



CENTRUM MEDYCZNE KSZTAŁCENIA PODYPLOMOWEGO

Zakład Informatyki Medycznej i Biomatematyki

**Perspektywy monitorowania
hipoksji tkanek
za pomocą spektrometrii impedancyjnej**

dr inż. Alicja Cicha-Mikołajczyk

Zebranie Naukowe Polskiej Grupy Narodowej
Międzynarodowego Towarzystwa Biostatystyki Klinicznej

Kraków 4.XII.2009



Hipoksja – definicja i przyczyny powstawania

Hipoksja - zjawisko charakteryzujące się zbyt małą podażą tlenu do tkanek
(niedotlenienie)

Podaż tlenu - ilość tlenu dostarczana komórkom w jednostce czasu

$$\text{Podaż } O_2 = \text{Zawartość } O_2 \text{ we krwi tętniczej} \cdot \text{Przepływ tkankowy}$$

Najczęstsze przyczyny niedotlenienia mięśnia serca:

- wrodzone wady serca,
- choroby układu oddechowego,
- choroby układu krążenia.

Podział hipoksji w zależności od przyczyny powstawania niedotlenienia:

1. **hipoksemia (hipoksja hipoksemiczna)** - obniżenie prężności tlenu we krwi tętniczej
2. **hipoksja hipokinetyczna (ischemia)** - obniżenie wielkości przepływu krwi
3. **hipoksja w anemii** - niewystarczające stężenie biologicznie czynnej hemoglobiny
4. **hipoksja histotoksyczna** - inaktywacja enzymów biorących udział w utlenianiu biologicznym i fosforylacji oksydacyjnej



Diagnozowanie hipoksji w warunkach klinicznych

Ischemia

➤ objawy kliniczne:

- przedmiotowe (bladość, lepki pot, spadek ciśnienia tętniczego, tachykardia lub inne zaburzenia tętna, pobudzenie ruchowe)
- podmiotowe (b. silny ból w klatce piersiowej, lęk przed śmiercią, duszność)

➤ elektrokardiografia

➤ oznaczanie biochemicznych markerów zawału uwalnianych do krwi

pomiar stężenia enzymów i izoenzymów:
np. troponiny cTnC, cTnI,
kinazy kreatynowej CK (CK MB),
mioglobiny MYO,
dehydrogenazy mleczanowej LDH

Hipoksemia

➤ objawy kliniczne

- wzrost częstości i głębokości oddychania, tachykardia oraz sinica

➤ gazometria krwi tętniczej

pomiar pO_2 , pCO_2

➤ pomiar wysycenia hemoglobiny tlenem

pomiar saturacji krwi tętniczej SaO_2

➤ oznaczanie równowagi kwasowo-zasadowej

pomiar pH krwi,
stężenia jonów wodorowęglanowych HCO_3^- ,
pomiar niedoboru bądź nadmiaru zasad

Wartości referencyjne:

$pO_2 = 65-95\text{mmHg}$, $pCO_2 = 36-45\text{mmHg}$,
 $SaO_2 = 95-99\%$



Diagnozowanie hipoksji w warunkach klinicznych c.d.

Dotychczas stosowane wskaźniki nie pozwalają na predykcję hipoksji, a po jej wystąpieniu na monitorowanie zmian związanych z niedotlenieniem, a ponadto w warunkach klinicznych ocena niedotlenienia mięśnia serca wymaga zastosowania różnych wskaźników – zależnych od patomechanizmu jego powstawania.

Zachodzi potrzeba znalezienia nowego markera hipoksji:

- prostego w użyciu,
- wiarygodnego i dokładnego,
- charakteryzującego się szybką odpowiedzią na niedotlenienie,
- niezależnego od przyczyny powodującej hipoksję,
- nieinwazyjnego dla badanej tkanki.



Metoda spektrometrii impedancyjnej

Metoda spektrometrii impedancyjnej:

- pozwala na wykrywanie różnic pomiędzy tkankami normalnymi i patologicznymi, np. umożliwia wykrywanie tkanek nowotworowych,
- pozwala na monitorowanie stanu tkanki w sposób ciągły,
- była już stosowana do oceny zmian w niedokrwionych narządach, ale dotychczas były to głównie badania post-mortem lub badania in-situ,
(W eksperymentach in vitro przeprowadzonych na izolowanym mięśniu serca [1, 2] pomiary impedancji wykonano tylko dla jednej częstotliwości)

Stan badań na dzień dzisiejszy:

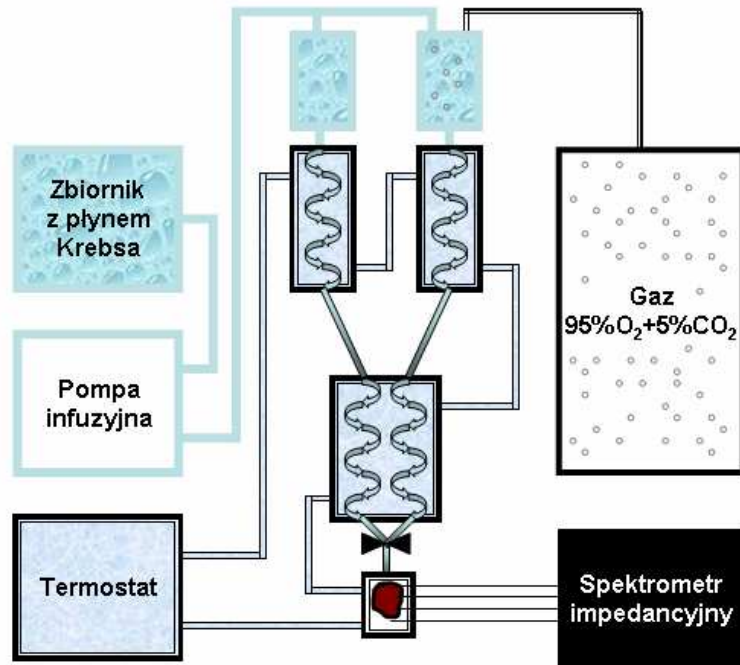
Brak badań impedancyjnych w warunkach krótkotrwałej ischemii, a przede wszystkim brak badań w warunkach chwilowej hipoksemii.

Cel pracy:

Zbadanie, opisanie i porównanie impedancji izolowanego mięśnia serca szczura perfundowanego metodą Langendorffa w warunkach prawidłowych i w warunkach indukowanej hipoksji oraz wykazanie, że monitorowanie zmian impedancji pozwala na wykrycie wystąpienia niedotlenienia mięśnia serca bez względu na patomechanizm jego powstawania.



Materiał i metody - Izolowane serce szczura



Rys.1. Schemat stanowiska do pomiaru impedancji izolowanego mięśnia serca szczura perfundowanego metodą Langendorffa

• **Materiał badany:**

samce szczurów rasy Whistar (200-300g),
anestezja (1000 i.u. heparyny, pentobarbital sodu 10mg/kg),
torakotomia, kaniulowanie serca, umieszczenie
w aparacie perfuzyjnym

• **Technika perfuzji metodą Langendorffa**

- perfuzja pod stałym ciśnieniem perfuzyjnym,
- perfuzja płynem perfuzyjnym Krebsa-Henseleita o następujących właściwościach:
 - skład chemiczny (mM): 118,0 NaCl, 25,0 NaHCO₃, 4,7 KCl, 1,2 KH₂PO₄, 2,5 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 11,0 glukoza;
 - ciśnienie parcjalne tlenu w płynie K.-H.: 580-610 mmHg (nasykanie mieszaniną gazów o składzie 95%O₂ + 5%CO₂);
 - kwasowość: 7,35-7,40 pH;
 - temperatura: 37°C.

• **Ustalanie żądanych warunków perfuzji**

- **warunki prawidłowe** – perfuzja płynem K.–H. o pO₂≈580-610 mmHg,
- **hipoksja hipoksemiczna** – perfuzja płynem K.–H. o pO₂≈150-160 mmHg,
- **hipoksja ischemiczna** – zamknięcie dopływu płynu perfuzyjnego do serca



Materiał i metody – Schematy układów eksperymentalnych i liczebność próby

Tabela 1.

**Schemat układu eksperymentalnego
w warunkach normoksji (Grupa 1A, n=5)
i hipoksji hipoksemicznej (Grupa 2A, n=6)
oraz przebieg eksperymentu (N=880)**

Eksperyment	Faza wstępna		Faza pomiarowa		
	30 ^A	30 ^B			
Czas [min.]			45		
Normoksja	1	1	1	1	1
Hipoksemia	1	1	2	2	2

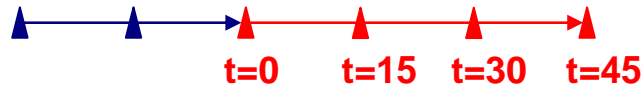
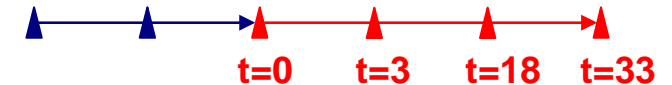


Tabela 2.

**Schemat układu eksperymentalnego
w warunkach normoksji (Grupa 1B, n=8)
i hipoksji ischemicznej (Grupa 2B, n=6)
oraz przebieg eksperymentu (N=1120)**

Eksperyment	Faza wstępna		Faza pomiarowa		
	30 ^A	30 ^B			
Czas [min.]			33		
Normoksja	1	1	1	1	1
Hipoksemia	1	1	3	1	1



Objaśnienia:

- A. perfuzja przed włączeniem elektrod,
- B. perfuzja po włączeniu elektrod,
- 1. perfuzja w warunkach prawidłowych ($pO_2=580-610\text{mmHg}$),
- 2. perfuzja w warunkach hipoksji ($pO_2=150-160\text{mmHg}$),
- 3. globalna ischemia - brak dopływu płynu perfuzyjnego do serca.

- ▲ Punkty charakterystyczne fazy wstępnej eksperymentu,
- ▲ Punkty charakterystyczne fazy pomiarowej eksperymentu

n – liczebność szczurów w grupie eksperymentalnej, N – liczba pomiarów w układzie eksperymentalnym

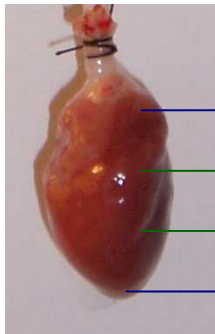


Materiał i metody – Pomiar impedancji

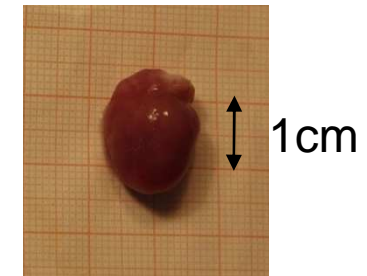
❑ Metoda pomiaru: tetrapolarna metoda prądowa:

- prąd aplikacyjny $I_a = 1,6 \text{ mA}$,
- zakres częstotliwości 1,25 – 206,0 kHz
(20 punktów pomiarowych),

❑ Rozmieszczenie elektrod:



- **elektrody aplikacyjne:**
albo koniuszek serca-lewa komora
albo koniuszek serca-lewy przedsionek,
- **elektrody detekcyjne:** lewa komora serca,
- odległość między elektrodami: 5mm.



❑ Wielkości mierzone:

- moduł impedancji $|Z|$ [ohm],
- kąt fazowy impedancji φ [deg].

$$R_{lijk} = |Z|_{lijk} * \sin(\varphi_{lijk})$$

❑ Wielkości obliczane:

- rezystancja R [ohm],
- reaktancja X_c [ohm].

$$X_{c_{lijk}} = |Z|_{lijk} * \cos(\varphi_{lijk})$$

l, i, j – poziomy czynników grupującego i powtarzanych pomiarów

gdzie $l = 1, 2; i = 1, 2, 3, 4; j = 1, 2, \dots, 20; k = 1, 2, \dots, n_g; n_g$ – liczebność grupy

❑ Zakres pomiaru:

- $|Z|$: 10-99,9ohm,
- φ : 0-45°

❑ Dokładność pomiaru:

- $|Z|$: +/-0,1ohm
- φ : +/-0,1°



1. **Analiza wielkości mierzonych i obliczanych w eksperymencie w zależności od warunków eksperymentalnych (warunków perfuzji) i czasu trwania eksperymentu:**

Analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami - klasyfikacja 3-czynnikowa:

1 czynnik grupujący: grupa,

2 czynniki powtarzanych pomiarów:

- czas pomiaru (4 poziomy),
- częstotliwość prądu aplikacyjnego (20 poziomów)

Dotychczas stosowane metody: metoda AUC, metoda AV.

2. **Modelowanie elektrycznych obwodów zastępczych:**

- w warunkach normoksji – analiza parametrów zastępczego obwodu elektrycznego, estymacja wartości referencyjnych,
- w toku perfuzji w warunkach normoksji, hipoksemii i ischemii połączonej z reperfuzyją – ocena trendów zmian przebiegów czasowych parametrów zastępczego obwodu elektrycznego

Przy weryfikowaniu hipotez statystycznych przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$

Analizy statystyczne wykonano w programie STATISTICA.US ver 4.3



Analiza wariancji z powtarzanymi pomiarami – klasyfikacja 3-czynnikowa

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_{g_l} + \alpha_{t_i} + \alpha_{f_j} + (\alpha_g \alpha_t)_{li} + (\alpha_g \alpha_f)_{lj} + (\alpha_t \alpha_f)_{ij} + (\alpha_g \alpha_t \alpha_f)_{lij} + \varepsilon_{ijk}$$

X_{ijk} – wartość zmiennej zależnej ($|Z|$, φ , R , X_c) dla k -tego pomiaru przy l -tym poziomie czynnika α_g ,
 i -tym poziomie czynnika α_t oraz j -tym poziomie czynnika α_f ,

μ – średnia ogólna,

α_{g_l} – efekt główny l -tego poziomu czynnika α_g (związanego z warunkami eksperymentalnymi),

α_{t_i} – efekt główny i -tego poziomu czynnika α_t (związanego z czasem pomiaru),

α_{f_j} – efekt główny j -tego poziomu czynnika α_f (związanego z częstotliwością prądu aplikacyjnego),

$(\alpha_g \alpha_t)_{li}$ – efekt interakcji l -tego poziomu czynnika α_g z i -tym poziomem czynnika α_t ,

$(\alpha_g \alpha_f)_{lj}$ – efekt interakcji l -tego poziomu czynnika α_g z j -tym poziomem czynnika α_f

$(\alpha_t \alpha_f)_{ij}$ – efekt interakcji i -tego poziomu czynnika α_t z j -tym poziomem czynnika α_f ,

$(\alpha_g \alpha_t \alpha_f)_{lij}$ – efekt interakcji l -tego poziomu czynnika α_g z i -tym poziomem czynnika α_t i j -tym poziomem czynnika α_f ,

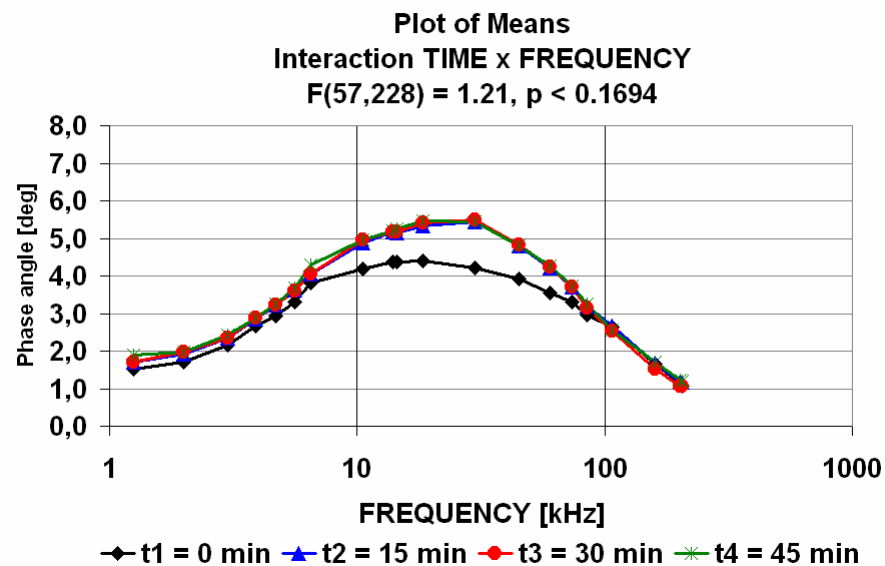
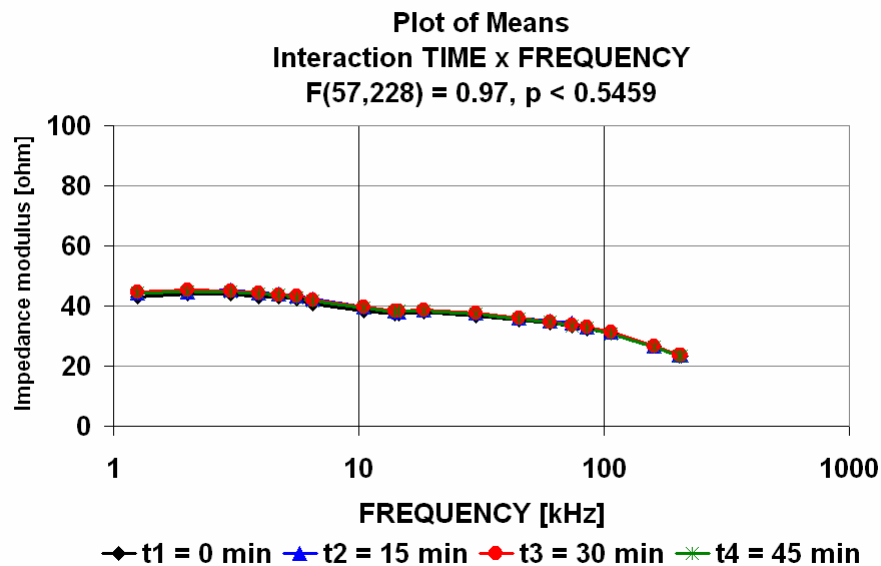
ε_{ijk} – błąd losowy o rozkładzie normalnym $N(0, \sigma^2)$

l, i, j – poziomy czynników grupującego i powtarzanych pomiarów

gdzie $l = 1, 2; i = 1, 2, 3, 4; j = 1, 2, \dots, 20; k = 1, 2, \dots, n_g; n_g$ – liczebność grupy



Wyniki pomiarów modułu i kąta fazowego impedancji w warunkach normoksji



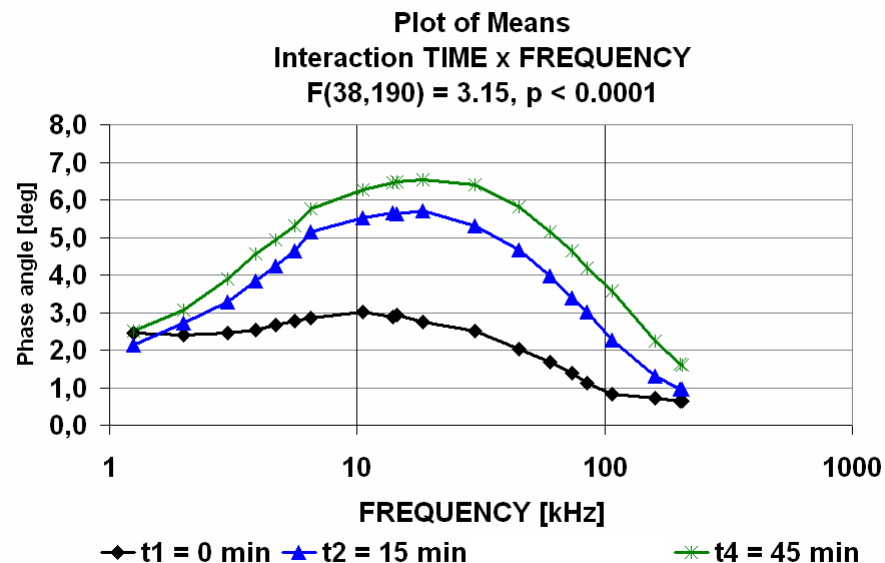
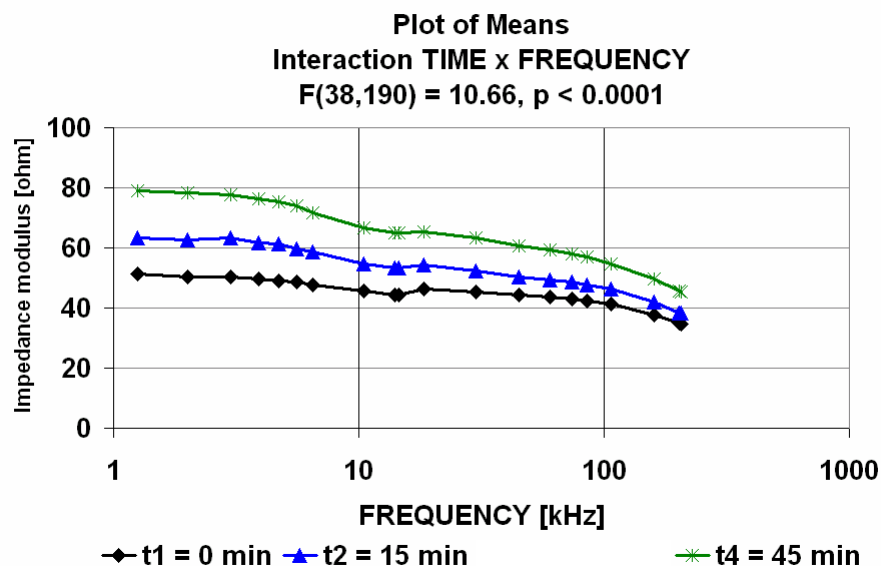
Rys.2. Uśrednione charakterystyk i częstotliwościowe modułu i kąta fazowego impedancji izolowanego mięśnia serca szczura w toku 45-minutowej perfuzji w warunkach prawidłowych ($pO_2 \approx 580-610 \text{ mmHg}$, $n=5$)

Summary of all Effects: 1-TIME, 2-FREQUENCY						
Effect	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	3	14,48	12	39,95	0,36	0,7812
2	19	919,28	76	47,04	19,54	0,0001
12	57	0,32	228	0,33	0,97	0,5459

Summary of all Effects: 1-TIME, 2-FREQUENCY						
Effect	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	3	0,28	12	0,20	1,38	0,2967
2	19	2,71	76	0,39	6,97	0,0001
12	57	0,01	228	0,01	1,21	0,1694



Wyniki pomiarów modułu i kąta fazowego impedancji w warunkach hipoksemii



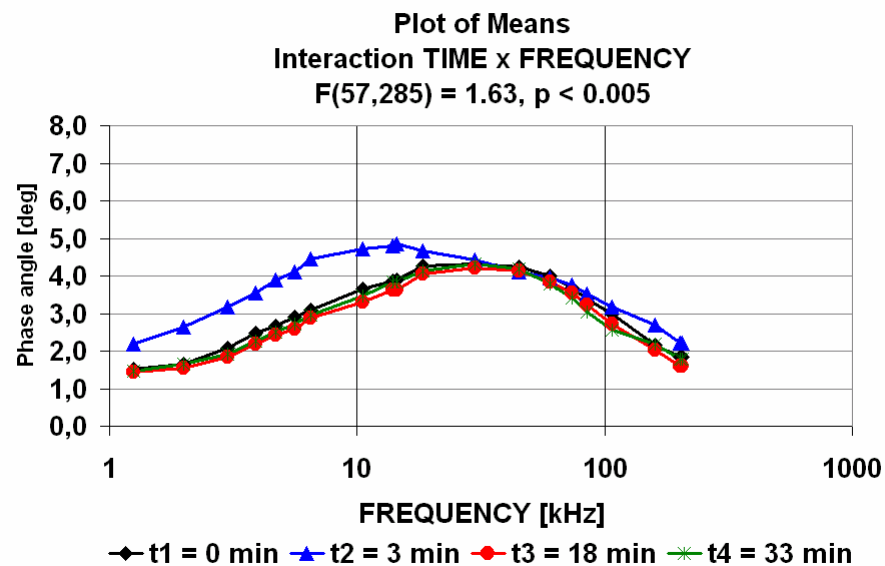
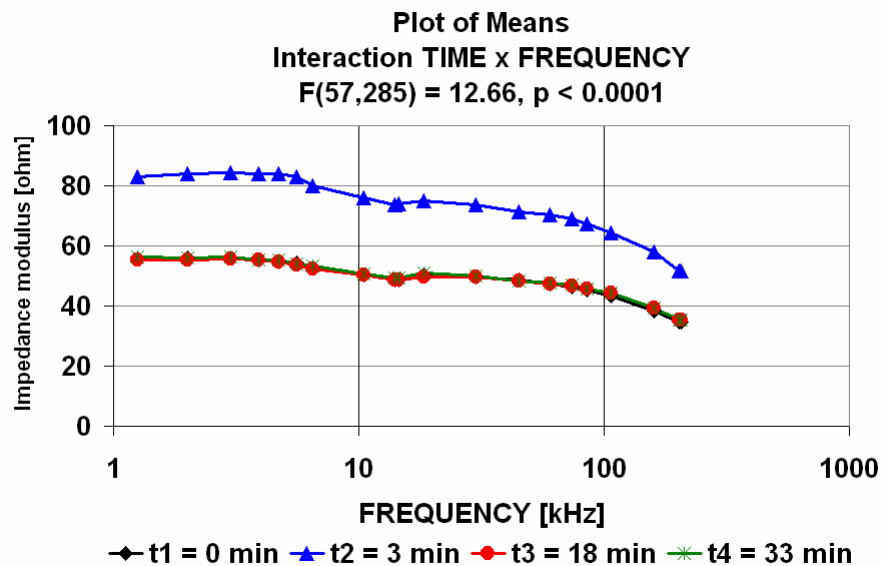
Rys.3. Uśrednione charakterystyk i częstotliwościowe modułu i kąta fazowego impedancji izolowanego mięśnia serca szczura w toku 45-minutowej perfuzji w warunkach hipoksemii ($pO_2 \approx 150-160 \text{ mmHg}$, $n=6$)

Summary of all Effects: 1-TIME, 2-FREQUENCY						
Effect	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	2	11720,42	10	1080,27	10,85	0,0031
2	19	1097,26	95	13,23	82,93	0,0001
12	38	54,65	190	5,13	10,66	0,0001

Summary of all Effects: 1-TIME, 2-FREQUENCY						
Effect	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	2	12,76	10	1,16	10,98	0,0030
2	19	2,26	95	0,34	6,68	0,0001
12	38	0,13	190	0,04	3,15	0,0001



Wyniki pomiarów modułu i kąta fazowego impedancji w warunkach ischemii



Rys.4. Uśrednione charakterystyk i częstotliwościowe modułu i kąta fazowego impedancji izolowanego mięśnia serca szczura w warunkach 3-minutowej globalnej ischemii i 30-minutowej reperfuzji (n=6)

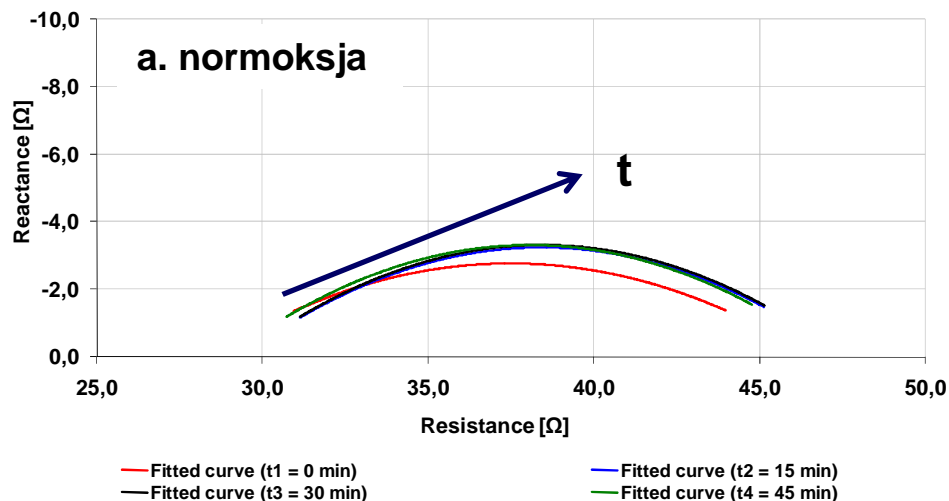
Summary of all Effects: 1-TIME, 2-FREQUENCY						
Effect	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	3	17629,65	15	1182,00	14,92	0,0001
2	19	1310,89	95	65,19	20,11	0,0001
12	57	23,30	285	1,84	12,66	0,0001

Summary of all Effects: 1-TIME, 2-FREQUENCY						
Effect	df Effect	MS Effect	df Error	MS Error	F	p-level
1	3	1,23	15	0,23	5,43	0,0099
2	19	1,46	95	0,52	2,80	0,0005
12	57	0,03	285	0,02	1,63	0,0052



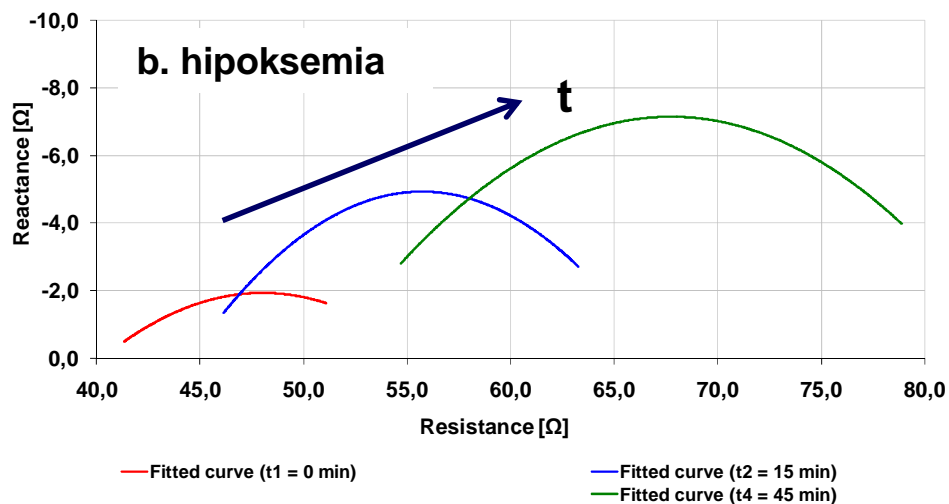
Prezentacja wyników pomiarów impedancji w warunkach normoksji, hipoksemii i ischemii połączonej z reperfuzją na płaszczyźnie zespolonej

Cole-Cole Plot

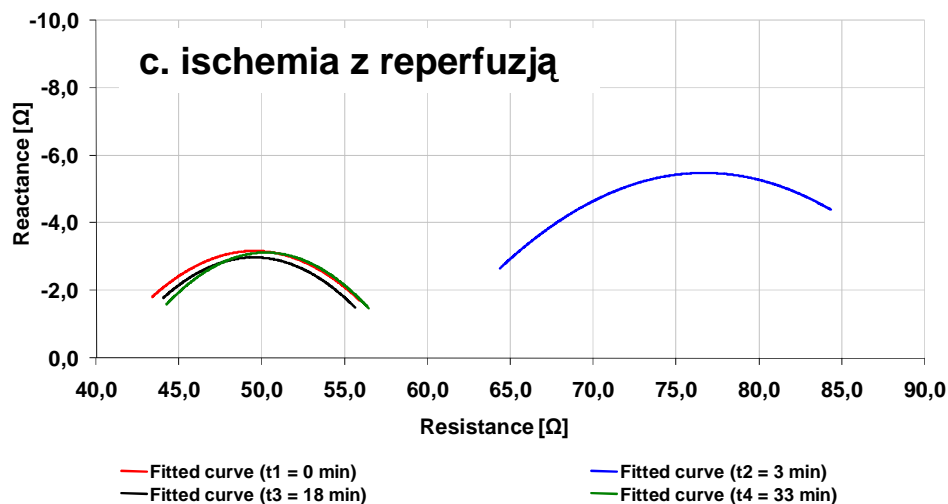


Rys.5. Wykresy $X_c=f(R)$ dla:
a. grupy kontrolnej,
b. grupy z hipoksją hipoksemiczną,
c. grupy z hipoksją ischemiczną.

Cole-Cole Plot



Cole-Cole Plot





Wnioski

- 1. Spektrometria impedancyjna pozwala na wykrycie i monitorowania stanu niedotlenienia mięśnia serca w warunkach eksperymentalnych, bowiem hipoksja bez względu na patomechanizm jej powstawania powoduje wzrost impedancji mięśnia serca.**
- 2. Dynamika zmian impedancji w stanie aerobowej pracy serca jest niewielka.**
- 3. Utrzymująca się 45-minutowa hipoksemia powoduje progresywny wzrost impedancji mięśnia serca. Największą dynamikę zmian impedancji obserwuje się w początkowym okresie ekspozycji na hipoksję, co przemawia za tym, że monitorowanie impedancji tkanki zagrożonej hipoksją we wczesnej fazie niedotlenienia mogłoby mieć duże znaczenie poznawcze, diagnostyczne i prognostyczne.**
- 4. W toku globalnej 3-minutowej ischemii obserwuje się wzrost impedancji mięśnia serca. Przywrócenie przepływu powoduje cofnięcie się zmian bez reperfuzyjnego uszkodzenia mięśnia serca, co świadczy o tym, że zmiany spowodowane krótkotrwałym globalnym niedokrwieniem są całkowicie odwracalne i niewykrywalne bez ciągłego monitorowania.**



Podsumowanie

W 1974 roku sugerowano, że chirurgia wieńcowych bypassów i rozwój czynników fibrynolitycznych ewentualnie pozwolą na uwalnianie okluzji wieńcowej. Dwadzieścia sześć lat później te techniki oraz przezskórne interwencje wieńcowe stały się standardową procedurą w ostrym zawale mięśnia serca.

Być może w niedalekiej przyszłości spektrometria impedancyjna stanie się standardową techniką w ocenie i monitorowaniu stanu tkanki mięśnia serca.

Piśmiennictwo:

1. *Jain S. K., Schuessler R. B., Saffitz J. E.: "Mechanisms of Delayed Electrical Uncoupling Induced by Ischemic Preconditioning", Circ Res, 2003, 92: 1138-1144.*
2. *Owens L. M., Fralix T. A., Murphy E., Cascio W. E., Gettes L. S.: "Correlation of ischemia induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood perfused rabbit heart", Circulation, 1996, 94(1): 10-3.*
3. *Cicha-Mikołajczyk A.: „Badania zmian impedancji izolowanego mięśnia serca szczura w warunkach hipoksji”. Rozprawa doktorska, Politechnika Warszawska 2009.*