

Sledování krevního průtoku v žaludku pomocí mikrodialýzy na potkaním modelu ischemie-reperfuze

Cibiček N.¹, Živná H.², Čermáková E.³, Palička V.⁴

¹ Ústav lékařské chemie a biochemie LF UP Olomouc

² Radioizotopové laboratoře a vivárium LF UK Hradec Králové

³ Oddělení výpočetní techniky LF UK Hradec Králové

⁴ Ústav klinické biochemie a diagnostiky LF UK a FN Hradec Králové

SOUHRN

Cíl studie: Mikrodialýza je užíváno k měření krevního průtoku; zhodnocení různých přístupů využitých paralelně v žaludku však doposud nebylo provedeno. Naším cílem bylo srovnat mikrodialyzační diluční techniku s metabolickým sledováním během dočasného uzávěru *a. coeliaca* u potkanů v celkové anestezii.

Typ studie: Základní výzkum na laboratorních zvířatech.

Název a sídlo pracoviště: Radioizotopové laboratoře a vivárium LF UK Hradec Králové.

Materiál a metody: Zvířata byla rozdělena do dvou skupin – ischemicko-reperfuzní ($n = 9$) a kontrolní ($n = 7$). Mikrodialyzační sondy byly implantovány do submukózy žaludku a následně perfundovány roztokem průtokového indikátoru $^3\text{H}_2\text{O}$. Ve vzorcích byla stanovena β -aktivita ^3H a koncentrace glukózy, laktátu, pyruvátu a glycerolu.

Výsledky: Nejdramatičtější odpovědi na ischemii byly pozorovány u relativních změn metabolických poměrů laktát/pyruvát a laktát/glukóza ($6,1\text{--}9,3\text{x}$, $p < 0,0001$), změny v poměru průtokového indikátoru $^3\text{H}_2\text{O}$ a koncentraci glycerolu byly vyjádřeny méně ($1,1\text{--}1,7\text{x}$, $p < 0,0001$ a $p < 0,01$ v daném pořadí). Diluční technika nejlépe korelovala s poměrem laktát/glukóza a glukózou samotnou ($r = 0,693$ a $-0,681$, v daném pořadí, $p < 0,0001$).

Závěry: Mikrodialýza je využitelná pro sledování ischemie žaludku. Využití metabolických indikátorů je nadřazeno diluční technice.

Klíčová slova: mikrodialýza, žaludeční submukóza, krevní průtok, ischemie-reperfuze.

SUMMARY

Cibiček N., Živná H., Čermáková E., Palička V.: Gastric blood flow monitoring using microdialysis in a rat model of ischemia-reperfusion

Objective: Microdialysis has been utilized for nutritive blood flow measurements, but various approaches have not been evaluated in parallel in the stomach yet. Our aim was to compare $^3\text{H}_2\text{O}$ efflux technique with biochemical monitoring during temporary celiac artery occlusion in rats under general anesthesia.

Design: Basic research on laboratory animals.

Settings: Radioisotope laboratories and vivarium, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové.

Material and methods: Animals were divided into two groups – ischemia-reperfusion ($n = 9$) and sham-operated ($n = 7$). Microdialysis probes were implanted in the gastric submucosa and perfused with a flow indicator $^3\text{H}_2\text{O}$ – containing solution. The samples were analysed for ^3H β -activity and glucose, lactate, pyruvate and glycerol concentrations.

Results: The most dramatic responses to ischemia were observed in the relative changes of metabolic ratios lactate/pyruvate and lactate/glucose (6.1 to 9.3x , $p < 0.0001$), the changes in flow indicator $^3\text{H}_2\text{O}$ efflux and glycerol were less pronounced (1.1 to 1.7x , $p < 0,0001$ and $p < 0,01$, resp.). The efflux technique correlated best with lactate/glucose ratio and glucose alone ($r = 0,693$ and $-0,681$, resp., $p < 0,0001$).

Conclusion: Microdialysis is applicable in monitoring gastric ischemia, metabolic monitoring being superior to the efflux technique.

Key words: microdialysis, gastric submucosa, blood flow, ischemia-reperfusion.

Úvod

Vzhledem k zásadnímu vztahu střeva k mortalitě za kritických stavů je ve studiích žádoucí sledování jeho perfuze. Otázka volby optimální metody je stále otevřená. Některé humánní studie podporují využití mikrodialýzy [1]. Principem mikrodialyzační diluční techniky je obrácený vztah mezi relativním úbytkem průtokového indikátoru ze sondy do extracelulárního prostoru a lokálním krevním průtokem. Alternati-

vou odhadu tkáňové perfuze pomocí mikrodialýzy je sledování běžných substrátů, např. glukózy, laktátu, pyruvátu a glycerolu. Nevýhodou tohoto přístupu je však variabilita metabolických indikátorů v systémevé krvi a jejich uvolnění do tkáně z jiných příčin, než jsou změny krevního průtoku. Cílem naší studie bylo srovnat mikrodialyzační diluční techniku s lokálním sledováním metabolických indikátorů na ischemicko-reperfuzním (IR) modelu u potkanů v celkové anestezii.

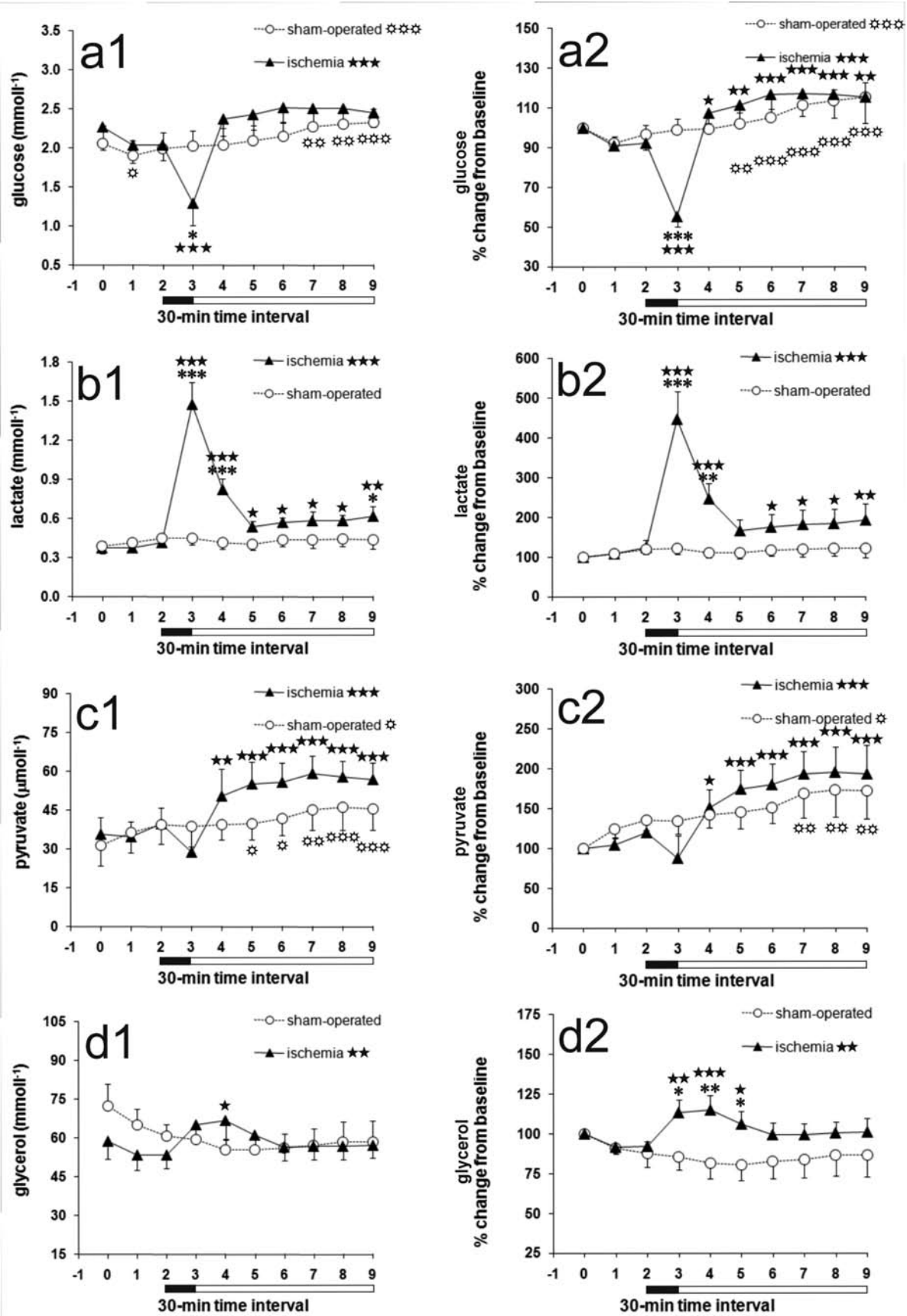


Fig. 1. The periods of ischemia and reperfusion are depicted as filled and empty bars below the x-axis, respectively. Panels a1-d1 show comparisons of dialysate glucose, lactate, pyruvate and glycerol respectively between sham-operated and ischemic animals in absolute terms. Panels a2-d2 show the same comparisons, but in levels related to individual baselines (100%). The advisability of the latter approach is best seen in glycerol. The asterisks represent between-group (★) and within-group comparisons (⊛ and ☆) for sham-operated and ischemic animals, respectively. Within the groups, all values were compared with the respective baselines (panels a1-d1), or the first values after them (a2-d2). One, two and three symbols stand for $p < 0.05$, 0.01 and 0.001, respectively.

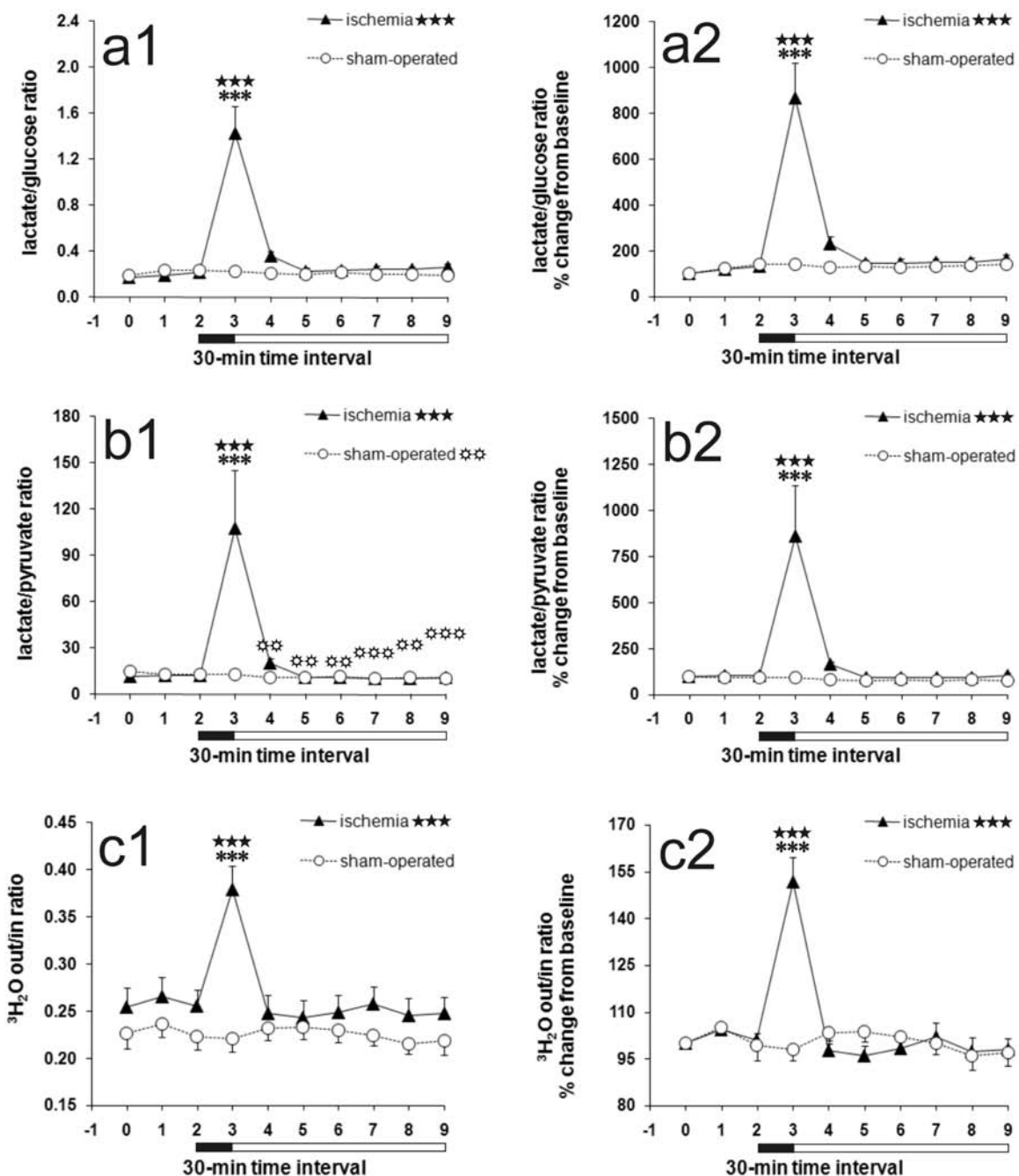


Fig. 2. Panels a1–c1 illustrate comparisons of calculated lactate/glucose, lactate/pyruvate and ³H₂O out/in ratios respectively between sham-operated and ischemic animals in absolute terms. Panels a2–c2 illustrate the same comparisons, but in levels related to individual baselines (100%). The advisability of the latter approach is obvious in ³H₂O out/in ratio.

Materiál a metody

Jako mikrodialyzační perfuzát byl použit roztok ³H₂O (= průtokový indikátor, MGP Zlín) v F1/1 s aktivitou 500 nCi. ml⁻¹. Dialyzát se před stanovením β-aktivity míchal s předem připraveným scintilačním roztokem. Dospělí potkaní samci kmene Wistar byli rozděleni do dvou skupin – ischemické (n = 9) a kontrolní („sham-operated“, n = 7). První skupina podstoupila v celkové pentobarbitalové anestezii kompletní 30minutovou okluzi *a. coeliaca*. Kontrolní skupina byla operována bez okluzí. Experimenty získaly souhlas etické komise. Technika submukózní mikrodialýzy žaludku je po-

psána jinde [2]. Po vstupních 60 minutách stabilizace byl zahájen 4,5hodinový sběr dialyzátu ve 30minutových intervalech (rychlost 2 μl . min⁻¹). V 10 μl alikvotech byla stanovena β-aktivita, ve zbylém vzorku (50 μl) koncentrace glukózy, laktátu, pyruvátu a glycerolu. Pro kolorimetrické analýzy dialyzátů bylo využito analyzátoru CMA 600 (CMA Microdialysis AB, Solna, Sweden) podle instrukcí výrobce. Pro každý interval byly navíc provedeny výpočty poměrů laktát/glukóza a laktát/pyruvát, které byly (podobně jako všechny ostatní parametry) vyjádřeny i v procentech bazální hodnoty (= 100 %). β-aktivita ³H byla stanovena pomocí scintilačního měřiče Beckman Coulter LS 6000 LL

(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) podle instrukcí výrobce. Poměry aktivit dialyzátu/perfuzátu (out/in) sondy byly vypočteny s ohledem k aktivitě pozadí. Data jsou vyjádřena jako průměr ± standardní chyba průměru (SEM) pro absolutní i relativní hodnoty. Statistické zhodnocení bylo provedeno testem ANOVA s následným Fisherovým LSD testem s mnohočetným srovnáním. Korelační koeficienty byly počítány podle Pearsona. Bylo využito programů NCSS 2007 a Statistica.

Výsledky

Výsledky mikrodialýzy přehledně shrnují obrázky 1 a 2 (na s. 237 a 238). Co se týče korelací mezi poměrem $^3\text{H}_2\text{O}$ out/in a metabolickými indikátory v absolutních hodnotách, nejsilnější vztah byl nalezen s laktát/glukózovým poměrem ($r = 0,693$, $p < 0,001$), glukózou ($r = -0,681$, $p < 0,001$) a laktátem ($r = 0,558$, $p < 0,001$). V relativním vyjádření (v procentech bazálních hodnot) byl nejsilnější vztah s glukózou ($r = -0,599$, $p < 0,001$), laktát/glukózovým poměrem ($r = 0,593$, $p < 0,001$) a laktát/pyruvátovým poměrem ($r = 0,559$, $p < 0,001$).

Diskuse

Hodnocení perfuze střeva pomocí technik in situ má význam vzhledem k diskrepanci mezi celkovým a lokálním průtokem. Naše studie jako první paralelně hodnotí dvě metody sledování tkáňové perfuze pomocí mikrodialýzy ve stěně žaludku. Prokázali jsme, že za předpokladu nesnížené bazální krevní průtokové rychlosti je při dostatečně dlouhém intervalu sběru vzorků možné detekovat ischemii již za 30 minut od uzavěru přírodní tepny. Pomocí diluční techniky jsme prokázali kompletní reperfuzi za 30 minut od odstranění cévní svorky. Z metabolických indikátorů je pro detekci ischemie zjevná preference poměrů laktát/pyruvát, laktát/glukóza, respektive glukózy samotné. Vzhledem k výraznému implantačnímu traumatu je využití relativních hodnot nutné u glycerolu (obr. 1 d1), u ostatních parametrů je lze doporučit. Dynamika metabolických indikátorů je výraznější než změny v poměru $^3\text{H}_2\text{O}$ out/in. Navíc lze na základě změn koncentrací metabolických indikátorů a jejich poměrů posoudit nejenom stav perfuze (obr. 1 1a, [3]), ischemické hypoxie s posunem k anaerobnímu metabolismu (obr. 1 2b), rozsah IR-indukovaného strukturálního poškození tkáně (obr.

1 1d, [4]), ale také možnou poruchu slizniční bariérové funkce (obr. 1 1b, d [5]). Vzhledem k tomu se přikláníme k současným trendům, které upřednostňují využití metabolických indikátorů před dilučními technikami.

Závěr

Na potkaním IR-modelu s využitím intramurální (submukózní) mikrodialýzy žaludku jsme prokázali, že ke spolehlivé detekci zásadních změn v perfuzi trávicí trubice lze využít jak perfuzních, tak metabolických indikátorů, přičemž metabolické indikátory jsou k tomuto účelu výhodnější.

Literatura

1. **Jansson, K., Redler, B., Truedsson, L., Magnuson, A., Ungerstedt, U., Norgren, L.** Postoperative on-line monitoring with intraperitoneal microdialysis is a sensitive clinical method for measuring increased anaerobic metabolism that correlates to the cytokine response. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2004, 39, p. 434–439.
2. **Cibicek, N., Zivna, H., Cibicek, J. et al.** Caffeine does not modulate nutritive blood flow to rat gastric submucosa – a microdialysis study. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 2008, 152, 1, p. 83–90.
3. **Krejci, V., Hildebrand, L., Büchi, C. et al.** Decreasing gut wall glucose as an early marker of impaired intestinal perfusion. *Crit. Care Med.*, 2006, 34, p. 2406–2414.
4. **Solligård, E., Juel, I. S., Bakkelund, K. et al.** Gut luminal microdialysis of glycerol as a marker of intestinal ischemic injury and recovery. *Crit. Care Med.*, 2005, 33, p. 2278–2285.
5. **Juel, I. S., Solligård, E., Skogvoll, E., Aadahl, P., Grønbech, J. E.** Lactate and glycerol released to the intestinal lumen reflect mucosal injury and permeability changes caused by strangulation obstruction. *Eur. Surg. Res.*, 2007, 39, p. 340–349.

Zdroje podpory: Výzkumný záměr FN v Hradci Králové MZO 00179906.

Do redakce došlo 22. 6. 2010.

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Norbert Cibicek, Ph.D.
Ústav lékařské chemie a biochemie
LF UP Olomouc
Hněvotínská 3
775 15 Olomouc
e-mail: norbert.cibicek@upol.cz