

Způsoby hodnocení krevní perfuze tkání pomocí intersticiální mikrodialýzy – přehled současných znalostí

N. Cibiček^{1,2}

¹ Ústav lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty UP Olomouc, přednostka prof. RNDr. Jitka Ulrichová, CSc.

² Oddělení klinické biochemie Nemocnice Hranice, a. s., Hranice, přednostka prim. RNDr. Pavla Horová

Souhrn: Mikrodialýza je dynamicky se rozvíjející technika využívaná k monitorování tkáňového metabolismu, bariérové funkce a k farmakologickým studiím a odhadům lokální krevní perfuze in situ. Předkládaný souhrnný článek přibližuje čtenáři poslední z uvedených aplikací, přičemž popisuje a srovnává 2 využívané přístupy – mikrodialyzační diluční techniky s využitím průtokových indikátorů a kontinuální metabolické sledování. V současné době je upřednostňováno využití metabolických indikátorů, pomocí nichž lze citlivěji a komplexněji hodnotit perfuzí navozené změny ve tkáních. Přes mnohé výhody zůstává měření tkáňové perfuze pomocí mikrodialýzy zatím soustředěno v oblasti klinického výzkumu. Pro širší přijetí a uplatnění v rutinních klinických postupech bude nutné provést více validačních studií a identifikovat situace, kde by mikrodialýza mohla nahradit stávající metody.

Klíčová slova: mikrodialýza – tkáňový metabolismus – lokální krevní perfuze – diluční techniky – průtokové indikátory – kontinuální metabolické sledování

Modes of tissue blood perfusion assessment by microdialysis – a review of current knowledge

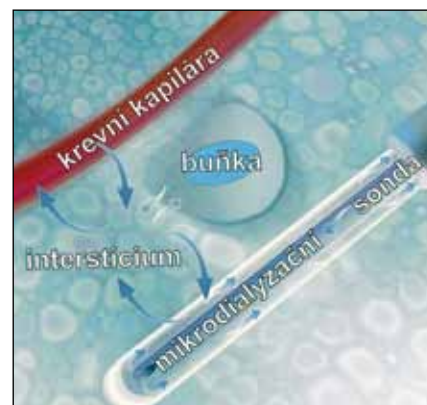
Summary: Microdialysis is a dynamically evolving method utilized for monitoring of tissue metabolism and barrier function, pharmacological studies and to estimate local blood perfusion in situ. The present review summarizes current knowledge of the last of the aforementioned applications on a characterization and comparison of two approaches used – microdialysis flow-indicator dilution technique and continuous metabolic monitoring. Currently, the use of metabolic indicators, which enable sensitive and complex evaluation of perfusion-induced changes in the tissue, is preferred. Despite the method's numerous advantages the measurement of tissue blood perfusion by microdialysis remains centralized in the area of clinical research, for the present. For wider acceptance and exercise in the routine clinical practice, more validating studies ought to be conducted and situations identified, where microdialysis could replace the current methods.

Key words: microdialysis – tissue metabolism – local blood perfusion – dilution techniques – flow indicators – continuous metabolic monitoring

Mikrodialýza – princip metody a její současné využití

Intersticiální mikrodialýza (dále jen mikrodialýza) je in vivo metoda vyvinutá začátkem 70. let minulého století Ungerstedtem a Pycockem původně pro neurovědu [1]. Její hlavní výhodou je možnost **kontinuálně monitorovat**, resp. ovlivňovat **metabolismus, funkční stav buněk a farmakokinetiku in situ** (bez nutnosti odběrů tkáně) a významně tím přispět **k časnému zachytu lokálních změn a personalizaci léčby**. Metoda pracuje na principu tzv. „umělé cévy“. To znamená, že získávání látek (metabolitů, xenobiotik, ukazatelů bariérové funkce nebo průtokových indikátorů) z tkáňového

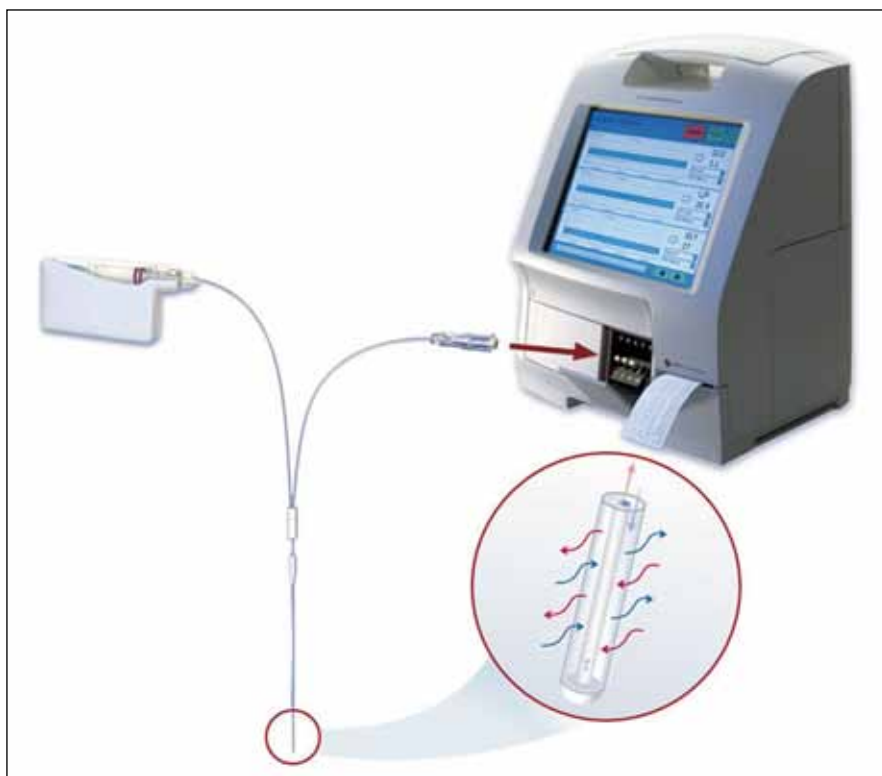
intersticia, nebo naopak dodávání těchto látek do extracelulární tekutiny je založeno na jejich obousměrné prosté difuzi skrze selektivně permeabilní membránu sterilní sondy implantované do tkáně (obr. 1). Tato sonda má většinou tvar jehly a dvojího, koncentrického lumen, které je pomocí tenké trubice kontinuálně perfundováno roztokem („perfuzátem“) imitujícím intersticiální tekutinu. Po kontaktu s mikrodialyzační membránou se perfuzát ve vnějším lumen obohatí o některé z látek, které se nacházejí v intersticiu, resp. ztratí část molekul, které se zde nenacházejí. Takto modifikovaný perfuzát (nazývá se „dialyzát“) se sbírá a analyzuje.



Obr. 1. Princip mikrodialýzy spočívá v napodobení funkce krevní kapiláry. Šipky ukazují směr toku perfuzního roztoku a znázorňují výměnu látek mezi sondou, intersticiem, buňkou a krevní kapilárou (upraveno podle: www.microdialysis.se).

Ve většině aplikací jsou využívány mikrodialyzační membrány, které jsou prakticky nepropustné pro makromolekuly typu proteinů nebo polysacharidů, což má zásadní klinicko-farmakologické i klinicko-biochemické výhody – sledování volné frakce léčiv a zkrácení, resp. usnadnění preanalytické fáze laboratorního měření. Jistou nevýhodou je využívání velmi nízkých perfuzních rychlostí (v desetinách až jednotkách mikrolitrů za minutu) nutných pro dosažení co nejvyšší efektivity dialýzy, což vyžaduje použití speciálních precizních pump (viz rozšiřující poznámka 1 na konci tohoto článku).

Díky své relativně malé invazivitě srovnatelné s injekčním vpichem nacházela mikrodialýza zpočátku své těžiště zejména v krátkodobých farmakologických a metabolických studiích centrálního nervového systému (CNS), podkožní tukové tkáně a kosterního svalu. Postupem času však našla uplatnění ve výzkumu celé řady dalších tkání a orgánů nevyjímaje orgány dutiny břišní, myokard, plíce, kost, kůže, oko nebo krevní řečiště [2–4]. V dnešní době už jen stěží najdeme kompartment, který by touto technikou nebyl badatelsky zasažen, a to především na úrovni zvířecích modelů. Své místo si však mikrodialýza intenzivně hledá i v oblasti humánní medicíny, přičemž se neomezuje jen na rovinu klinického výzkumu s využitím krátkého (několikahodinového) sledování. Snahy o její prosazení v rutinní neurointenzivní péči [5], diabetologii [6], klinické farmakologii [7], rekonstrukční chirurgii [8] a dalších oborech si kromě intenzivistů a farmakologů zaslouží pozornost i široké klinické obce. Přes dynamický rozvoj mikrodialýzy zůstává nejlépe prozkoumanou oblastí jejího využití v klinice sledování metabolismu, tkáňové perfuze a poškození buněk CNS. Na pracovištích, kde se mikrodialýza rutinně používá, jsou standardem systémy poskytující **informace o metabolismu a krevním průtoku přímo u lůžka pacienta** (v rámci tzv. POCT diagnostiky,



Obr. 2. Schéma diskontinuálního systému, zleva: klinická pumpa, trubice, sonda, mikrozkuumavka, transmembránová difúze, POCT analyzátor s dotekovým displejem a tiskárnou (zdroj: www.microdialysis.se).

kam patří např. i analyzátoy krevních plynů). Vyžadují však odběr dialyzátu do mikrozkuumavek, čímž vzniká riziko záměny vzorků (obr. 2).

Nejnovější komerční diagnostické přístroje nabízí tzv. on-line systémy měřící „v reálném čase“ (zpoždění kolem 5 min) na bázi biosenzorů, které odběr do mikrozkuumavek nevyžadují (obr. 3).

Současné trendy směřující k miniaturizaci laboratorní techniky vedou k vytváření tkáňových biosenzorů využívajících spojení mikrodialýzy, mikrofluidiky a elektrochemie (tzv. „lab-on-a-chip“) s bezdrátovým přenosem dat, které intenzivistům do budoucna umožní telemetrické sledování metabolismu a krevní perfuze paralelně v různých tělesných kompartmentech [9–11]. Ve stadiu zkoumání jsou rovněž možnosti léčebného využití mikrodialýzy, např. se současnou aplikací nanotechnologií [12].

Ačkoli se český čtenář již mohl s mikrodialýzou setkat i v domácí literatuře, údajů v češtině bylo dle databáze Pubmed publikováno zatím

velmi málo [13–17] a obecné klinické povědomí o této metodě a jejích aplikacích je v českých zemích poměrně chatrné. Předkládaný přehledový článek si klade za cíl přiblížit výzkumně zaměřeným klinikům některé výhody i úskalí aplikace mikrodialýzy pro hodnocení tkáňové krevní perfuze, a to na základě srovnání 2 přístupů – dilučních technik a metabolického monitorování.



Obr. 3. Systém Eirus™ od firmy CMA Microdialysis ke kontinuálnímu sledování glykemie a laktatemie na JIP. Sonda je zavedena cestou centrálního žilního katétru (zdroj: www.microdialysis.se).

Techniky využívající průtokové indikátory (diluční techniky)

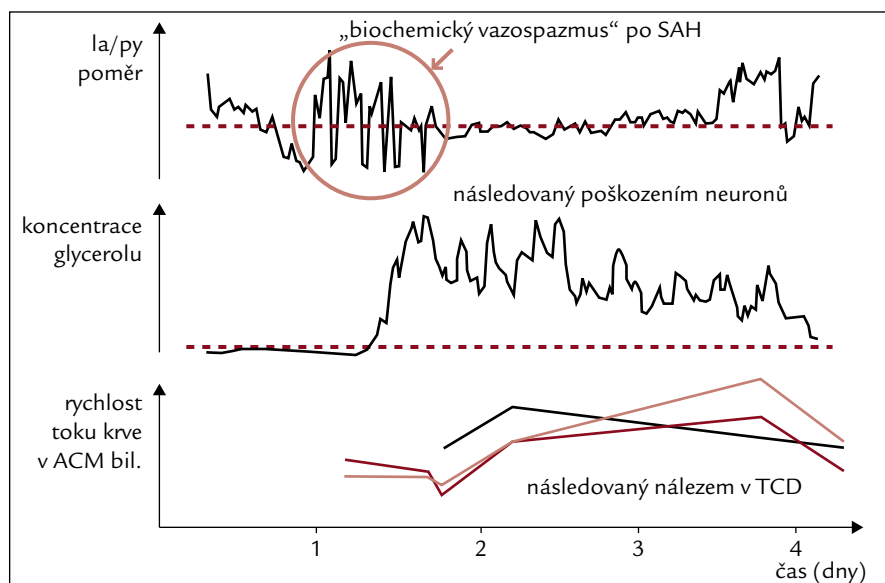
Jako průtokový indikátor se označuje látka, která je přidávána do perfuzátu za účelem difuze do vyšetřované tkáně. Může se jednat o látku tělu cizí nebo o (značený, případně neznačený) metabolit, který je v perfuzátu v několika násobně vyšší koncentraci než v intersticiální tekutině. Principem metody je **pozitivní, byť nelineární vztah mezi difuzním tokem průtokového indikátoru (flow-markeru) ze sondy do intersticia a následně do krevního řečiště** a krevní perfuzí tohoto řečiště. Průkopníkem metody byli Hickner et al, který ji aplikovali v kosterním svalu [18]. Protože se difuzí v intersticiu průtokový indikátor do různé míry „ředí“, stala se Hicknerova technika prototypem všech tzv. dilučních neboli indikátorových technik („efflux techniques“, viz rozšiřující poznámka 2 na konci tohoto článku).

Pokud má být průtokový indikátor využitelný v klinice, musí splňovat několik důležitých podmínek. Jeho molekula musí být netoxická, apyrogenní, dobře popsána co do svých biologických účinků, bez prokazatelného vlivu na průsvit cév, krevní průtok a lokální metabolismus, musí mít rovněž dobré difuzní vlastnosti v extracelulární tekutině (rozpusťnost ve vodě, malou molekulovou hmotnost), jednoduchou přípravu v roztoku za sterilních podmínek, nekomplikovanou preanalytiku (stabilitu v získaném vzorku) včetně dostupného analytického zázemí a v neposlední řadě také příznivou cenu. Původní, Hicknerem navržený průtokový indikátor etanol téměř všechny tyto podmínky splňoval. Vzhledem k nesnadnému analytickému stanovení (optimálně pomocí plynové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí) a své těkavosti však byl později modifikován značením molekuly pomocí ^{14}C , nebo spíše nahrazen jinými molekulami, zejména $^3\text{H}_2\text{O}$, přičemž odpověď metody nebyla touto změnou zásadně ovlivněna [19]. Slibných výsledků bylo recentně dosaženo i s močovinou [20], kterou lze snadno

stanovit u lůžka pacienta pomocí mikrodialyzačního analyzátoru ISCUS firmy CMA Microdialysis (obr. 2). Protože sérovou i tkáňovou koncentraci močoviny lze v horizontu několika hodin považovat za konstantní a koncentrace močoviny v perfuzátu několikánásobně převyšuje koncentraci ve tkáni, lze ji v této souvislosti použít. Jak močovina, tak další navržené indikátory (gentamycin, lithium) však na svojí validaci doposud čekají [14,21,22].

Vliv etanolu na lokální mikrocirkulaci nebo metabolismus glukózy nebyl prokázán ani v poměrně širokém rozmezí koncentrací na vstupu do sondy (od 5×10^{-3} do 1 mol l^{-1}) [18]. Při kontrolovaných perfuzích lýtkového svalu kočky v rozsahu adekvátním průtoku lidským kosterním svalu za bazálních podmínek (zhruba $1\text{--}10 \text{ ml } 100 \text{ g tkáň}^{-1} \text{ min}^{-1}$) vyslovil Hickner předpoklad nelineární, rychlé odpovědi své metody na redukci krevní perfuze, přičemž lineární závislost bychom našli až při několikanásobném zvýšení krevního průtoku. K objasnění teoretických základů metody a otázek ohledně její robustnosti přispěl Wallgren, který poskytl její matematické zpracování za modelových podmínek. Počítal přitom se splněním několika zásadních **předpokladů**. K nim patří **rovnoměrná distribuce kapilár** ve svalu a jejich homogenní a v čase konstantní perfuze, **homogenní prostředí svalové tkáně pro difuzi etanolu a dosažení ustálených rozdílů mezi koncentracemi v sondě, v intersticiu svalu a v kapilárách** (tzv. „steady-state“ podmínky). Přestože splnění těchto předpokladů si lze v živé tkáni představit jen velmi obtížně, našel Wallgren přijatelnou shodu mezi teoretickým modelem a výsledky Hicknerových in vivo experimentů. Tím se podařilo demonstrovat možnost existence nejenom kvalitativního, ale i kvantitativního charakteru vztahu mezi krevním průtokem kosterním svalu a poměrem koncentrací etanolu v dialyzátu a perfuzátu [23]. Nadšení z Wallgrenových výsledků se projevilo v širší aplikaci mi-

krodialýzy k měření tkáňové krevní perfuze ve svalu a podkožním tuku, a to nejenom v experimentálních, ale i v klinických studiích. **Výsledky** etanolové diluční techniky měření krevní perfuze je přesto potřeba **interpretovat opatrně** – s přihlédnutím na možnost jejich ovlivnění pohybem sondy ve tkáni nebo změnou difuze indikátoru v důsledku svalové kontrakce [24]. Vzhledem ke specifickému vlivu jednotlivých tkání na hodnotu difuzního koeficientu látky, a tím i na její transport do krevního řečiště, nelze výsledky dilučních metod aplikovaných v různých kompartmentech jednoduše srovnávat. Dalším faktorem, který je potřeba vzít do úvahy, je čas k dosažení „plató“ koncentrací průtokového indikátoru neboli bazálních steady-state podmínek. Tato doba může v závislosti na charakteru tkáně a na její krevní perfuzi překročit 2 hod [19,25]. Nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím interindividuální variabilitu je však **kvalita techniky zavedení sondy do tkáně** (implantační mikrotrauma, viz rozšiřující poznámka 3 na konci tohoto článku). Potíží s nesourodou implantační technikou lze předejít „odloženou“ mikrodialýzou, při které dojde k resorpci mikrohematomu a částečné úpravě architektury tkáně v okolí sondy. Samotný odběr vzorků pak probíhá až 4. den po implantaci sondy [26]. Jinou alternativou je vyřazení špatně zavedených sond. V akutní medicíně, ke které vzhledem k charakteru mikrodialýzy směřuje většina snah o její klinické využití, však lze uvedené postupy aplikovat jen velmi omezeně. Pro sledování dynamiky tkáňové krevní perfuze v klinických studiích je většinou dostačující dosažení steady-state podmínek (stabilita odpovědi ve 2 po sobě následujících měřeních), které závisí na odplavení uvolněných intracelulárních, resp. intravaskulárních hmot. K tomu dochází přibližně po 60 (30–90) min od implantace. Nejlepší praktickou pomůckou pro hodnocení interindividuálních odlišností pak zůstává vyjádření výsledků mikrodialýzy v procen-



Obr. 4. Lokální metabolické indikátory jsou časnou známkou incipientního vazospazmu a buněčného poškození u pacientů se subarachnoidálním krvácením (SAH). Upraveno podle [38].

tech vstupní neboli bazální hodnoty (subjekt je sám sobě kontrolou) [27]. V důsledku obecně nízké schopnosti dilučních technik detektovat malé změny krevního průtoku jsou poměry indikátorů v dialyzátu a perfuzátu považovány **pouze** za **kvalitativní ukazatele**. Z těchto důvodů **chybí** diluční techniky měření tkáňové perfuze **ve většině recentních klinických studií a také v doporučeních expertů** na mi-

krodialýzu pro implementaci do multimodální klinické monitorace v neurointenzivní péči [5].

Techniky využívající metabolické indikátory

Metabolické indikátory jsou, na rozdíl od průtokových indikátorů, vesměs látky tělu vlastní, které vznikají v buňkách a difundují do intersticiální tekutiny v rámci časných metabolických změn způsob-

bených nedostatečným prokrvením a/nebo dodávkou kyslíku. Techniky využívající metabolické indikátory jsou tudíž založeny na difuzi metabolitů ze tkání do mikrodialyzační sondy.

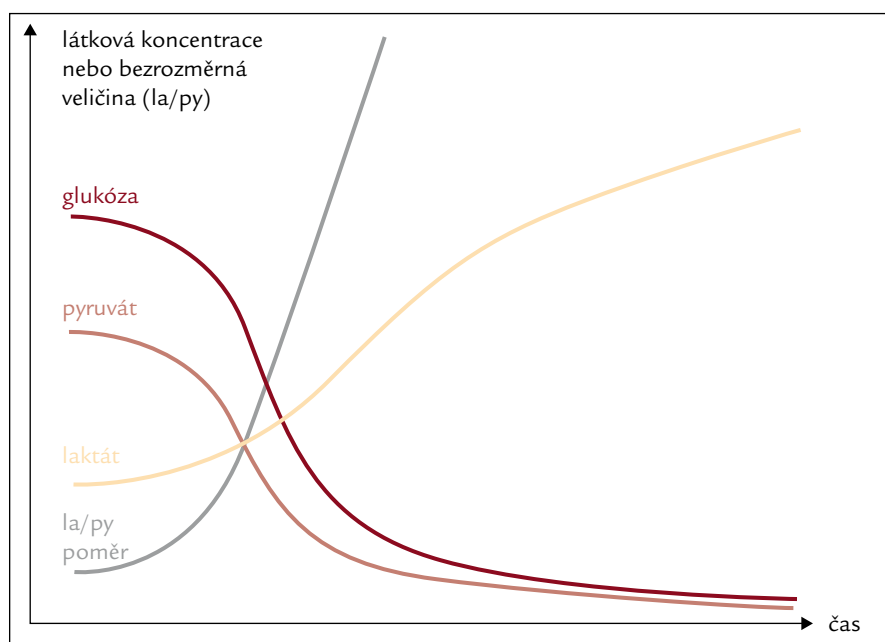
Využití metabolických indikátorů v detekci poruch lokální mikrocirkulace má **mnohé výhody**.

Za prvé, jejich změny jsou relativně specifické jak pro tkáňovou hypoperfuzi (glukóza [28], glutamát [29] nebo hypoxantin [30]), tak pro hypoxii s posunem redoxního stavu buněk (poměr laktát/pyruvát [31]), přičemž v některých případech mohou pomoci při odlišení arteriální a venózní okluze [32] nebo mitochondriální dysfunkce (poměr laktát/glukóza) [33].

Za druhé, ischemií navozené tkáňové poškození, jako je např. ztráta střešní bariérové funkce, rozpad mozkových buněk nebo netěsnost střešní anastomózy, se může projevit v absolutních hodnotách glycerolu, laktátu a/nebo laktát/pyruvátového (la/py) poměru [34–36]. Tyto změny korelují s tkáňovou tenzí kyslíku a nálezy na pozitronové emisní tomografii [37]. Metabolické indikátory mohou předcházet změnám krevního průtoku diagnostikovaným dopplerovskými metodami i o řadu hodin (obr. 4) [38]. Naopak systémové parametry (laktatemie) nemusí lokální ischemické změny reflektovat vůbec [39].

Za třetí, metabolické indikátory mohou odrážet intenzitu stresové reakce v důsledku sympatikotonie na JIP (elevace glycerolu v podkožní tukové tkáni), nebo mohou jednoduše korelovat se svými systémovými protějšky (jako např. podkožní tkáňová glukóza, která je substrátem senzorů v diabetologii) [6,40].

Za čtvrté, lokální metabolické změny mohou korelovat s klinickými symptomy, morbiditou i mortalitou – sledování změn glukózy a la/py poměru v mozkové tkáni může mít význam jak pro krátkodobou, tak i pro dlouhodobou predikci dalšího vývoje stavu pacientů po traumatu mozku nebo subarachnoidálním krvácením [41–44].



Obr. 5. Typická dynamika základních metabolických indikátorů v mikrodialyzátu při tkáňové ischemii. Paralelní měření glykemie umožňuje odlišit systémové změny od lokální hypoperfuze nebo mitochondriální dysfunkce.

Za páté, využití kombinace několika metabolických indikátorů závislých na tkáňové perfuzi zvyšuje senzitivitu i specifitu metody pro záchyt změn mikrocirkulace (obr. 5).

Za šesté, v koncentračních poměrech (jako je např. la/py poměr) jsou podmínky pro difuzi dvou fyzikálněchemicky příbuzných molekul ovlivněny podobně, tj. jejich poměr je více závislý na lokálním metabolismu než na možných nepredikovatelných změnách funkce sondy. Z výše uvedených důvodů autoři při hodnocení mikrocirkulace pomocí mikrodialýzy v posledních letech v převážné míře upřednostňují metabolické indikátory [29,45–47].

Úskalí interpretace metabolických indikátorů se týkají především tkáňově specifických metabolických reakcí na ischemii (mozek vs játra, „nepoškozený“ mozek vs penumbra vs nekrotická tkáň, peritoneum vs místo anastomózy apod.) [40,48]. Přes publikovaná doporučení [5] se dodnes můžeme mezi experty setkat s nejednotným postupem ohledně počtu cerebrálních katetrů a míst implantace. Mezi další úskalí patří změny koncentrací indikátorů v systémové cirkulaci a vyplavení tkáňových metabolitů (např. glycerolu) v důsledku implantačního mikrotraumatu a nikoli následkem ischemie [49,50]. Jak v případě průtokových, tak v případě metabolických indikátorů je proto potřeba **dbát na kvalitu implantační techniky a funkci sondy v čase monitorovat**. Doba nutná pro tkáňovou stabilizaci a zahájení měření však zde bývá kratší (většinou do 1 hod). Podobně jako v případě průtokových indikátorů lze implantační mikrotrauma částečně řešit výpočtem relativních hodnot (% z bazální hodnoty). Nejvýhodnějším a v klinické praxi nejvíce používaným přístupem je však **minimalizace mikrodialyzační perfuzní rychlosti** (k řádu desetin $\mu\text{l} \times \text{min}^{-1}$) s dosažením téměř 100% transmembránové koncentrační ekvibrace indikátoru. V takovém případě lze **koncentraci indikátoru v dialyzátu považovat**

Tab. 1. Semikvantitativní srovnání mikrodialyzačních technik využívaných k hodnocení tkáňové mikrocirkulace.

Parametr	Průtokové indikátory	Metabolické indikátory
citlivost k detekci změn krevního průtoku	+	+++
specifičnost	+	+ / ++
nezávislost metod na tkáni	+	+ / -
praktičnost provedení (analytické zázemí)	+ / -	+++
informační výtežnost (přidaná hodnota)	+ / -	+++
využití v klinických studiích a rutinní praxi na specializovaných klinikách	+ / -	+++

za identickou s koncentrací v intersticiu. Pro většinu aplikací v klinické praxi je tento přístup zcela dostačující. Hůře je použitelný pouze v případech, kdy je cílem sledování velmi rychlé dynamiky změn v čase (v řádu desítek sekund nebo několika minut), protože klade vysoké nároky na citlivost analytické metody, resp. vyžaduje on-line zapojení [51], které zatím není ani v mikrodialyzačních centrech běžné. Kompromisním řešením může v takové situaci být kontinuální ředění dialyzátu [52].

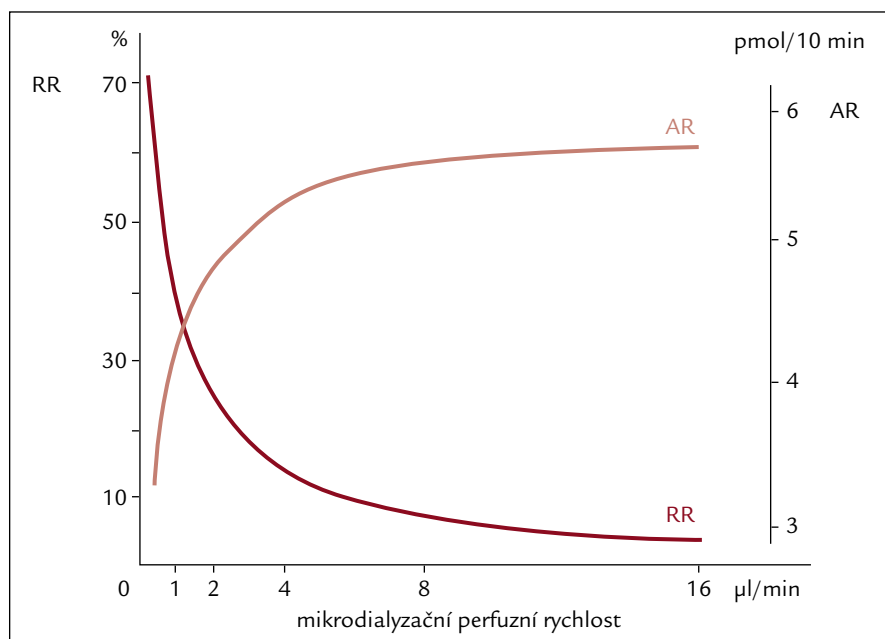
Metabolické indikátory přinášejí do experimentu i klinické medicíny kromě informace o stavu mikrocirkulace i **další důležité patofyziologické a prognostické údaje**. Unikátní software (ICU Pilot firmy CMA Microdialysis) přizpůsobený podmínkám multimodálního monitorování na JIP umožňuje srovnávat historické i aktuální trendy vývoje všech měřených parametrů (včetně farmakoterapie) jak v rámci jednoho pacienta, tak se zprůměrovanými daty získanými ze souboru podobných pacientů. Hlavním smyslem sledování metabolických indikátorů není zcela nahradit, ale spíše vhodně doplnit stávající metody využívané na JIP (měření intrakraniálního tlaku a teploty, transkraniální Doppler, saturace krve kyslíkem v jugulárním bulbu a tkáňová tenze kyslíku atd.). Využití mikrodialýzy tak umožňuje lépe **pochopit vývoj stavu pacienta, stratifikovat jeho riziko a personalizovat farmakologickou a/nebo nutriční terapii** s cílem zmírnit nebo **předejít rozvoji sekundárního poškození**, případně

časné odhalit selhání (chirurgické) **léčby**. Srovnání obou mikrodialyzačních přístupů poskytuje tab. 1.

Přes tyto výhody si **mikrodialýza zatím nezískala postavení standardní monitorovací techniky** v neurointenzivní péči [53]. Při stávajícím světovém trendu zavádění multimodálních měřících postupů na JIP se však jeví jako velmi pravděpodobné, že s přibývajícím klinickými zkušenostmi tuto pozici obhájí.

Vlastní zkušenosti

Ve výzkumu na našem pracovišti jsme se zaměřili na srovnání indikátorové techniky pomocí $^3\text{H}_2\text{O}$ a metabolického sledování pomocí mikrodialýzy na malých laboratorních zvířatech. Na rozdíl od jiných autorů, kteří techniky srovnávali na modelu hemoragického šoku v jaterní tkáni a kosterním svaly [54], jsme prokázali, že při kritických změnách krevního průtoku (ischemie/reperfúze) žaludeční stěny je možné zachytit velmi významnou odpověď obou přístupů již 30 min po změně průtoku. Potvrdili jsme přitom předpoklad, že jak bazální hodnoty, tak i dynamika změn průtokového indikátoru $^3\text{H}_2\text{O}$ (tj. citlivost metody k záchytu změn mikrocirkulace) nezávisí jenom na charakteru tkáně, ale také velmi významně na kvalitě implantace sondy. Nejtěsnější vztah mezi oběma technikami jsme našli mezi laktát/glukózovým poměrem (resp. glukózou samotnou) a poměrem aktivit (dialyzát/perfuzát) indikátoru $^3\text{H}_2\text{O}$, a to jak v absolutních, tak relativních vyjádřeních [50].

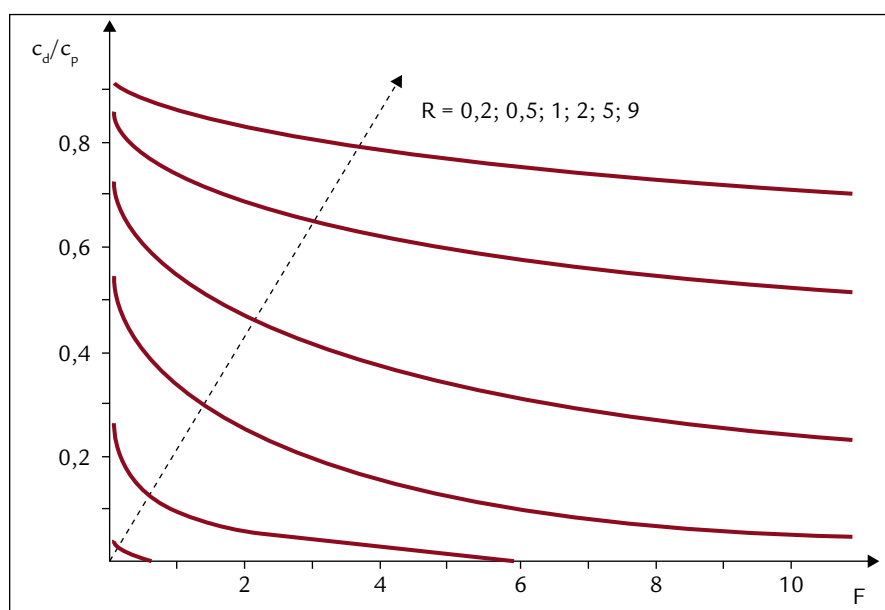


Obr. 6. AR a RR dopaminu vyjádřena jako funkce rychlosti průtoku mikrodialyzačního perfuzátu sondou CMA/10. Upraveno dle www.microdialysis.se.

Závěr

Oba mikrodialyzační přístupy k odhadům stavu mikrocirkulace mají své výhody i nedostatky, jejichž detailní znalost je zásadní pro správnou interpretaci výsledků. Pro většinu klinických aplikací je **výhodnější využití metabolických indikátorů**, které kromě změn mikrocirkulace umožňují posoudit i míru hypoxie či velikost tkáňového poškození se sekundárními

změnami fyziologických procesů, stratiť riziko pacienta a personalizovat jeho léčbu. Přes mnohé výhody zůstává měření tkáňové perfuze pomocí mikrodialýzy **soustředěno na klinický výzkum**. Pokud se mají mikrodialyzační techniky měření tkáňové perfuze prosadit v rutinních klinických postupech, bude do budoucna nutné provést více ověřovacích studií a identifikovat situace, kde by mohly nahradit



Obr. 7. Teoretický graf závislosti poměru c_d/c_p pro etanol na normalizovaném krevním průtoku kosterním svalem (F) a normalizované rychlosti perfuze mikrodialyzační sondy (R). Vesměs bezrozměrné veličiny. Upraveno podle [23].

stávající metody, případně je obohatit o svůj unikátní metabolicko-farmakologický potenciál.

Rozšiřující poznámky

1. Pro hlubší pochopení některých vztahů je vhodné definovat základní pojmy a parametry, se kterými mikrodialýza pracuje.

Absolutní výtěžek (absolute recovery – AR) látky konkrétní sondou ze tkáně je definován vztahem:

$$AR [mol \cdot s^{-1}] = c_d V_d / t \quad \{1\},$$

kde: $c_d [mol \cdot l^{-1}]$ je koncentrace látky v dialyzátu, tj. na výstupu z mikrodialyzační sondy, $V_d [l]$ je objem dialyzátu, $t [s]$ je čas (perioda) sběru dialyzátu.

Relativní výtěžek (relative recovery – RR neboli extrakční frakce) studované látky ze tkáně je pro danou mikrodialyzační sondu definován následujícími vztahy:

$$RR = (c_d - c_p) / (c_t - c_p) \times 100 (\%) \quad \{2\},$$

kde: $c_p [mol \cdot l^{-1}]$ je koncentrace látky v perfuzátu (infuzátu), tj. na vstupu do sondy, $c_d [mol \cdot l^{-1}]$ je koncentrace látky v dialyzátu, $c_t [mol \cdot l^{-1}]$ je koncentrace látky v extracelulární tekutině v těsné blízkosti sondy;

respektive v případě nulových koncentrací dané látky v perfuzním médiu:

$$RR = c_d / c_t \times 100 (\%) \quad \{3\}.$$

Rozdílnou závislost AR a RR na rychlosti průtoku mikrodialyzačního perfuzátu znázorňuje obr. 6.

Relativní únik látky z mikrodialyzační sondy do tkáně (relative delivery – RD) je při tzv. retrodialýze roven:

$$RD = (c_p - c_d) / (c_p - c_t) \times 100 (\%) \quad \{4\},$$

respektive v případě předpokladu nulových tkáňových koncentrací dané látky:

$$RD = (c_p - c_d) / c_p \times 100 (\%) \quad \{5\}.$$

2. V citované Hicknerově práci byl difúzní tok průtokového indikátoru vyjádřen pomocí poměru c_d/c_p jako tzv. „outflow-to-inflow ratio“. Vzhledem k tomu, že součet RD (viz {5}) a c_d/c_p je roven 1, je vztah mezi c_d/c_p a krevní perfúzí obrácený, tj. se snižujícím se průtokem ve tkáni koncentrační poměr průtokového indikátoru na výstupu a vstupu do sondy stoupá. Rychlost perfuze mikrodialyzační sondy však

s poměrem c_d/c_p koreluje pozitivně. Nelinearitě těchto vztahů demonstruje výraz {6} a obr. 7.

$$c_d/c_p \sim 1/F \sim R \{6\},$$

kde F je normalizovaný krevní průtok tkání (bezrozměrná veličina), R je normalizovaná rychlost perfuze mikrodializační sondy (bezrozměrná veličina).

Veličinu definovanou poměrem c_d/c_p lze tudíž chápat jako „relativní zůstatek“ průtokového indikátoru v sondě. Hodnoty, které může nabývat, se pohybují v rozmezí 0–1.

3. Implanční mikrotrauma způsobí z krátkodobého hlediska uvolnění lipidových i proteinových složek plasmatických membrán, vyplavení buněčného obsahu i složek krve, což zvýší viskozitu okolního média a sníží koeficient difuze studované látky. Vyjádřením nepřímo úměrné závislosti koeficientu difuze látky (D) na viskozitě média je Stokes-Einsteinova rovnice:

$$D [m^2 s^{-1}] = k_B T / 6\pi\eta\sigma \{7\},$$

kde: $T [K]$ je absolutní teplota média (extracelulární tekutiny), k_B je Boltzmannova konstanta ($= 1,38 \times 10^{-23} m^2 kg s^{-2} K^{-1}$), $\eta [kg s^{-1} m^{-1}]$ je viskozita média (extracelulární tekutiny), $\sigma [m]$ je poloměr sledované molekuly.

Pokud je v různých experimentech vstupní koncentrační gradient mezi perfuzátem sondy a okolní tkání konstantní, je koeficient difuze hlavní determinantou permeability prostředí (extracelulární tekutiny) a difuzního toku látky (J), jak lze odvodit z 1. Fickova zákona difuze:

$$J [mol s^{-1} m^{-2}] = \Delta n / \Delta t A = P \Delta c = (D / \Delta x) \Delta c \{8\},$$

kde: $\Delta n [mol]$ je látkové množství dané látky, které se účastní difuze, $\Delta t [s]$ je čas, po který difuze látky probíhá, $P [m s^{-1}]$ je permeabilita prostředí (extracelulární tekutiny) pro danou látku, $D [m^2 s^{-1}]$ je koeficient difuze dané látky v daném prostředí, $A [m^2]$ je plocha difuze, $\Delta x [m]$ je tloušťka difuzního regionu, $\Delta c [mol l^{-1}]$ je koncentrační gradient.

Pokles permeability média a difuzního toku látky v důsledku většího implančního traumatu vyústí ve zpo-

malení úniku průtokového indikátoru ze sondy, který se projeví zvýšením bazálního koncentračního poměru c_d/c_p . V případě masivnější lokální hemoragie se tento poměr může blížit hodnotě 1. Vzhledem k tomu, že poměr c_d/c_p je funkcí obrácené hodnoty tkáňového průtoku (vztah {6}, obr. 7), vede vzestup bazálních hodnot poměru c_d/c_p ke snížení citlivosti metody zejména ve smyslu znesnadnění zachytu ischemie. Pokud se tento problém zkombinuje s relativně malou difuzní plochou některých typů mikrodializačních sond, může při detekci změn krevního průtoku diluční metodou dojít až k jejímu selhání.

Velikost prostorové heterogenity (tj. rozdílů ve funkci identických, paralelně měřících sond) lze posoudit pomocí variačního koeficientu iniciálních hodnot poměru c_d/c_p pro daný typ sondy a tkáň. Tyto hodnoty se běžně pohybují v procentech až desítkách procent, přičemž mají negativní vztah k mikrodializační perfuzní rychlosti. Pokud jde o etanol, tak snižování perfuzní rychlosti ve snaze maximalizovat RR, resp. RD, a tím i citlivost metody ke změnám krevního průtoku se částečně balancuje zvýšenou variabilitou výsledků v důsledku zhoršených preanalytických podmínek (zejména odpařování). Teoretickou hodnotu RD vyplývající z charakteristik selektivně-permeabilní membrány, okolní tkáň a průtokové rychlosti mikrodializační sondou popisuje vztah {9}.

$$RD = (1 - e^{-PA/F}) \times 100 \{9\},$$

kde: e je Eulerovo číslo (2,718), $P [m s^{-1}]$ je permeabilita mikrodializační membrány a extracelulární tekutiny pro danou látku, $A [m^2]$ je difuzní plocha mikrodializační membrány, $F [m^3 s^{-1}]$ je průtok perfuzátu mikrodializační sondou.

Poděkování

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MSM 6198959216.

Literatura

1. Ungerstedt U, Pycock C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bull Schweiz Akad Med Wiss* 1974; 30: 44–55.

2. Lee GJ, Park JH, Park HK. Microdialysis applications in neuroscience. *Neurol Res* 2008; 30: 661–668.

3. De la Peña A, Liu P, Derendorf H. Microdialysis in peripheral tissues. *Adv Drug Deliv Rev* 2000; 45: 189–216.

4. Plock N, Kloft C. Microdialysis – theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. *Eur J Pharm Sci* 2005; 25: 1–24.

5. Bellander BM, Cantais E, Enblad P et al. Consensus meeting on microdialysis in neurointensive care. *Intensive Care Med* 2004; 30: 2166–2169.

6. McGarraugh G. The chemistry of commercial continuous glucose monitors. *Diabetes Technol Ther* 2009; 11 (Suppl 1): S17–S24.

7. Höcht C, Opezzo JA, Bramuglia GF et al. Application of microdialysis in clinical pharmacology. *Curr Clin Pharmacol* 2006; 1: 163–183.

8. Setälä L, Koskenvuo H, Gudaviciene D et al. Cost analysis of 109 microsurgical reconstructions and flap monitoring with microdialysis. *J Reconstr Microsurg* 2009; 25: 521–526.

9. Baldini F. Microdialysis-based sensing in clinical applications. *Anal Bioanal Chem* 2010; 397: 909–916.

10. Mecker LC, Martin RS. Integration of microdialysis sampling and microchip electrophoresis with electrochemical detection. *Anal Chem* 2008; 80: 9257–9264.

11. Van Gompel JJ, Chang SY, Goerss SJ et al. Development of intraoperative electrochemical detection: wireless instantaneous neurochemical concentration sensor for deep brain stimulation feedback. *Neurosurg Focus* 2010; 29: E6.

12. Tai LA, Tsai PJ, Wang YC et al. Thermosensitive liposomes entrapping iron oxide nanoparticles for controllable drug release. *Nanotechnology* 2009; 20: 135101.

13. Nedvídková J, Nedvídek J, Koska J et al. Využití mikrodializační techniky in vivo v základním a klinickém výzkumu. *Čas Lék Čes* 2003; 142: 307–310.

14. Mandák J, Živný P, Lonský V et al. Sledování průtoku krve kosterním svařem a vybraných metabolických ukazatelů v průběhu operace v mimotělním oběhu. *Rozhl Chir* 2003; 82: 460–468.

15. Pojar M, Mandák J. Intersticiální mikrodialýza v klinické a experimentální medicíně. *Čas Lék Čes* 2006; 145: 766–770; diskuse 770–771.

16. Kremen J, Bláha J, Matias M et al. Monitorování glykemie u kriticky nemocných pacientů: srovnání arteriálních a intersticiálních hladin glukózy měřených pomocí mikrodialýzy tukové tkáň. *Vnitř Lék* 2006; 52: 777–781.

17. Rybka J. Monitorování glykemie u kriticky nemocných pacientů – editorial. *Vnitř Lék* 2006; 52: 765–767.

18. Hickner RC, Rosdahl H, Borg I et al. The ethanol technique of monitoring local blood flow changes in rat skeletal muscle: implications for microdialysis. *Acta Physiol Scand* 1992; 146: 87–97.

19. Stallknecht B, Donsmark M, Enevoldsen LH et al. Estimation of rat muscle blood flow by microdialysis probes perfused with ethanol, 14C ethanol, and 3H2O. *J Appl Physiol* 1999; 86: 1054–1061.

20. Farnebo S, Samuelsson A, Henriksson J et al. Urea clearance: a new method to register local changes in blood flow in rat skeletal muscle based on microdialysis. *Clin Physiol Funct Imaging* 2010; 30: 57–63.

21. Hrubá P, Živný P, Živná H et al. Muscle, liver and kidney interstitium blood flow changes in rats measured by microdialysis with flow marker added. *Klin Biochem Metab* 2004; 12: 9–13.
22. Cibiček N, Mičuda S, Chládek J et al. Lithium microdialysis and its use for monitoring of stomach and colon submucosal blood perfusion – a pilot study using ischemic preconditioning in rats. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2006; 49: 227–231.
23. Wallgren F, Amberg G, Hickner RC et al. A mathematical model for measuring blood flow in skeletal muscle with the microdialysis ethanol technique. *J Appl Physiol* 1995; 79: 648–659.
24. Rådegran G, Pilegaard H, Nielsen JJ et al. Microdialysis ethanol removal reflects probe recovery rather than local blood flow in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1998; 85: 751–757.
25. Clough GF, Boutsouki P, Church MK et al. Effects of blood flow on the in vivo recovery of a small diffusible molecule by microdialysis in human skin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 681–686.
26. Kitano M, Norlén P, Håkanson R. Gastric submucosal microdialysis: a method to study gastrin- and food-evoked mobilization of ECL-cell histamine in conscious rats. *Regul Pept* 2000; 86: 113–123.
27. Rosdahl H, Lind L, Millgård J et al. Effect of physiological hyperinsulinemia on blood flow and interstitial glucose concentration in human skeletal muscle and adipose tissue studied by microdialysis. *Diabetes* 1998; 47: 1296–1301.
28. 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: 2406–2414.
29. Liu Z, Vuohelainen V, Tarkka M et al. Glutamate release predicts ongoing myocardial ischemia of rat hearts. *Scand J Clin Lab Invest* 2010; 70: 217–224.
30. Ostman B, Michaelsson K, Rahme H et al. Tourniquet-induced ischemia and reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 418: 260–265.
31. Harken AH. Lactic acidosis. *Surg Gynecol Obstet* 1976; 142: 593–606.
32. Setälä LP, Korvenoja EM, Härmä MA et al. Glucose, lactate and pyruvate response in an experimental model of microvascular flap ischemia and reperfusion: a microdialysis study. *Microsurgery* 2004; 24: 223–231.
33. Clausena T, Zaunera A, Levasseura JE et al. Induced mitochondrial failure in the feline brain: implications for understanding acute post-traumatic metabolic events. *Brain Research* 2001; 908: 35–48.
34. Juel IS, Solligård E, Skogvoll E et al. Lactate and glycerol released to the intestinal lumen reflect mucosal injury and permeability changes caused by strangulation obstruction. *Eur Surg Res* 2007; 39: 340–349.
35. Matthiessen P, Strand I, Jansson K et al. Is early detection of anastomotic leakage possible by intraperitoneal microdialysis and intraperitoneal cytokines after anterior resection of the rectum for cancer? *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1918–1927.
36. Hillered L, Valtysen J, Enblad P et al. Interstitial glycerol as a marker for membrane phospholipid degradation in the acutely injured human brain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 64: 486–491.
37. Lieutaud T, Dailler F, Artru F et al. Neurochemical monitoring in neurointensive care using intracerebral microdialysis. In: Cremers TIFH, Westerink BHC (eds). *Handbook of Microdialysis – Methods, Applications and Perspectives*. In: Huston JP (ed.). *Handbook of Behavioral Neuroscience*. Amsterdam: Academic press, Elsevier Science 2007; 16: 659–673.
38. Nilsson OG, Brandt L, Ungerstedt U et al. Bedside detection of brain ischemia using intracerebral microdialysis: subarachnoid hemorrhage and delayed ischemic deterioration. *Neurosurgery* 1999; 45: 1176–1184.
39. Klaus S, Staubach KH, Eichler W et al. Clinical biochemical tissue monitoring during ischaemia and reperfusion in major vascular surgery. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 289–291.
40. Ståhl N, Møllergård P, Hallström A et al. Intracerebral microdialysis and bedside biochemical analysis in patients with fatal traumatic brain lesions. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001; 45: 977–985.
41. Vespa PM, McArthur D, O'Phelan K et al. Persistently low extracellular glucose correlates with poor outcome 6 months after human traumatic brain injury despite a lack of increased lactate: a microdialysis study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 865–877.
42. Sarrafzadeh A, Haux D, Küchler I et al. Poor-grade aneurysmal subarachnoid hemorrhage: relationship of cerebral metabolism to outcome. *J Neurosurg* 2004; 100: 400–406.
43. Oddo M, Schmidt JM, Carrera E et al. Impact of tight glycemic control on cerebral glucose metabolism after severe brain injury: a microdialysis study. *Crit Care Med* 2008; 36: 3233–3238.
44. Marcoux J, McArthur DA, Miller C et al. Persistent metabolic crisis as measured by elevated cerebral microdialysis lactate-pyruvate ratio predicts chronic frontal lobe brain atrophy after traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2008; 36: 2871–2877.
45. Jansson K, Ungerstedt J, Jonsson T et al. Human intraperitoneal microdialysis: increased lactate/pyruvate ratio suggests early visceral ischaemia. A pilot study. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 1007–1011.
46. Solligård E, Juel IS, Bakkelund K et al. Gut luminal microdialysis of glycerol as a marker of intestinal ischemic injury and recovery. *Crit Care Med* 2005; 33: 2278–2285.
47. Setälä L, Papp A, Romppanen EL et al. Microdialysis detects postoperative perfusion failure in microvascular flaps. *J Reconstr Microsurg* 2006; 22: 87–96.
48. Jansson K, Strand I, Redler B et al. Results of intraperitoneal microdialysis depend on the location of the catheter. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 63–70.
49. Emmertsen KJ, Wara P, Soerensen FB et al. Intestinal microdialysis – applicability, reproducibility and local tissue response in a pig model. *Scand J Surg* 2005; 94: 246–251.
50. Cibiček N, Živná H, Vrublová E et al. Gastric submucosal microdialysis in the detection of rat stomach ischemia – a comparison of the 3H₂O efflux technique with metabolic monitoring. *Physiol Meas* 2010; 31: 1355–1368.
51. Deeba S, Corcoles EP, Hanna GB et al. Use of rapid sampling microdialysis for intraoperative monitoring of bowel ischemia. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1408–1413.
52. Korf J, Huinink KD, Postuma-Trumpie GA. Ultraslow microdialysis and microfiltration for in-line, on-line and off-line monitoring. *Trends Biotechnol* 2010; 28: 150–158.
53. Andrews PJ, Citerio G, Longhi L et al. Neuro-Intensive Care and Emergency Medicine (NICEM) Section of the European Society of Intensive Care Medicine. NICEM consensus on neurological monitoring in acute neurological disease. *Intensive Care Med* 2008; 34: 1362–1370.
54. Sitina M, Cerny V. Evaluating tissue perfusion using labelled water indicator microdialysis in a rat model of haemorrhagic shock. *Physiol Meas* 2007; 28: 689–696.

MUDr. Norbert Cibiček, Ph.D.
www.medchem.upol.cz
 e-mail: cibicek@seznam.cz

Doručeno do redakce: 7. 10. 2010
 Přijato po recenzi: 19. 5. 2011

www.klinickaonkologie.cz