

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



MIKRODIALÝZA V GASTROINTESTINÁLNÍM TRAKTU POTKANA

- BIOCHEMICKÁ STUDIE NUTRIČNÍHO KREVŇNÍHO PRŮTOKU A STŘEVNÍ BARIÉRY

Anglický název dizertační práce:

MICRODIALYSIS IN THE RAT GUT

- A BIOCHEMICAL STUDY OF NUTRITIONAL BLOOD FLOW AND MUCOSAL BARRIER

NORBERT CIBIČEK

Autoreferát dizertační práce

Doktorský studijní program: Lékařská chemie a biochemie

HRADEC KRÁLOVÉ

2008

Dizertační práce byla vypracována v rámci prezenčního studia doktorského studijního programu Lékařská chemie a biochemie na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze a v Radioizotopové laboratoři a viváriu Lékařské Fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Student: MUDr. Norbert Cibiček
Oddělení klinické biochemie, Nemocnice Hranice a.s., Hranice

Školitel: Doc. MUDr. Pavel Živný, CSc.
Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Univerzita Karlova v Praze,
Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Hradci Králové

Školitel-specialista: Prof. MUDr. Zdeněk Zadák, CSc.
Centrum pro výzkum a vývoj, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: Prof. MUDr. RNDr. Vilém Šimánek, DrSc.
Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity
Palackého v Olomouci

Prof. MUDr. Antonín Jabor, CSc.
Úsek laboratorních metod, Institut klinické a experimentální medicíny,
Praha

Obhajoba dizertační práce proběhne dne **4. prosince 2008 od 14:30 hod.** v zasedací místnosti děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

Tato práce vznikla za podpory Výzkumného záměru Fakultní nemocnice v Hradci Králové MZO 00179906 a částečně také grantu MŠMT COST B25.

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Doc. MUDr. RNDr. Milan Mělka, CSc.
Předseda komise pro obhajoby dizertačních prací v doktorském studijním programu Lékařská chemie a biochemie

OBSAH

1. SOUHRN	4
2. SUMMARY	5
3. PŮVODNÍ PRÁCE	6
4. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
5. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	8
<i>Mikrocirkulace, oxid dusnatý a střevní bariéra</i>	8
<i>Měření metabolismu, hemodynamiky a gastrointestinální bariéry</i>	9
6. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	11
7. MATERIÁL A METODY	12
<i>Chemikálie</i>	12
<i>Zvířecí modely</i>	12
<i>Experimentální protokoly</i>	12
<i>Stabilita funkce sondy, kalibrační postupy a vyšetření nutričního krevního průtoku</i>	12
<i>Laboratorní analýzy, měření střevní integrity a světelná mikroskopie</i>	13
<i>Analýza dat</i>	13
8. VÝSLEDKY	14
<i>Studie I</i>	14
<i>Studie II</i>	15
<i>Studie III</i>	18
9. DISKUSE	20
<i>Metodologické poznámky</i>	20
<i>Ischemická příprava (studie I)</i>	21
<i>Účinky kofeinu (studie II)</i>	21
10. ZÁVĚRY A PERSPEKTIVY DO BUDOUCNA	23
11. POUŽITÁ LITERATURA	24
12. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA	26
<i>Monografie a kapitoly v monografiích</i>	26
<i>Původní články a statě ve sbornících</i>	26
<i>Přehledové články</i>	27
<i>Přednášky na odborných setkáních, které přednesl autor dizertace</i>	27

1. SOUHRN

Úvod

Přestože mikrodialýzy bylo užito pro měření krevního průtoku v mnohých tkáních, data ze žaludeční submukózy potkana doposud chybí. V předchozí studii bylo jako nový marker průtoku navrženo lithium, které však zatím nebylo dostatečně validováno. Konzumace kávy poškozuje slizniční bariéru žaludku, která závisí na přiměřeném krevním zásobení. Není však jasné, do jaké míry může být krevní průtok v žaludku ovlivněn kofeinem. Dosavadní metody měření střevní propustnosti vyžadovaly využití, resp. ovlivnění systémové cirkulace – mikrodialýza jako možná alternativa zatím nebyla v této aplikaci odzkoušena.

Cíle

Cílem bylo zaprvé: zjistit využitelnost lithia při monitoraci změn krevního průtoku v submukóze žaludku a střeva daných ischemií/reperfúzí pomocí mikrodialýzy a zhodnotit systémové projevy pomocí aktivit vybraných enzymů a tvorby oxidu dusnatého; zadruhé: studovat lokální vliv kofeinu na mikrocirkulaci a tvorbu oxidu dusnatého v žaludeční submukóze a systémový vliv na oxidativní stres vyšetřením malondialdehydu; a zatřetí: zavést novou metodu kontinuálního měření slizniční propustnosti v sestupném tračníku potkana s využitím mikrodialýzy.

Materiál a metodika

Bylo užito techniky žaludeční a střevní submukózní mikrodialýzy a single-pass lumenální perfúze sestupného tračníku potkanů v celkové pentobarbitalové anestézii. Jako mikrodialyzační perfuzát byly použity roztoky obsahující lithium, ethanol, Ringerův a fyziologický roztok. Perfuzát střevního lumen obsahoval Ringerův roztok obohacený ^{51}Cr -EDTA s nebo bez přidání ethanolu. Kofein byl aplikovaný i.p. v dávkách 1, 10 a 50 mg kg⁻¹ těl. hm. Ischémie a reperfúze bylo dosaženo dočasným uzávěrem *truncus coeliacus*.

Výsledky

Mikrodialýza s využitím lithia jakožto flow-markeru naznačila snížení krevní perfúze žaludeční submukózy během uzávěru *tr. coeliacus*. V reperfúzní fázi bylo v žaludcích bez ischemické přípravy dosaženo navrácení krevní perfúze k původním hodnotám na rozdíl od těch, u kterých tato příprava proběhla. Mikrocirkulace v sestupném tračníku zůstala beze změn podobně jako vyšetřené sérové analyty (studie I). Podání kofeinu nevedlo k významným změnám žaludeční submukózní mikrocirkulace, produkce oxidu dusnatého nebo sérového malondialdehydu (studie II). Sliznice sestupného tračníku vystavena působení ethanolu podlehla značným makro- i mikroskopickým změnám, které byly spojeny se zvýšením propustnosti pro ^{51}Cr -EDTA (studie III).

Závěr

Výše zmíněné experimentální techniky žaludeční a střevní mikrodialýzy včetně propustnosti střevní sliznice byly úspěšně zavedeny. Nebylo potvrzeno ochranné zvýšení krevního průtoku v žaludku v důsledku ischemické přípravy. Kofein neovlivňuje krevní průtok v submukóze žaludku, tvorbu malondialdehydu ani na Ca^{2+} nezávislou syntézu oxidu dusnatého. K objasnění role kofeinu v kontextu dráždivých účinků kávy na sliznici žaludku budou potřebné další studie.

Klíčová slova

Mikrodialýza • Krevní průtok • Lithium • Žaludek a střevo • Oxid dusnatý • Ischemická příprava • Kofein • Slizniční bariéra • Propustnost

2. SUMMARY

Background

Microdialysis has been used to measure blood perfusion in almost all tissues but data from rat gut submucosa are missing. Lithium, previously suggested as a suitable flow marker has not been validated yet. Coffee impairs gastric mucosal barrier, but the effect of caffeine on gastric blood flow requires elucidation. All established *in vivo* methods of mucosal permeability assessment necessitate the functional involvement of bloodstream – the application of microdialysis as an alternative has not yet been tested.

Aims

The aims were: firstly, to investigate the applicability of lithium microdialysis for monitoring blood flow changes due to ischemia/reperfusion in rat stomach and colon submucosa and to assess the systemic effects on selected enzymes and nitric oxide; secondly, to evaluate local impact of caffeine on gastric submucosal microcirculation, nitric oxide release and its systemic effect on oxidative stress-related marker malondialdehyde; and finally, to develop a microdialysis method of continuous mucosal permeability measurement in rat descending colon.

Materials and methods

Gastric and colon submucosal microdialysis technique plus colon single-pass luminal perfusion were used in pentobarbital-anaesthetized rats. As microdialysis perfusate, lithium, ethanol, Ringer or saline solution-containing media were applied. Luminal perfusate contained ⁵¹Cr-EDTA-enriched Ringer solution with/without ethanol. Caffeine was applied i.p. in doses 1, 10 and 50 mg kg⁻¹ b. wt. Ischemia and reperfusion were accomplished by temporary celiac artery occlusion.

Results

Lithium microdialysis indicated a decrease in blood perfusion during celiac artery occlusion in stomach. During reperfusion, the ischemic stomachs showed a restoration of blood perfusion in contrast to the preconditioned ones. Colon microcirculation remained unaltered as did studied serum analytes (study I). Caffeine administration did not affect gastric submucosal microcirculation, nitric oxide production or serum malondialdehyde (study II). Colon mucosa exposed to ethanol presented with profound macro- and microscopical changes associated with increased tracer permeability (study III).

Conclusions

The aforementioned microdialysis and mucosal permeability techniques were successfully tested and found applicable in given experimental settings. Caffeine was found not to interfere with submucosal blood perfusion, malondialdehyde and Ca²⁺-independent nitric oxide synthesis. Further studies are needed to account for the lack of gastric protective blood flow enhancement due to ischemic preconditioning and to explore possible mechanisms behind the effects of caffeine on gastric physiology in relation to irritant effects of coffee.

Key words

Microdialysis • Blood Perfusion • Lithium • Gut • Nitric Oxide • Ischemic Preconditioning • Caffeine • Barrier • Permeability

3. PŮVODNÍ PRÁCE

Dizertační práce je založena na následujících studiích označených v textu římskými čísly:

- I. CIBIČEK N, MIČUDA S, CHLÁDEK J, ŽIVNÝ P, ZADÁK Z, ČERMÁKOVÁ E 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 Králové)* **2006**;49(4):227-31.
- II. CIBIČEK N, ŽIVNÁ H, CIBIČEK J, ČERMÁKOVÁ E, VOŘÍŠEK V, MALÁKOVÁ 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):83-90.
- III. CIBIČEK N, ŽIVNÁ H, ZADÁK Z, KULÍŘ J, ČERMÁKOVÁ E, PALIČKA V. Colon submucosal microdialysis: a novel in vivo approach in barrier function assessment - a pilot study in rats. *Physiol Res* **2007**;56(5):611-7.

4. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANOVA – analýza rozptylu
ALT – alaninaminotransferáza
AMYL – amyláza
AST – aspartátaminotransferáza
CAO – okluze *truncus coeliacus*
cGMP – cyklický guanosin monofosfát
CHE – cholinesteráza
CM – kontrolní roztok (jak byl použit ve studii III)
cpm – počet impulzů za minutu
ECF – extracelulární tekutina
EDTA – kyselina etylendiamintetraoctová (⁵¹Cr-EDTA – sůl EDTA obsahující ⁵¹Cr)
EM – etanolový roztok (jak byl použit ve studii III)
GC-MS – plynová chromatografie (plynový chromatograf) spojený s MS detekcí
HE – hematoxylin-eozin
HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IP – (gastro-) intestinální propustnost
IPC – ischemická příprava
IR – ischemie/reperfúze, ischemicko-reperfúzní
IS – skupina s ischemií ve studii I
ISP – skupina s ischemickou přípravou před ischemií ve studii I
LDH – laktátdehydrogenáza
LIP – lipáza
LM – mikrodialýza s využitím lithia
MDA – malondialdehyd
MP – mikrodialyzační sonda (proba)
MS – hmotnostní spektrometrie (hmotnostní spektrometr)
NO – oxid dusnatý
NOS – syntáza oxidu dusnatého (nNOS – neuronální, eNOS – endoteliální, iNOS – inducibilní, cNOS – konstitutivní NOS izoforma)
rIPC – IPC působící ve vzdálených lokalizacích
R1/1 – Ringerův roztok
S – kontrolní skupina ve studii I
SEM – standardní chyba průměru
UV – VIS – (u HPLC) detekce v ultrafialovém až viditelném spektru

5. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Za poslední tři desetiletí došlo k velkému posunu v chápání střeva jako významného činitele jak v udržení homeostázy organismu, tak při vzniku nemocí. Intaktní střevní slizniční bariéra a další obranné mechanismy (jako např. adekvátní prokrvení splachníku) hrají zásadní roli v uchování zdraví. Poškození střevních funkcí se pak může projevit širokou škálou příznaků od dyspepsie až k multiorgánovému selhání. Přestože se ve výzkumu prevence a léčby střevních postižení využila již řada experimentálních metod, s mikrodialýzou jakožto perspektivní *in vivo* metodou sledování lokálního metabolismu a krevního průtoku je zatím velmi málo zkušeností.

Mikrocirkulace, oxid dusnatý a střevní bariéra

Ischemicko-reperfúzní (IR) postižení střeva je asociováno s vysokou morbiditou a mortalitou. Jako příčiny se zde podepisují chirurgické zákroky, různá onemocnění a šokové stavy, přičemž platí, že střevní sliznice a její mikrocirkulace (zejména buňky endotelu) patří mezi nejzranitelnější tkáně. Biochemické změny spojené s IR-indukovanou mikrovaskulární dysfunkcí jsou charakteristické pro akutní imunitní reakci, která může dosáhnout takové intenzity, že ovlivní vzdálené orgány a vyvolá tzv. systémovou zánětlivou odpověď vedoucí až k multiorgánovému selhání. Právě tato rizika volají po hledání efektivních preventivně-léčebných přístupů. Již několik let je známo, že funkční rezervy střeva vystaveného působení ischemie a reperfúze lze potencovat tzv. ischemickou přípravou (IPC), resp. procesem, kdy krátká IR epizoda vede k ochraně před následnou déletrvající IR fází. Časově působí IPC ve dvou fázích – časné a pozdní; z hlediska místa jde o působení klasické – lokální a vzdálené, rIPC. Přestože byly poskytnuty důkazy o existenci tohoto fenoménu v různých orgánech splachníku, údaje o tračníku doposud chybí. Co se týče mechanismů vysvětlujících IPC, centrální role byla připsána působení oxidu dusnatého, NO.

NO je volný radikál produkovaný z L-argininu rodinou svých syntáz (NOS). Byly popsány tři izoformy NOS – neuronální (nNOS), endoteliální (eNOS) a indukibilní (iNOS), čehož první dvě formy tvoří nízká množství NO a jsou exprimovány tzv. konstitutivně (constitutive, cNOS), přičemž poslední vyžaduje indukovanou syntézu svých proteinů *de novo*, a to ke tvorbě velkého množství NO. Regulace fyziologických funkcí (jako např. udržování integrity slizniční bariéry) a ochranné role byly připisovány NO vznikajícímu z konstitutivních izoform. Mezi mechanismy jeho působení řadíme kromě vazodilatace prevenci leukocytární adheze a sekrece, snížení degranulace žírných buněk, redukci adheze a sekrece destiček, stimulaci sekrece hlenu žaludečními epitelii s rozšířením jeho ochranné vrstvy a antioxidační funkci. Na druhé straně iNOS byla považována za patologickou, protože její indukce vede ke snížení viability střevních epitelii a ke zvýšení tvorby lézí v celé řadě experimentálních modelů slizniční iritace a stresu. Příliš vysoká množství NO jsou již sama o sobě schopna poškodit sliznice, o to více tak činí v kombinaci s lumenálními iritanty, čímž zvyšují epiteliální propustnost. Tyto efekty pravděpodobně nejsou způsobeny NO jako takovým, ale spíše produkty jeho reakcí se superoxidem - peroxynitritem a kyselinou peroxydusitou. Přes zmíněná pozorování je diskuse ohledně významu iNOS stále otevřená, a to i díky nálezům jejího gastroprotektivního působení (Konturek *et al.* 1998).

Zachování slizniční bariérové integrity žaludku závisí na rovnováze mezi agresivními a ochrannými faktory, které jsou na jedné straně reprezentovány kyselinou chlorovodíkovou a na straně druhé adekvátním prokrvením sliznice s dostatečnou tvorbou hlenu. Kofein podporuje vylučování žaludeční kyseliny a může také přispívat ke slizniční hypoperfúzi způsobené poškozením (mikro)vaskulatury (Roth and Ivy 1945, Pfeiffer and Roth 1970). Navíc jde o látku potlačující acetylcholinem navozenou tvorbu ochranného hlenu a poškozující integritu žaludeční sliznice (Dziaduś-Sokołowska *et al.* 1989). Tato pozorování

jsou v souladu s epidemiologickými studiemi, které spojují konzumaci kávy s gastroezofageálním refluxem, tvorbou vředů a rakovinou horní části trávicí trubice. Na druhé straně se ukazuje, že kofein může (také) zvyšovat prokrvení žaludeční sliznice (Ozturkcan *et al.* 1974) a vykazovat ochranný vliv na slizniční bariéru (Wittmers *et al.* 1998), čímž by při vzniku slizničního poškození mohl působit preventivně (Koyama *et al.* 1999). U kofeinu se jedná o metylxantin s možnými protichůdnými účinky (antagonismus na adenosinových receptorech, inhibice fosfodiesterázy, aktivace Ca²⁺-kanálů a inhibice guanylátcyklázy), které mohou interferovat s produkcí NO a/nebo s jeho druhým poslem cyklickým guanozinmonofosfátem (cGMP). Po kofeinu bylo prokázáno snížení exprese NOS a oslabení glutamátem navozené tvorby NO. Ingeste kofeinu rovněž snižuje množství vydechovaného NO a neguje ochranný vliv IPC. Na druhé straně endotel aorty reaguje na kofein zvýšením syntézy NO. Přes jasnou podporu vazokonstrikční role kofeinu v různých orgánech neposkytuje literatura konzistentní údaje o vlivu kofeinu na perfúzi žaludeční (sub)mukózy, funkci cévního endotelu a (tudíž ani na) tvorbu žaludečních slizničních lézí (Papamichael *et al.* 2005, Umemura *et al.* 2006, Yano *et al.* 1982, Parmar *et al.* 1985, Koyama *et al.* 1999). Navíc, údaje o lokální tvorbě NO v žaludku a modulaci celkového oxidačního stresu po podání kofeinu zatím zcela chybí.

Měření metabolismu, hemodynamiky a gastrointestinální bariéry

Pro pochopení procesů probíhajících v citlivých orgánech (jako je např. mozek) může být odběr systémové krve a/nebo vzorků tkáně shledán jako neadekvátní a/nebo poškozující. Z těchto důvodů byl hledán přístup, který by s vyšší specificitou a senzitivitou poskytl důležité biochemické a patofyziologické informace minimálně invazivním způsobem. Po letech experimentování s tzv. push-pull kanylymi, semi-permeabilními dialyzačními vložkami a jejich kombinacemi ve formě dialytród, se vývoj *in vivo* měření tkáňových procesů usadil na kontinuální perfúzi dutých dialyzačních vláken, které byly později nahrazeny jehlovitými mikrodialyzačními sondami. Mezi hlavní výhody posledního ze zmíněných postupů patří prevence změn (zejména stoupání) tkáňového tlaku a možnost kontinuálního měření analytů. V dnešní době je technika mikrodialýzy propracovaná natolik, že se (ve specializovaných centrech) začíná objevovat v rutinní klinické praxi, a to zejména v neurointenzivní péči jako prostředek peri- a postoperativního metabolického sledování. Přestože jsou dostupná i jistá experimentální a pilotní klinická data z aplikací mikrodialýzy ve splanchniku, zkušenosti s mikrodialýzou žaludku a střeva zůstávají nadále nedostatečné.

Pro měření krevního průtoku ve stěně žaludku a střeva není prozatím žádná metoda zlatého standardu, která by byla všeobecně přijata pro klinické použití. Mezi důvody lze počítat i fakt, že informace relevantní pro posouzení střevní viability vyžadují popis mikrocirkulace, protože lokální perfúze nemusí nutně korelovat s celkovým krevním tokem do orgánu skrze velké cévy. V humánní a experimentální medicíně je možné použít měření sérového laktátu, dopplerovský ultrazvuk, laserovou dopplerovskou flowmetrii, tonometrii, počítačovou tomografii, nukleární magnetickou rezonanční angiografii, pozitronovou emisní tomografii, metody využívající fluorescein, oximetrii, techniky diluce barviva, intravitální mikroskopii a metody clearance inertního plynu nebo mikrosfér. Problémem těchto metod je však nedostatečná senzitivita nebo specificita, hodnocení zatížené subjektivním faktorem, nedostatečná klinická validace nebo použitelnost, významné metodologické problémy nebo příliš vysoká cena pro rutinní využití. První (a dodnes používaná) metoda měření krevního průtoku využívající techniku mikrodialýzy byla založena na negativní korelaci mezi kapilární perfúzí a výtokem indikátoru (etanol) z perfúzního média do extracelulárního tkáňového moku (Hickner *et al.* 1992). Mezi hlavní výhody tohoto postupu patřila nízká invazivita a přímý kontakt sondy s intersticiem v blízkosti kapilár a okolních buněk umožňující zároveň paralelní sledování metabolismu včetně farmakologických studií. Nevýhodou byl spíše kvalitativní charakter měření průtoku a těkavost etanolu (preanalytická fáze). Proto jsme se

v předchozí pilotní práci zaměřili na studium lithia, které bylo použito jako indikátor průtoku krve v intersticiu jater, ledviny a kosterního svalu po parciální hepatektomii a nefrektomii (Hrubá *et al.* 2004). Tato slibná metoda však stále čeká na svoji validaci (např. na modelu IR). Funkce střevní bariéry je posuzována jako snadnost nefacilitované difúze specifických látek přes střevní sliznici, tj. (gastro-)intestinální propustnost (IP). IP testy jsou založeny na sledování prostupu markerů neboli sond přes sliznici, a to v obou směrech. Mezi typické sondy patří cukry (sacharóza, laktulóza nebo manitol), polyetylglykoly, ⁵¹Cr-značený etylendiamintetraacetát (⁵¹Cr-EDTA), peroxidáza a různé proteiny jako např. bovinní sérový albumin. Problémem těchto metod je řada faktorů, které mohou ovlivnit výsledky výtěžku sond, jako např. krevní průtok (což se v praxi řeší využitím poměru výtěžků dvou sond, např. laktulózy a manitolu). Lze například předpokládat, že pokud perfúze vyšetřovaného úseku střeva na delší dobu klesne k hodnotám blízkým nule, dojde k významnému omezení obohacení krve nebo lumenálního perfuzátu markerem, což povede k falešně nízkým hodnotám propustnosti. Toto lze očekávat zejména při krátkodobých experimentech, které využívají umělého omezení krevního průtoku a kontinuálně monitorují hodnoty IP pomocí jediné sondy. V takovém případě by aplikace mikrodialýzy v submukóze střeva mohla při výtěžku sondy s výhodou nahradit krevní cévy a navíc ještě poskytnout další lokální (biochemické, farmakologické nebo hemodynamické) informace.

6. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Obecným cílem práce bylo využít mikrodialýzu ve splachnické oblasti potkana se zaměřením na bariérovou funkci střeva a hemodynamické, resp. metabolické děje významné pro udržení této funkce. Specifickými cíly bylo:

- I. zhodnotit využitelnost mikrodialýzy lithia (LM) v submukóze žaludku a tračníku potkana pro sledování změn krevního průtoku způsobených IR, studium ochranného vlivu lokální a vzdálené IPC na nutriční krevní průtok a výzkum možných systémových projevů okluze *truncus coeliacus* (CAO) a IPC změřením vybraných enzymových aktivit a NO;
- II. studovat možný (na dávce závislý) vliv kofeinu na mikrocirkulaci a tvorbu NO v submukóze žaludku a na marker systémového oxidačního stresu plazmatický malondialdehyd (MDA);
- III. otestovat možnost využití mikrodialýzy submukózy tračníku pro kontinuální měření stavu střevní slizniční bariéry potkana po intraluminální perfúzi koncentrovaným etanolem.

7. MATERIÁL A METODY

Chemikálie

Jako mikrodialyzační perfúzní roztoky byly využity: sérový standard Li^+ (2 mmol l^{-1} , Eppendorf, Hamburg, Germany, studie I), 0,9 % fyziologický roztok obohacený etanolem s konečnou koncentrací 50 mmol l^{-1} (studie II) nebo Ringerův roztok (InMediec s.r.o., Luhačovice, Czech Republic, studie III). Kofein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku tak, aby bylo dosaženo koncentrací 0,5, 5 a 25 mg ml^{-1} (studie II). Jako luminální perfuzát ve studii III byl využit roztok $^{51}\text{Cr-EDTA}$ v 0,005 mol l^{-1} EDTA, 433,64 MBq (11,72 mCi) ml^{-1} , pH=7,0 (Perkin Elmer, Boston, MA, USA), který byl zředěn R1/1 (1: 1666,7 obj. – kontrolní roztok, CM), nebo stejným způsobem v roztoku R1/1 a 96 % etanolu tak, aby vznikl 20 %-ní roztok etanolu (etanolový roztok, EM).

Zvířecí modely

Experimenty byly prováděny na dospělých potkaních samcích kmene Wistar v celkové pentobarbitalové anestézii (úvodní dávka 50 mg/kg tělesné hmotnosti). V závěru byla zvířata usmrcena odběrem arteriální krve; séra nebo plazmy byly uchovány při -20 až -70 °C. Všechna zvířata obdržela péči v souladu s platnými zákony na ochranu zvířat proti týrání. Ve studiích I a II bylo užito upravené techniky žaludeční submukózní mikrodialýzy (Kitano *et al.* 2000). Mikrodialyzační sonda CMA/20, CMA/Microdialysis, Solna, Švédsko, (studie I) nebo MAB 11.8.10, Microbiotech/se AB, Stockholm, Švédsko (studie II) byla vložena do připraveného tunelu a zajištěna stehem. V sestupném tračnicku byly stejným způsobem implantovány sondy CMA/20 (studie I) nebo MAB 1.2.4., (studie III). Katetry byly perfundovány čerpadlem LD 20, Tesla Přelouč (studie I) nebo CMA 102, CMA Microdialysis AB, Solna, Švédsko (studie II, III). IR poškození žaludku bylo dosaženo pomocí mikrosvorky v úrovni odstupu *truncus coeliacus* z břišní aorty (Pajdo *et al.* 2001). Účinnost intervence byla vždy ověřena vizuálně. Single-pass perfúze střeva bylo dosaženo pomocí kanyly s dvojitým lumen, která byla po vložení a upevnění proplachována pumpou LD 20.

Experimentální protokoly

Studie I zahrnovala tři skupiny zvířat – první kontrolní skupinu (S), druhou ischemickou skupinu (IS), která podstoupila 30-minutovou CAO s následnou 2,5 hodiny trvající reperfúzí a konečně třetí skupinu s identickou IR fází, které předcházela ischemická příprava sestávající z 5 min. ischemie a 25 min. reperfúze (ISP). Studie II využila čtyři skupiny zvířat, z nichž první byl intraperitoneálně aplikován fyziologický roztok (kontrola), druhé, třetí a čtvrté pak roztoky kofeinu s koncentracemi 0,5, 5 a 25 mg ml^{-1} (dávky kofeinu byly v daném pořadí 1, 10 a 50 mg kg^{-1} těl. hm.). Ve studii III byla první skupina vyšetřována jako kontrolní (obdržela pouze CM), přičemž druhá skupina byla vystavena 30-minutovému působení intraluminálního EM.

Stabilita funkce sondy, kalibrační postupy a vyšetření nutričního krevního průtoku

Ve studiích I a III byly sondy kalibrovány *in vitro* s využitím „zero-net flux“ metody (Lönnroth *et al.* 1987). Měření NO pomocí *in vivo* mikrodialýzy ve studii II bylo validováno ve dvou krocích. Nejdříve byla po dobu 7 hodin kontinuálně testována stabilita funkce sondy pro výtěžek dusičnanového aniontu. Poté byl stanoven výtěžek sondy *in vivo* metodou „zero-net flux“. Odhad krevní perfúze v submukóze žaludku ve studii I byl vyjádřen pomocí rozdílu koncentrací iontu lithia (vtoková – výtoková konc.) jak bylo uvedeno v předchozí studii (Hrubá *et al.* 2004). Tento parametr je označen jako „LM“. Ve studii II byla pro popis lokálního krevního průtoku využita technika diluce etanolu, která pracuje s poměrem jeho

koncentrací na výstupu a vstupu (Hickner *et al.* 1995), přičemž koncentrace etanolu v perfuzátu činila 50 mmol l⁻¹.

Laboratorní analýzy, měření střevní integrity a světelná mikroskopie

Li⁺ byl stanoven plamenovou fotometrií. Sérový NO byl stanoven jako suma dusitanu a dusičnanu (NO₃⁻ pomocí HPLC s UV–VIS detekcí, NO₂⁻ fluorimetricky). Sérové aktivity enzymů byly stanoveny pomocí rutinního biochemického analyzátoru (Hitachi 917). NO v mikrodialyzátech byl stanoven jako suma dusitanu a dusičnanu metodou ELISA pomocí komerčně dostupného kitu. Analýza etanolu byla provedena na přístroji GC-MS. Plazmatický kofein byl stanoven pomocí HPLC s fotodiodovým detektorem. Plazmatický MDA byl stanoven fotometricky. Aktivita gama záření byla změřena přístrojem LB 2111. Propustnost sliznice tračnicku byla určena výpočtem: [(cpm dialyzátu – cpm pozadí) / (cpm lumenálního perfuzátu – cpm pozadí)] x 100. Výsledky byly vyjádřeny v %. Pro vyšetření světelnou mikroskopií byly použity standardní parafínové řezy a barvení hematoxylin–eozinem (HE). Kritéria pro zhodnocení poškození sliznice žaludku jsou detailně popsána jinde (Natale *et al.* 2001).

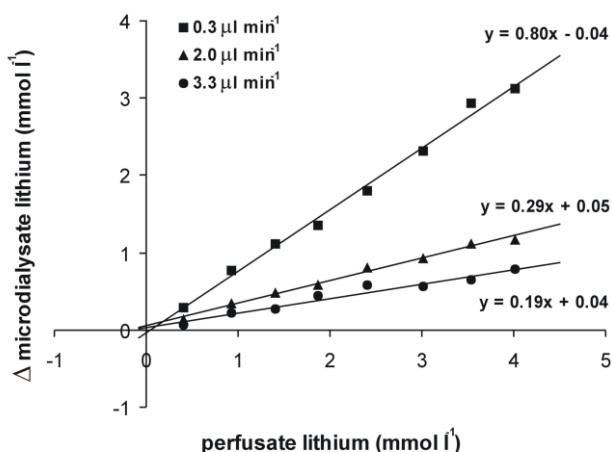
Analýza dat

Pokud není uvedeno jinak, data jsou průměry ± standardní chyby průměru (SEM) absolutních nebo relativních hodnot (které byly vztaženy k individuálním referenčním hodnotám, tj. 100 % získaným hned po ukončení ekvilibrační periody). Pro statistické vyhodnocení bylo užito testů normality, analýzy rozptylu (ANOVA) s nebo bez opakování s Fisherovým LSD *post hoc* testem pro mnohočetná srovnání (pouze ve studii I) s využitím programů NCSS 2004 a Statistica. Hladina významnosti α byla stanovena na 0,05.

8. VÝSLEDKY

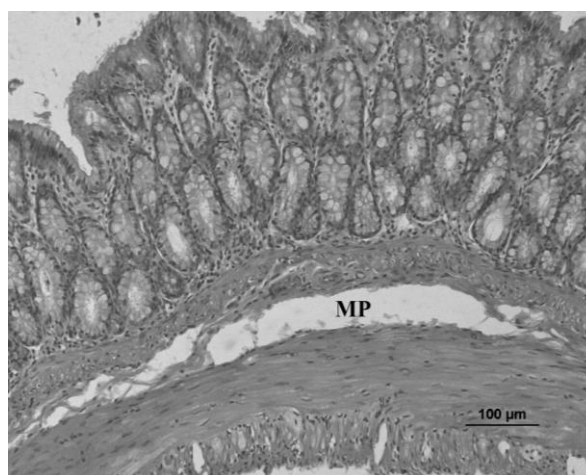
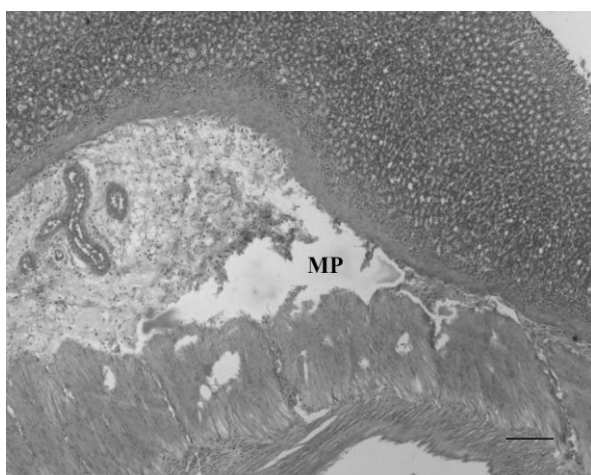
Studie I – souhrn hlavních výsledků

- Získali jsme základní znalost o funkci použité mikrodialyzační sondy (CMA 20) pomocí *in vitro* testu (obr. 1).
- Ověřili jsme správnou pozici sondy v orgánech (obr. 2).
- Výchozí hodnoty LM se mezi skupinami ani mezi místy implantace nelišily. Absolutní hodnoty LM ve skupině S svědčí pro stabilitu krevní perfúze v žaludku. Krátká i dlouhá ischemie vedla k poklesu hodnot LM, které se v reperfuční fázi ve skupině IS navrátily k výchozím hladinám, přičemž ve skupině s ischemickou přípravou došlo k dalšímu poklesu LM. Žádná z popsaných změn nedosáhla statistické významnosti při srovnávání s kontrolní skupinou (S). V tračniku nebyly zachyceny změny (obr. 3).
- Experimentální zákroky neměly významný vliv na sérový NO a aktivity vybraných enzymů (obr. 4 a 5).



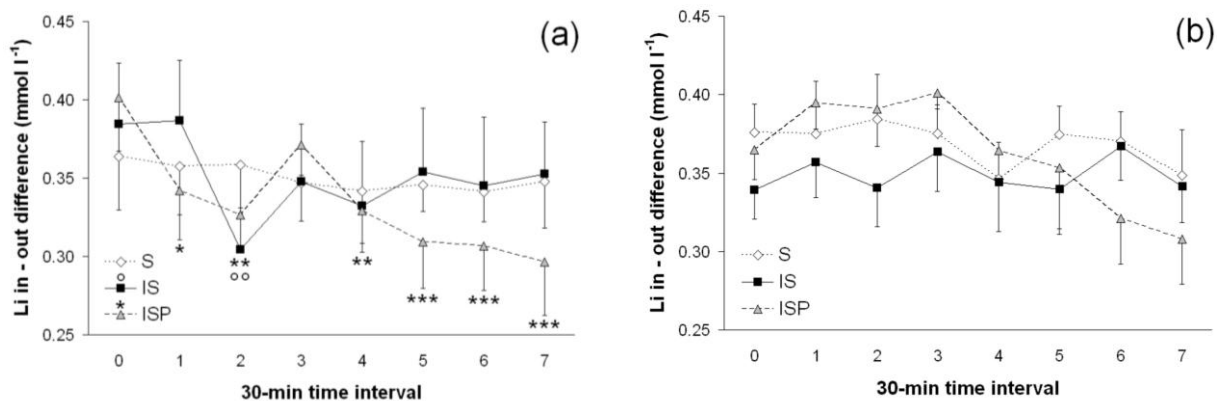
Obr. 1.

In vitro kalibrace sondy CMA 20 (tři experimenty po osmi měřeních). Rozdíl v koncentraci lithia v perfuzátu a dialyzátu vyneseno proti lithiu v perfuzátu poskytne přímku jejíž gradient představuje výtěžek sondy (80, 29 a 19 % pro perfuzní rychlosti 0.3, 2 a 3.3 μl min⁻¹).



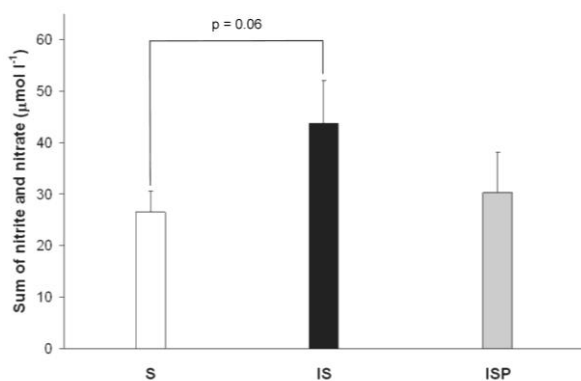
Obr. 2.

Histologický pohled na stěnu žaludku (vlevo) a tračníku (vpravo) naznačuje původní pozici mikrodialyzačních sond (MP) ve skupině S.



Obr. 3.

Srovnání úrovně krevní perfúze vyjádřené jako rozdíl v koncentraci lithia v perfuzátu a dialyzátu (LM) v submukóze žaludku (a) a tračniku (b). Symboly *, °; **, °° a ***, °°° označují $p < 0.05$; $p < 0.01$ a $p < 0.001$ ve srovnání s výchozími hodnotami v rámci skupin. Průměry \pm SEM ($n = 6 - 8$).

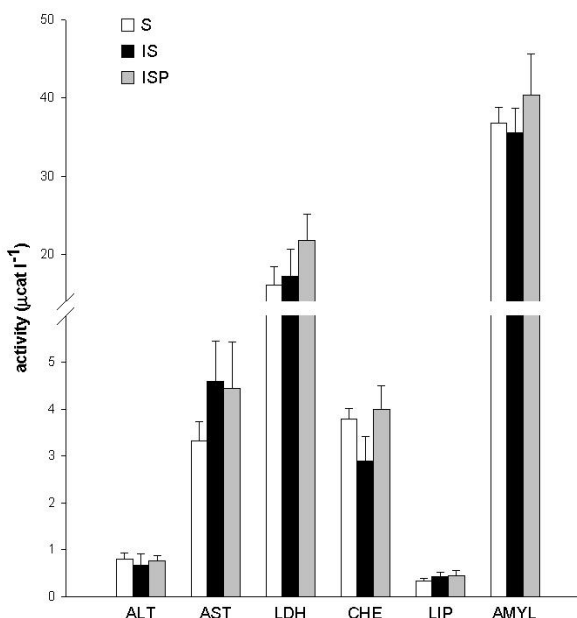


Obr. 4 (nahore).

Průměry + SEM ($n = 6 - 10$).

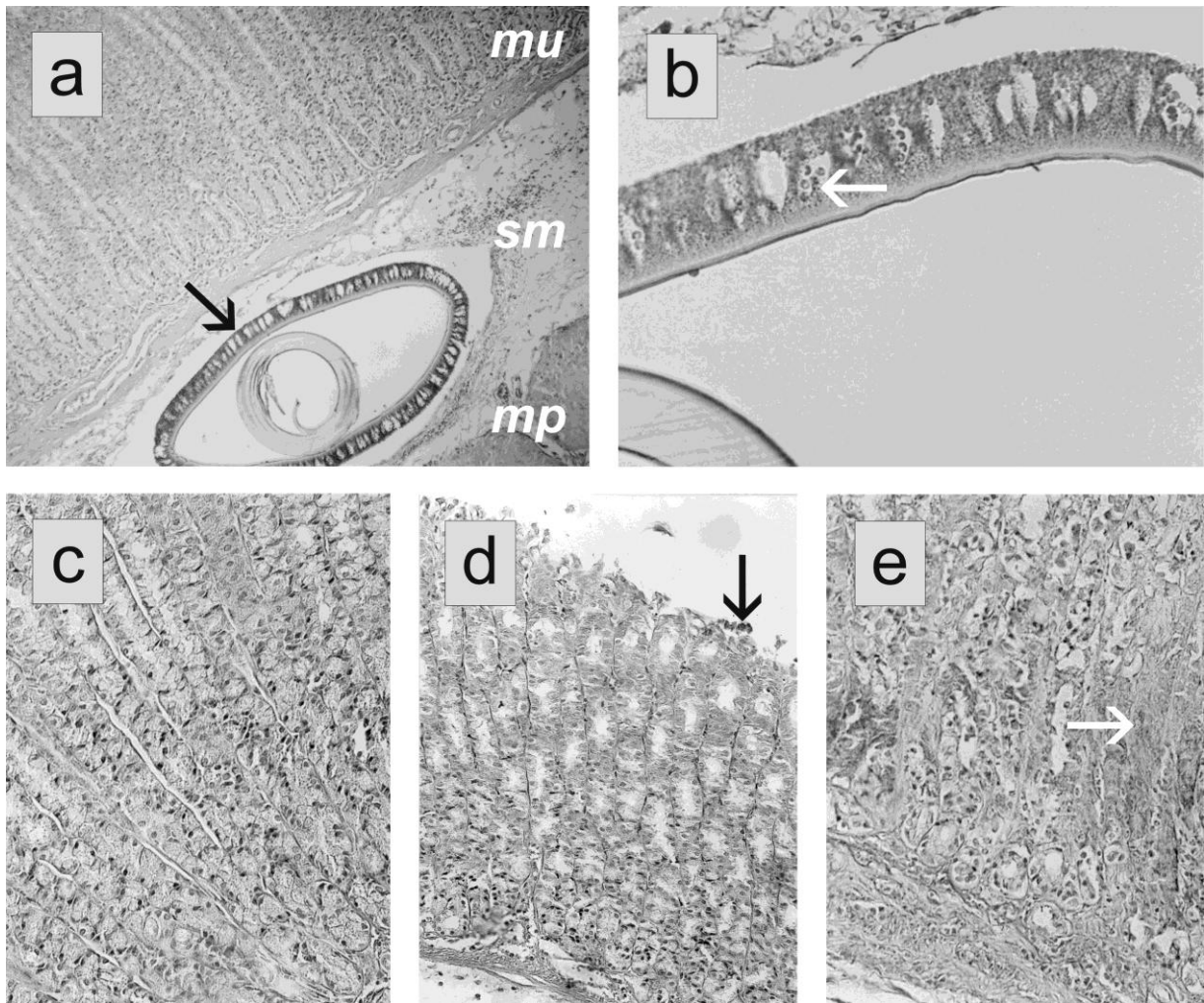
Obr. 5 (vpravo).

Průměry + SEM ($n = 6 - 10$).



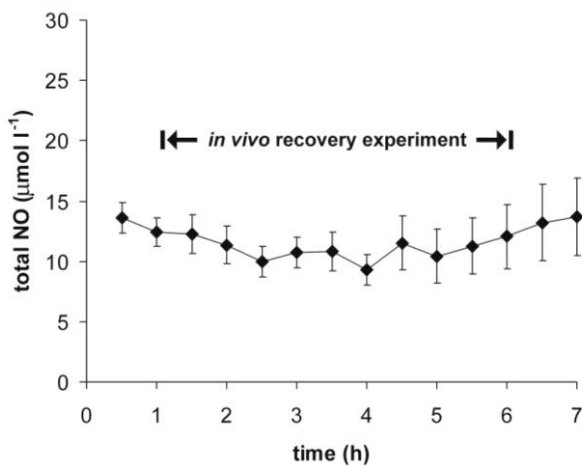
Studie II – souhrn hlavních výsledků

- Ověřili jsme správnou pozici sondy v orgánu (obr. 6a), přičemž histologický obraz byl v souladu s literaturou (obr. 6b, Kitano *et al.* 2000).
- Všechny skupiny obsahovaly histologické léze stupňů 0-II; makroskopicky nebyla sliznice žaludku kofeinem ovlivněna (obr. 6c-e).
- Získali jsme znalost o funkci použité mikrodialyzační sondy (MAB 11.8.10) *in vivo* s průkazem její stability včetně produkce NO ve sledovaném čase (obr. 7, 8).
- Kofein byl bez efektu na extracelulární koncentraci dusičnanů a dusitanů (obr. 9a), resp. na mikrocirkulaci studovanou etanolovou diluční technikou (obr. 9b).
- Biologická dostupnost kofeinu po i.p. podání byla srovnatelná s aplikací i.v.; dané dávky však nevedly ke změně oxidačního stresu hodnoceného pomocí koncentrací plazmatického markeru lipoperoxidace - MDA (tab. 1).



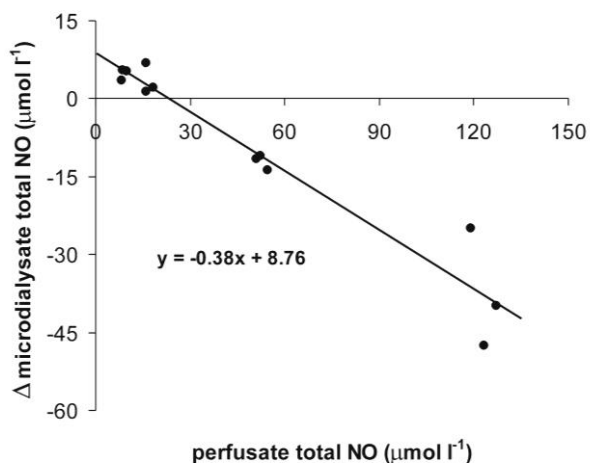
Obr. 6.

Panel "a" dokládá správnou pozici mikrodialyzační sondy (šipka). Katetr je obklopen edémem s hyperémií a mírným difúzním zánětlivým infiltrátem, který místy proniká do sliznice. Pevnější vnitřní trubice sondy byla poškozena v průběhu krájení preparátu (*mu*=sliznice, *sm*=submukóza, *mp*=vlastní svalová vrstva). Panel "b" přináší detail zevní membrány sondy s vcestovanými polymorfonukleáry (šipka). Panely "c-e" ukazují normální sliznici (stupeň 0), a dále léze prvního a druhého stupně, tj. oloupané epitelie a nekrózu jamek (šipky). Standardní barvení hematoxylin-eosinem, původní zvětšení "a" 125x, "b" 500x, "c-e" 250x.



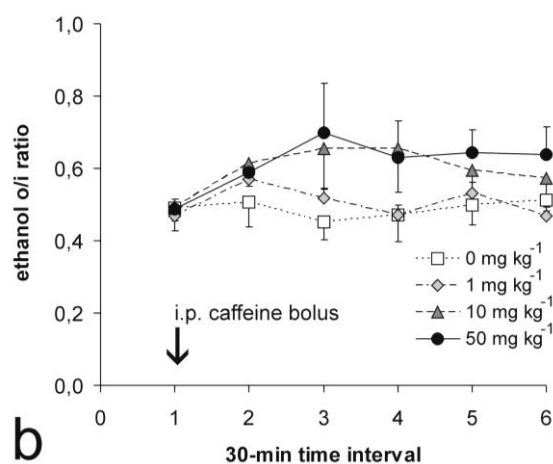
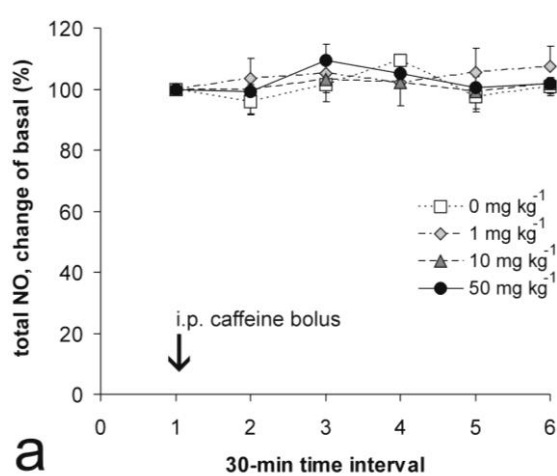
Obr. 7.

Graf popisuje stabilitu celkové produkce NO (suma dusičnanů a dusitanů) měřené pomocí *in vivo* mikrodialýzy v submukóze žaludku potkanů v celkové anestézii. Šipky definují časový průběh *in vivo* kalibrace sondy (která provedena v jiné studii, viz obr. 8). Data jsou vyjádřena jako průměry \pm SEM z pěti měření.



Obr. 8.

In vivo kalibrace sondy (metoda “zero net-flux”). Výsledkem nanesení rozdílu v obsahu celkového NO mezi dialyzátem a perfuzátem proti NO v perfuzátu je přímka, jejíž směrnice představuje výtěžek sondy (38 %). Průsečík s osou x pak souhlasí s koncentrací NO v okolním tkáňovém moku ($\sim 23 \mu\text{mol l}^{-1}$), přičemž průsečík s osou y se přibližuje k průměrné hodnotě získané v daném časovém intervalu z experimentu zkoumajícího stabilitu produkce NO. (11 $\mu\text{mol l}^{-1}$, obr. 7). Jednotlivé výsledky ze třech zvířat jsou vyjádřeny jako body.



Obr. 9.

Panel “a” představuje celkovou produkci NO v návaznosti na zvyšující se dávky kofeinu. V průběhu 2,5 h sledování nedošlo k významným rozdílům. Panel “b” ilustruje průběh mikrocirkulace sledované etanolovou diluční technikou (která negativně koreluje s nutričním krevním průtokem). Přes jistou tendenci ke zhoršení (zejm. v intervalech 3 a 5) po podání kofeinu nebyly ani zde zachyceny statisticky signifikantní změny. Výsledky jsou průměry \pm SEM ze šesti měření.

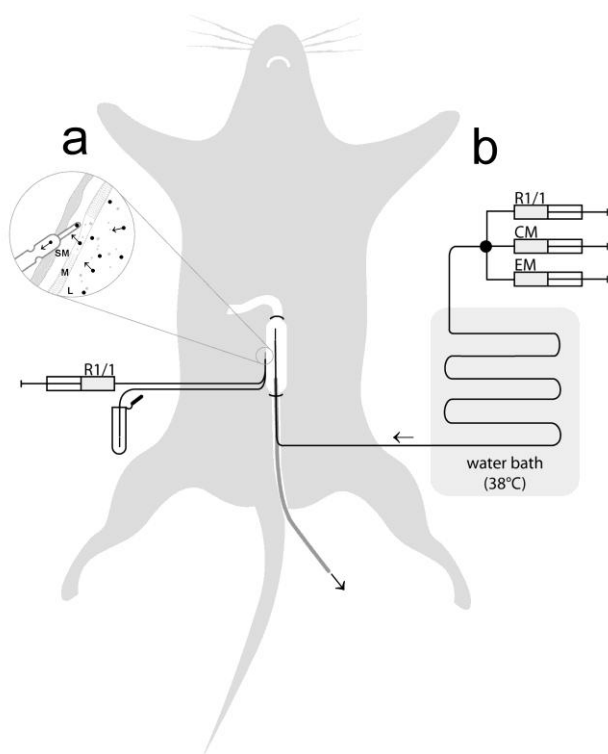
i.p. dávka kofeinu (mg kg^{-1} b.wt.)	0	1	10	50
plazmatický kofein (mg l^{-1})	0 ± 0.00	1.43 ± 0.07	11.80 ± 0.42	56.51 ± 1.68
plazmatický MDA ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	0.94 ± 0.05	0.91 ± 0.12	0.84 ± 0.03	0.80 ± 0.15

Tab. 1.

Tabulka shrnující vliv různých dávek kofeinu na jeho plazmatickou hladinu a koncentraci malondialdehydu (MDA) při ukončení experimentu. Spojitost mezi dávkou kofeinu a produkcí MDA nebyla nalezena podobně jako významné změny v plazmatických koncentracích MDA. Data jsou prezentována jako průměry \pm SEM ze šesti měření.

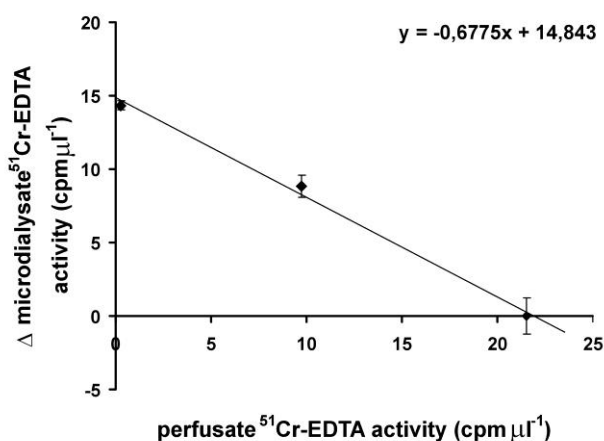
Studie III – souhrn hlavních výsledků

- Technika *in vivo* submukózní mikrodialýzy při paralelní single-pass lumenální perfúzi sestupného tračníku potkana byla úspěšně zavedena (obr. 10).
- Získali jsme základní znalost o funkci použité mikrodialyzační sondy (MAB 1.2.4.) pomocí *in vitro* testu (obr. 11).
- Ověřili jsme správnou pozici sondy v orgánu (obr. 12a).
- Neperfundovaná část střeva nebyla experimentální procedurou morfologicky ovlivněna (obr. 12b). Aplikace R1/1 a vehikula (CM) neměla vliv na mikroskopický obraz perfundované části střeva (obr. 12c). Intraluminální podání etanolu vedlo k značnému (až makroskopickému) poškození střeva (obr. 12d,e).
- EM zvýšilo propustnost sliznice pro radioaktivní sondu (obr. 13).



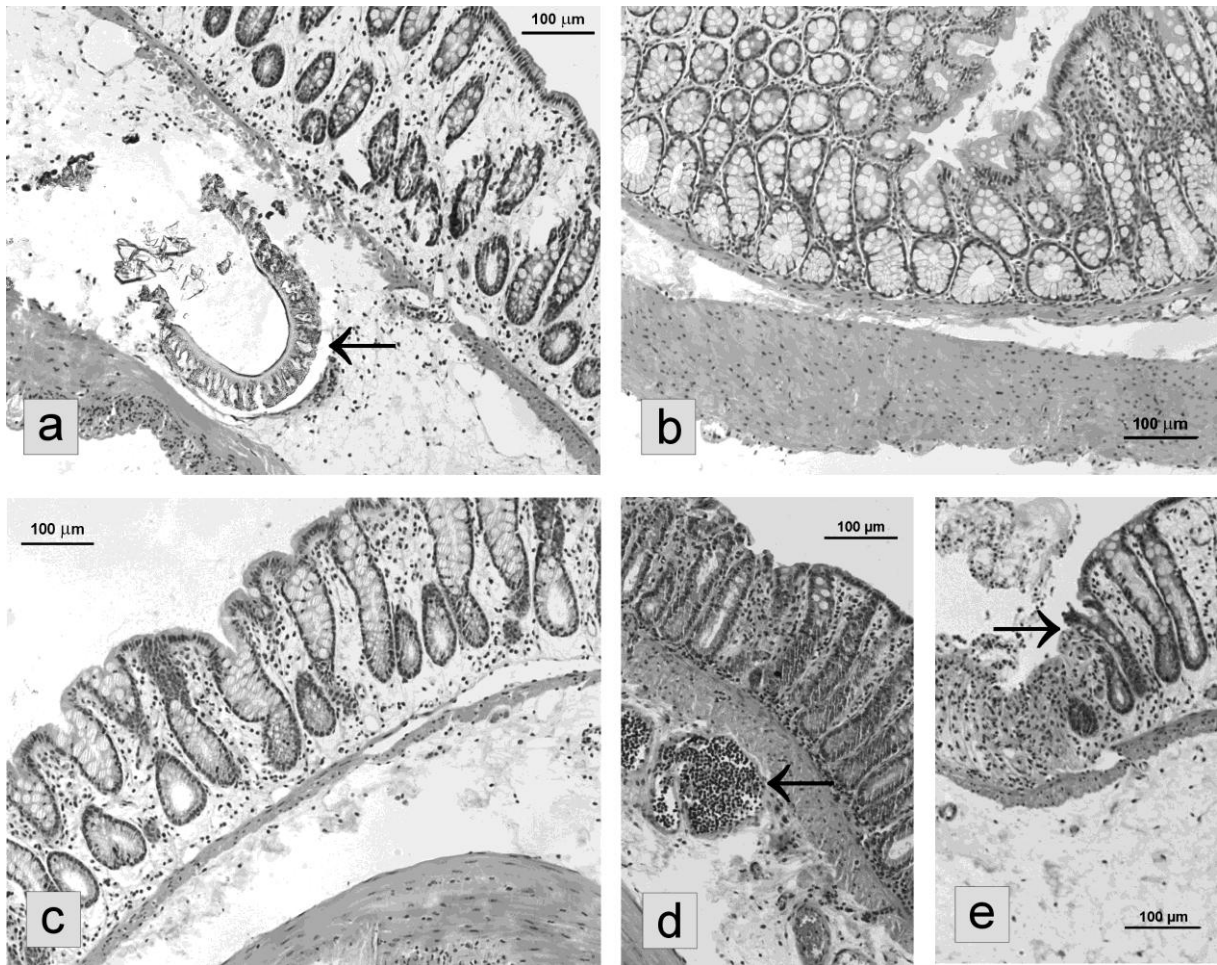
Obr. 10.

Schéma submukózní *in vivo* mikrodialýzy (a) s paralelní single-pass lumenální perfúzi sestupného tračníku (b). Navrhovaná technika měření střevní slizniční bariéry nevyžaduje ligaci ledvin, kanylaci cév pro krevní odběry ani perforaci trávicí trubice.



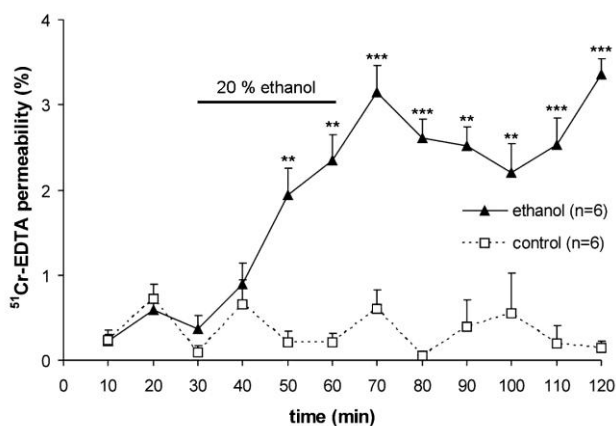
Obr. 11

Kalibrace sondy *in vitro* (metoda “no net-flux”). Výsledkem nanesení rozdílu v aktivitě $^{51}\text{Cr-EDTA}$ mezi dialyzátem a perfuzátem proti aktivitě $^{51}\text{Cr-EDTA}$ v perfuzátu je přímka, jejíž směrnice představuje výtěžek sondy (68 %). Průsečík s osou x souhlasí s aktivitou $^{51}\text{Cr-EDTA}$ v okolním médiu (kádinka). Výsledky jsou průměry \pm SEM ze šesti měření.



Obr. 12.

Diagram demonstrující histologický obraz stěny sestupného tračníku (stnd. barvení hematoxylin-eosinem, zvětšení vyznačeno měřítkem). a, Verifikace pozice sondy. Šipka ukazuje na zbytky sondy, která byla poškozena přípravou histologického preparátu. b, Proximální (neperfundovaná) část tračníku s nepoškozenými vrstvami orgánu. c, Obrázek zachycující střevní stěnu po perfúzi s vehikulem (kontrolní skupina) bez zásadního patologického nálezu. d, a e, Etanolová skupina se vyznačovala leukocytární infiltrací (šipka, d), kterou provázela ztráta typické slizniční architektury (šipka, e) v důsledku erozivního působení etanolu.



Obr. 13.

Odhad střevní bariérové funkce pomocí měření propustnosti sliznice pro $^{51}\text{Cr-EDTA}$ (lumen-submukóza) poměrem aktivit 15 μl perfuzního média k 15 μl mikrodialyzátu $\times 100$, vyjádřeno v %. Postupný nárůst aktivity je patrný v průběhu perfuze EM v etanolové skupině. ** a *** označují $p < 0.01$ a $p < 0.001$.

9. DISKUSE

Metodologické poznámky

K ekvilibraci složení ECF a redukci intraindividuální variability je v mikrodialýze běžně využívána úvodní tzv. stabilizační epizoda (~ 30-90 min, s interpretací relativních výsledků vztažených k vlastním referenčním hodnotám, viz studie II). Tato doba však nestačí k eliminaci hlavního zdroje interindividuální variability – akumulaci biologického materiálu (buňky, destičky, fibrin atd.) v těsném okolí sondy následkem tkáňového mikrotraumatu. Přes snahu minimalizovat tkáňové poškození a krvácení v okolí sondy nebylo vždy možné dosáhnout uspokojivých výsledků (s nutností vyřazení některých zvířat), a to zejména při umístění sondy do tračníku (studie I). Do budoucna by proto bylo vhodné provádět měření s několikadenním odkladem po implantaci sondy do tkáně (Kitano *et al.* 2000).

Ve studii I bylo jako indikátoru krevní perfúze využito iontů Li^+ , a to zejména pro jeho netěkavost, dobrou difúzi v tělních tekutinách bez vazby na komponenty mikrodialyzačního systému a možnost relativně jednoduché analýzy. Li^+ má navíc apyrogenní charakter, je levné, snadno dostupné a dobře popsané z hlediska farmakokinetiky i dynamiky (bezpečnosti) vzhledem k jeho dlouholetému terapeutickému využití, což ho předurčuje k aplikacím v humánní medicíně (etické hledisko). Z těchto důvodů se Li^+ jeví jako velice výhodné a perspektivní aditivum do mikrodialyzačních perfúzních roztoků k měření krevního průtoku. Hlavní jeho nevýhodou je však nutnost získání relativně objemných vzorků (minimum je 100 μl) pro analýzu na plamenovém fotometru (kvůli mrtvému objemu). Na druhé straně, pro dosažení optimální senzitivity mikrodialýzy v detekci lokálního krevního průtoku (jinými slovy co nejvyššího výtěžku sondy) je nutno počítat s minimálními perfúzními rychlostmi vyžadujícími delší časové intervaly sběru (tento fakt demonstrují i výsledky kalibrace sondy *in vitro*, kdy perfúzní rychlost 2 $\mu\text{l min}^{-1}$ vedla k výtěžku pouhých 30 %, obr. 3). Přes vysokou interindividuální variabilitu dat a zatím pro mikrodialýzu nepřizpůsobenou analytickou fází se metoda LM ukázala jako slibná v kvalitativní detekci změn v mikrocirkulaci. Pro uplatnění v humánních studiích však budou potřebné ještě další validace (zejm. srovnání se zavedenými metodami).

Literatura poskytuje jen omezené množství dat týkajících se měření NO v žaludku pomocí *in vivo* mikrodialýzy. Iversen *et al.*, kteří (za použití odlišného typu sondy a průtokové rychlosti) měřili koncentraci NO ve stěně žaludku králíků, dospěli k hodnotám cca. 10 a 70 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro dusitan, resp. dusičnan. Výtěžek sondy pro dané látky *in vitro* představoval 31 - 33 %, přičemž autoři funkci sondy *in vivo* nehodnotili – jejich odhadem by se mohl pohybovat mezi 10 - 40 % (Iversen *et al.* 1997). Suzuki *et al.* validovali využití sond (podobného typu jaký byl použit u nás) ke studiu metabolismu dusíkatých látek v lumen lidského žaludku. Vypočtený výtěžek sondy *in vitro* pro dusitan činil při rychlosti perfúze 2 $\mu\text{l min}^{-1}$ 71 % (Suzuki *et al.* 2003). Naše výsledky výtěžků sondy *in vivo* jsou srovnatelné s těmito pracemi, jelikož funkce dialyzačních membrán v podmínkách *in vivo* v obecné rovině klesá. Koncentrace celkového intersticiálního NO ve studii II (~ 23 $\mu\text{mol l}^{-1}$) byl u potkana nižší než našli Iversen *et al.* u králíka. Je věcí diskuse do jaké míry tento rozdíl lze připsat na vrub odlišností v technice a druhu použitých zvířat.

Studie III využila jako indikátor IP $^{51}\text{Cr-EDTA}$, a to z důvodu nízké molekulové hmotnosti a průměru, tj. charakteristik, které této látce umožňují snadný a rychlý prostup skrze přirozené bariéry organismu. Jediným činitelem, který pak hraje významnou roli v propustnosti sliznice pro $^{51}\text{Cr-EDTA}$ je integrita tzv. tight junctions epiteliální výstelky. Další výhodou $^{51}\text{Cr-EDTA}$ je stanovení gama aktivity, které nevede ke ztrátě objemu vzorku, čímž tento lze uchovat pro jiné analýzy. Z důvodu jednorázové přípravy radioaktivních roztoků byl efekt rozpadu eliminován využitím poměru aktivit v mikrodialyzátu a lumenálním perfuzátu. 20 %-ní roztok etanolu vedl k masivním erozím a k produkci makroskopicky patrných slizničních lézí

spojených s významným vzestupem propustnosti sliznice pro vybraný indikátor. Variabilita výsledků IP v kontrolní skupině – patrně způsobena kolísáním intraluminálního tlaku v důsledku přechodných změn rychlosti lumenální perfúze – nenabyla statisticky signifikantních rozměrů a postrádala histologický korelát (obr. 2, studie III).

Ischemická příprava (studie I)

V obecné rovině je účinnost IPC závislá na modulaci krevního průtoku částečně cestou lokálního (Pajdo *et al.* 2001) a/nebo systémového vzestupu tvorby NO (Koti *et al.* 2002). Ve druhém případě jde o mechanismus, který se pravděpodobně uplatňuje ve vzdálených orgánech (Brzozowski *et al.* 2004). V našem experimentu však měla IPC tendenci působit obráceně – inhibicí vzestupu NO daného dlouhodobou ischemií (obr. 4). Stabilní hodnoty LM v kontrolní skupině (S) svědčí pro dobrou reprodukovatelnost dat, naopak epizody ischemie vedly k očekávaným poklesům ve sledovaném parametru. Zajímavostí je absence pozitivního vlivu IPC na mikrocirkulaci; výsledky spíše naznačují možnost tzv. „no-reflow“ podmínek, které jsou typické pro komplikovanou IR s poruchou mikrocirkulace, což nebylo pozorováno ve skupině IS (obr. 3a). Tyto výsledky by bylo možné částečně vysvětlit i pomocí adenosín-xantinové teorie (Peralta *et al.* 1998), podle které mohlo dojít k neadekvátní reperfúzní fázi v průběhu IPC, což však vzhledem k vizuální kontrole průtoku po odstranění vaskulárního klipu nepovažujeme za pravděpodobné. Pitevni nálezy nenasvědčily pro ztrátu intravaskulárního objemu. V dalším ze studovaných orgánů - sestupném tračníku - jsme nezaznamenali významné změny LM. V tomto případě jde o novou informaci zajímavou mimo jiné i proto, že rIPC byl popsán v celé řadě vzdálených orgánů.

Co se týče jaterního poškození, Koti *et al.* popsali snížení poškození mikrocirkulace a hepatocytů (plazmatických aktivit ALT a AST) po aplikaci IPC (Koti *et al.* 2002). K podobným závěrům dospěli u příjemců transplantovaných jater s IPC Gong *et al.* (Gong *et al.* 2004). Prospěch z IPC projevující se zachováním mikrocirkulace a nízké aktivity plazmatické lipázy je patrný také u IR poškození pankreatu (Obermaier *et al.* 2004, Dembinski *et al.* 2003). Studie I prokázala absenci vlivu CAO na jaterní nebo pankreatický parenchym. V případě jater lze toto vysvětlit krevním zásobením, které jde hlavně cestou *v. portae*. Prokrvení slinivky břišní však závisí na *a. splenica* (využita k uzávěru výše zmíněnými autory), která z *a. celiaca* odstupuje. Pro studium IR změn v jednotlivých orgánech bude zřejmě v budoucnu nutná více selektivní klampáž.

Účinky kofeinu (studie II)

Protože v případě kávy jde o složitou směs látek působících v závislosti na typu zpracování kávových zrn, ve studii II jsme se zaměřili na farmakologicky dobře popsané chemické individuum - kofein. Studovali jsme předpokládanou roli kofeinu v poškození integrity sliznice žaludku a duodena kávou pozorované u mladých zdravých jedinců (Cibickova *et al.* 2004), a to měřením lokální produkce NO a krevního průtoku v žaludeční submukóze včetně vlivu kofeinu na systémový oxidativní stres a morfologii sliznice.

Literatura uvádí snížení exprese NOS v kosterním svalu, oslabení glutamátem indukované tvorby NO v myší míše a konečně pokles vylučování NO ve vydechovaném vzduchu krátce po požití kofeinu. Negativní vliv kofeinu na syntézu NO nepřímo podporuje i nález oslabení ochranného vlivu IPC tj. reaktivní hyperémie v důsledku hypoperfúzí indukované akumulace adenosínu a následně tvorby NO. Na druhé straně endotel aorty reaguje na kofein zvýšením syntézy NO. S ohledem na použitou analytickou metodiku lze konstatovat, že naše výsledky svědčí o absenci vlivu kofeinu na iNOS (eNOS tvoří nanomolární koncentrace NO) v žaludku potkana v celkové anestézii.

Co se týče krevního průtoku v tomto orgánu, někteří autoři popisují pozitivní vliv kofeinu *in a ex vivo* (Ozturkcan *et al.* 1974, Koyama *et al.* 1999), což však naše výsledky nepodporují. Přímý vliv kofeinu na klidový krevní průtok, resp. indukovanou vaskulární kontraktilitu nebyl

nalezen ani v jiných studiích (Umemura *et al.* 2006, Wierema *et al.* 2005). Podobně lze nalézt rozpory ve vlivu kofeinu na funkci endotelu - Papamichael *et al.* prokázali akutní negativní vliv (Papamichael *et al.* 2005), Umemura *et al.* naopak pozitivní vliv na indukovanou vazodilataci, přičemž za bazálních podmínek efekt pozorován nebyl (Umemura *et al.* 2006). Tato skupina svá pozorování vysvětlila zvýšením endoteliální produkce NO způsobeným aktivací na ryanodin citlivých Ca²⁺ kanálů s následným potlačením degradace cGMP, přičemž předchozí skupina argumentovala inhibicí solubilní guanylát cyklázy s následnou supresí tvorby cGMP. Ani v jednom případě však tvorba NO *in situ* měřena nebyla. Jelikož farmakologická aktivita kofeinu závisí na jeho plazmatické koncentraci, jeho konečný vazomotorický účinek může být výsledkem rovnováhy mezi možným vazokonstrikčním (adenozin antagonistickým) a vazodilatačním (NO uvolňujícím) působením.

Existuje několik mechanismů, kterými může kofein zvýšit hladinu oxidačního stresu (Papamichael *et al.* 2005); jedním z nich je i (neselektivní) antagonismus na receptorech pro adenosin – látku zvyšující produkci NO jako antioxidantu. Al Moutaery *et al.* zjistili zvýšenou míru oxidačního stresu (MDA v mozku) po úrazu mozku u potkanů předem vystavených kofeinu, která byla navíc spojena s na dávce závislým zvýšením jejich úmrtnosti (Al Moutaery *et al.* 2003). Přes dobrou biodostupnost kofeinu dosaženou i.p. podáním byla však v našem experimentu pozorována pouze nevýznamná tendence k nižším plazmatickým koncentracím MDA, což svědčí pro absenci akutního negativního vlivu kofeinu na systémovou lipoperoxidaci. Pokusili jsme se rovněž studovat vliv kofeinu na makro- i mikromorfologii sliznice. Makroskopicky negativní nálezy se promítly i do histologicky srovnatelných lézí ve všech skupinách zvířat. Tyto závěry je přesto nutno považovat za pilotní a v budoucnu je ověřit pomocí složitějšího (validovaného) histomorfometrického měření.

10. ZÁVĚRY A PERSPEKTIVY DO BUDOUCNA

Předkládaná disertační práce přispěla k rozšíření aplikačních možností a odhalení limitací mikrodialýzy v gastrointestinálním traktu potkana. Studie I demonstruje novou alternativu měření krevního průtoku v gastrointestinálním traktu pomocí intersticiální mikrodialýzy. Za daných experimentálních podmínek technika umožnila zachycení změn v krevním průtoku žaludeční submukózou potkana, nicméně nepotvrdila popisovaný ochranný vliv ischemické přípravy na tkáňovou mikrocirkulaci. K objasnění tohoto fenoménu a srovnání mikrodialýzy lithia se zavedenými metodami (při paralelní invazivní monitoraci krevního tlaku) budou potřebné další studie.

Výsledky studie II naznačují, že intraperitoneální podání kofeinu (ve studovaných dávkách) pravděpodobně nevede k tvorbě akutních morfologických změn na sliznici žaludku. Kofein neovlivňuje nutriční krevní průtok ani tvorbu oxidu dusnatého v žaludeční submukóze a nemá vliv ani na systémový oxidační stres hodnocený úrovní lipoperoxidace v plazmě. Pro vysvětlení nežádoucích účinků kávy na sliznici žaludku a možné role kofeinu (resp. jiných dráždivých konstituentů) v těchto dějích jsou nutné další studie. Pro zvýšení citlivosti mikrodialýzy k zachytu změn je potřebné jít cestou redukce interindividuální variability (např. zaváděním nových kontinuálních kalibračních procesů s využitím radioaktivních sond nebo pomocí tzv. oddálené mikrodialýzy).

Metodikou navrženou ve studii III bylo možné zachytit poškození slizniční bariéry bez nutnosti ligace orgánů, krevních odběrů resp. venózní katetrizace. Tato pilotní studie poskytuje solidní základ pro rozvoj nové metody využitelné v experimentech obsahujících kontinuální měření integrity střevní slizniční bariéry, přičemž navíc umožňuje paralelní monitoraci biochemických dějů nebo farmakologie. V dalším kroku bude nutné srovnání mikrodialýzy (v ideálním případě spojené s monitorací a regulací intraluminálního tlaku) s referenčními metodami měření bariérové funkce střeva.

11. POUŽITÁ LITERATURA

Uveden je výběr 29 klíčových citací z celkového počtu 134 citovaných prací v dizertačním spisu.

- AL MOUTAERY K, AL DEEB S, KHAN HA, TARIQ M. Caffeine impairs short-term neurological outcome after concussive head injury in rats. *Neurosurgery* **2003**;53(3):704-12.
- BRZozowski T, KONTUREK PC, KONTUREK SJ, PAJDO R, KWIECIEN S, PAWLIK M ET AL. Ischemic preconditioning of remote organs attenuates gastric ischemia-reperfusion injury through involvement of prostaglandins and sensory nerves. *Eur J Pharmacol* **2004**;499:201-13.
- CIBICKOVA L, CIBICEK N, ZDANSKY P, KOHOUT P. The impairment of gastroduodenal mucosal barrier by coffee. *Acta Medica (Hradec Králové)* **2004**;47(4):275-8.
- DEMBINSKI A, WARZECHA Z, CERANOWICZ P, TOMASZEWSKA R, DEMBINSKI M, PABIANCZYK M ET AL. Ischemic preconditioning reduces the severity of ischemia/reperfusion-induced pancreatitis. *Eur J Pharmacol* **2003**;473:207-16.
- DZIADUŚ-SOKOŁOWSKA A, ORLEF A, BILSKI R, MROCZKA J. The effect of ethanol-caffeine interaction on the gastric mucosal barrier. *Pol J Pharmacol Pharm* **1989**;41(3):253-8.
- GONG JP, TU B, WANG W, PENG Y, LI SB, YAN LN. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* **2004**;10:73-6.
- HICKNER RC, EKELUND U, MELLANDER S, UNGERSTEDT U, HENRIKSSON J. Muscle blood flow in cats: comparison of microdialysis ethanol technique with direct measurement. *J Appl Physiol* **1995**;9(2):638-47.
- HICKNER RC, ROSDAHL H, BORG I, UNGERSTEDT U, JORFELDT L, HENRIKSSON J. The ethanol technique of monitoring local blood flow changes in rat skeletal muscle: implications for microdialysis. *Acta Physiol Scand* **1992**;146(1):87-97.
- HRUBÁ P, ŽIVNÝ P, ŽIVNÁ H, PALIČKA V. Muscle, liver and kidney interstitium blood flow changes in rats measured by microdialysis with flow marker added. *Klin Biochem Metab* **2004**;12:9-13.
- IVERSEN HH, CELSING F, LEONE AM, GUSTAFSSON LE, WIKLUND NP. Nerve-induced release of nitric oxide in the rabbit gastrointestinal tract as measured by in vivo microdialysis. *Br J Pharmacol* **1997**;120:702-6.
- 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**;86:113-23.
- KONTUREK PC, BRZozowski T, SLIWOWSKI Z, PAJDO R, STACHURA J, HAHN EG ET AL. Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. *Scand J Gastroenterol* **1998**;33(7):691-700.
- KOTI RS, YANG W, DASHWOOD MR, DAVIDSON BR, SEIFALIAN AM. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transpl* **2002**;8:1182-91.
- KOYAMA R, KATAOKA H, TANAKA Y, NAKATSUGI S, FURUKAWA M. Effect of caffeine on ibuprofen-induced gastric mucosal damage in rats. *J Pharm Pharmacol* **1999**;51(7):817-24.
- LÖNNROTH P, JANSSON PA, SMITH U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. *Am J Physiol* **1987**;253(2):228-31.

- NATALE G, LAZZERI G, BLANDIZZI C, GHERARDI G, LENZI P, PELLEGRINI A ET AL. Serial histomorphometry of whole rat stomach: an accurate and reliable method for quantitative analysis of mucosal damage. *Toxicol Appl Pharmacol* **2001**;174:17-26.
- OBERMAIER R, VON DOBSCHUETZ E, DROGNITZ O, HOPT UT, BENZ S. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow and leukocyte adherence in postischemic pancreatitis. *Langenbecks Arch Surg* **2004**;389:51-6.
- OZTURKCAN O, DE SAINT BLANQUAT G, DERACHE R. Effet de la caféine sur le flux sanguin de la muqueuse gastrique chez le Rat. *Thérapie* **1974**;29:941-4.
- PAJDO R, BRZOZOWSKI T, KONTUREK PC, KWIECIEN S, KONTUREK SJ, SLIWOWSKI Z ET AL. Ischemic preconditioning, the most effective gastroprotective intervention: involvement of prostaglandins, nitric oxide, adenosine and sensory nerves. *Eur J Pharmacol* **2001**;427:263-6.
- PAPAMICHAEL CM, AZNAOURIDIS KA, KARATZIS EN, KARATZI KN, STAMATELOPOULOS KS, VAMVAKOU G ET AL. Effect of coffee on endothelial function in healthy subjects: the role of caffeine. *Clin Sci (Lond)* **2005**;109(1):55-60.
- PARMAR NS, TARIQ M, AGEEL AM. Effect of nicotine, alcohol and caffeine pretreatment on the gastric mucosal damage induced by aspirin, phenylbutazone and reserpine in rats. *Jpn J Pharmacol* **1985**;39(1):1-6.
- PERALTA C, CLOSA D, XAUS C, GELPI E, ROSELLO-CATAFAU J, HOTTER G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* **1998**;28:768-73.
- PFEIFFER CJ, ROTH JLA. Studies on the secretory and cytotoxic actions of caffeine on the ferret gastric mucosa. *Exp Mol Pathol* **1970**;13:66-78.
- ROTH JA, IVY AC. The pathogenesis of caffeine-induced ulcers. *Surgery* **1945**;17:644-9.
- SUZUKI H, MORIYA A, IJIMA K, MCELROY K, FYFE VE, MCCOLL KEL. Validation of microdialysis probes for studying nitrosative chemistry within localized regions of the human upper gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol* **2003**;38:856-63.
- UMEMURA T, UEDA K, NISHIOKA K, HIDAKA T, TAKEMOTO H, NAKAMURA S ET AL. Effects of acute administration of caffeine on vascular function. *Am J Cardiol* **2006**;98:1538-41.
- WIEREMA TK, HOUBEN AJ, KROON AA, POSTMA CT, KOSTER D, VAN ENGELSHOVEN JM ET AL. Mechanisms of adenosine-induced renal vasodilatation in hypertensive patients. *J Hypertens* **2005**;23(9):1731-6.
- WITTMERS LE, ALICH A, QUIRK DR. Effect of caffeine on the Gastric Potential Difference (GPD). *FASEB Journal* **1998**;12(5):737.
- YANO S, ISOBE Y, HARADA M. The etiology of caffeine-induced aggravation of gastric lesions in rats exposed to restraint plus water-immersion stress. *J Pharmacobiodyn* **1982**;5(7):485-94.

12. PŘEHLED PUBLIKAČNÍ ČINNOSTI AUTORA

Monografie a kapitoly v monografiích

Autor zatím monografii ani kapitoly v monografii do tisku neodeslal.

Původní články a statě ve sbornících

- CIBICEK N, CIBICKOVA L, KOHOUT P, ZDANSKY P.** Využití testu propustnosti (SaLM) v detekci postižení horní části trávicí trubice u pacientů s horním dyspeptickým syndromem – pilotní studie. *Acta Medica (Hradec Králové) Suppl* **2004**;47(1):23-8.
- CIBICKOVA L, CIBICEK N, ZDANSKY P, KOHOUT P.** The impairment of gastroduodenal mucosal barrier by coffee. *Acta Medica (Hradec Králové)* **2004**;47(4):275-8.
- CIBIČEK N.** Infekční endokarditída. *Medicína po promoci* **2005**;6(4):99-100.
- CIBICEK N, MICUDA S, CHLADEK J, ZIVNY P, ZADAK Z, CERMAKOVA E 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 Králové)* **2006**;49(4):227-31.
- CIBIČEK N, ŽIVNÁ H, ZADÁK Z, KULÍŘ J, ČERMÁKOVÁ E, PALIČKA V.** Colon submucosal microdialysis: a novel in vivo approach in barrier function assessment - a pilot study in rats. *Physiol Res* **2007**;56(5):611-17. (IF=2,1)
- CIBIČKOVÁ L, PALIČKA V, CIBIČEK N, ČERMÁKOVÁ E, MIČUDA S, BARTOŠOVÁ L ET AL.** Differential effects of statins and alendronate on cholinesterases in serum and brain of rats. *Physiol Res* **2007**;56(6):765-70. (IF=2,1)
- MICUDA S, FUKSA L, BRČAKOVA E, OSTERREICHER J, CERMANOVA J, CIBICEK N ET AL.** Zonation of mrp2 in rat liver after induction with dexamethasone. *J Gastroen Hepatol* **2007** [e-pub] (IF=1,7)
- POJAR M, MANĎÁK J, CIBIČEK N, LONSKÝ V, DOMINIK J, PALIČKA V ET AL.** Peripheral tissue metabolism during off-pump versus on-pump coronary artery bypass graft surgery: the microdialysis study. *Eur J Cardiothorac Surg* **2008**;33(5):899-905. (IF=2,1)
- CIBIČEK N, ŽIVNÁ H, CIBIČEK J, ČERMÁKOVÁ E, VOŘÍŠEK V, MALÁKOVÁ 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):83-90.
- CIBICKOVA L, HYSPLER R, TICHA A, CIBICEK N, PALICKA V, CERMAKOVA E ET AL.** Cholesterol synthesis in central nervous system of rat is affected by simvastatin as well as by atorvastatin. *Pharmazie* **2008** (accepted) (IF=0,7)
- CIBICKOVA L, HYSPLER R, MICUDA S, CIBICEK N, ZIVNA H, JUN D, TICHA A, PALICKA V.** The influence of simvastatin, atorvastatin, alendronate and high-cholesterol diet on acetylcholinesterase activity, amyloid beta and cholesterol synthesis in rat brain. *Steroids* **2008** [e-pub] (IF=2,4)
- CIBIČKOVÁ L, PALIČKA V, HYŠPLER R, CIBIČEK N, ČERMÁKOVÁ E.** Alendronate lowers cholesterol synthesis in the central nervous system of rats – a preliminary study. *Physiol Res* **2009**;58(3) [e-pub] (IF=2,1)
- CIBIČEK N, ŽIVNÁ H, ZADÁK Z, KULÍŘ J, ČERMÁKOVÁ E.** Colonic submucosal microdialysis: a novel in vivo approach to barrier function assessment – a pilot study in rats. FONS Symposium klinické biochemie, Pardubice 17.-19. září **2006**, ISBN 80-903167-7-8.
- CIBICEK N, FLÄRING U, WERNERMAN J, ROOYACKERS O, KLAUDE M.** The effect of endotoxemia on muscle proteasome activity in healthy volunteers. *Clin Nutr Suppl* **2007**;2(2):153-4. (IF=2,5)

CIBICKOVA L, HYSPLER R, PALICKA V, CERMAKOVA E, CIBICEK N. Cholesterol synthesis in central nervous system of rat is affected by simvastatin as well as by atorvastatin. *Clin Nutr Suppl* **2007**;2(2):17. (IF=2,5)

CIBIČEK N, MANDÁK J, POJAR M, NEDVÍDKOVÁ J, ČERMÁKOVÁ E, ŽIVNÝ P ET AL. Extracorporeal circulation during cardiac surgery impairs skeletal muscle energy metabolism – a microdialysis study. *Klin Biochem Metabol Suppl* **2007**;15:62.

Přehledové články

CIBICKOVA L, SOUKUP T, CIBICEK N, CHLADEK J. Nitric oxide and systemic sclerosis. *Acta Medica (Hradec Králové)* **2006**;49(4):245-6.

CIBIČKOVÁ L, CIBIČEK N. Budou mít statiny a bisfosfonáty společné indikace? *Farmakoterapie* **2007**;6:550-1.

Přednášky na odborných setkáních, které přednesl autor disertace

CIBIČEK N, CIBIČKOVÁ L, KOHOUT P, ŽDÁNSKÝ P. Klinické využití testu propustnosti pro sacharózu (SaLM) pro neinvazivní diagnostiku postižení sliznic horní části trávicí trubice u pacientů s horním dyspeptickým syndromem. 10. jubilejní sympozium o morfologii a funkci střeva, duben 2004, Staré Splavy, ČR

CIBIČEK N, ŽIVNÝ P. Our first experience with microdialysis as tools for monitoring tissue chemistry, blood perfusion and gut barrier function in gastrointestinal tract of rats. 1. fakultní konference studentů doktorského studia, listopad 2005, Hradec Králové, ČR

CIBIČEK N. Mikrodialýza jako metoda monitorace krevní perfúze a střevní bariérové funkce u potkana. 24. setkání biochemiků královéhradeckého, pardubického a jihočeského regionu, červen 2006, Písek, ČR