



väitös

Marko Sallialmi

LL, erikoislääkäri
Vaasan keskussairaala,
Leikkausosasto
marko.sallialmi[at]gmail.com

MIKROVERENKIERTO JA HEMOREOLOGIA KRIITTISESTI SAIRAILLA POTILAILLA

Marko Sallialmi

Helsingin yliopisto 10.5.2013

Vastaväittäjä

Professor Michael Piagnerelli, University of Mons-Hainaut and Free University of Brussels, Belgium

Esitarkastajat

Dosentti Kai Kiviluoma, Oulun yliopisto
Dosentti Riitta Lassila, Hyks, Hyytymishäiriökliniikka

▶ Väitöskirjatyössä tutkittiin teho-
hoitoa vaativien potilaiden mikro-
verenkiertoa ja veren virtausomai-
suuksia. Lähes sadan vuoden ajan
on tiedetty, että hapentarjonta ja
hapenkulutus ovat terveellä ihmisellä
tasapainossa. Elimistö säätelee eri
kudosten verenkiertoa avaamalla ja
sulkemalla hiussuonia kulloisenkin
tarpeen mukaisesti. Nestehoidon
vaikutukset elimistössä välittyvät
osittain verisuonten endoteelin
glykokalyksin kautta. Verisuonen
seinämän endoteelisolujen veri-
suonen sisäpinnalle syntetisoima
ja ylläpitämä glykokalyksi koostuu
glykoproteiineista ja proteoglykaa-
neista, molemmat rakenteeltaan
sokerikuorrutettuja proteiineja.
Glykokalyksin liittyy myös edellä mai-
nittuihin proteiineihin kiinnittyneitä
glykosaminoglykaaneja (vanhalta
nimeltään mukopolysakkaridit).
Näitä ovat heparaanisulfaatti,

kondroitiinisulfaatti, dermataanisulfaatti, kerataanisulfaatti, sekä hyaluronaani. Joukko solukalvon läpäiseviä proteoglykaaneja ("ankkuriproteiinit", syndekaanit ja glypikaanit) kiinnittää glykokalyksin sulfatoidut glykosaminoglykaanit

paikoilleen endoteelisolun pintaan. Solukalvon CD44-proteiinit kiinnittävät puolestaan yli 1000 kDa:n kokoiset hyaluronaani-molekyylit osaksi glykokalyksia (1).

Glykokalyksi hidastaa plasman virtausta endoteelisolun

Väitöskirja ja osatyöt

Marko Sallialmi: Microcirculation and hemorheology in critically-ill patients thesis: <http://urn.fi/URN:ISBN:978-952-10-8687-8>

1. Sallialmi M, Oksala N, Pettilä V, Tenhunen J. Evaluation of sublingual microcirculatory blood flow in the critically ill. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012; 56: 298-306.
2. Liuhanen S, Sallialmi M, Pettilä V, Oksala N, Tenhunen J. Measurement of vascular endothelial glycocalyx layer thickness in vivo with a

plug-in for Image. *Comput Methods Programs Biomed* 2013; 110: 38-47.

3. Sallialmi M, Tenhunen J, Yang R, Oksala N, Pettilä V. Vascular adhesion protein-1 and syndecan-1 in septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand* 2012; 56: 316-22.
4. Sallialmi M, Tenhunen J, Kultti A, Tammi M, Pettilä V. Plasma hyaluronan and hemorheology in patients with septic shock: a clinical and experimental study. *Clin Hemorheol Microcirc* 2013 (epub ahead of press)

Teknisen laadun tarkastelu johti siihen, ettei videoleikkeitä voitu lainkaan käyttää kliinisessä osiossa.



Vasemmalta vastaväittäjä Michael Piagnerelli, väittelijä Marko Sallisalmi ja kustos Ville Pettilä

läheisyydessä. Plasman proteiinit liittyvät toiminnallisesti erottamattomaksi osaksi glykokalyksia (2). Glykokalyksi säätelee elimistön koagulaation ja fibrinolyysin välistä tasapainoa,(3) nesteen ja aineenvaihduntatuotteiden vaihtoa veren ja kudosten kesken (4,5), leukosyyttien kulkeutumista tulehdusreaktioalueelle,(6) sekä välittää tietoa valitsevista virtausolosuhteista endoteelisolun sisälle (engl. mechanosensing) (7). Tehohoidossa potilaiden mikroverenkierto häiriintyy, mikä mahdollisesti myötävaikuttaa monielinvaurion syntyyn (8).

Vaikka videomikroskopia on erittäin altis teknisille häiriöille, ei julkaisusta kirjallisuudesta löydy lainkaan mainintoja teknisistä ongelmista ja siitä, kuinka mikroverenkierron kuvattujen videoleikkeiden tekninen laatu varmistetaan osana kliinistä tutkimusprotokollaa. Endoteelin

glykokalyksin tapahtumista eri eläinkoeasetelmista on vahva näyttö, mutta tutkimusta aloitettaessa ei aiheesta löytynyt lainkaan julkaistua tietoa ihmisillä. Glykokalyksin paksuuden kuvantamisesta on julkaistu epäsuora kuvantamismenetelmä, joka perustuu videomikroskopiaan, jonka käyttö ihmisillä ja tehohoidossa on vielä tutkimusvaiheessa. (9) Ei ole olemassa tutkimusnäyttöä, että glykokalyksin tapahtumat tehohoitosairauksien yhteydessä johtaisivat mikroverenkiertohäiriöön.

Tutkimuskysymykset

Väitöskirjan ensimmäisen osatyön tarkoituksena oli selvittää, voidaanko videomikroskoopilla luotujen mikroverenkiertoa kuvaavien videoleikkeiden teknistä laatua tarkastella ennalta suunnitellun kriteeristön mukaan. Osatyössä I kehitettiin kliinisiin tutkimuksiin päätyvien

videoleikkeiden teknisen systemaattista laadun raportointia. Tämä on tärkeä osa mikroverenkiertotutkimusten tutkimusharhan hallintaa. Edelleen tutkimuksessa pyrittiin kehittämään digitaalinen kuvankäsittelyalgoritmi, jolla glykokalyksin paksuusmittauksen vaihteluvakiota voitaisiin pienentää (osatyö II). Kahdessa kliinisessä osatyössä pyrittiin selvittämään, esiintyykö bakteerien aiheuttamaa verenmyrkytystä sairastavilla potilailla kohonneita endoteelin glykokalyksin vaurion merkkiaineita (osatyö III) sekä verrata sepsispotilailta ja verrokeilta mitattujen makromolekyyliproteiinien pitoisuuksia, hyaluronaanin massafraktioiden jakaumaa, sekä plasman viskositeettia (osatyö IV). Lisäksi osatyössä IV mallinnettiin laboratorio-olosuhteissa vereen lisättyjen keittosuolan, hydroksietyyli-äidin ja hyaluronaanin sekä

>>

samanaikaisesti tapahtuvan veren luonnollisten proteiinien laimenemisen vaikutusta veren viskositeettiin.

Menetelmät

Tutkimus toteutettiin prospektiivisena observaatiotutkimuksena kahdella yliopistosairaalan teho-osastolla. Tutkimukseen osallistui 36 tehohoitopotilasta sekä 26 tervettä vapaaehtoista tutkimushenkilöä vuosina 2008-2012. Tutkimuksessa kerättiin videokuvaa suun alueen mikroverenkierrasta tehohoitoon tulleilta sepsis-, pankreatiitti- ja sydänleikkauspotilailta sekä terveiltä verrokeilta. Videoleikkeistä analysoitiin systemaattisesti tekniset virhelähteet ja samalla kehitettiin uusi, tietokonepohjaiseen kuvankäsittelyyn perustuva mittausalgoritmi endoteelin glykokalyksin paksuuden mittaukseen. Sepsispotilailta ja verrokeilta kerättiin laboratorionäytteitä, joista mitattiin syndekaani-1-, hyaluronaani-, myeloperoksidaasi- ja vascular adhesion protein-1-pitoi-

suudet, plasman kokonaisproteiinipitoisuus ja elektroforeettiset fraktiot, hyaluronaanin massafraktioiden jakaumat, sekä plasman viskositeetti. Osatyön IV elimistön ulkopuolisessa laboratoriosuudessa mallinnettiin

lisäksi vereen lisättyjen keittosuolan ja hydroksietyylitärkkelyksen ja hyaluronaanin, sekä samanaikaisesti tapahtuvan veren luonnollisten proteiinien laimenemisen, vaikutusta veren viskositeettiin.

Tulokset

Osatyössä I verrokeilta ja tehohoitoa vaativilta potilailta kerättiin yhteensä 240 videoleikettä. Ensimmäisen osatyön tuloksena todettiin, että videomikroskooppimenetelmän virhelähteiden tunnistamisen perusteella systemaattinen kuvan laadun analysointi ja tieteellinen raportointi

on mahdollista. Tutkitussa 240 videoleikkeen aineistossa korkealaatuisen videomateriaalin osuus oli ainoastaan 31%.

Osatyössä II kehitettiin endoteelin glykokalyksin paksuuden mittaamiseen puoliautomaattinen mittausalgoritmi, jota käyttämällä endoteelin glykokalyksikerroksen paksuuden vaihteluvakio (4,3% - 5,8%) pienehi huomattavasti verrattuna tutkijan manuaalisesti suorittamaan mittamiseen (7,2% - 9,8%).

Osatyössä III sepsispotilailta mitattiin verestä samanaikaisesti merkittävästi kohonneet endoteelin glykokalyksikerroksen vaurion merkkiainepitoisuudet sekä endoteelin ja yleistyneen tulehdusreaktion merkkiainepitoisuudet.

Osatyössä IV todettiin, että veren suurikokoisten proteiinimolekyylien pitoisuudet ja plasman viskositeetti olivat sepsis-potilailla merkittävästi vähäisempiä kuin verrokeilla. Hyaluronaanin pitoisuuden suureneminen sepsiksessä oli tilastollisesti merkittävää, mutta massajakaumaltaan kiertävä hyaluronaani ei sepsis-potilailla eronnut verrokeista. Hyaluronaanin lisääntynyt pitoisuus ei riittänyt kumoamaan kokonaisproteiini-pitoisuuden alenemisestä seurannutta viskositeetin alenemaa. Elimistön ulkopuolisen mallintamisen perusteella potilaille tehohoidossa annettu nestehoito vaikuttaa suuresti veren viskositeettiin ja kliinisessä tutkimusosiossa havaittuihin veren viskositeetin mittausarvoihin.

Pohdinta

Tutkimuksessa luotiin ensin tekninen laatustandardi ja systemaattinen videoleikkeiden laaduntarkastusprotokolla. Teknistä laatustandardia tarvitaan, jotta tulevaisuudessa videomateriaalin laatu voitaisiin raportoida osana tutkimusprotokollaa ja tuloksia. Tässä tutkimuksessa teknisen laadun tarkastelun tulokset johtivat kuitenkin siihen, ettei videoleikkeitä voitu lainkaan käyttää kliinisessä osiossa. Tästä syystä aiottu videomikroskopiatutkimus muuttui laboratoriotutkimukseksi.

Videoleikkeiden tekninen laatu-standardi ei ole sellaisenaan vielä valmis, vaan se vaatii jatkokehittelyä. Suunnitellut monikeskustutkimukset ja erityisesti tutkimuksia arvioivat artikkelien vertaisarvioijat sekä lukijat hyötyisivät, mikäli analyysiin päätyneiden videoleikkeiden tekninen laatu raportoitaisiin avoimesti. Muutoin lukijan on mahdoton poissulkea vaihtoehtoa, että mikroverenkiertotutkimuksen tulos onkin itse asiassa seurausta teknisen artefaktin aiheuttamasta harhasta.

Glykokalyksin paksuuden mittaminen ihmisillä on vasta tutkimusvaiheessa, eikä mittaamisella toistaiseksi ole kliinistä merkitystä. Tässä tutkimuksessa kehitetty glykokalyksin paksuusmittauksen mittausalgoritmi osoitti pienentävän inhimillisen virheen määrää. Mittausalgoritmista tehtiin liitännäinen vapaan lähdekoodin ImageJ kuvankäsittelyohjelmaan, jota ylläpitää ja jakaa Yhdysvaltain National Institute of Health. Mittausalgoritmi ja tietokoneohjelma ovat nyt vapaasti muiden tutkijoiden ladattavissa, käytettävissä ja edelleen kehitettävissä.

Ennen tätä tutkimusta ei lainkaan tiedetty, kuinka vascular adhesion protein-1 käyttäytyy sepsiksessä, ja assosioituuko sen aktivaatioon glykokalyksin vauriomerkkiainepäästöä. Mekanistisesti on mahdollista, että vascular adhesion protein-1:n endoteelin glykokalyksin alla, endoteelisolun solukalvolla, tuottama vetyperoksidi itse asiassa onkin se tekijä, joka johtaa glykokalyksin rakenteiden pilkkoutumiseen, kulkeutumiseen verenkiertoon, sekä endoteelin adheesiomolekyylien paljastumiseen tulehdusreaktioissa. Tämä uusi tutkimushypoteesi vaatii jatkotutkimuksia.

Aiheesta aiemmin julkaistun kirjallisuuden valossa tutkijoille oli yllätys, että plasma viskositeetti oli sepsis-potilailla alentunut. Nestettä vaativien potilaiden hoitaminen elektrolyyttiliuksilla johtaa väistämättä matalaan viskositeettiin. Albumiinin paremmuutta osoittavaa tutkimusnäyttöä ei ole. Jos

Aiheesta aiemmin julkaistun kirjallisuuden valossa tutkijoille oli yllätys, että plasma viskositeetti oli sepsis-potilailla alentunut.



synteettisten kolloidien poistuminen käytöstä korvataan laimeilla albumiiniuoksilla, ei tätä linjamuutosta pidä puolustella ainakaan mikroverenkierröllisillä ja hemoreologisilla näkökohdilla. ■

Viitteet

1. Gouverneur M, Spaan JA, Pannekoek H, ym. Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H458-2.
2. Van Teeffelen JW, Brands J, Stroes ES, Vink H. Endothelial glycocalyx: sweet shield of blood vessels. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17: 101-5.
3. Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 536-45.
4. Gao L, Lipowsky HH. Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes. *Microvasc Res* 2010; 80: 394-401.
5. Levick JR, Michel CC. Microvascular fluid exchange and the revised Starling principle. *Cardiovasc Res* 2010; 87: 198-210.
6. Lipowsky HH. The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases. *Ann Biomed Eng* 2012; 40: 840-8.
7. Tarbell JM, Weinbaum S, Kamm RD. Cellular fluid mechanics and mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* 2005; 33: 1719-23.
8. Sakr Y, Dubois MJ, De Backer D, ym. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. *Crit Care Med* 2004; 32: 1825-31.
9. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Mooij HL, ym. Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *J Appl Physiol* 2008; 104: 845-52.