr Surg Int* 2007;23:685-688.
 22. Ein SH, Marshall DG, Girvan D: Peritoneal drainage under local anesthesia for perforations from necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1977;12:963-967.
 23. Ahmed T, Ein S, Moore A: The role of peritoneal drains in treatment of perforated necrotizing enterocolitis: recommendations from recent experience. *J Pediatr Surg* 1998;33:1468-1470.
 24. Morgan LJ, Shochat SJ, Hartman GE: Peritoneal drainage as primary management of perforated NEC in the very low birth weight infant. *J Pediatr Surg* 1994;29:310-314; discussion 314-315.
 25. Cass DL, Brandt ML, Patel DL, Nuchtern JG, Minifee PK, Wesson DE: Peritoneal drainage as definitive treatment for neonates with isolated intestinal perforation. *J Pediatr Surg* 2000;35:1531-1536.
 26. Goyal A, Manalang LR, Donnell SC, Lloyd DA: Primary peritoneal drainage in necrotising enterocolitis: an 18-year experience. *Pediatr Surg Int* 2006;22:449-452.
 27. Sugarman ID, Kiely EM: Is there a role for high jejunostomy in the management of severe necrotising enterocolitis? *Pediatr Surg Int* 2001;17:122-124.
 28. Moore TC: Successful use of the "patch, drain, and wait" laparotomy approach to perforated necrotizing enterocolitis: is hypoxia-triggered "good angiogenesis" involved? *Pediatr Surg Int* 2000;16:356-363.
 29. Banieghbal B, Davies MR: Damage control laparotomy for generalized necrotizing enterocolitis. *World J Surg* 2004;28:183-186.

30. Lessin MS, Schwartz DL, Wesselhoeft CW, Jr.: Multiple spontaneous small bowel anastomosis in premature infants with multisegmental necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 2000;35:170-172.
31. Voss M, Moore SW, van der Merwe I, Pieper C: Fulminating necrotising enterocolitis: outcome and prognostic factors. *Pediatr Surg Int* 1998;13:576-580.
32. Spencer AU, Neaga A, West B, Safran J, Brown P, Btaiche I, Kuzma-O'Reilly B, Teitelbaum DH: Pediatric short bowel syndrome: redefining predictors of success. *Ann Surg* 2005;242:403-409; discussion 409-412.
33. Wales PW, de Silva N, Kim J, Lecce L, To T, Moore A: Neonatal short bowel syndrome: population-based estimates of incidence and mortality rates. *J Pediatr Surg* 2004;39:690-695.
34. Jakubik LD, Colfer A, Grossman MB: Pediatric short bowel syndrome: pathophysiology, nursing care, and management issues. *J Soc Pediatr Nurs* 2000;5:111-121.
35. Schalamon J, Mayr JM, Hollwarth ME: Mortality and economics in short bowel syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:931-942.
36. Wilmore DW: Factors correlating with a successful outcome following extensive intestinal resection in newborn infants. *J Pediatr* 1972;80:88-95.
37. Touloukian RJ, Smith GJ: Normal intestinal length in preterm infants. *J Pediatr Surg* 1983;18:720-723.
38. Benson JM, King PA: Multiple atresias in a low-birth-weight twin. *J Pediatr Surg* 1999;34:1040-1042.
39. McCullagh M, Garvie DC, Dykes EH: A new method of intestinal salvage for severe small bowel ischemia. *J Pediatr Surg* 1994;29:1231-1233.
40. Petty JK, Ziegler MM: Operative strategies for necrotizing enterocolitis: The prevention and treatment of short-bowel syndrome. *Semin Pediatr Surg* 2005;14:191-198.

41. Mattioli G, Castagnetti M, Repetto P, Leggio S, Jasonni V: Complications of mechanical suturing in pediatric patients. *J Pediatr Surg* 2003;38:1051-1054.
42. Powell RW: Stapled intestinal anastomosis in neonates and infants: use of the endoscopic intestinal stapler. *J Pediatr Surg* 1995;30:195-197.
43. Thornton FJ, Barbul A: Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am* 1997;77:549-573.
44. Golub R, Golub RW, Cantu R, Jr., Stein HD: A multivariate analysis of factors contributing to leakage of intestinal anastomoses. *J Am Coll Surg* 1997;184:364-372.
45. Hendriks T, Mastboom WJ: Healing of experimental intestinal anastomoses. Parameters for repair. *Dis Colon Rectum* 1990;33:891-901.
46. Ordorica-Flores RM, Bracho-Blanchet E, Nieto-Zermeno J, Reyes-Retana R, Tovilla-Mercado JM, Leon-Villanueva V, Varela-Fascinetto G: Intestinal anastomosis in children: a comparative study between two different techniques. *J Pediatr Surg* 1998;33:1757-1759.
47. Winkeltau GJ, Treutner KH, Kleimann E, Lerch MM, Ger R, Haase G, Schumpelick V: Protection of intestinal anastomoses by biodegradable intraluminal bypass tubes under the condition of general peritonitis: an experimental study on the CLP model in rats. *Dis Colon Rectum* 1993;36:154-160.
48. Nordkild P, Hjortrup A, Kjaergaard J: Tissue adhesives and intestinal anastomosis. *Ann Chir Gynaecol* 1986;75:205-208.
49. Schier F, Bondartschuk M, Danzer E: Tetrachlorodecaoxide does not jeopardize anastomotic healing: an experimental study in animals. *Pediatr Surg Int* 2001;17:180-184.
50. Bundy CA, Jacobs DM, Zera RT, Bubrick MP: Comparison of bursting pressure of sutured, stapled and BAR anastomoses. *Int J Colorectal Dis* 1993;8:1-3.

51. Kuzu MA, Koksoy C, Kale IT, Tanik A, Terzi C, Elhan AH: Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J Surg* 1998;176:348-351.
52. Jonsson T, Hogstrom H: Effect of suture technique on early healing of intestinal anastomoses in rats. *Eur J Surg* 1992;158:267-270.
53. Haukipuro KA, Hulkko OA, Alavaikko MJ, Laitinen ST: Sutureless colon anastomosis with fibrin glue in the rat. *Dis Colon Rectum* 1988;31:601-604.
54. Siemonsma MA, de Hingh IH, de Man BM, Lomme RM, Verhofstad AA, Hendriks T: Doxycycline improves wound strength after intestinal anastomosis in the rat. *Surgery* 2003;133:268-276.
55. Syk I, Agren MS, Adawi D, Jeppsson B: Inhibition of matrix metalloproteinases enhances breaking strength of colonic anastomoses in an experimental model. *Br J Surg* 2001;88:228-234.
56. Hogstrom H, Haglund U, Zederfeldt B: Suture technique and early breaking strength of intestinal anastomoses and laparotomy wounds. *Acta Chir Scand* 1985;151:441-443.
57. Hjortrup A, Nordkild P, Kiaergaard J, Sjontoft E, Olesen HP: Fibrin adhesive versus sutured anastomosis: a comparative intraindividual study in the small intestine of pigs. *Br J Surg* 1986;73:760-761.
58. Havlicek K, Vlcek B: [Reinforcement anastomoses in the small intestine with fibrin glue (experimental study)]. *Rozhl Chir* 1992;71:314-319.
59. Holland-Cunz S, Chmelnik M, Roll M, Gunther P, Schafer KH: The clipped intestinal non-perforating anastomosis of small bowel: a new technique. *Pediatr Surg Int* 2007;23:87-93.
60. Kim HB, Lee PW, Garza J, Duggan C, Fauza D, Jaksic T: Serial transverse enteroplasty for short bowel syndrome: a case report. *J Pediatr Surg* 2003;38:881-885.

61. Hedlund H: Colorectal resection and anal anastomosis with an intraluminal stapler in Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 1997;12:142-144.
62. Shapiro SD: Diverse roles of macrophage matrix metalloproteinases in tissue destruction and tumor growth. *Thromb Haemost* 1999;82:846-849.
63. Agren MS: Gelatinase activity during wound healing. *Br J Dermatol* 1994;131:634-640.
64. Hawley PR, Faulk WP, Hunt TK, Dunphy JE: Collagenase activity in the gastro-intestinal tract. *Br J Surg* 1970;57:896-900.
65. van der Stappen JW, Hendriks T, de Boer HH: Collagenolytic activity extracted from intestinal anastomoses of the rat. *Matrix* 1989;9:238-243.
66. Chowcat NL, Savage FJ, Hembry RM, Boulos PB: Role of collagenase in colonic anastomoses: a reappraisal. *Br J Surg* 1988;75:330-334.
67. Savage FJ, Lacombe DL, Boulos PB, Hembry RM: Role of matrix metalloproteinases in healing of colonic anastomosis. *Dis Colon Rectum* 1997;40:962-970.
68. Shaper KR, Savage FJ, Hembry RM, Boulos PB: Regulation of matrix metalloproteinases in a model of colonic wound healing in a rabbit. *Dis Colon Rectum* 2001;44:1857-1866.
69. de Hingh IH, Lomme RM, van Goor H, Bleichrodt RP, Hendriks T: Changes in gelatinase activity in the gastrointestinal tract after anastomotic construction in the ileum or colon. *Dis Colon Rectum* 2005;48:2133-2141.
70. Kiyama T, Onda M, Tokunaga A, Efron DT, Barbul A: Effect of matrix metalloproteinase inhibition on colonic anastomotic healing in rats. *J Gastrointest Surg* 2001;5:303-311.
71. de Hingh IH, Siemonsma MA, de Man BM, Lomme RM, Hendriks T: The matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 improves the strength of intestinal anastomoses in the rat. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:348-354.

10. Seznam použitých zkratek

ASA	aproximační střevní anastomóza
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
GIT	gastrointestinální trakt
IC	ileocékální
MMPs	matrixové metaloproteinázy
nCPAP	nasal continuous positive airway pressure
NNPH	novorozenec s nízkou porodní hmotností (< 2500g)
NVNP	novorozenec s velmi nízkou porodní hmotností (< 1500g)
NENPH	novorozenec s extrémně nízkou porodní hmotností (< 1000g)
NEC	novorozenecká nekrotizující enterokolitida
SA	střevní anastomóza
SBS	syndrom krátkého střeva (short bowel syndrom)
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel elektroforéza
TPV	totální parenterální výživa
UPV	umělá plicní ventilace