

Zastosowanie jonoforezy w ocenie funkcji mikrokrążenia

The use of iontophoresis in the assessment of microvascular function

Marcin Hellmann, Maria Dudziak

Zakład Diagnostyki Chorób Serca II Katedry Kardiologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

STRESZCZENIE

Jonoforeza jest szeroko stosowana jako test farmakologiczny służący do badania reaktywności mikrokrążenia. Najczęściej stosuje się jonoforezę acetylocholino, która w połączeniu z technikami obrazowania mikrokrążenia *in vivo* umożliwia nieinwazyjną ocenę funkcji śródbłonna. Wykazano, że wywołana przez acetylocholinę wazodylatacja zależna od śródbłonna jest zaburzona między innymi w nadciśnieniu tętniczym, chorobie wieńcowej, cukrzycy typu 2 czy zespole bezdechu sennego.

Choroby Serca i Naczyń 2015, 12 (1), 39–43

Słowa kluczowe: jonoforeza, mikrokrążenie, śródbłonek

ABSTRACT

Iontophoresis has been widely used as a pharmacological test to assess microvascular reactivity. Acetylcholine iontophoresis coupled with *in vivo* microcirculation imaging techniques is the most commonly used for noninvasive assessment of endothelial function. It has been shown that acetylcholine-induced endothelium-dependent vasodilation is impaired in hypertension, coronary artery disease, type 2 diabetes and obstructive sleep apnea.

Choroby Serca i Naczyń 2015, 12 (1), 39–43

Key words: iontophoresis, microcirculation, endothelium

Adres do korespondencji:

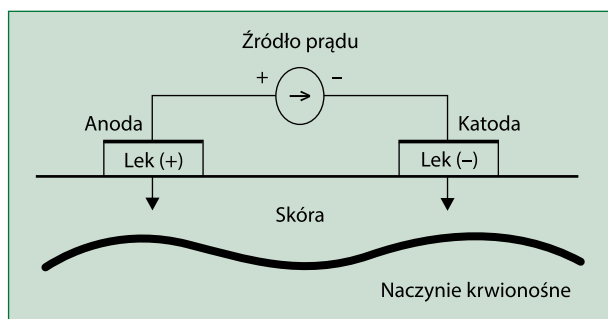
dr n. med. Marcin Hellmann
Zakład Diagnostyki Chorób Serca
II Katedra Kardiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Smoluchowskiego 17, 80–214 Gdańsk
tel.: 58 349 33 80, faks: 58 349 33 79
e-mail: marcin.hellmann@gmail.com

WPROWADZENIE

Mikrokrążenie skórne często jest wykorzystywane jako reprezentatywne łożysko naczyniowe do oceny globalnej funkcji mikrokrążenia [1]. W licznych badaniach wykazano dysfunkcję mikrokrążenia obwodowego u pacjentów ze schorzeniami układu sercowo-naczyniowego, sugerując, że uogólniona dysfunkcja mikrokrążenia może leżeć u podłoża tych chorób [2, 3].

Jonoforezę substancji wazoaktywnych stosuje się jako test farmakologiczny do oceny reaktywności mikrokrążenia. Metoda ta umożliwia nieinwazyjne wprowadzenie leku w obszar mikrokrążenia skórniego, a ewentualne zmiany przepływu krwi w odpowiedzi na podaną substancję można rejestrować za pomocą laserowych skanerów perfuzji. W badaniach funkcji mikrokrążenia najczęściej stosuje się jonoforezę acetylocholino (Ach, *acetylcholine*) i nitroprusydku sodu (SNP, *sodium nitroprusside*), które umożliwiają ocenę wazodylatacji zależnej i niezależnej od śródbłonna [1].

Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego jest zjawiskiem kluczowym w przebiegu chorób układu krążenia. Sugeruje się, że zmiany patologiczne w mikrokrążeniu wyprzedzają patologie dużych naczyń [4]. W związku z tym wydaje się istotne, by w sposób efektywny móc ocenić funkcje mikrokrążenia. Należy jednak podkreślić, że — ze względu na mikroskopijne wymiary, heterogenność perfuzji oraz niejednorodną budowę — mikrokrążenie jest częścią układu sercowo-naczyniowego, której badanie jest bardzo trudne. Ocena reaktywności mikrokrążenia w odpowiedzi na jonoforezę substancji wazoaktywnych jest możliwa dzięki zastosowaniu technik obrazowania perfuzji *in vivo*, takich jak: laserowy skaner dopplerowski (LDI, *laser Doppler imaging*) czy analiza kontrastu obrazu spekli laserowych (LSCI, *laser speckle contrast imaging*). Metody te pozwalają na nieinwazyjne, bezkontaktowe monitorowanie mikrokrążenia, a przy tym cechują się



Rycina 1. Idea jonoforezy

dobrą powtarzalnością pomiarów, a także bardzo dobrą rozdzielczością przestrzenną [5].

JONOFOREZA

Jonoforeza to nieinwazyjna metoda miejscowej aplikacji substancji rozpuszczonych pozostających w formie zjonizowanej. Polega na przezskórnym przenikaniu jonów, które jest możliwe dzięki zastosowaniu prądu elektrycznego o małym natężeniu. Wprowadzenie cząstek obdarzonych ładunkiem elektrycznym do organizmu przez skórę umożliwia odpowiednie urządzenie emitujące galwaniczny prąd stały (ryc. 1). Ilość wprowadzonego leku jest wprost proporcjonalna do natężenia prądu i czasu jego przepływu. Przenikanie leku zależy również od jego stężenia, pH roztworu i właściwości fizjologicznych skóry. Za transport cząsteczek odpowiadają dwa niezależne od siebie mechanizmy — elektromigracja i elektroosmoza [6].

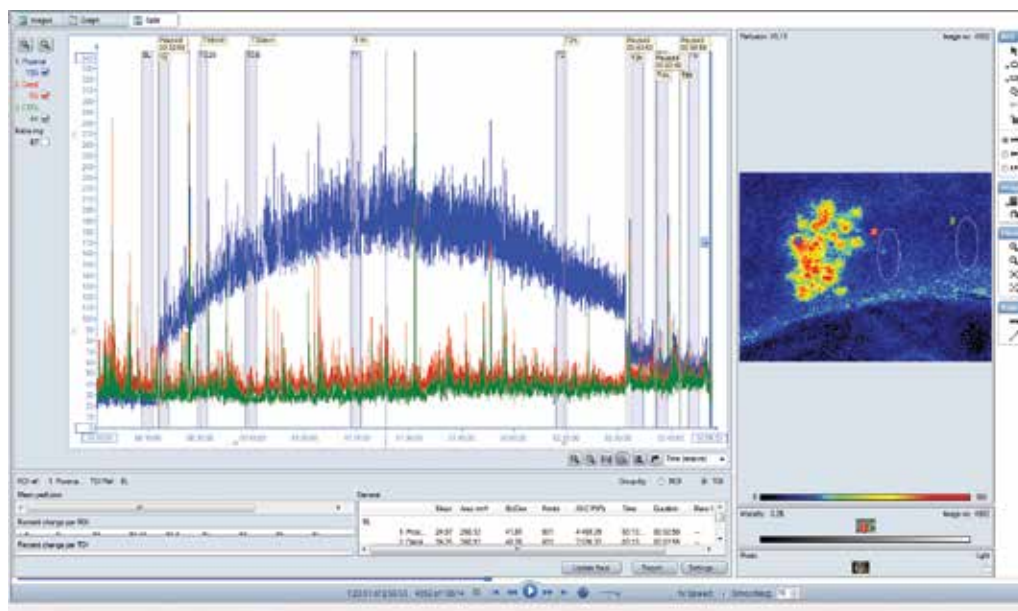
Układ do jonoforezy składa się ze źródła zasilania, elektrody czynnej oraz elektrody biernej. Elektrody czynne są równocześnie sondami do jonoforezy, w których umieszcza się badaną substancję. Sondy mają powierzchnię 1,2–7,2 cm², a ich wielkość pozwala na aplikacje od 300 do 1500 μ L roztworu leku. Natężenie prądu i czas trwania jonoforezy różnią się zależnie od stosowanych protokołów i założonych celów badawczych (ryc. 2). Zazwyczaj stosuje się 20-minutową jonoforezę przy użyciu prądu o natężeniu 20–240 μ A. Substancje wykorzystywane w jonoforezie muszą wykazywać zdolność dysocjacji elektrolitycznej. Elektroda czynna może być katodą lub anodą. Substancje o ładunku ujemnym umieszcza się pod katodą, zaś naładowane dodatnio — pod anodą. W badaniach mikrokrążenia najczęściej stosuje się jonoforezę acetylocholino. Ładunek tej substancji jest dodatni, więc jonoforeza ma charakter anodowy [7].

Mikrokrążenie skórne ma szczególnie gęstą sieć włókien nerwowych, w związku z czym za reaktywność tego



Rycina 2. Układ pomiarowy z zastosowaniem laserowego skanera dopplerowskiego i jonoforezy. Dwie sondy do jonoforezy podłączone do źródła zasilania umieszczone na wewnętrznej powierzchni prawego przedramienia. Perfuzję mikrokrążenia rejestrowano za pomocą laserowego skanera dopplerowskiego na obszarze, na którym zostały umieszczone sondy do jonoforezy. Elektrody pasywne wchodzące w skład systemu do jonoforezy umiejscowiono w odległości około 10 cm od elektrod aktywnych

obszaru naczyniowego odpowiadają w dużej mierze nerwy czuciowe poprzez tak zwany odruch włókienkowy (aksonowy). W wyniku podrażnienia skóry, na przykład prądem, dochodzi do niespecyficznego rozkurczu naczyń mikrokrążenia. W celu zniesienia odruchu aksonowego, który występuje podczas jonoforezy, często stosuje się miejscowe znieczulenie z użyciem lidokainy i prylokainy [8]. Pozwala to na obserwację właściwego efektu substancji wazodylatacyjnej. W doświadczeniach z jonoforezą równie często stosuje się izotoniczny roztwór chlorku sodu (0,9-proc. NaCl), który pełni rolę kontroli. Warto również zauważyć, że 0,9-proc. NaCl powoduje mniejszą niespecyficzną wazodylatację w skórze ludzkiej spowodowaną odruchem aksonowym niż woda destylowana, co potwierdzono w badaniach na zwierzętach. Niewystępowanie zmian w zakresie wielkości przepływu w mikrokrążeniu po jonoforezie 0,9-proc. NaCl stanowi potwierdzenie zniesienia odruchu aksonowego dzięki zastosowaniu preparatu lidokainy i prylokainy [9].



Rycina 3. Jonoforeza analogu prostacykliny oraz rejestracja perfuzji mikrokrążenia metodą analizy kontrastu obrazu spekli laserowych. Krzywe po lewej stronie przedstawiają przepływ krwi. Widać istotny wzrost perfuzji w miejscu podania prostacykliny (niebieska krzywa). Na kolorowej mapie perfuzji z prawej strony można zaobserwować wazodylatację w miejscu podania analogu prostacykliny oraz brak reakcji naczyniowej po podaniu 0,9-pocentowego roztworu chlorku sodu (0,9% NaCl)

ZASTOSOWANIE W OCENIE FUNKCJI MIKROKRĄŻENIA

Jonoforeza jest techniką szczególnie nadającą się do badania wpływu substancji wazoaktywnych na mikrokrążenie oraz oceny funkcji śródbłonna (ryc. 3). Szerokie zastosowanie znalazła jonoforeza Ach i SNP, które stosuje się do oceny zależnej i niezależnej od śródbłonna wazodylatacji mikrokrążenia [1]. Acetylocholina, łącząc się z receptorem muskarynowym (M3) na komórkach śródbłonna, pośredniczy w rozkurczu naczyń w mechanizmie zależnym od śródbłonna. Dokładny mechanizm, w którym Ach prowadzi do wazodylatacji, pozostaje niejasny. Wydaje się, że regulacja ta zależy w dużej mierze od szlaków cyklooksygenazy, choć dane na ten temat są rozbieżne. Dyskusyjne pozostaje także to, w jakim stopniu tlenek azotu (NO, *nitric oxide*) uczestniczy w obserwowanej reakcji. Nitroprusydek sodu jest egzogenym donorem NO, który aktywuje cytozolową cyklazę guanylanową, powodując wzrost stężenia cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP, *cyclic guanosine monophosphate*). Nasilenie produkcji cGMP prowadzi do rozkurczu mięśni gładkich naczyń. Jonoforezę SNP stosuje się do oceny mechanizmu wazodylatacji niezależnej od śródbłonna [4].

Dzięki badaniom z zastosowaniem jonoforezy Ach i SNP u pacjentów z grupy podwyższonego ryzyka choroby wieńcowej stwierdzono dysfunkcję zależnych i niezależnych od śródbłonna mechanizmów wazody-

lacyjnych w mikrokrążeniu obwodowym [10]. Z kolei u pacjentów ze stwierdzoną chorobą wieńcową wykazano zmniejszoną odpowiedź na Ach, co dodatkowo korelowało z wynikami innych testów reaktywności służącymi ocenie funkcji śródbłonna mikrokrążenia [11]. Zaburzenie zależnej od śródbłonna wazodylatacji stwierdzono również w grupie chorych z niewydolnością serca. Dysfunkcję śródbłonna obserwowano w naczyniach mikrokrążenia oraz równolegle w naczyniach przewodzących ocenianych metodą wazodylatacji tętnicy ramiennej po niedokrwieniu (FMD, *flow-mediated vasodilation*), nie wykazując zwiększonej sztywności tętnic w badaniu podatności naczyń tętniczych (prędkość fali tętna [PWV, *pulse wave velocity*]) [12]. Dodatkowo odpowiedź na Ach była istotnie zaburzona u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym z porównaniem z grupą osób zdrowych. Natomiast wielkość rozkurczu zależnego od SNP nie różniła się w obu badanych grupach. Wyniki te sugerują, że nadciśnienie tętnicze jest związane z dysfunkcją śródbłonna w mikrokrążeniu skórnym [13]. Stosując jonoforezę Ach w połączeniu z LSCI, dowiedziono również, że zależna od śródbłonna odpowiedź naczyniorozkurczowa jest istotnie zmniejszona w grupie chorych z nadciśnieniem tętniczym współwystępującym z dyslipidemią [14]. Co interesujące, u pacjentów z hipercholesterolemią wykazano również, że terapia statynami znacząco poprawia niezależną od śródbłonna odpowiedź naczyniową

podczas jonoforezy SNP [15]. W ostatnich badaniach z zastosowaniem LSCI wykazano zaburzenie zależnej i niezależnej od śródbłonna wazodylatacji u chorych na cukrzycę typu 2 z obturacyjnym bezdechem sennym [16].

OGRANICZENIA METODY

Na podstawie kilku badań określono, że powtarzalność wyrażona jako współczynnik zmienności dla pomiarów między dniami wynosiła między 6,4% a 12,1% w odniesieniu do metody LDI w połączeniu z jonoforezą Ach [4]. W kolejnym badaniu wyznaczona powtarzalność pomiarów wynosiła 25,5%, gdy jednak zmieniono kryterium oceny, wyrażając odpowiedź na Ach jako czas potrzebny do osiągnięcia maksymalnego przepływu (*time to peak*), to współczynnik zmienności wyniósł 10,4% [11]. Należy wyraźnie podkreślić, że powtarzalność tej metody zależy w dużej mierze od tego, w jaki sposób przedstawia się wyniki. Ze względu na wysokie koszty laserowych metod obrazowania mikrokrążenia opisywana metoda nie jest szeroko dostępna, co skutkuje brakiem standaryzacji w interpretacji wyników badań znacznie uniemożliwiającym bezpośrednie porównywanie badań i walidację metody. Istotne jest również, jaką technikę oceny mikrokrążenia stosuje się w badaniach odpowiedzi na jonoforezę substancji wazoaktywnej. Nadzieje budzi metoda LSCI, która wykazała się bardzo dobrą powtarzalnością pomiarów w połączeniu z innymi testami reaktywności. Na jakość i powtarzalność badań mają wpływ także artefakty wywołane ruchem; szczególnie wrażliwa jest metoda LSCI [17]. Ponadto na interpretację wyników wpływają liczne czynniki, między innymi temperatura otoczenia, wiek i płeć pacjenta oraz wszelkie substancje wazokatywne, takie jak kofeina. W celu uzyskania wiarygodnych wyników konieczne jest stosowanie precyzyjnych procedur badawczych. Wydaje się, że poza zrozumieniem złożonych mechanizmów regulacyjnych, należy też dążyć do unifikacji w przedstawianiu rezultatów, by móc uznać jonoforezę Ach za marker prognostyczny w chorobach układu sercowo-naczyniowego [5]. Z pewnością również metoda wymaga korelacji z innymi dostępnymi technikami oceny funkcji mikrokrążenia.

ZASTOSOWANIE W TERAPII ZABURZEŃ MIKROKRĄŻENIA

Warto zauważyć, że jonoforeza mogłaby stanowić idealną drogę podania leku w zaburzeniach mikrokrążenia, w których pożądanym jest efekt miejscowy. Oczekiwany

efekt terapeutyczny substancji wazodylatacyjnej podawanej systemowo jest często równoważony przez poważne ogólnoustrojowe działania niepożądane związane z silnymi właściwościami rozszerzenia naczyń krwionośnych. Miejscowe podawanie tych leków pozwoliłoby na uniknięcie toksyczności systemowej oraz zwiększenie stężenia leku w obszarze docelowym [18].

System transdermalnej aplikacji leku ma wiele zalet, między innymi pozwala uniknąć efektu pierwszego przejścia przez wątrobę, jak również zmniejsza liczbę działań niepożądanych stosowanej terapii. Ponadto jonoforeza jest metodą nieinwazyjną i umożliwiającą szybkie oraz kontrolowane podawanie wybranej dawki leku [19]. Z terapeutycznego punktu widzenia jonoforeza może być alternatywą dla systemowego podawania leków. Szczególnie przydatna mogłaby być w chorobach przebiegających z zaburzeniami mikrokrążenia, w których pożądanym byłoby wysokie miejscowe stężenie leku [20].

Jonoforeza znalazła kilka zastosowań klinicznych. Metoda ta jest obecnie stosowana w leczeniu nadmiernej potliwości. Wykorzystuje się ją również w systemach do szybkiego znieczulania miejscowego z zastosowaniem lidokainy i epinefryny. Epinefryna zmniejsza przepływ krwi i tym samym obniża klirens lidokainy. W leczeniu ostrych bólów pooperacyjnych stosuje się z powodzeniem urządzenie wykorzystujące mechanizm jonoforezy fentanylu [18]. Ostatnio w badaniach wykazano, że jonoforeza treprostinilu, analogu prostacykliny, zwiększa perfuzję w mikrokrążeniu człowieka. Badacze sugerują, że metoda ta mogłaby stanowić formę leczenia owrzodzeń w przebiegu cukrzycy bądź twardziny układowej [21].

PODSUMOWANIE

Jonoforeza Ach i SNP znalazła szerokie zastosowanie jako test farmakologiczny służący do oceny funkcji mikrokrążenia. Metoda ta, w połączeniu z nowoczesnymi technikami obrazowania perfuzji w mikrokrążeniu, umożliwia ocenę stanu naczyń i funkcji śródbłonna. Ze względu na małą dostępność i brak standaryzacji w interpretacji wyników badań metody tej nie stosuje się dotychczas jako rutynowego narzędzia klinicznego w codziennej praktyce. Jednak badania naukowe z zastosowaniem jonoforezy Ach i SNP umożliwiają lepsze zrozumienie złożonych mechanizmów regulacyjnych oraz uzupełniają wiedzę na temat patofizjologii schorzeń układu krążenia. W licznych testach dowiedziono, że odpowiedź wazodylatacyjna zależna od śródbłonna jest zaburzona u pacjentów ze schorzeniami

układu sercowo-naczyniowego. Warto podkreślić, że jonoforeza substancji wazodylatacyjnych może również stanowić formę terapii szczególnie w zaburzeniach mikrokrążenia obwodowego.

PIŚMIENNICTWO

- Roustit M., Cracowski J.L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol. Sci.* 2013; 34: 373–384.
- Feihl F., Liaudet L., Waeber B. i wsp. Hypertension: a disease of the microcirculation? *Hypertension* 2006; 48: 1012–1017.
- Vincent M.A., Clerk L.H., Lindner J.R. i wsp. Microvascular recruitment is an early insulin effect that regulates skeletal muscle glucose uptake *in vivo*. *Diabetes* 2004; 53: 1418–1423.
- Turner J., Belch J.J., Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends Cardiovasc. Med.* 2008; 18: 109–116.
- Roustit M., Cracowski J.L. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation* 2012; 19: 47–64.
- Kalia Y.N., Naik A., Garrison J., Guy R.H. Iontophoretic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 619–658.
- Tesselaar E., Sjöberg F. Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. *Microvasc. Res.* 2011; 81: 88–96.
- Roustit M., Simmons G.H., Carpentier P., Cracowski J.L. Abnormal digital neurovascular response to local heating in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008; 47: 860–864.
- Blaise S., Roustit M., Hellmann M., Millet C., Cracowski J.L. Cathodal iontophoresis of treprostinil induces a sustained increase in cutaneous blood flux in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 2013; 53: 58–66.
- Ijzerman R.G., de Jongh R.T., Beijik M.A. i wsp. Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003; 33: 536–542.
- Agarwal S.C., Allen J., Murray A., Purcell I.F. Laser Doppler assessment of dermal circulatory changes in people with coronary artery disease. *Microvasc. Res.* 2012; 84: 55–59.
- Shantsila E., Wrigley B., Shantsila A. i wsp. Ethnic differences in macrovascular and microvascular function in systolic heart failure. *Circ Heart Fail.* 2011; 6: 754–762.
- Farkas K., Kolossváry E., Járjai Z., Nemsik J., Farsang C. Non-invasive assessment of microvascular endothelial function by laser Doppler flowmetry in patients with essential hypertension. *Atherosclerosis* 2004; 173: 97–102.
- Cordovil I., Huguenin G., Rosa G. i wsp. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvasc. Res.* 2012; 83: 376–379.
- Khan F., Litchfield S.J., Stonebridge P.A., Belch J.J. Lipid-lowering and skin vascular responses in patients with hypercholesterolaemia and peripheral arterial obstructive disease. *Vasc. Med.* 1999; 4: 233–238.
- Tahrani A.A., Ali A., Raymond N.T. i wsp. Obstructive sleep apnea and diabetic neuropathy: a novel association in patients with type 2 diabetes. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186: 434–441.
- Roustit M., Millet C., Blaise S., Dufournet B., Cracowski J.L. Excellent reproducibility of laser speckle contrast imaging to assess skin microvascular reactivity. *Microvasc. Res.* 2010; 80: 505–511.
- Murray A.K., Herrick A.L., Gorodkin R.E., Moore T.L., King T.A. Possible therapeutic use of vasodilator iontophoresis. *Microvasc. Res.* 2005; 69: 89–94.
- Dixit N., Bali V., Baboota S., Ahuja A., Ali J. Iontophoresis — an approach for controlled drug delivery: a review. *Curr. Drug. Deliv.* 2007; 4: 1–10.
- Murray A.K., Moore T.L., King T.A., Herrick A.L. Vasodilator iontophoresis — a possible new therapy for digital ischemia in systemic sclerosis? *Rheumatology* 2008; 47: 76–79.
- Roustit M., Gaillard-Bigot F., Blaise S. i wsp. Cutaneous iontophoresis of treprostinil in systemic sclerosis: a proof-of-concept study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2014; 95: 439–445.