

UNIwersYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W
POZNANIU

WYDZIAŁ NAUK O ZDROWIU



Kasem Bahloul

Wpływ hipotermii na właściwości dielektryczne rogówki szczura

**ZAKŁAD BIONIKI I BIOIMPEDANCJI
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W POZNANIU**

PROMOTOR ROZPRAWY DOKTORSKIEJ: DR HAB. EWA MARZEC

POZNAŃ 2013

Spis treści

1. Wprowadzenie.....	3
1.1. Mechanizm termoregulacji organizmów stałocieplnych.....	3
1.2. Hipotermia.....	8
1.2.1. Wpływ zimnego otoczenia na homojotermię człowieka.....	10
1.2.2. Hipotermia podczas znieczulenia i operacji.....	12
1.2.3. Hipotermia terapeutyczna.....	17
2. Założenia i cel pracy.....	20
3. Materiał i metoda.....	21
3.1. Charakterystyka badanych grup.....	21
3.2. Przebieg hipotermii.....	21
3.2.1. Stosowane leki.....	21
3.2.2. Zagadnienia etyczne.....	22
3.3. Przygotowanie rogówek do badań dielektrycznych.....	22
3.4. Charakterystyka metody spektroskopii dielektrycznej.....	22
4. Wyniki.....	25
4.1. Porównanie uwodnionych rogówek grupy kontrolnej z badaną.....	25
4.1.1. Temperaturowe zależności parametrów dielektrycznych.....	25
4.1.2. Częstotliwościowe zależności parametrów dielektrycznych.....	28
4.1.3. Energia aktywacji przewodności właściwej.....	32
4.2. Porównanie suchych rogówek grupy kontrolnej z badaną.....	35
4.2.1. Temperaturowe zależności parametrów dielektrycznych.....	35
4.2.2. Częstotliwościowe zależności parametrów dielektrycznych.....	38
4.2.3. Energia aktywacji przewodności właściwej.....	42
5. Omówienie wyników.....	44
6. Wnioski.....	54
7. Piśmiennictwo.....	55

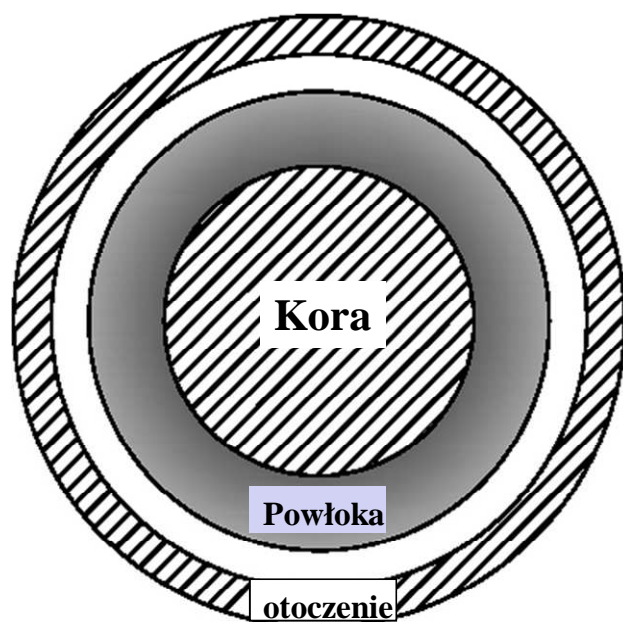
8. Streszczenie	66
9. Abstract.....	68
10. Spis rycin i tabel.....	70

1. Wprowadzenie

1.1. Mechanizm termoregulacji organizmów stałocieplnych

Organizm stałocieplny jest termodynamicznym układem otwartym, w którym wszystkie procesy życiowe zachodzą dzięki wymianie energii i masy z otoczeniem zewnętrznym [1]. Udział energii cieplnej w tym układzie dotyczy pochłaniania, przetwarzania i utraty ciepła przez organizm. Zachowanie optymalnego komfortu cieplnego przez ten organizm jest możliwe tylko w stanie równowagi bilansu cieplnego (homojotermii), co zapewnia sprawnie działająca termoregulacja [2-4]. Do tej pory opracowano różne modele termoregulacyjne dla człowieka [5-8] w celu poznania wpływu czynników środowiska zewnętrznego takich jak np. temperatura, wilgotność i prędkość powietrza, promieniowanie elektromagnetyczne i chemiczne toksyny na mechanizm transportu ciepła w tym organizmie.

Najczęściej stosowany jest dwuskładnikowy model cieplny Gagge [5] uwidoczniiony na Ryc.1.



Ryc.1. Model termoregulacyjny człowieka [5]

Model ten stanowią dwa współśrodkowe walce, z których wewnętrzny tzw. kora (mózg, narządy brzuszne i klatki piersiowej) posiada uregulowaną temperaturę ok. 37°C, natomiast zewnętrzny walec tzw. powłoka (skóra, tkanka tłuszczowa i mięśnie) temperaturę w zakresie od 28 do 35°C. Temperatura skóry, która pełni rolę bufora między korą i otoczeniem zewnętrznym, zależy od wymiany ciepła z tymi obszarami.

Bilans cieplny organizmu człowieka z uwzględnieniem mechanizmów fizycznych wzajemnego oddziaływania tego organizmu z otoczeniem zewnętrznym przedstawia zależność [9]:

$$Q_S = Q_M - (\pm W) \pm Q_E \pm Q_R \pm Q_C \pm Q_K, \quad (1)$$

gdzie: Q_M – ciepło metabolizmu,

Q_S – ciepło dodatkowe,

(+W) – praca dostarczana do organizmu,

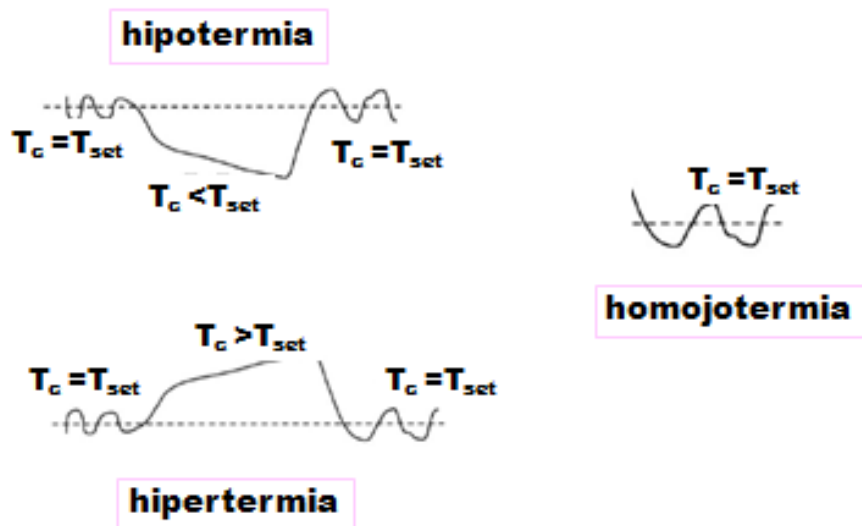
(-W) – praca wykonana przez organizm

Q_E , Q_R , Q_C i Q_K – są to odpowiednio ciepła parowania, promieniowania, konwekcji i przewodnictwa wymieniane między organizmem i otoczeniem.

Ciepło wymieniane dotyczy ciepła pobieranego z otoczenia i tego oddawanego przez organizm do otoczenia.

Z zależności (1) wynikają trzy stany bilansu cieplnego człowieka uwidocznione na rycinie 2. [10]:

- homojotermia,
- hipertermia,
- hipotermia

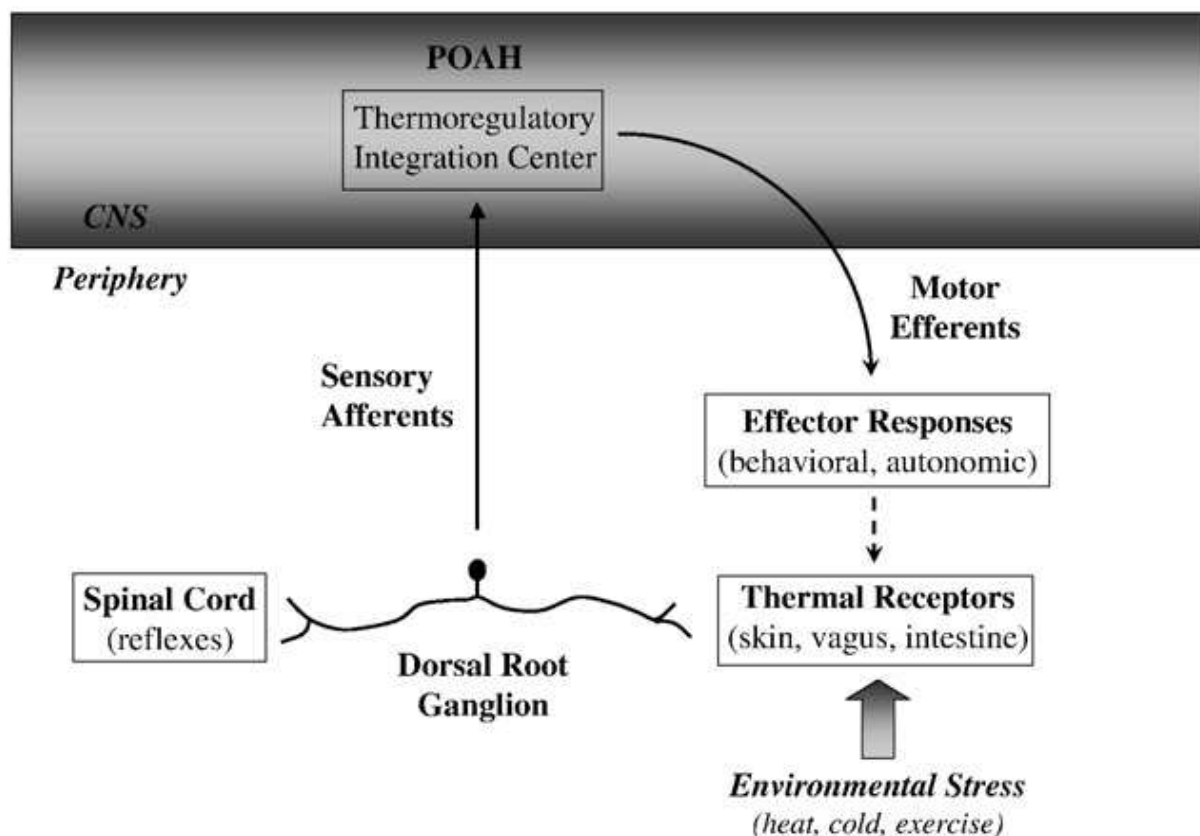


Ryc.2. Przebiegi temperatury kory człowieka w stanach: homojotermii, hipertermii i hipotermii [10]

Homojotermia (linia przerywana na rycinie1.) występuje wtedy, gdy nie powstaje dodatkowe ciepło, czyli $Q_S = 0$, co oznacza, że ciepło wymieniane z otoczeniem jest równe ciepłu uzyskiwanemu w wyniku przemian metabolicznych. W tym stanie temperatura kory T_c o dopuszczalnym zakresie między-progowym $36.5 - 37.5^\circ\text{C}$ oscyluje wokół tzw. temperatury „set-point” $T_{\text{set}} \sim 37^\circ\text{C}$. Hipertermia odpowiada takiemu stanowi organizmu, w którym powstaje dodatkowe ciepło, czyli $Q_S > 0$, gdyż ciepło doprowadzone do organizmu jest większe od ciepła oddawanego do otoczenia i w rezultacie $T_c > T_{\text{set}}$. Natomiast hipotermia występuje wówczas, gdy organizm traci dodatkowe ciepło, czyli $Q_S < 0$, jako konsekwencja większych strat ciepła do otoczenia w porównaniu z tym doprowadzanym do ciała, powoduje to spadek T_c w stosunku do T_{set} ($T_c < T_{\text{set}}$).

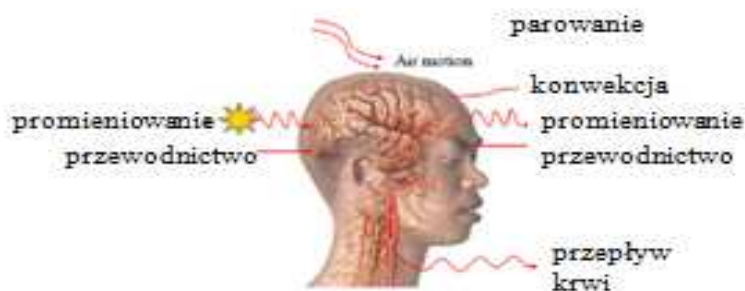
W organizmie człowieka utrzymanie temperatury kory T_c na poziomie homeostazy zachodzi w układzie regulacji automatycznej z ujemnym sprzężeniem zwrotnym [10-12].

Na rycinie 3. uwidoczniono schemat termoregulacji, zgodnie z którym układ sterujący (podwzgórze POAH) odbiera z receptorów kory i powłoki sygnały wejściowe i po porównaniu ich z temperaturą odniesienia „set-point” T_{set} , wysyła w pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego odpowiedzi za pomocą behawioralnych i autonomicznych efektorów.



Ryc.3. Układ regulacji temperatury w organizmie człowieka [11]

Ciepło powstające w procesach metabolicznych produkowane przez korę jest uwalniane do powłoki za pomocą przewodnictwa cieplnego, które jest transportem biernym wynikającym z bezpośredniego kontaktu między tymi obszarami oraz przepływającej krwi. Następnie ciepło jest oddawane ze skóry do otoczenia zewnętrznego człowieka przy udziale mechanizmów konwekcji, promieniowania elektromagnetycznego, parowania i przewodzenia [6, 13-15]. Drugorzędny bezpośredni sposób utraty ciepła (i masy) z kory do otoczenia jest oddychanie. Rycina 4. przedstawia różne typy mechanizmów fizycznych transportu ciepła w organizmach stałocieplnych na przykładzie mózgu człowieka [14].



Ryc.4. Mechanizmy fizyczne wymiany ciepła między mózgiem człowieka a jego środowiskiem zewnętrznym [14]

1.2. Hipotermia

Hipotermia w organizmie człowieka może być wywołana przez mechanizmy endogenne, ekspozycję na zimne otoczenie i kontrolowane obniżenie temperatury wnętrza organizmu (kory) [16]. Wpływ tych czynników na przebieg hipotermii u człowieka został szerzej omówiony w Podrozdziałach 1.2.1, 1.2.2. i 1.2.3. tej rozprawy.

Hipotermia endogenna wynika ze zmniejszonego wydzielania ciepła z powodu metabolicznych zaburzeń w takich stanach jak niedoczynność tarczycy, hipoglikemia, niedoczynność przysadki, długotrwałych zabiegów chirurgicznych, masowych transfuzji lub z niedostatecznie zachodzącej termoregulacji wynikającej z dysfunkcji centralnego układu

nerwowego (np. nowotwór, uraz). Z kolei w nagłej hipotermii organizmu, przyczyną obniżenia temperatury kory jest zimne otoczenie a nie zaburzenie układu termoregulacji. Znaczna liczba pacjentów z urazami powypadkowymi jest w stanie nagłej hipotermii. Natomiast zastosowanie kontrolowanej hipotermii w warunkach klinicznych polega na aktywnym chłodzeniu pacjentów np. po zatrzymaniu krążenia. Ma to na celu zabezpieczenie ważnych życiowo organów przed deficytem energetycznym. Ponadto, hipotermia kontrolowana stosowana jest podczas planowanych operacji, gdyż działa ochronnie na komórki organizmu.

Wymienione powyżej czynniki endogenne i egzogenne powodujące hipotermię organizmu mają wpływ na wielkość obniżenia temperatury kory, dlatego dokonano klasyfikacji hipotermii na łagodną (32-35°C), umiarkowaną (28-32°C) i ciężką (<28°C) [16]. Na podstawie tego podziału widać, że hipotermii odpowiadają temperatury kory poniżej 35°C. Jednakże za krytyczną temperaturę kory u pacjentów urazowych przyjmuje się 34°C, gdyż ich śmiertelność wyraźnie wzrasta poniżej tej temperatury i stąd hipotermii łagodnej, umiarkowanej i ciężkiej przyporządkowane są odpowiednie zakresy temperatur: 35-34°C, 34-32°C i < 32°C. Jak wynika z doniesień naukowych nie ma do tej pory jednoznacznej klasyfikacji hipotermii organizmu człowieka, której odpowiadałyby ustalone przedziały temperatury kory. Dla przykładu, ze względu na neuroochronne zastosowanie hipotermii w takich sytuacjach klinicznych jak uszkodzenie rdzenia kręgowego, ciężki uraz głowy czy udar przyjmuje się następującą klasyfikację hipotermii: łagodną (33-36°C), umiarkowaną (28-32°C), ciężką (16-28°C) i głęboką (<15°C) [17]. Chociaż hipotermię w zakresie temperatury kory 32-34°C nazywa się w piśmiennictwie zamiennie jako łagodną lub umiarkowaną. Z kolei w publikacji [18] autorzy wyraźnie wskazują na brak konsekwentnego stosowania terminu „łagodna hipotermia” w piśmiennictwie naukowym i tą nazwę w swoich zastosowaniach klinicznych odnoszą do zakresu temperatury 34-36°C, dla hipotermii okołoperacyjnej u pacjentów.

Hipotermia w zależności od mechanizmów ją wywołujących indukuje patofizjologiczne zmiany w różnych narządach organizmu. Hipotermia wpływa na aktywność enzymów, które decydują o funkcjonowaniu narządów i metabolizmie w tym leków. Tak więc obniżenie temperatury środowiska enzymów powoduje zmianę farmakodynamiki lotnych środków znieczulających jak również innych leków rutynowo podawanych podczas znieczulenia [19,20]. U pacjentów poddanych hipotermii wzrasta rozpuszczalność środków znieczulających w tkankach, np. wzrost koncentracji fentanylu w osoczu krwi wynosi ok. 5% na 1°C redukcji temperatury kory pacjenta [20]. Randomizowane badania z zastosowaniem

łagodnej hipotermii [21] wskazują na wyraźne opóźnienie w zwolnieniu dorosłych pacjentów z jednostki pooperacyjnej, u których hipotermia powoduje termiczny dyskomfort związany ze wzrostem ciśnienia krwi, akcji serca i koncentracji katecholaminy w osoczu [22]. Interesujące jest to, że podobnie przedłużający się czas powrotu z jednostki pooperacyjnej nie jest zaobserwowany u noworodków i dzieci [16].

Kolejną niekorzystną zmianą pooperacyjną jest drżenie mięśniowe, które powoduje wzrost zużycia tlenu o ponad 100% oraz wzrost ciśnienia śródocznego i śródmózgowego [18]. Drżenie mięśniowe może być ograniczone przez zastosowanie powierzchniowego grzania skóry [23] lub przez zastosowanie różnych leków takich jak np. clonidine, ketanserin, traumadol [18].

Hipotermia może również powodować zmiany w układzie sercowo-naczyniowym. Zawał serca jest jednym z powodów nieoczekiwanego okołoperacyjnego zdarzenia chorobowego lub śmierci [24].

Hipotermia u starszych pacjentów powoduje nadciśnienie, które jest rezultatem 3-krotnego wzrostu stężenia noradrenaliny w osoczu [25], co może wpływać na wzrost pobudliwości serca i zwiększać prawdopodobieństwo zaburzeń rytmu serca. Natomiast u młodych osobników u których nie występują hemodynamiczne reakcje na łagodną hipotermię, takie komplikacje nie występują [22]. Do zmian niekorzystnych wynikających z hipotermii operacyjnej należy 2% wzrost lepkości krwi na każdy 1°C obniżonej temperatury kory [16]. W pracy [18] wykazano, że hipotermia indukuje morfologiczne zmiany w strukturze płytki krwi, które decydują o jej aktywności. Pacjenci poddani hipotermii charakteryzują się zaburzeniami w układzie krzepnięcia mogącymi prowadzić do rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. Ponadto obniżona temperatura kory u pacjentów do 35°C podczas operacji powoduje wyraźny wzrost utraty krwi w porównaniu z pacjentami tymi będącymi w czasie operacji w stanie normotermii [26]. Z publikacji [27] wynika również, że u pacjentów poddanych operacji, których temperatura kory wynosiła 36.1°C straty krwi były większe w porównaniu z pacjentami, u których temperatura ciała w okresie trwania operacji wynosiła 36.6°C.

Konsekwencją hipotermii może być również śpiączka, osłabienie odruchu ocznego i wyraźne zmiany w zarejestrowanym elektroencefalogramie [16].

Zakażenia rany są poważnymi powikłaniami znieczulenia i operacji [28]. Hipotermia może ułatwić okołoperacyjne zakażenia rany gdyż bezpośrednio osłabia funkcje immunologiczne, takie jak „nie-specyficzna” śmierć tlenowa bakterii przy udziale krwinek białych [18]. Oprócz obniżenia zdolności krwinek białych do fagocytozy, również zwężenie

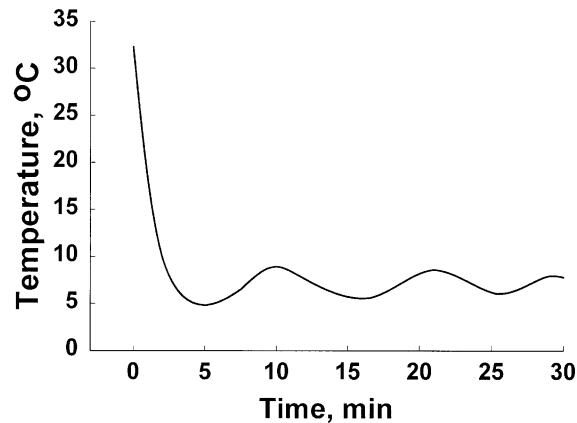
naczyń skórnych prowadzące do niedotlenienia tkanek może utrudniać gojenia się rany. Tlen jest niezbędny do utworzenia blizny, która powstaje przez przyłączenie grup wodorotlenowych do licznych reszt proliny i lizyny, tworząc w ten sposób wiązania sieciujące wewnątrz i między łańcuchami kolagenu, co wpływa na wytrzymałość tkanki na rozciąganie. Zwężenie naczyń na skutek zastosowania hipotermii, powoduje ograniczenie ilości tlenu dostarczanego do tkanek i tym samym obniżenie dopływu tlenu do kolagenu.

Omówione powyżej przykłady efektów niekorzystnego oddziaływania hipotermii na organizm człowieka nie stanowią przeszkody w jej klinicznym pozytywnym zastosowaniu, takim jak hipotermia terapeutyczna, której mechanizm działania omówiony jest w Podrozdziale 1.2.3.

1.2.1. Wpływ zimnego otoczenia na homojotermię człowieka

Warunki otoczenia człowieka o temperaturze niższej niż temperatura jego ciała powodują powstanie gradientu temperatury między skórą a środowiskiem zewnętrznym. W konsekwencji ciało oddaje ciepło na zewnątrz w wyniku mechanizmów przewodnictwa i konwekcji. Ponadto, wiatr powoduje wzrost straty ciepła przez konwekcję z powierzchni skóry w porównaniu z otoczeniem bezwietrznym. Z kolei zanurzenie ciała w wodzie wywołuje około 70-krotny wzrost [9] transportu ciepła przez konwekcję i przewodnictwo między skórą a otoczeniem w porównaniu z tymi mechanizmami zachodzącymi w powietrzu. Ten mechanizm straty ciepła przez skórę w wodzie zależy od głębokości i wielkości powierzchni ciała zanurzonego w tej wodzie. Dlatego, okrycie (ubranie) izoluje ciało od otoczenia zewnętrznego ograniczając straty ciepła za pomocą wymienionych powyżej mechanizmów fizycznych.

W odpowiedzi na zimno mechanizmy termoregulacyjne człowieka prowadzą do odpowiedzi ze strony naczyń [29-32]. Następuje obwodowe zwężenie naczyń powodujące zmniejszony przepływ krwi i redukcję konwekcyjnego transportu ciepła między korą a powłoką, co wpływa na wzrost wewnętrznej warstwy izolacyjnej. Ponieważ ciepło jest traczone z eksponowanej powierzchni ciała szybciej niż jest ono uzupełniane z wnętrza organizmu, stąd zachodzi gwałtowny spadek temperatury skóry palca jak uwidoczniono dla przykładu na rycinie 5. [9].



Ryc. 5. Zależność temperatury łożyska paznokcia od czasu trwania zanurzenia palca ręki w zimnej wodzie [9]

Jak przedstawiono na rycinie 5. zwężenie naczyń rozpoczyna się, gdy temperatura skóry spada poniżej 35°C i staje się maksymalnie ok. 31°C dla tej tkanki. Stąd odpowiedź skurczowa na zimno opóźnia stratę ciepła i chroni w ten sposób korę przed obniżeniem temperatury, co odbywa się kosztem obniżenia temperatury tkanek obwodowych. W rękach i palcach pod wpływem zimna zachodzi jeszcze inny efekt naczynioruchowy polegający na rozszerzeniu naczyń, co uwidocznione jest na rycinie 5. jako oscylacje temperatury skóry będące rezultatem krótkotrwałego wzrostu przepływu krwi do chłodniejszych palców. Podobny efekt indukowanego zimnem rozszerzenia naczyń występuje w mięśniach i skórnym układzie naczyniowym przedramienia.

Innym fizjologicznym mechanizmem pozwalającym zachować normotermię u człowieka poddanego stresowi zimna jest wzrost wytwarzanego ciepła w procesach termogenezy drżeniowej, która pomaga zrównoważyć straty ciepła przez organizm do otoczenia. Drżenie, jako wynik niespontanicznych rytmicznych skurczów mięśnia rozpoczyna się w tułowiu a następnie rozszerza się do kończyn powodując wzrost zużycia tlenu przez organizm.

Na utrzymanie homojotermii w zimnym otoczeniu mają wpływ takie parametry antropometryczne jak powierzchnia i masa ciała [6,9,33]. Osoby, których iloraz powierzchni do masy jest duży doświadczają większego obniżenia temperatury ciała w zimnym otoczeniu w porównaniu z tymi osobami o mniejszej wartości liczbowej tego stosunku. Wynika to z faktu, iż tkanki tłuszczowe i nietłuszczowe różnią się oporem cieplnym i jest to wyraźnie widoczne w większej wartości tego parametru dla tkanki tłuszczowej niż dla skóry i mięśni, co wpływa na zmianę przewodnictwa cieplnego między korą i powłoką. Tkanka tłuszczowa podskórna stanowi wyraźną izolację przed stratą

ciepła w zimnym otoczeniu i im większa jest jej grubość tym mniejsze przewodnictwo cieplne, a więc i lepsza ochrona wnętrza organizmu przed obniżeniem temperatury. Stąd u osób otyłych drżenie jest mniejsze i doświadczają oni mniejszego obniżenia temperatury ciała podczas stresu zimna w porównaniu ze szczupłymi.

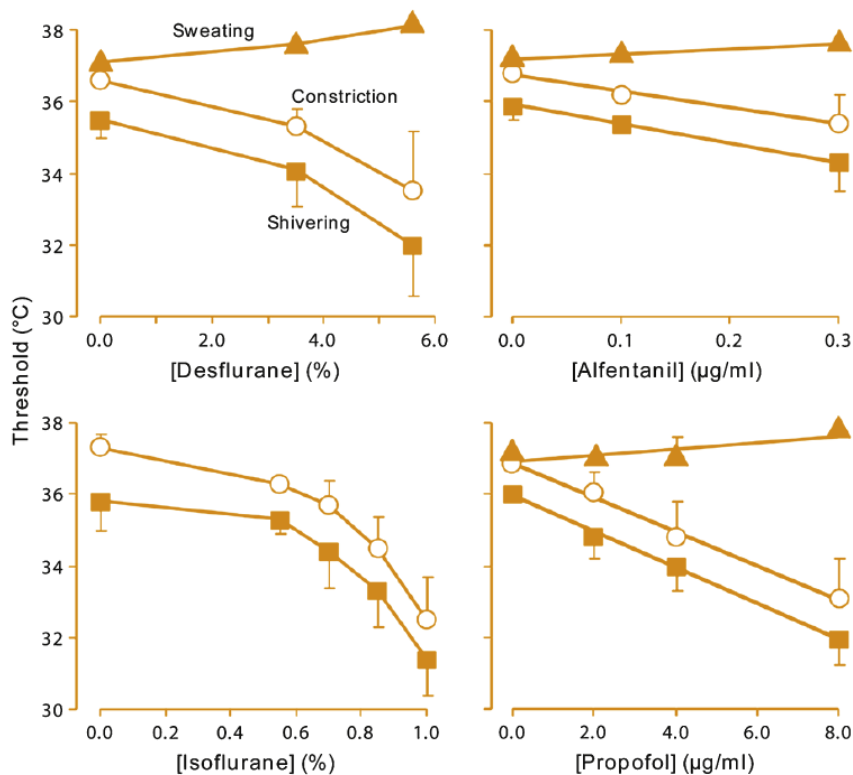
1.2.2. Hipotermia podczas znieczulenia i operacji

Występowanie stanu hipotermii (temperatura kory poniżej 36°C) u pacjentów podczas znieczulania i operacji jest konsekwencją zaburzenia mechanizmów termoregulacji organizmu w wyniku zastosowania środków znieczulających i oddziaływania niskiej temperatury sali operacyjnej na tego pacjenta [18,34-36]. Dlatego też, w przypadku przeprowadzanych operacji na otwartych jamach ciała zachodzi większa strata ciepła z organizmu do otoczenia. Ponieważ hipotermia okołoperacyjna może powodować takie powikłania pooperacyjne jak zakażenia rany czy wzrost utraty krwi u pacjenta, dlatego wymagane jest utrzymanie jego temperatury w stanie odpowiadającym homojotermii, jeżeli nie ma wskazań do hipotermii. Stąd, celowe jest monitorowanie temperatury kory podczas znieczulenia i operacji w takich miejscach jak, tętnica płucna, przełyk, błona bębenkowa, pęcherz i odbył, aby zastosować odpowiednie metody kompensacji strat ciepła z organizmu do otoczenia w razie wystąpienia nieprawidłowych pomiarów tego parametru fizjologicznego [36, 37-39].

Ogólna hipotermia organizmu

Większość stosowanych klinicznie środków znieczulających wpływa na centralne i obwodowe mechanizmy termoregulacyjne organizmu człowieka [18,34,37]. Ich działanie powoduje podwyższenie temperaturowego progu korowego dla pocenia i jego obniżenie dla zwężenia naczyń i drżenia, co powoduje wzrost zakresu między-progowego ok. 20-krotnie w porównaniu do homojotermii, której zakres wynosi ok. 0.2°C. Pacjenci w tym szerszym zakresie progowym kory wynoszącym 3-5°C stają się poikilotermiczni, z powodu niesprawnych autonomicznych mechanizmów termoregulacji, co sprzyja hipotermii.

Rycina 6. przedstawia przykładowe zależności progowej temperatury kory pacjenta dla mechanizmów pocenia, zwężenia naczyń i drżenia od dawki środka znieczulającego, gdy temperatura skóry u tego pacjenta wynosi 34°C. Z uwidoczniionych przebiegów widać, iż wzrost dawki środka znieczulającego powoduje liniowy (opiooid i propofol) wzrost temperatury dla pocenia, natomiast nieliniowy (desfluran i isofluran) spadek temperatury dla zwężenia naczyń i drżenia [18,39].

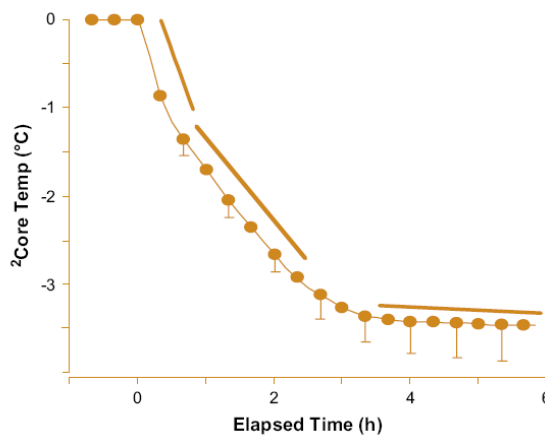


Ryc. 6. Wpływ środków znieczulających na temperaturę kory człowieka [18]

W stanie homojotermii termoregulacyjne zwężenie naczyń powoduje powstanie między korą i powłoką różnicy temperatury wynoszącej 2-4°C. Wywołanie ogólnego znieczulenia wpływa na redukcję temperaturowego progu kory dla zwężenia naczyń poniżej temperatury ciała w wyniku otwarcia anastomoz tętniczo-żylnych.

Rycina 7. przedstawia wielkość obniżenia temperatury kory w zależności od czasu trwania znieczulenia. Krzywa na tej rycinie wyraźnie pokazuje, że podczas wprowadzania pacjenta do znieczulenia oddawanie ciepła z wnętrza organizmu do tkanek obwodowych powoduje początkowy spadek temperatury kory o 1 – 1.5°C. Następnie, podczas kolejnych 2-3 godz. temperatura kory liniowo spada z mniejszą prędkością, ponieważ ciepło oddawane do otoczenia przewyższa wytwarzane ciepło metabolizmu. W rezultacie ok. 90% całego ciepła z

organizmu uwalnianie jest przez powierzchnię skóry w wyniku takich mechanizmów fizycznych jak promieniowanie i konwekcja oraz w mniejszym stopniu przez parowanie i przewodnictwo cieplne. Po 3-5 godz. trwania znieczulenia temperatura kory stabilizuje się, co jest rezultatem wyrównania się ilości ciepła traconego przez skórę do otoczenia z tym wytworzonym przez organizm. Taka sytuacja występuje u pacjentów dobrze izolowanych lub efektywnie podgrzewanych w czasie znieczulenia. Jednakże u pacjentów, którzy osiągają pożądaną, w warunkach zabiegu operacyjnego, temperaturę ciała plateau temperaturowe kory wynika z ponownej aktywacji termoregulacyjnego zwężenia naczyń obwodowych, które zmniejsza utratę ciepła przez skórę, ograniczając w ten sposób rozchodzenie się ciepła tylko do obszaru korowego organizmu. W ten sposób śródoperacyjne zwężenie naczyń obwodowych przywraca gradient temperatury kora-powłoka ($2-4^{\circ}\text{C}$) typowy dla homojotermii, który zabezpiecza centralnie generowane ciepło metabolizmu przed transportem do tkanek obwodowych.



Ryc.7. Wielkość spadku temperatury kory w zależności od czasu trwania znieczulenia [18]

Aktualne doniesienia naukowe dotyczące skutków ubocznych zastosowania znieczulenia ogólnego u ludzi [18,40,41], wskazują na konieczność dalszego testowania takich leków, które mogą osłabić układ termoregulacji ale bez wprowadzania efektów ubocznych wynikających z ich działania znieczulającego. Ponadto sugerowana jest ilościowa analiza czynników fizycznych środowiska sali operacyjnej, które mogą mieć wpływ na okołooperacyjne straty ciepła przez pacjenta, jak również oszacowanie ilościowe tych strat pochodzących z ran pacjenta podczas różnego typu operacji. W celu dalszego poznania szkodliwych i korzystnych efektów oddziaływania znieczulenia ogólnego na organizm ludzki, bardzo pomocne są tego typu badania z wykorzystaniem zwierząt prowadzone w różnych ośrodkach naukowych [42-50].

Miejscowa hipotermia organizmu

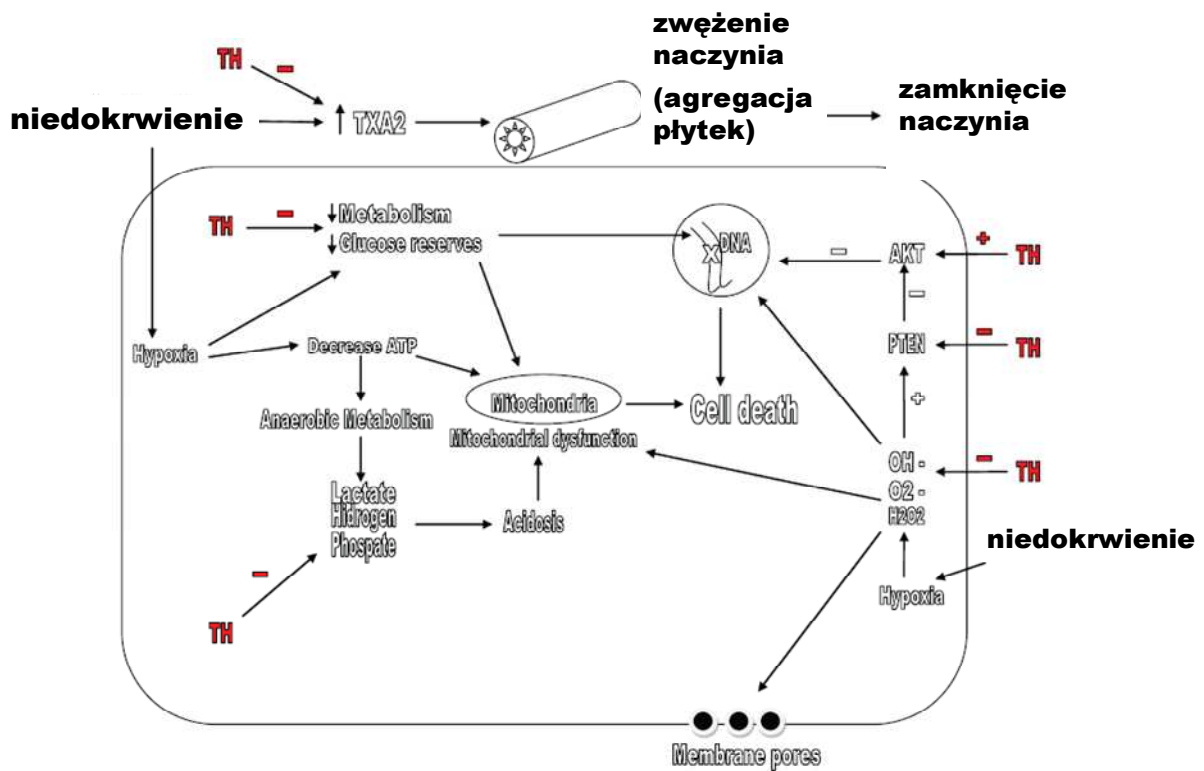
Znieczulenie miejscowe zastosowane u ludzi zmniejsza odpowiedź układu termoregulacji. W rezultacie hipotermia powszechnie występuje u pacjentów poddanych znieczuleniu rdzeniowemu i zewnątrzoponowemu [18,39], które obejmuje ponad połowę powierzchni ciała. To obwodowe zahamowanie mechanizmów obronnych termoregulacji jest głównym powodem hipotermii podczas znieczulenia miejscowego. U pacjentów poddanych działaniu hipotermii o pożądanej wartości temperatury może wystąpić drżenie mięśni, które jest uciążliwe zarówno dla pacjenta, jak i personelu medycznego. Miejscowe środki znieczulające powodują 3-krotny wzrost między-progowego zakresu temperaturowego kory w porównaniu z homojotermią jako konsekwencja wzrostu progu pocenia ok. 0.3°C i obniżenia progów zwężenia naczyń i drżenia ok. 0.5°C .

1.2.3. Hipotermia terapeutyczna

Hipotermia terapeutyczna jest jedną z ważnych metod neuro ochronnych stosowanych w takich sytuacjach klinicznych jak zatrzymanie akcji serca [51,52], ciężki uraz głowy [53-53], uszkodzenie rdzenia kręgowego [17,55], udar mózgu [54,56,57] oraz w innych chorobach jak ostra niewydolność wątroby [58,59].

Mechanizm molekularny działania hipotermii terapeutycznej

Na rycinie 8. uwidoczniono kilka efektów pozytywnego oddziaływania hipotermii na neurony umożliwiając ich przeżycie w wyniku wystąpienia niedokrwienia mózgu spowodowanego zmniejszonym dopływem tlenu i krwi do tego narządu [56].



Ryc.8. Mechanizm molekularny działania hipotermii terapeutycznej [56]

Przedstawiona na rycinie 8. seria przemian w komórce niedokrwionej jest zapoczątkowana obniżonym poziomem ATP, który powoduje przejście metabolizmu komórkowego z tlenowego na beztlenowy do wzrostu stężenia wodoru, fosforanu i mlecza, i w konsekwencji do kwasicy wewnątrz- i zewnątrz- komórkowej. W wyniku niedokrwienia następuje wyraźny wzrost zewnątrzkomórkowego poziomu neurotoksycznego glutaminianu (Glu) i innych neuroprzekaźników takich jak asparaginian (Asp) i dopamina oraz wolnych rodników [60,61]. Wraz z produkcją w komórce takich wolnych rodników jak OH^\cdot , O_2^\cdot , i H_2O_2 pojawia się mechanizm zapalny jako normalna odpowiedź fizjologiczna na to zaburzenie. W przebiegu tego procesu oprócz cytokin ochronnych pojawiają się cytokiny prozapalne takie jak TNF-alfa i IL-1Beta [62]. Te wymienione zmiany w strukturze komórki prowadzą do jej obrzęku i śmierci. Ilość wytwarzanych wolnych rodników i cytokin zapalnych po neurologicznym uszkodzeniu zależą od temperatury środowiska, stąd korzystne jest osłabienie tych mechanizmów komórkowych przez hipotermię, a w konsekwencji zmniejszenie kwasicy komórkowej [56]. Jest to możliwe dlatego, że hipotermia oddziałuje

równocześnie na mózgowy przepływ krwi, zużycie tlenu, wykorzystanie glukozy i mózgowy metabolizm. Obniżenie temperatury kory o 1°C powoduje zmniejszenie metabolizmu mózgowego nawet o 7% [63]. Hipotermia także poprawia mózgowy metabolizm glukozy, chroniąc jej zasoby, dzięki czemu może być ona wykorzystana nawet kilka dni po uszkodzeniu tego narządu [64].

Inny mechanizmem dzięki któremu hipotermia zapewnia integralność neuronów po niedokrwieniu polega na zmniejszeniu poziomu mózgowego glicyny (Gly), co osłabia jej oddziaływanie na receptory N-methyl-D-asparaginianowe (NMDA), które z kolei wolniej odpowiadają na pobudliwość glutaminianu chroniąc w ten sposób wewnątrz komórki przed wzrostem poziomu wapnia i śmiercią neuronu [65,66]. Po niedokrwieniu ciężkim urazie mózgu ulegają uszkodzeniu błony komórkowe i wzrasta przepuszczalność komórek śródbłonna, która prowadzi do zaniku bariery krew-mózg na kilku poziomach [67,68]. W rezultacie dochodzi do powstania obrzęku mózgu i nadciśnienia śródczaszkowego [69]. Hipotermia zmniejsza cytotoksyczny obrzęk mózgu i uszkodzenie śródbłonkowego układu naczyniowego.

Niektórzy badacze twierdzą [70,71], że aktualnie hipotermia jest najbardziej skuteczną metodą zapobiegającą nadciśnieniu śródczaszkowemu po wystąpieniu ciężkiego urazu głowy, stąd proponowane są dalsze badania dotyczące możliwości równoczesnego zastosowania hipertermii i innych metod klinicznych. Zaobserwowano również u pacjentów z niedokrwieniem i ciężkim urazem głowy, wzrost poziomu tromboksanu A₂ (TXA₂), który bardzo niekorzystnie wpływa na naczynia krwionośne powodując ich zwężenie, nadmierne gromadzenie płytek krwi i w konsekwencji ich zamknięcie [72]. Zastosowanie hipotermii w tych sytuacjach klinicznych spowodowało zmniejszenie koncentracji TXA₂. Z kolei po wystąpieniu udaru hipotermia może powstrzymać padaczkowo-rodną aktywność mózgu i jest również skuteczna w napadach toniczno-klonicznych uogólnionych [73].

2. Założenia i cel pracy

Cel pracy:

- porównanie in vitro wpływu temperatury, wilgotności i częstotliwości pola elektrycznego na właściwości dielektryczne rogówki szczura z grupy kontrolnej i poddanej hipotermii,
- analiza wpływu hipotermii na mechanizm polaryzacji i przewodnictwa elektrycznego rogówki w odniesieniu do struktury molekularnej układu *nabłonek - istoty właściwa – śródbłonek – woda*,
- ocena wpływu wody luźno związanej i związanej na całkowite przewodnictwo elektryczne rogówki kontrolnej i badanej,
- ocena przydatności spektroskopii dielektrycznej do pomiaru przewodnictwa elektrycznego rogówki ludzkiej poddanej miejscowemu znieczuleniu in vivo przed i po zastosowaniu fotoablacji laserowej.

Realizacja powyższego celu pracy wymagała następujących założeń:

- szczury z grupy kontrolnej i badanej posiadały podobną masę ciała,
- szczury poddane hipotermii po zakończonym czasie jej trwania były natychmiast skrwawiane,
- przed wykonaniem badań dielektrycznych rogówki pobrane od szczurów z grupy normotermicznej i hipotermicznej były umieszczone w pojemnikach o tej samej temperaturze i wilgotności otoczenia,
- uwalnianie wody zabsorbowanej in vitro przez rogówki z obu grup szczurów odbywało się w tych samej komorze pomiarowej w temperaturze około 140°C
- czas trwania pomiarów dielektrycznych dla każdej rogówki z obu badanych grup był podobny.

3. Materiał i metoda

3.1. Charakterystyka badanych grup

Badania przeprowadzono na dwóch grupach szczurów szczepu Wistar, samcach o średniej masie ciała 250g. Obie grupy liczyły po 8 zwierząt. Kontrolowano rektalną temperaturę ciała szczurów przy użyciu termometru termistorowego umożliwiającego pomiar temperatury w zakresie od 0°C do 50°C. Parametry termiczne obu grup były następujące:

grupa kontrolna - normotermiczna o temperaturze rektalnej 37,0°C-37,5°C;

grupa badana - poddana hipotermii o temperaturze rektalnej $27,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Częstość pracy serca i oddechów zwierząt odczytywano przy użyciu analizatora TOT (tętno – oddech – temperatura) produkcji Poznańskich Zakładów Naprawczych Sprzętu Medycznego.

3.2. Przebieg hipotermii

Po uspianiu, zwierzęta umieszczano w pomieszczeniu o temperaturze 17.0 – 18.0°C i układano na tafli szkła. Na tafli oraz pod nią umieszczane były zamrożone wkłady do pojemników izotermicznych. Zwierzęta schładzano do osiągnięcia temperatury rektalnej $27.0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ (25 -30 min). Po osiągnięciu zadanej temperatury zwierzęta utrzymywano w stanie oziębienia przez 1 godzinę. Po zakończeniu doświadczenia szczury skrwawiano poprzez punkcję prawej komory serca. Podczas sekcji z każdej badanej grupy pobrano rogówki, które zabezpieczono w pojemnikach z 0.9%NaCl i dostarczona do Zakładu Bioniki i Bioimpedancji Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, w celu wykonania badań dielektrycznych.

3.2.1. Stosowane leki

Szczury usypiano podając domięśniowo ketaminę(40mg/kg masy ciała) i xylazynę(5mg/kg masy ciała) [74,75].W trakcie eksperymentu (w zależności od potrzeby) podawano ketaminę i xylazynę w ilości 1/3 podanej dawki leków.

Pod wpływem zastosowanej dawki leków szczury o średniej masie ciała 250g przesypiały 120-140 minut, a termogeneza drzeniowa była wyłączona.

3.2.2. Zagadnienia etyczne

Projekt badań uzyskał pozytywną opinię Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach (nr 67/2010).

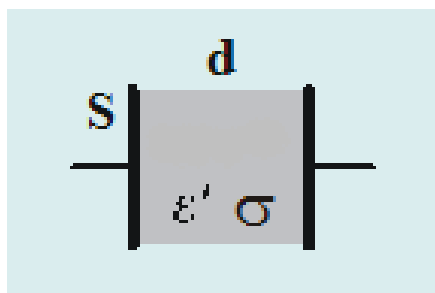
3.3. Przygotowanie rogówek do badań dielektrycznych

Przed pomiarami dielektrycznymi rogówki obu grup były płukane w wodzie destylowanej i następnie powietrznie suszone w temperaturze otoczenia o wilgotności RH 60-70%. Następnie na obie powierzchnie każdej rogówki nakładano elektrody z pasty srebrnej o powierzchni 3 x 4mm.

Badania wykonano w atmosferze powietrza dla dwóch stanów rogówek z obu grup szczurów. Pierwszy stan określony jako „uwodniony” dotyczył próbek, których wilgotność jest w równowadze z wilgotnością otaczającego powietrza o wartości ~70%RH. Drugi stan określony jako „suchy” dotyczył tych samych próbek pozbawionych wody zaabsorbowanej z otoczenia, tzw. wody luźno związanej, w wyniku wygrzewania ich w temperaturze 140°C około 1 godziny i natychmiastowym schłodzeniu do temperatury pokojowej. Doniesienia naukowe [76,77] dopuszczają taką metodę uwalniania wody luźno związanej z materiałów biologicznych w zakresie 120-150°C, a więc jeszcze w bezpiecznym obszarze temperaturowym, w którym nie zachodzi proces degradacji w tych materiałach.

3.4. Charakterystyka metody spektroskopii dielektrycznej

Pomiary in vitro właściwości dielektrycznych rogówki kontrolnej i poddanej hipotermii wykonano przy pomocy analizatora impedancji HIOKI 3522-50 LCR w zakresie częstotliwości pola elektrycznego 500Hz – 100kHz. W celu zbadania wpływu temperatury na te właściwości, rogówkę z nałożonymi elektrodami (rycina9.) do których podłączono analizator umieszczono w komorze pomiarowej. Temperatura wewnątrz tej komory wraz z badaną próbką była programowo ustawiana za pomocą regulatora (typu 650, UNIPAN, Poland) w zakresie 22-150°C.



Ryc.9. Rogówka z nałożonymi elektrodami stanowiącymi kondensator pomiarowy

Zmierzonymi parametrami elektrycznymi były rezystancja R i pojemność C określone wzorami:

$$R = d/\sigma \cdot S \quad (2)$$

$$C = \epsilon_0 \epsilon' S/d \quad (3)$$

gdzie, ϵ_0 - przenikalność elektryczna próżni,

d – grubość rogówki,

S – powierzchnia rogówki,

σ – przewodność właściwa (konduktywność),

ϵ' - przenikalność dielektryczna.

Z tych zależności wyraźnie wynika, iż rezystancja i pojemność rogówki zależą od jej rozmiarów geometrycznych ($d \cdot S$) oraz parametrów dielektrycznych σ i ϵ' , które charakteryzują odpowiednio zdolność rogówki do przewodzenia prądu elektrycznego i gromadzenia ładunku elektrycznego w jej elementach strukturalnych. Te dwa parametry dielektryczne zależą od częstotliwości pola elektrycznego doprowadzonego do rogówki i od temperatury otoczenia, natomiast nie zależą od rozmiarów geometrycznych tkanki.

W omawianej rozprawie przeprowadzono analizę porównawczą właściwości dielektrycznych rogówki kontrolnej z badaną w oparciu o parametry σ i ϵ' wyznaczone z zależności (1) i (2).

Wyniki badań (średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe) przedstawiono w postaci częstotliwościowych f i temperaturowych T zależności:

- ✓ przenikalności dielektrycznej ϵ' ,
- ✓ przewodności właściwej σ ,
- ✓ strat dielektrycznych ϵ'' ($\epsilon'' = \sigma/2\pi f\epsilon_0$),
- ✓ współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$.

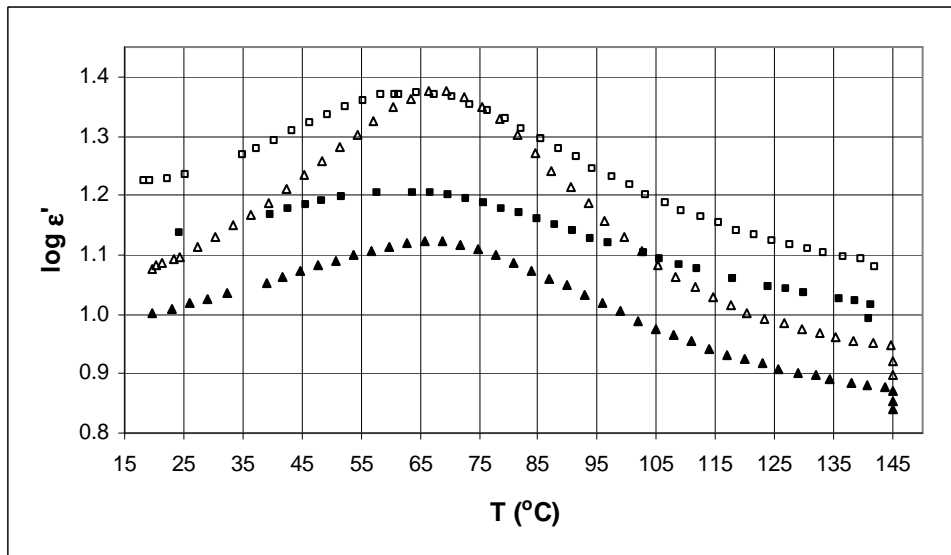
Analizę statystyczną zmierzonych parametrów przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 9.0.

4. Wyniki

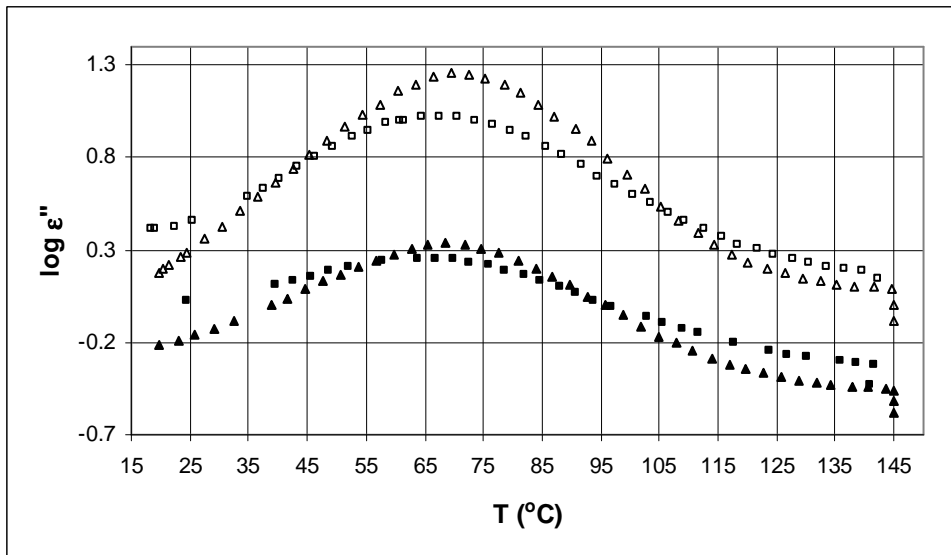
4.1. Porównanie uwodnionych rogówek grupy kontrolnej z badaną

4.1.1. Temperaturowe zależności parametrów dielektrycznych

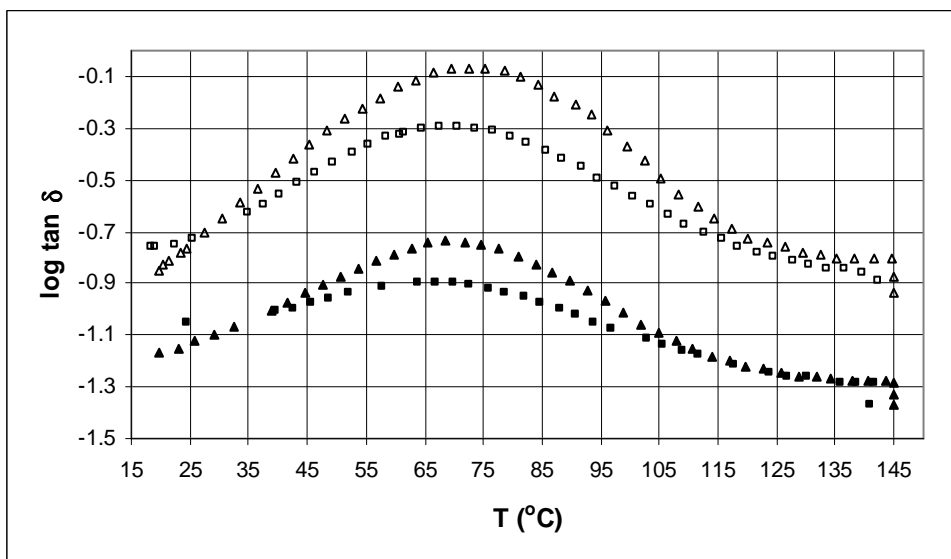
Wpływ wilgotności otoczenia na odpowiedzi temperaturowe właściwości dielektrycznych rogówek grupy kontrolnej i badanej dla wybranych częstotliwości pola elektrycznego 2kHz i 80kHz uwidocznił na rycinie 10 (a, b i c).



Ryc. 10a. Temperaturowe zależności logarytmu przenikalności dielektrycznej ϵ' rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej (\triangle :2kHz; \blacktriangle :80kHz) i badanej (\square :2kHz; \blacksquare :80kHz)



Ryc. 10b. Temperaturowe zależności logarytmu strat dielektrycznych ϵ'' rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej (\triangle :2kHz; \blacktriangle :80kHz) i badanej (\square :2kHz; \blacksquare : 80kHz)



Ryc. 10c. Temperaturowe zależności logarytmu współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$ rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej (\triangle :2kHz; \blacktriangle :80kHz) i badanej (\square :2kHz; \blacksquare : 80kHz)

Wspólną cechą przedstawionych krzywych dla obu grup rogówek są temperaturowe maksima przenikalności dielektrycznej ϵ' (rycina10a.), strat dielektrycznych ϵ'' (rycina10b.) i współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$ (rycina10c.) w okolicy 70°C dla każdej częstotliwości, które wskazują na obecność wody luźno związanej zaabsorbowanej in vitro przez te tkanki. Ponadto dla częstotliwości pola elektrycznego 80kHz amplituda pików dla obu grup jest wyraźnie mniejsza w porównaniu z tą dla częstotliwości 2kHz. Natomiast wpływ hipotermii na rogówkę jest widoczny przede wszystkim dla krzywych dotyczących przenikalności dielektrycznej (rycina10a.) i współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$ (rycina10c.) tej tkanki. Dla 80kHz wartości liczbowe ϵ' są większe dla rogówki badanej w porównaniu do rogówki kontrolnej w całym zakresie temperatury. Dla 2kHz krzywe ϵ' dla obu grup mają podobne wartości liczbowe w temperaturowym maksimum, natomiast poniżej i powyżej tej temperatury hipotermia również podwyższa przenikalność dielektryczną w tym materiale podobnie jak dla częstotliwości 80kHz. Natomiast współczynnik strat dielektrycznych $\tan\delta$ dla rogówki badanej ma niższe wartości liczbowe dla obu częstotliwości w obszarze temperaturowego maksimum w porównaniu z rogówką kontrolną. Dla temperatur powyżej i poniżej tego piku temperaturowego dla wszystkich uwidocznionych przebiegów $\tan\delta$ wartości liczbowe tego parametru nie ulegają wyraźnej zmianie pod wpływem hipotermii. Mniejszy wpływ hipotermii na rogówkę jest widoczny w przebiegu temperaturowym strat dielektrycznych na rycinie 10b. Wyraźne różnice między krzywymi ϵ'' badaną i kontrolną dotyczą temperaturowego maksimum w okolicy 70°C dla 2kHz, które posiada większe wartości liczbowe dla rogówki kontrolnej.

W tabeli 1. przedstawiono dla częstotliwości 2kHz i 80kHz w temperaturze 70°C wartości liczbowe współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$ rogowki uwodnionej kontrolnej i badanej, które odpowiadają temperaturowemu maksimum przenikalności dielektrycznej ϵ' (rycinie10a.) i strat dielektrycznych ϵ'' (rycinie10b.) tych tkanek.

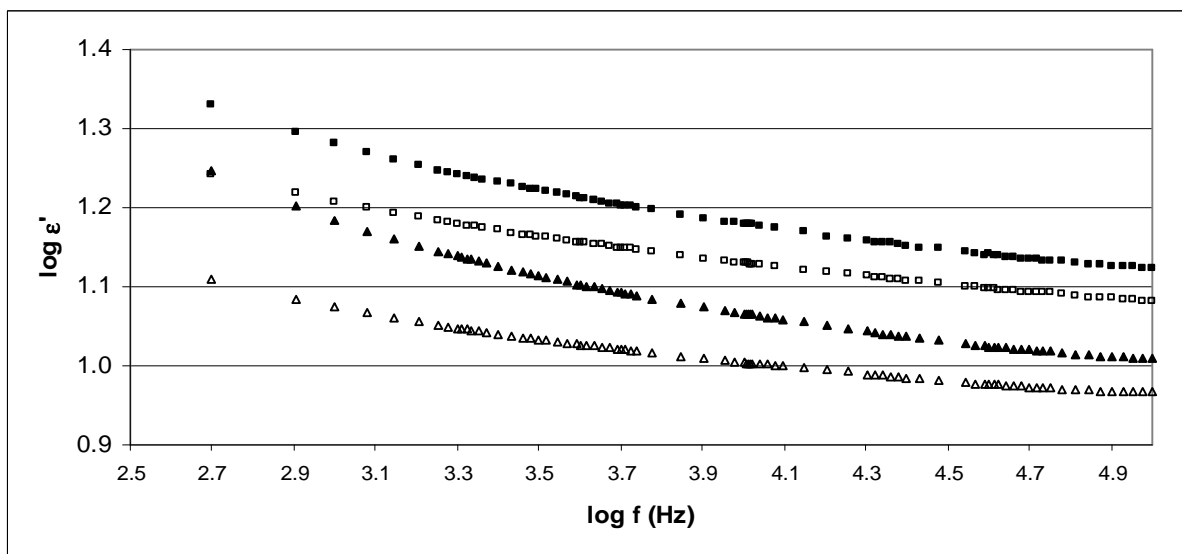
Tabela 1. Współczynnik strat dielektrycznych $\tan\delta$ rogowki uwodnionej z grupy kontrolnej i badanej dla 2kHz i 80kHz w temperaturze 70°C

grupy rogówek uwodnionych	współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$	
	częstotliwość f	częstotliwość f
	2kHz	80kHz
kontrolna	0.858±0.005	0.183±0.003
badana	0.512±0.004	0.127±0.003

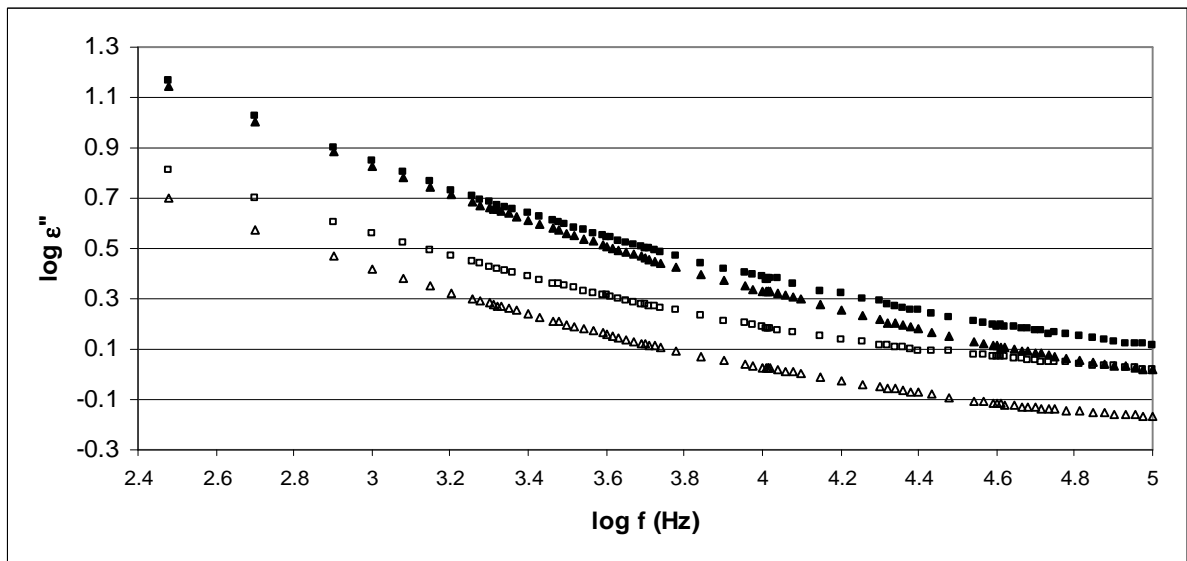
Uwidocznione dane dla grupy badanej w tabeli 1. ulegają zmniejszeniu 1.5 razy w porównaniu do grupy kontrolnej dla 2kHz i 80kHz w temperaturze odpowiadającej dekompozycji wody luźno związanej z rogowką.

4.1.2. Częstotliwościowe zależności parametrów dielektrycznych

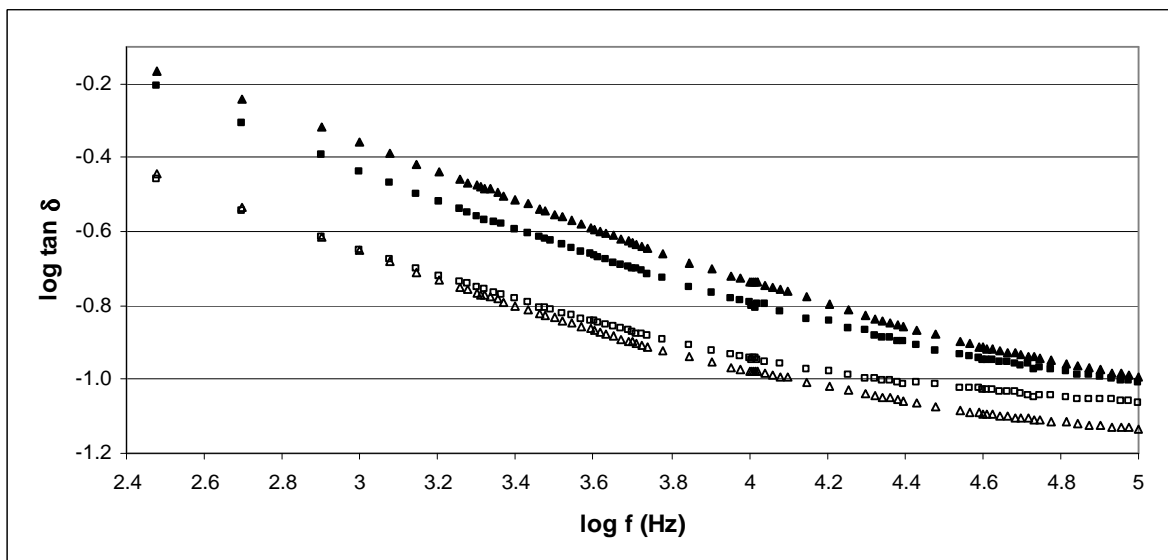
Na rycinie 11(a, b i c). przedstawiono zależności logarytmu ϵ' , ϵ'' i $\tan\delta$ od logarytmu częstotliwości f dla rogówek uwodnionych z grupy kontrolnej i badanej w temperaturze 25°C i 40°C.



Ryc. 11a. Zależność logarytmu przenikalności dielektrycznej ϵ' od logarytmu częstotliwości rogówki uwodnionej w temperaturze 25°C (\triangle : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)



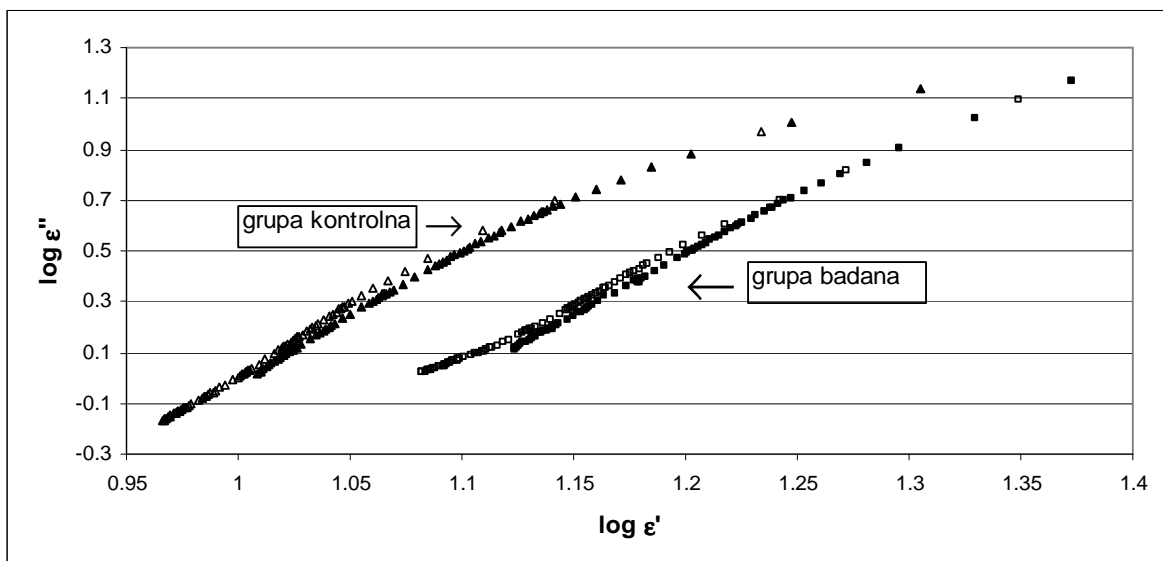
Ryc. 11b. Zależność logarytmu strat dielektrycznych ϵ'' od logarytmu częstotliwości f rogowki uwodnionej w temperaturze 25°C (Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)



Ryc. 11c. Zależność logarytmu współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$ od logarytmu częstotliwości f rogowki uwodnionej w temperaturze 25°C (Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)

Wspólną cechą wszystkich przebiegów na rycinie 11(a, b i c). jest zmniejszanie się wartości liczbowych ϵ' , ϵ'' i $\tan\delta$ ze wzrostem częstotliwości pola elektrycznego. Krzywe przenikalności dielektrycznej ϵ' (rycinie 11a.) dla grupy badanej w temperaturze 25°C i 40°C położone są powyżej odpowiednich krzywych dla grupy kontrolnej. Podobne zachowanie dla obu grup jest widoczne dla częstotliwościowych zależności ϵ'' w 25°C na rycinie 11b., z wyjątkiem przebiegów ϵ'' w 40°C poniżej 4kHz, które posiadają zbliżone wartości liczbowe tego parametru dla rogówki badanej i kontrolnej. Inny charakter krzywych widoczny jest dla parametru $\tan\delta$ na rycinie 11c., który w 25°C ulega wyraźnemu wzrostowi powyżej 10kHz dla rogówki poddanej hipotermii. Z kolei wzrost temperatury rogówki badanej (40°C) powoduje obniżenie $\tan\delta$ dla niskich częstotliwości w stosunku do rogówki kontrolnej.

Na rycinie 11d., przedstawiono dla porównania rogówkę kontrolną z badaną jako zależność strat dielektrycznych od przenikalności dielektrycznej w temperaturze 25°C i 40°C i w zakresie częstotliwości 500Hz do 100kHz. Na tej rycinie dla każdego z tych przebiegów najmniejszą i największą wartość liczbową zmierzono odpowiednio dla 100kHz i 500Hz.



Ryc. 11d. Zależność logarytmu strat dielektrycznych ϵ'' od logarytmu przenikalności dielektrycznej ϵ' rogówki uwodnionej w temperaturze 25°C(Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C(\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)

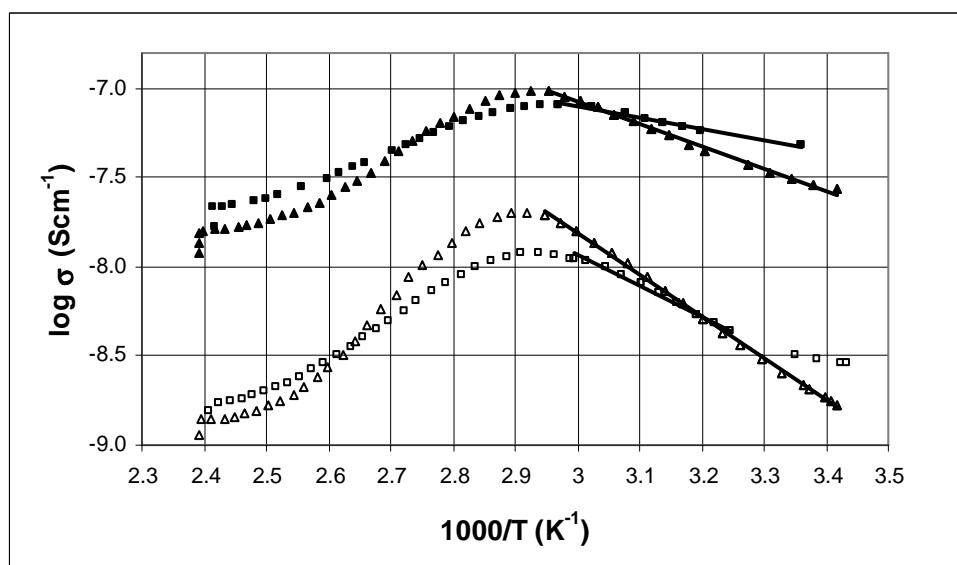
W tabeli 2. przedstawiono dla 2kHz i 80kHz i temperatur 25°C i 40°C wartości liczbowe współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$ rogówki uwodnionej kontrolnej i badanej odpowiadające parametrom dielektrycznym ϵ' i ϵ'' na rycinie 11 (a-b).

Tabela 2. Wartości liczbowe $\tan\delta$ rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej i badanej w temperaturze 25°C i 40°C i dla częstotliwości 2kHz i 80kHz

grupy rogówek uwodnionych	temperatura T	współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$	
		częstotliwość f	częstotliwość f
		2kHz	80kHz
kontrolna	25°C	0.172 ±0.004	0.075 ±0.005
	40°C	0.335 ±0.005	0.106 ± 0.005
badana	25°C	0.178 ±0.005	0.088 ±0.005
	40°C	0.277 ±0.005	0.101 ± 0.005

4.1.3. Energia aktywacji przewodności właściwej

Energię aktywacji ΔH przewodności właściwej σ dla obu grup rogówek, która jest odpowiedzialna za uwalnianie wody z tych tkanek, wyznaczono na podstawie zależności uwidocznionych na rycinie 12.



Ryc. 12. Zależność logarytmu przewodności właściwej σ od odwrotności temperatury dla rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej (Δ : 2kHz; \blacktriangle : 80kHz) i badanej (\square : 2kHz; \blacksquare : 80kHz)

Krzywe dla obu grup rogówek odpowiadające częstotliwości 2kHz mają mniejszą przewodność właściwą σ w każdej temperaturze w porównaniu do odpowiednich wartości tego parametru dla 80kHz. Przedstawione na rycinie 3. zależności $\log \sigma$ od odwrotności temperatury T umożliwiają wyznaczenie ΔH w zakresie liniowego odcinka tych krzywych, tj. od 20°C do 70°C (3.41K^{-1} do 2.92K^{-1}). Hipotermia wpływa na zmniejszenie kąta nachylenia tych prostych dla 2kHz i 80kHz w porównaniu do rogówek w stanie normotermii.

Liniowy przebieg tych krzywych jest opisany zależnością Arrheniusa:

$$\log \sigma = \log \sigma_0 - \Delta H/kT \quad (4)$$

gdzie: k – stała Boltzmana, T – temperatura i ΔH – energia aktywacji.

Na podstawie powyższej zależności obliczono energię aktywacji ΔH przewodności właściwej obu grup rogówek dla 2kHz i 80kHz, których wartości liczbowe zamieszczono w tabeli 3. Dane w tabeli pokazują, iż dla grupy badanej ΔH przewodności właściwej rogówki jest mniejsza o 60% i 48% odpowiednio dla 2kHz i 80kHz, w porównaniu do grupy kontrolnej.

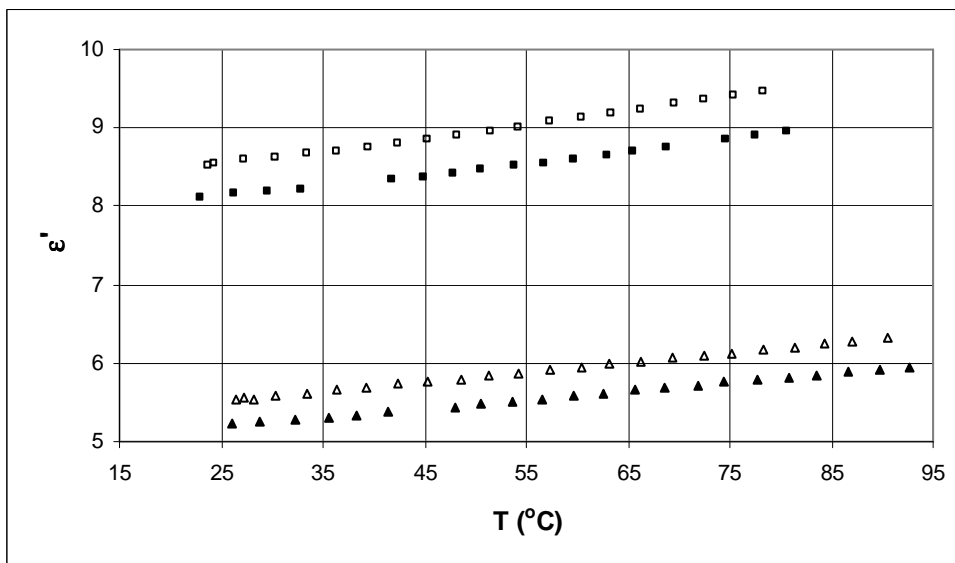
Tabela 3. Energia aktywacji ΔH przewodności właściwej rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej i badanej dla częstotliwości 2kHz i 80kHz

grupy rogówek uwodnionych	ΔH (kJ/mol)	
	częstotliwość f 2kHz	częstotliwość f 80kHz
kontrolna	44 ± 3	23 ± 3
badana	27 ± 3	11 ± 2

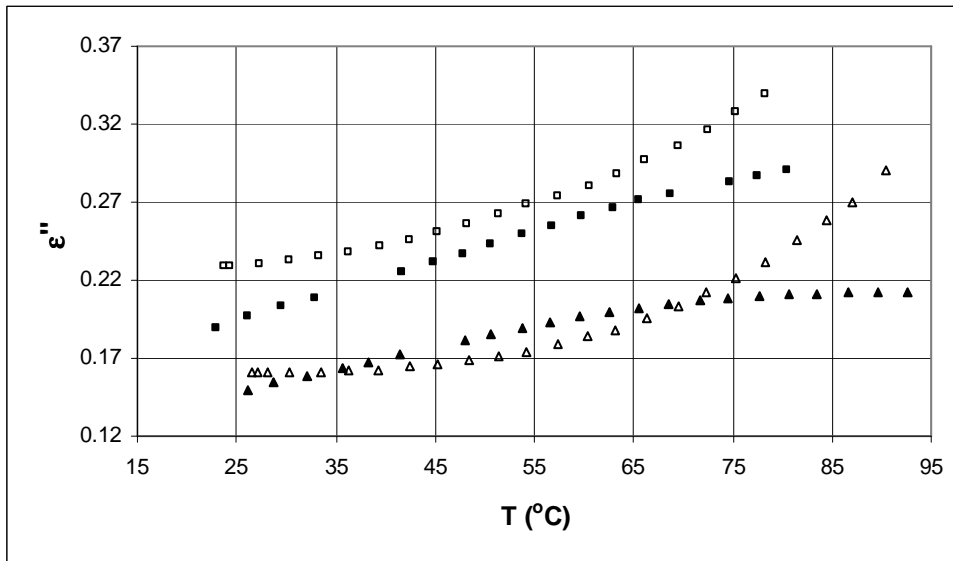
4.2. Porównanie suchych rogówek grupy kontrolnej z badaną

4.2.1. Temperaturowe zależności parametrów dielektrycznych

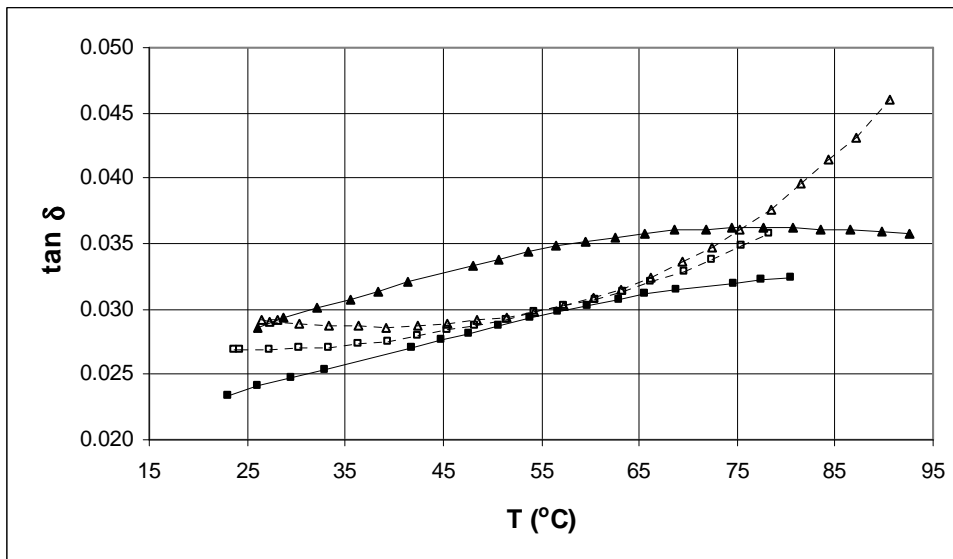
Rycina 13(a, b i c). przedstawia temperaturowe zależności przenikalności dielektrycznej ϵ' i strat dielektrycznych ϵ'' rogówki suchej dla grupy kontrolnej i badanej wykonane dla wybranych częstotliwości pola elektrycznego 2kHz i 80kHz.



Ryc. 13a. Temperaturowe zależności przenikalności dielektrycznej ϵ' rogówki suchej z grupy kontrolnej (\triangle :2kHz; \blacktriangle :80kHz) i badanej (\square :2kHz; \blacksquare : 80kHz)



Ryc. 13b. Temperaturowe zależności strat dielektrycznych ϵ'' rogówki suchej z grupy kontrolnej (Δ :2kHz; \blacktriangle :80kHz) i badanej (\square :2kHz; \blacksquare : 80kHz)



Ryc. 13c. Temperaturowe zależności współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$ rogówki suchej z grupy kontrolnej (Δ :2kHz; \blacktriangle :80kHz) i badanej (\square :2kHz; \blacksquare : 80kHz)

Uwidocznione krzywe dla obu grup rogówek nie posiadają temperaturowych maksimum ϵ' , ϵ'' i $\tan \delta$ w okolicy 70°C dla każdej częstotliwości, które występowały dla uwodnionego stanu tych rogówek na rycinie 10(a, b i c). Brak wody luźno związanej w suchych rogówkach charakteryzuje się powolnym ciągłym wzrostem ϵ' i ϵ'' dla rosnących temperatur w tych tkankach. Hipotermia powoduje ponad 60% wzrost przenikalności dielektrycznej i strat dielektrycznych w rogówce w porównaniu z normotermią dla tej samej temperatury i częstotliwości. Natomiast wyraźne obniżenie współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$ rogówki pod wpływem hipotermii występuje dla 80kHz.

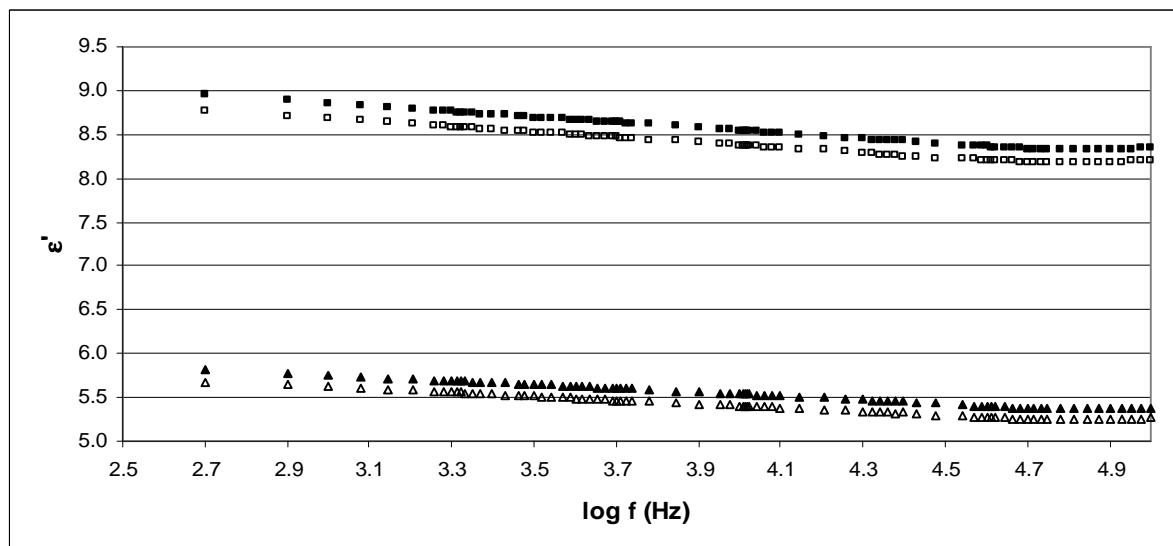
W tabeli 4. przedstawiono dla 2kHz i 80kHz w 70°C wartości liczbowe współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$ rogówki kontrolnej i badanej w stanie suchym, które odpowiadają wartościom liczbowym przenikalności dielektrycznej ϵ' (rycina 13a.) i strat dielektrycznych ϵ'' (rycina 13b.) tych tkanek.

Tabela 4. Współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$ rogówki suchej z grupy kontrolnej i badanej dla 2kHz i 80kHz w temperaturze 70°C

grupy rogówek suchych	współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$	
	częstotliwość f	częstotliwość f
	2kHz	80kHz
kontrolna	0.033±0.001	0.036±0.001
badana	0.033±0.001	0.031±0.001

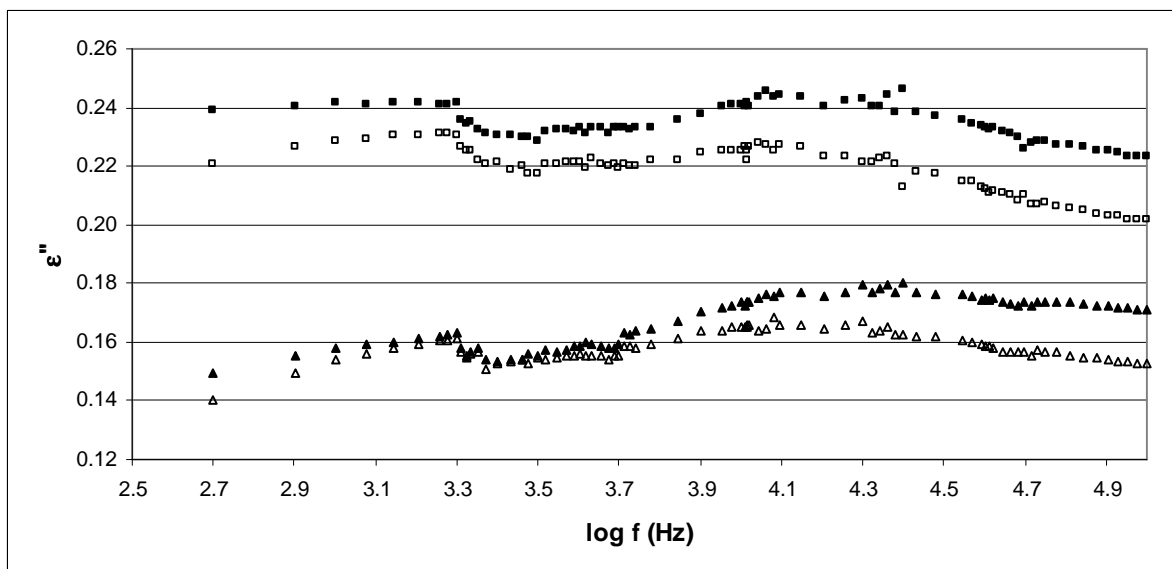
4.2.2. Częstotliwościowe zależności parametrów dielektrycznych

Na rycinie 14(a, b i c). przedstawiono częstotliwościowe zależności przenikalności dielektrycznej ϵ' i strat dielektrycznych ϵ'' rogówki kontrolnej i badanej stanie suchym dla temperatur 25°C i 40°C.

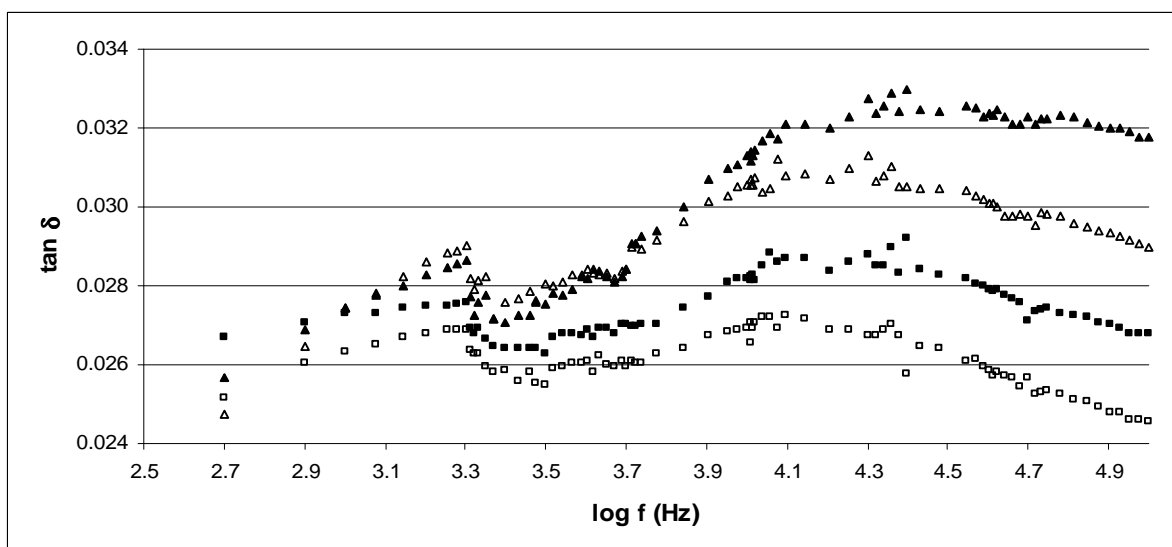


Ryc. 14a. Zależność przenikalności dielektrycznej ϵ' od logarytmu częstotliwości rogówki suchej w temperaturze 25°C(Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C(\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)

Wspólną cechą krzywych ϵ' (rycina 14a.) dla obu grup rogówek jest zmniejszenie oraz wzrost wartości tego parametru odpowiednio ze wzrostem częstotliwości oraz temperatury. Natomiast z uwidocznionych przebiegów wynika, że hipotermia wpływa na ponad 60% wzrost wartości liczbowej ϵ' rogówki w porównaniu do jej stanu w normotermii.



Ryc. 14b. Zależność strat dielektrycznych ϵ'' od logarytmu częstotliwości rogowki suchej w temperaturze 25°C(Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C(\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)



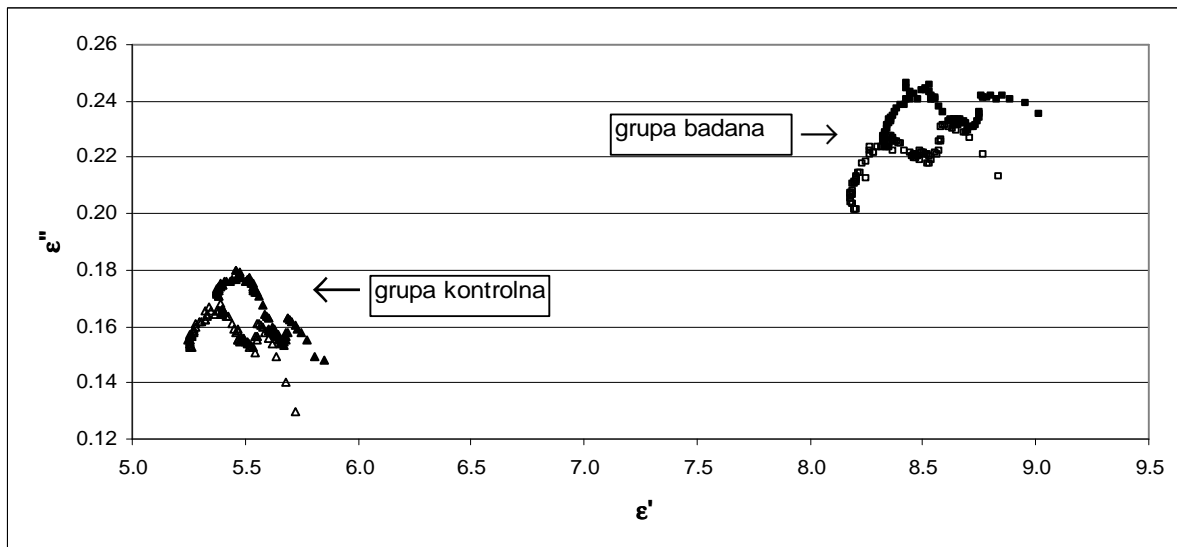
Ryc. 14c. Zależność współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$ od logarytmu częstotliwości rogowki suchej w temperaturze 25°C(Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C(\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)

Krzywe ϵ'' (ryc.14b.) i $\tan \delta$ (ryc.14c.) dla obu grup rogówek posiadają wyraźne maksima niskoczęstotliwościowe w okolicy 2kHz oraz szerokie wysokoczęstotliwościowe w zakresie 12 - 18kHz. Wzrost temperatury w rogówce wpływa na przesunięcie tego drugiego piku ale tylko dla rogówki kontrolnej w kierunku wyższych częstotliwości bez zmiany położenia tego pierwszego (2kHz).

Przebiegi ϵ'' rogówek obciążonych hipotermią mają większe straty dielektryczne dla każdej częstotliwości i temperatury w porównaniu z rogówkami kontrolnymi.

Natomiast krzywe $\tan \delta$ dla rogówki z hipotermią leżą poniżej odpowiednich krzywych dla rogówki kontrolnej.

Na rycinie 14d. efekt oddziaływania hipotermii na właściwości dielektrycznej rogówki uwidocznił się jako przesunięcie strat dielektrycznych ϵ'' i przenikalności dielektrycznej ϵ' w kierunku wyższych wartości w porównaniu do stanu normotermii tej tkanki.



Ryc. 14d. Zależność strat dielektrycznych ϵ'' od przenikalności dielektrycznej ϵ' rogówki suchej w temperaturze 25°C (\triangle : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)

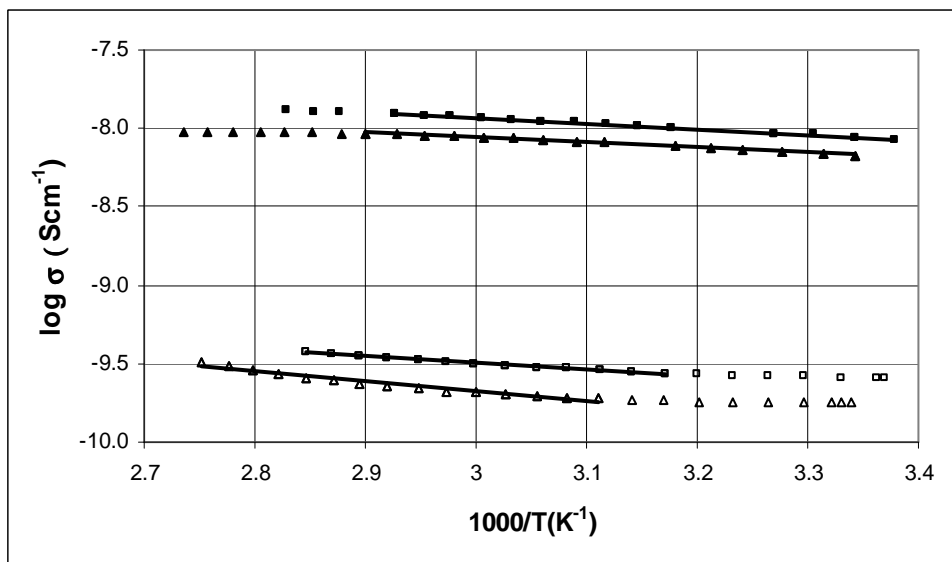
W Tabeli 5. przedstawiono dla 2kHz i 80kHz i temperatur 25°C i 40°C wartości liczbowe współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$ rogówki suchej kontrolnej i badanej odpowiadające parametrom dielektrycznym ϵ' i ϵ'' na rycinie 14 (a-b).

Tabela 5. Wartości liczbowe $\tan\delta$ rogówki suchej z grupy kontrolnej i badanej w temperaturze 25°C i 40°C i dla częstotliwości 2kHz i 80kHz

grupy rogówek suchych	temperatura T	współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$	
		częstotliwość f 2kHz	częstotliwość f 80kHz
kontrolna	25°C	0.0290 ±0.0002	0.0290 ±0.0002
	40°C	0.0290 ±0.0002	0.0320 ±0.0002
badana	25°C	0.0275 ±0.0002	0.0245 ±0.0002
	40°C	0.0267 ±0.0002	0.0270 ± 0.0002

4.2.3. Energia aktywacji przewodności właściwej

Na rycinie 15. przedstawiono zależność logarytmiczną σ od odwrotności temperatury T dla obu grup rogówek w stanie suchym.



Ryc. 15. Zależność logarytmu przewodności właściwej σ od odwrotności temperatury dla rogówki suchej z grupy kontrolnej (\triangle :2kHz; \blacktriangle :80kHz) i badanej (\square :2kHz; \blacksquare : 80kHz)

Dla uwidocznionych przebiegów obu grup odpowiadających ich liniowym odcinkom w przedziałach odwrotności temperatury $3.17\text{K}^{-1} - 2.75\text{K}^{-1}$ ($43 - 91^\circ\text{C}$) dla 2kHz i $3.37\text{K}^{-1} - 2.9\text{K}^{-1}$ ($27 - 61^\circ\text{C}$) dla 80kHz, wyznaczono energie aktywacji ΔH przewodności właściwej σ . W tabeli 6. przedstawiono wartości liczbowe tej energii w celu porównania rogówki badanej z kontrolną.

Tabela 6. Energia aktywacji ΔH przewodności właściwej σ rogówki suchej z grupy kontrolnej i badanej dla 2kHz i 80kHz

grupy rogówek	ΔH (kJ/mol)	
	częstotliwość f	częstotliwość f
suchych	2kHz	80kHz
kontrolna	12.0 ± 0.5	6.3 ± 0.5
badana	8.0 ± 0.5	6.9 ± 0.5

Z porównania wartości liczbowych ΔH grupy kontrolnej z badaną przedstawionych w tabeli 6. wynika, że wzrost częstotliwości pola elektrycznego przyłożonego do rogówek ujawnia mniejszą różnicę w energii aktywacji przewodności właściwej w stanie normotermii i hipotermii tych tkanek.

5. Omówienie wyników

Do zwierząt najczęściej wykorzystywanych jako modele symulujące ludzkie tkanki w stanach ich normalnego i zaburzonego funkcjonowania należą szczury. Mała masa i względnie duża powierzchnia ciała szczura decydują o szybkiej przemianie materii, której towarzyszy transport energii cieplnej wewnątrz organizmu oraz jej wymiana z otoczeniem zewnętrznym, umożliwiając dzięki temu skuteczną ocenę efektów biologicznych, które ujawniają się w krótkim czasie po wywołaniu u tych organizmów hipotermii [10].

W celu poznania korzystnych i szkodliwych efektów oddziaływania hipotermii na prawidłową fizjologię szczura zastosowano między innymi takie metody badawcze jak immuno-histo-chemiczne [78-82], mechaniczne [83-85], optyczne [86,87] i elektryczne [88-92]. Badania te pozwoliły oszacować wynikającą z obniżenia temperatury ciała szczura zmianę wartości liczbowych wielu biochemicznych i fizjologicznych parametrów do których należą: koncentracja jonów wewnątrz- i zewnątrz komórkowa, ciśnienie krwi, objętość oddechu, temperatura kory i sztywność tkanki.

Ze względu na kliniczne zastosowania hipotermii ogólnej i lokalnej u pacjentów w takich stanach chorobowych jak zatrzymanie akcji serca [51,52], ciężki uraz głowy [54], uszkodzenie rdzenia kręgowego [17,55], udar [57], tętniaki mózgowie i aorty brzuszno-piersiowej [93], w poznaniu efektów oddziaływania hipotermii na te organizmy bardzo pomocne okazały się wyniki badań wykonane na modelu szczura symulującym powyższe stany chorobowe [16,17,23,52-54,55,56]. Przykładowo, rezultaty badań szczura z zatrzymanym krążeniem [23,52] wyraźnie wskazują na neuroprotektoryjne działanie hipotermii poprzez redukcję metabolizmu mózgowego i zużycia tlenu, co przyczynia się do zmniejszenia obrzęku mózgowego i ciśnienia śródczaszkowego. Ponadto te badania pokazują, że hipotermia działa stabilizująco na lipoproteiny błonowe zapewniając w ten sposób równowagę bariery krew-mózg [54,56], zmniejsza reaktywność wolnych rodników, hamuje uwalnianie komórek nacieku zapalnego i cytokin, jak również redukuje destrukcyjne kaskady enzymatyczne powodujące wtórne uszkodzenie tkanek po zatrzymaniu krążenia. Inny przykład wskazujący na neuroochronne działanie hipotermii dotyczy jej zastosowania u szczurów z uszkodzonym rdzeniem kręgowym [16,17,23,53,54]. Z tych badań wynika, że obniżenie temperatury całego organizmu szczura w wyniku zastosowania hipotermii ogólnoustrojowej wpłynęło na zmniejszony przepływ krwi w rdzeniu i mniejsze obrzęki w miejscach uszkodzenia narządów. Ponadto, znaczna redukcja aktywności krwinek białych i

reakcji odpornościowych spowodowały osłabiony napływ krwinek białych obojętnochłonnych do uszkodzonego rdzenia. Hipotermia u tych zwierząt obniżyła poziom neurotoksycznego glutaminianu, którego nadpobudliwe działanie występuje nawet po przywróceniu normalnego przepływu krwi w tych organizmach.

Z aktualnego piśmiennictwa naukowego wynika, że nadal prowadzone są intensywne badania na szczurach [23,94-97] dotyczące dokładnego poznania mechanizmów neuroprotekcijnego działania hipotermii, które powinny jednoznacznie dopomóc klinicytom we właściwym doborze pacjentów do terapii niskotemperaturowej, w zależności od rozpoznanej choroby i jej stopnia zaawansowania. Z publikacji tych wynika również, że nadal nie jest precyzyjnie określone tzw. okno czasowe rozpoczęcia i kontynuowania chłodzenia pacjenta oraz dalszego udoskonalenia wymagają metody chłodzenia ze względu na inny sposób ich zastosowania w hipotermii ogólnej i lokalnej. Dodatkowa trudność w doborze odpowiednich technik chłodzenia lokalnego u ludzi polega na tym, że nie można wykorzystać szczura jako modelowego materiału biologicznego do sprawdzenia działania tych metod ze względu na jego małe rozmiary. Ten fakt znajduje potwierdzenie w zastosowanej hipotermii lokalnej w mózgu szczura [52], gdzie elementem chłodzącym był implantowany zwój umieszczony między mięśniem skroniowym i czaszką. Okazało się jednak, że ta technika chłodzenia zastosowana w mózgu człowieka była nie skuteczna ze względu na większą grubość czaszki i jej duże pole powierzchni w porównaniu z tymi parametrami u szczura. Stąd istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań na zwierzętach w celu opracowania odpowiednich metod lokalnego chłodzenia narządów w konkretnych zastosowaniach klinicznych [17,23,39,54], gdzie wymagane jest zabezpieczenie zdrowych organów przed skutkami ubocznymi hipotermii, tak jak to można zaobserwować w zastosowaniu hipotermii ogólnej. Ponadto, ze względu na zastosowania kliniczne hipotermii celowe jest prowadzenie dalszych badań na szczurach umożliwiające poznanie korzystnych efektów skojarzonego działania tej metody z lekami neuroprotekcijnymi jak np. koenzymem Q10, czy terapią genową [98,99]. Potwierdzeniem takiego postępowania jest publikacja [100] z której wynika, że dla modelu szczura z zatrzymanym krążeniem po zastosowaniu adenozyliny w połączeniu z hipotermią nastąpił wzrost mózgowego przepływu krwi oraz zmniejszenie jego obrzęku, jako rezultat nie tylko zastosowania hipotermii, ale również poprawy mikrokrążenia przez rozszerzenie naczyń i przeciwplytkowe działanie adenozyliny.

Do badania właściwości fizyko-chemicznych rogówki jak również w zastosowaniach klinicznych do oceny stanu fizjologicznego tej tkanki najczęściej stosuje się metody optyczne [101-106], mechaniczne [83-85,107-111] i elektryczne [112-122].

Morfologię i stan fizjologiczny rogówki można oszacować *in vitro* za pomocą fotometru fluorescencyjnego [103]. Z kolei mikroskop lustrzany i konfokalny [101,103] oraz optyczna tomografia koherentna [106] umożliwiają bezpośrednie badanie *in vivo* warstw strukturalnych rogówki oraz obliczenie na tej podstawie takich morfologicznych parametrów jak gęstość, wielkość (polymegethism) i kształt (pleomorphism) komórek. Znajomość tych parametrów jest ważna, gdyż ulegają one zmianie nie tylko wraz z wiekiem pacjenta, ale również po zastosowaniu soczewek kontaktowych czy po operacji zaćmy. Ponadto, ze względu na zastosowanie w chirurgii keratorefrakcyjnej nowych technik jak np. pierścieni wewnątrz istoty właściwej, który może spowodować uszkodzenie komórek śródbłonna, celowe jest zbadanie gęstości tych komórek w obszarze przyśrodkowym i obwodowym rogówki za pomocą mikroskopu lustrzanego [101]. Zastosowanie metod optycznych jest również przydatne do oceny stanu fizjologicznego rogówki dawcy przed jej transplantacją oraz w poznaniu neurochemicznych mechanizmów rogówki odpowiedzialnych za gojenie się rany po uszkodzeniu operacyjnym lub zmianach chorobowych tej tkanki [102]. Obrazowanie mikroskopowe dostarczają również informacji o zmianach anizotropowych fibryli kolagenowych rogówki ludzkiej i szczura spowodowanych przez cukrzycę [104]. Z badań właściwości polaryzacyjnych i optycznej anizotropii rogówki myszy [105] wynika, że nieenzymatyczna glikacja powoduje agregację makrocząsteczki kolagenu, co uwidacznia się w obrazie mikroskopowym jako redukcja średnicy fibryli kolagenowych prowadząca do zmętnienia rogówki.

Prawidłowy mechanizm funkcji optycznej rogówki polegający na załamaniu i transmisji światła do siatkówki oka, zależy również od jej właściwości mechanicznych. Na urazy mechaniczne narażony jest przede wszystkim nabłonek rogówki, którego powierzchnia stanowi barierę oddzielającą wewnątrz tej tkanki od otoczenia zewnętrznego. Badania *in vitro* i *in vivo* właściwości mechanicznych rogówki dotyczących jej sztywności i lepko-sprężystości są ważne, gdyż dostarczają informacji o efektach oddziaływania na tą tkankę czynników które ją deformują, takich jak ciśnienie śródgałkowe i zmienne ciśnienie atmosferyczne [83], cukrzyca [84,85], chirurgia refrakcyjna [107-111] czy elektrody pomiarowe nałożone na rogówkę podczas badania za pomocą elektroretinografu [112].

Piśmiennictwo naukowe dotyczące badania właściwości elektrycznych rogówki szczura [115-117,120,121] dostarcza informacji o elementach strukturalnych tej tkanki odpowiedzialnych za przewodzenie prądu elektrycznego. Uzyskana na podstawie tych badań wiedza o mechanizmach przewodnictwa i polaryzacji dielektrycznej w rogówce ma zastosowanie w projektowaniu i konstrukcji nowoczesnej aparatury medycznej oraz w interpretacji aktualnych wyników badań rogówki ludzkiej za pomocą takich metod elektrodiagnostycznych jak keratoplastyka przewodząca [114,118], elektroretinografia [112], elektrookulografia [113].

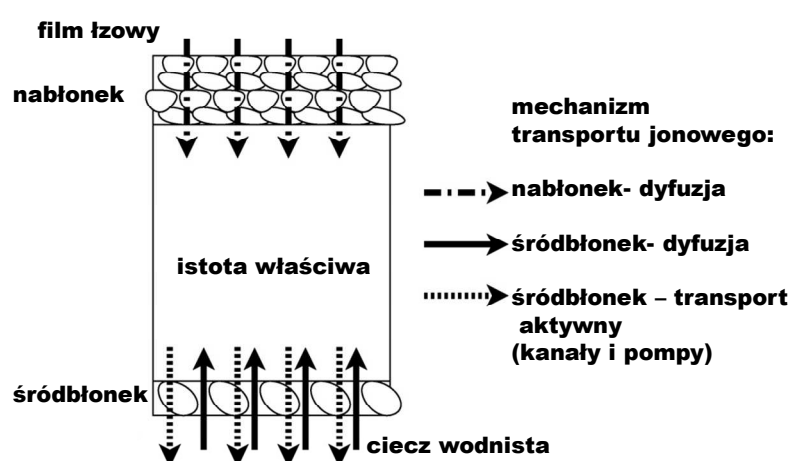
Aktualnie w różnych ośrodkach naukowych i klinicznych prowadzone są badania mechanizmów elektrycznych rogówki za pomocą różnych technik pomiarowych. Elektrofizjologiczne badania rogówki za pomocą techniki „patch-clamp” [122] pozwalają zrozumieć funkcję kanałów jonowych śródbłonka w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Z kolei zastosowanie sond wibracyjnych i platynowych matryc mikroelektrodowych [117] w śródbłonku umożliwia poznanie endogennych mechanizmów elektrycznych gojenia się ran. Za pomocą pomiaru *in vitro* rezystancji elektrycznej śródbłonka czyli jej biernych właściwości elektrycznych [116] oszacowano przepuszczalność jonową rogówki. Inni badacze [119] zastosowali metodę impedancji elektrycznej w celu poznania mechanizmów transportu jonowego w rogówce. Na podstawie tych badań wykazano nieinwazyjność metod elektrycznych w zastosowaniach klinicznych do diagnozowania dysfunkcji rogówki.

Dostępna literatura naukowa dotycząca zastosowania różnych metod elektrycznych w badaniach rogówki ludzkiej i zwierzęcej nie dostarcza informacji o wpływie szerokiego zakresu temperatur otoczenia rogówki na jej parametry dielektryczne takie jak konduktywność czy przenikalność dielektryczna. W omawianej rozprawie zaprezentowano wyniki badań tych właściwości dla rogówki szczura z uwzględnieniem oddziaływania na tą tkankę temperatur poniżej i powyżej ich fizjologicznego zakresu biorąc pod uwagę zastosowanie kliniczne tych przedziałów temperatur odpowiednio w hipotermii lokalnej i ogólnej [123,124] i keratoplastyce przewodzącej [118].

Przedstawione na rycinie 10(a, b i c) krzywe umożliwiają ocenę wpływu temperatury i wilgotności otoczenia na właściwości dielektryczne rogówki in vitro, pobranej od zwierząt z grupy kontrolnej i poddanej hipotermii. Temperaturowe zależności przenikalność dielektrycznej ϵ' , strat dielektrycznych ϵ'' i współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$ charakteryzują zdolność tej tkanki do gromadzenia ładunku elektrycznego i jego transportu w postaci prądu elektrycznego. Te dwa mechanizmy określane jako polaryzacja i przewodnictwo dielektryczne są odpowiedzią rogówki na doprowadzone do niej zewnętrzne promieniowanie elektromagnetyczne.

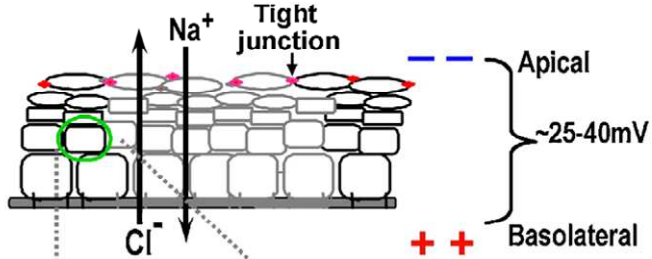
Podobnie jak w przypadku innych tkanek o niejednorodnej budowie strukturalnej [125], rogówka w omawianej rozprawie rozpatrywana jest jako układ biologiczny wielofazowy, który zapewnia narządowi wzroku załamanie światła dzięki temu, że rogówka jest optycznie przezroczysta i posiada gładką zakrzywioną powierzchnię. Jednakże biofizyczny mechanizm funkcjonowania rogówki dotyczy również jej właściwości dielektrycznych za które odpowiedzialny jest układ *nabłonek - istoty właściwej - śródbłonek - wody* (epithelium-stromal-endothelium-water) [81,117,119-121].

W omawianej rozprawie do interpretacji otrzymanych wyników właściwości dielektrycznych rogówki wykorzystano aktualnie dostępne w piśmiennictwie naukowym modele transportu jonowego w całej rogówce [119], nabłonku [117] i śródbłonku [121], uwidocznione odpowiednio na rycinach 16, 17 i 18.

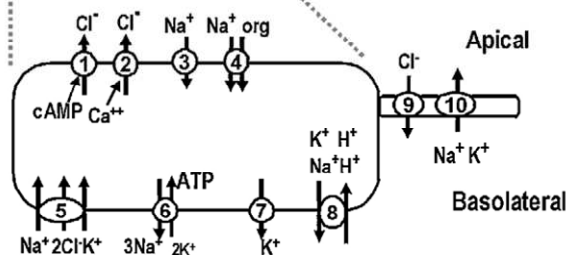


Ryc.16. Mechanizm transportu jonowego w rogówce [119]

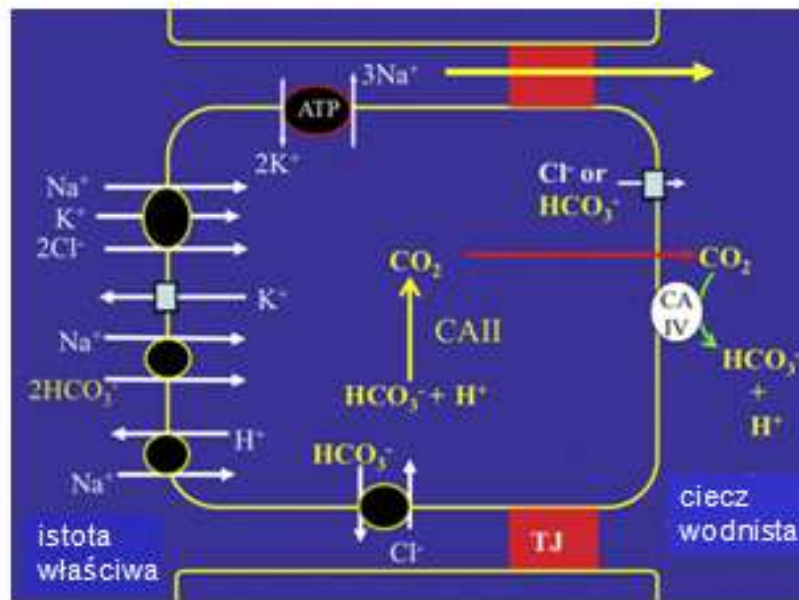
(A) Cornea epithelium and the electric potential difference



(B) Transportation of ions in an epithelial cell



Ryc. 17. Różnica potencjałów elektrycznych między podstawą i wierzchołkiem nabłonka (A).
Transport jonowy w komórce nabłonka (B) [117]



Ryc.18. Kanały i pompy jonowe w śródbłonku [121]

Z przedstawionych na rycinach 16-18. modeli przewodnictwa jonowego rogówki wynika, że każda z trzech faz ze względu na rodzaj i gęstość rozmieszczenia elementów strukturalnych ma niezależny wpływ na transport nośników ładunku elektrycznego w tej tkance. Nabłonek (~50 μ m) charakteryzuje się gęstym upakowaniem komórek, względnym niedostatkiem organelli i brakiem naczyń krwionośnych. Te cechy wpływają na redukcję rozpraszania światła a tym samym sprzyjają przezroczystości nabłonka. Z kolei, małe rozpraszanie światła w istocie właściwej rogówki zapewniają regularne przerwy między fibrylami kolagenowymi, które posiadają jednakową średnicę (~30nm) [120]. Regularne przerwy między fibrylami kontrolowane są przez hydrofilowe glikozaminoglikany (GAG) substancji podstawowej, które posiadając dużą ilość ładunku ujemnego przyłączają cząsteczki wody, której nadmiar może prowadzić do obrzęku istoty właściwej a więc utraty przez nią przezroczystości. Gdy uwodnienie istoty właściwej wynosi ~3.5mgH₂O/mg suchej tkanki lub mniej wówczas ta faza rogówki jest względnie przezroczysta. Zawartości wody w istocie właściwej ma wpływ na takie właściwości optyczne jak aberracja rogówki i wielkość rozpraszanego światła. Jeżeli uwodnienie istoty właściwej rośnie to współczynnik załamania światła ulega redukcji i odwrotnie [126], co ma istotne znaczenie w prawidłowym przebiegu fotoablacji laserowej [127]. Stąd zalecana jest kontrola zawartości wody w rogówce przed i po zabiegu chirurgii refrakcyjnej z zastosowaniem lasera, gdyż wzrost współczynnika załamania po fotoablacji jest konsekwencją odwodnienia rogówki. Taki stan rogówki powoduje wzrost rozpraszanego światła w całej tkance i efekt zamglenia, który często występuje po wykonanym zabiegu. Jednakże istota właściwa, która zawiera płasko-cienkie keratocyty rozprasza więcej światła niż nabłonek. Rozpraszanie światła przez keratocyty jest znacznie większe po urazie [120], gdyż wówczas te struktury uruchamiając regenerację istoty właściwej zmieniają swój kształt.

Natomiast, śródbłonek jest cienką (~4 μ m) [121] zlewającą się warstwą o bardzo dużej gęstości substancji wewnątrzkomórkowej, ale ponieważ ma bardzo krótki tor optyczny więc prawie nie rozprasza światła. Dwie ważne funkcje, które śródbłonek spełnia w rogówce to transport z cieczy wodnistej składników odżywczych z wyjątkiem tlenu oraz utrzymanie w istocie właściwej stałego poziomu uwodnienia, którego zachwianie prowadzi do obrzęku rogówki, utraty przezroczystości i osłabionego widzenia. Ta tendencja do spęcznienia istoty właściwej a w konsekwencji całej rogówki jest hamowana przez mechanizm „pompy” śródbłonka, za który odpowiedzialny jest aktywny transport (Na⁺K⁺ATPaza), kanały HCO₃⁻, Cl⁻ przy udziale anhidrazy węglanowej. Jednakże model transportu jonowego śródbłonka

uwidoczony na rycinie 18. wyjaśniający mechanizm działania „pompy” jeszcze nie jest kompletnie poznany [116,121,128].

W takim biologicznym układzie rogówki, między wymienionymi warstwami strukturalnymi oraz wewnątrz nich występuje woda o dużej przewodności właściwej (konduktywności), stąd na podstawie uzyskanych w rozprawie wyników badań celowa jest ocena wpływu wody luźno związanej i związanej na całkowite przewodnictwo elektryczne rogówki kontrolnej i badanej.

Woda związana jest obecna w rogówce zarówno przed jej pobraniem jak i po pobraniu od szczura odpowiednio w warunkach *in vivo* i *in vitro*, i jej oddziaływanie na parametry dielektryczne rogówki jest uzależnione od temperatury otoczenia. Natomiast wpływ wody luźno związanej na właściwości dielektryczne rogówki zależy od wilgotności i temperatury otoczenia w jakich wykonywane są pomiary tej tkanki. Ta woda jest absorbowana przez rogówkę w ten sposób, że tworzy wiązania wodorowe z grupami polarnymi łańcuchów bocznych białek nabłonka i śródbłonka [120,121]. Jak wynika z wcześniejszych badań rogówki wykonanych *in vitro* innymi metodami fizycznymi [122] śródbłonek pochłania większą ilość wody niż nabłonek rogówki.

Na podstawie charakteru temperaturowych zależności zmierzonych parametrów dielektrycznych (rycina 10a,b i c) można wnioskować, że wzrost temperatury wpływa na zmianę ilości i ruchliwości protonów wody w wyniku jej dekompozycji. Piki temperaturowe ϵ' , ϵ'' i $\tan \delta$ w okolicy 70°C dla rogówki kontrolnej i badanej wskazują na początek procesu dyfuzji wody z tych tkanek. Poniżej tych temperatur w rogówkach zachodzi zrywanie wiązań wodorowych jakie tworzą cząsteczki tej wody między swoimi molekułami oraz z białkami nabłonka i śródbłonka rogówki. Uwidocznione w tabeli 3. wartości liczbowe energii aktywacji ΔH niezbędnej do uwolnienia z rogówki kontrolnej i badanej wody luźno związanej są porównywalne z energią wiązań wodorowych. Hipotermia powoduje obniżenie ΔH , co może wskazywać na udział mniejszej ilości protonów wody w mechanizmie przewodnictwa elektrycznego rogówki w porównaniu z tym w stanie normotermii. Z porównania przebiegu krzywych ϵ' i ϵ'' uwidoczonych na rycinach 10 i 11. dla rogówki kontrolnej i badanej wynika również, że hipotermia ma nie tylko osłabiający wpływ na przewodnictwo, ale działa także wzmacniająco na mechanizm polaryzacyjny typu Maxwell-Wagner-Sillars (MWS) w tej tkance. Ten hamująco-wzmacniający efekt hipotermii należy wiązać z wpływem obniżonej temperatury szczura w warunkach *in vivo* na wzrost ściśliwości komórek nabłonka i śródbłonka, które taką strukturę rogówki zachowują również w stanie *in vitro* podczas

pomiarów dielektrycznych. W tej sytuacji, pochłanianie wody z otoczenia przez rogówkę obciążoną hipotermią w celu utworzenia wiązań wodorowych z łańcuchami bocznymi białek powierzchniowych oraz wewnątrz- i między komórkami jest utrudnione ze względu na ograniczony dostęp do tych struktur. Efektem tego jest większa zdolność rogówki do powierzchniowego gromadzenia ładunku niż do jego transportu jako prądu elektrycznego przez głębsze warstwy tej tkanki. Takie zachowanie rogówki uwodnionej potwierdzają uwidocznione w tabeli 1. mniejsze wartości liczbowe współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$ (ϵ''/ϵ') w stanie hipotermii w porównaniu z normotermią. Ten wyznaczony parametr dielektryczny pozwala na równoczesną ocenę efektywności mechanizmów przewodnictwa i polaryzacji elektrycznej zachodzących w rogówce, gdyż wyraża stosunek energii elektrycznej rozproszonej w postaci ciepła do energii elektrycznej zachowanej w badanym układzie rogówka-woda w wyniku doprowadzonego pola elektrycznego. Strata energii wynika z przepływu prądu przez trzy warstwy rogówki. Podczas, gdy energia zachowana jest rezultatem kumulacji ładunków elektrycznych między oraz wewnątrz tych warstw. Te dwa mechanizmy związane ze stratą i akumulacją energii elektrycznej w rogówce odzwierciedla model tej tkanki na rycinie 16.

Uwidocznione na rycinie13(a, b i c) i rycinie14(a, b i c) krzywe przedstawiają dla porównania właściwości dielektryczne rogówki kontrolnej z rogówką poddaną hipotermii po usunięciu z nich wody zaabsorbowanej z otoczenia w warunkach *in vitro*, czyli w stanie suchym. Wzmocnienie mechanizmów przewodnictwa i polaryzacji jonowej w rogówce badanej potwierdzają na tych rycinach większe wartości liczbowe ϵ' i ϵ'' w porównaniu z rogówką kontrolną. Prawdopodobnie jest to efekt zachwiania równowagi jonowej wewnątrz- i zewnątrz-komórkowej w nabłonku i śródbłonku, co wpływa na ruchliwość i gromadzenie się ładunku elektrycznego w tych warstwach rogówki. Za to zaburzenie równowagi elektrolitycznej pod wpływem hipotermii jest odpowiedzialne przede wszystkim podwyższone wewnątrz-komórkowe stężenie potasu [16,17,52,54,], które może powodować hipokaliemię u pacjentów podczas hipotermii terapeutycznej. Stąd, zalecane jest monitorowanie poziomu potasu u tych pacjentów w fazie ich ogrzewania podczas powrotu do normotermii, gdyż wówczas jony tego pierwiastka mogą gwałtownie przemieścić się na zewnątrz komórki powodując hiperkaliemię.

Uwidocznione na rycinie 14 (b, c) maksima ϵ'' i $\tan \delta$ rogówki kontrolnej i badanej w okolicy 2 i 16kHz odzwierciedlają mechanizmy transportu jonowego, których intensywność zależy od ilości zdolnych do relaksacji swobodnych jonów i miejsc polarnych, takich jak wiązania wodorowe czy łańcuchy boczne białek w niejednorodnej strukturze rogówki. To pierwsze maksimum o czasie relaksacji około 0.5ms należy przypisać swobodnym jonom w nabłonku i śródbłonku rogówki oraz ich polaryzacji powierzchniowej. Ten drugi pik o czasie relaksacji 0.06ms można przyporządkować przewodnictwu jonowemu między włóknami kolagenu i polaryzacji indukowanej na powierzchni tego białka jak również innym elementom strukturalnym istoty właściwej, takim jak keratocyty czy proteoglikany [120,122]. Hipotermia powoduje przesunięcie tego maksimum w okolicy 16kHz w kierunku niższych częstotliwości w stosunku do normotermii. To sugeruje, że oprócz zachwiania równowagi jonowej w rogówce mogło nastąpić również uszkodzenie istoty właściwej.

6. Wnioski

- Zmierzone in vitro temperaturowe i częstotliwościowe zależności parametrów dielektrycznych rogówki szczura odzwierciedlają mechanizmy polaryzacji i przewodnictwa elektrycznego w strukturze *nabłonka - istoty właściwej - śródbłonka - wody* w stanie normotermii i hipotermii tej tkanki.
- Woda zaabsorbowana in vitro przez rogówkę powoduje osłabienie i wzmocnienie odpowiednio mechanizmów przewodnictwa i polaryzacji elektrycznej w tkance obciążonej hipotermią w porównaniu z normotermią.
- Brak wody luźno związanej in vitro w rogówce ujawnia wpływ hipotermii na wzmocnienie mechanizmów przewodnictwa i polaryzacji elektrycznej w tej tkance.
- Otrzymane wyniki badań właściwości dielektrycznych rogówki szczura w stanie normotermii i hipotermii, sugerują możliwość zastosowania spektroskopii dielektrycznej do oceny in vivo zawartości wody w rogówce ludzkiej przed i po wykonaniu zabiegu chirurgii refrakcyjnej z zastosowaniem lasera.

7. Piśmiennictwo

1. M. Prek, V. Butala; "Principles of exergy analysis of human heat and mass exchange with the indoor environment", *Int. J. Heat Mass Transfer* 53 (2010) 5806-5814.
2. M. Prek; "Thermodynamical analysis of human thermal comfort"; *Energy* 31 (2006) 732-743.
3. M. Al-Othmani, N. Ghaddar, K. Ghali; "A multi-segmented human bioheat model for transient and asymmetric radiative environments"; *Int. J. Heat Mass Transfer* 51 (2008) 5522-5533.
4. Yasuhiro Shimazaki, Atsumasa Yoshida, Ryota Suzuki, Takeshi Kawabata, Daiki Imai, Shinichi Kinoshita; "Application of human thermal load into unsteady condition for improvement of outdoor thermal comfort" *46*(2011).
5. A.P. Gagge, A.P. Fobelets, L.G. Berglund; "A standard predictive index of human response to the thermal environment", *ASHRAE Trans.* 92 (1986) 709-731.
6. M. Prek; "Thermodynamic analysis of human heat and mass transfer and their impact on thermal comfort", *Int. J. Heat Mass Transfer* 48 (2005) 731-739.
7. A. Kurz; "Physiology of Thermoregulation", *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 22 (2008) 627-644.
8. P. Dongmei, C. Mingyin, D. Shiming, Q. Minglu; "A four-node thermoregulation model for predicting the thermal physiological responses of a sleeping person", *Building and Environment* 52 (2012) 88-97.
9. A. J. Young, J. W. Castellani; "Exertion-induced fatigue and thermoregulation in the cold", *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 128(2001)769-776.
10. L. R. Leon; "Thermoregulatory responses to environmental toxicants: The interaction of thermal stress and toxicant exposure", *Toxicology and Applied Pharmacology* 233 (2008) 146-161.
11. M. A. Mahmood, R.M. Zweifler; "Progress in shivering control", *Journal of the Neurological Sciences* 261 (2007) 47-54.
12. J. Waterhouse; "Homeostatic control mechanisms", *Anaesth Intensive Care* 11(2010) 274-278.

13. I. Campbell; "Body temperature and its regulation", *Aanaesth Intensive Care* 12 (2011) 240-244.
14. X. Xue, J. Liu; "Mechanism Interpretation of the Biological Brain Cooling and Its Inspiration on Bionic Engineering", *Journal of Bionic Engineering* 8 (2011) 207–222.
15. H. Zhang, E. Arens, C. Huizenga, T. Han; "Thermal sensation and comfort models for non-uniform and transient environments: Part I: Local sensation of individual body parts", *Building and Environment* 45 (2010) 380–388.
16. F. Hildebrand, P. V. Giannoudis, M. van Griensven, M. Chawda, H.C. Pape; "Pathophysiologic changes and effects of hypothermia on outcome inelective surgery and trauma patients", *The American Journal of Surgery* 187 (2004) 363–371.
17. B. K. Kwon, C. Mann, H. M. Sohn, A. S. Hilibrand, F. M. Phillips, J. C. Wang, M. G. Fehlings; "Hypothermia for spinal cord injury", *The Spine Journal* 8 (2008) 859-874.
18. A. Kurz, "Thermal care in the perioperative period", *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 22 (2008) 39-62.
19. M. Liu, X. Hu, J. Liu; "The effect of hypothermia on isoflurane MAC in children", *Anesthesiology* 94 (2001) 429–432.
20. H.G. Fritz, M. Holzmayr, B. Walter B et al.; "The effect of mild hypothermia on plasma fentanyl concentration and biotransformation in juvenile pigs", *Anesthesia and Analgesia* 100 (2005) 996–1002.
21. R. Lenhardt, E.Marker, V.Goll et al.; "Mild intraoperative hypothermia prolongs postoperative recovery", *Anesthesiology* 87 (1997) 1318–1323.
22. S.M. Frank, M.S. Higgins, M.J. Breslow et al.; "The catecholamine, cortisol, and hemodynamic responses to mild perioperative hypothermia", *Anesthesiology* 82 (1995) 83–93.
23. S. S. Song, P. D. Lyden; "Overview of Therapeutic Hypothermia", *Current Treatment Options in Neurology* 14 (2012) 541–548.
24. S.M. Frank, L.A. Fleisher, M.J. Breslow et al.; "Perioperative maintenance of normothermia reduces the incidence of morbid cardiac events: A randomized clinical trial", *The Journal of the American Medical Association* 277 (1997) 1127–1134.
25. S.M. Frank, S.N. Raja, C. Bulcao, D.S. Goldstein; "Age-related thermoregulatory differences during core cooling in humans", *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279 (2000) R349–R354.

26. .H. Schmied, A. Kurz, D.I. Sessler, et al.; “Mild hypothermia increases blood loss and transfusion requirements during total hip arthroplasty”, *Lancet* 347 (1996) 289–92.
27. M. Winkler, O. Akca, B. Birkenberg, et al.; “Aggressive warming reduces blood loss during hip arthroplasty”, *Anesth. Analg.* 91(2000) 978–84.
28. R. Greif, O. Akca, E.P. Horn et al.; “Supplemental perioperative oxygen to reduce the incidence of surgical wound infection. Outcomes Research Group”, *New England Journal of Medicine* 342 (2000) 161–167.
29. T.V. Kozyreva; “Neurophysiological aspects of the long-term adaptation to cold in mammals: The role of central and peripheral thermoreceptors”, *Journal of Thermal Biology* 31 (2006) 105–114.
30. A.M.J. van Ooijena, W.D. van MarkenLichtenbelt, A.A. van Steenhoven, K.R. Westerterp; “Seasonal changes in metabolic and temperature responses to cold air in humans”, *Physiology & Behavior* 82 (2004) 545– 553.
31. C. O'Brien, C. Mahoney, W. J. Tharion, I. V. Sils, J. W. Castellani; “Dietary tyrosine benefits cognitive and psychomotorperformance during body cooling”, *Physiology & Behavior* 90 (2007) 301–307.
32. M. D. Muller, E. J. Ryan, D. M. Bellar, Chul-Ho Kim, R. P. Blankfield, S. M. Muller, E. L. Glickman; “The influence of interval versus continuous exercise on thermoregulation, torso hemodynamics, and fingerdexterity in the cold”, *Eur. J. Appl. Physiol.* 109 (2010) 857–86.
33. X. Xue, J. Liu; “Multi-scale modeling on human intravascular cooling to induce brain hypothermia via circle of Willis”, *ForschIngenieurwes* 75 (2011) 257–269.
34. R. M. Forstot; “The etiology and management of inadvertent perioperative hypothermia”, *Journal of Clinical Anaesthesia* 7 (1995) 657-674.
35. A. Kurz, “Prevention and treatment of perioperative hypothermia”, *Current Anaesthesia & Critical Care* 12 (2001) 96-102.
36. A. Torossian, “Thermal management during anaesthesia and thermoregulation standards for the prevention of inadvertent perioperative”, *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 22 (2008) 659-668.
37. R. Lenhardt, “Monitoring and thermal management”, *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 17 (2003) 569-581.
38. T. E. Bell-Stephens, R. A. Jajfi, G. K. Steinberg; “Intraoperative and Intensive Care Management of the Patient Undergoing Mild Hypothermia”, in *Hypothermia and*

- Cerebrall Ischemia: Mechanisms and Clinical Applications, Edited by: C. M. Maier and G. K. Steinberg © Humana Press Inc., Totowa, NJ.7 (2004) 103-118
39. O. Kimberger; "Thermoregulatory management for mild therapeutic hypothermia", *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* 22 (2008) 729-744.
 40. L.J. Crowley, D. J. Buggy; "Shivering and Neuraxial Anesthesia", *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 33 (2008) 241-252.
 41. S.M. Burns, K. Piotrowski, G. Caraffa, M. Wojnakowski; "Incidence of Postoperative Hypothermia and the Relationship to Clinical Variables", *Journal of PeriAnesthesia Nursing*, 25 (2010) 286-289.
 42. G. E. Aksenova, O. S. Logvinovich, L. A. Fialkovskaya, V. N. Afanasyev, D. A. Ignat'ev, I. K. Kolomiytseva, E. E. Fesenko; "The Effect of Hypothermia on the Ornithine Decarboxylase Activity in Tissues of Rats", *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 428 (2009) 249-251.
 43. K. P. Ivanov; "Restoration of vital activity of cooled animals without rewarming the body", *Eur. J. Appl. Physiol.* 105 (2009) 5-12.
 44. J. D. Scudder, R.V. Blystone, D.A. Pulliam; "Control of anesthesia-induced hypothermia by ambient temperature regulation in rats", *J. Therm. Biol.* 34(2009) 176-182.
 45. L. I. Kramarova, R. Kh. Ziganshin, E. N. Gakhova; "Endogenous Hypometabolic-Hypothermic Factors and Their Possible Application to Life in the Cold", *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 35(2009) 538-548.
 46. S. A. Zabelinskii, M. A. Chebotareva, A. M. Kalandarovb, B. A. Feizulaev, N. K. Klichkhanov, A. I. Krivchenko, A. M. Kazennov; "Effect of Total Hypothermia on the Fatty Acid Composition of Blood Phospholipids of Rats and Ground Squirrels and of the Light Irradiation on Chemical Processes in Lipid Extract", *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 47(2011) 333-340.
 47. N. Irwin, J.M.E. Francis, P.R. Flatt; "Alterations of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) during cold acclimation", *Regulatory Peptides* 167 (2011) 91-96.
 48. H. Aslami, M.T. Kuipers, Ch.J. P. Beurskens, J.J. T. H. Roelofs, M.J. Schultz, N.P. Juffermans; "Mild hypothermia reduces ventilator-induced lung injury, irrespective of reducing respiratory rate", *Translational Research* 159 (2012) 110-117.
 49. L.S. Duraku, E.S. Smits, S.P. Niehof, S.E.R. Hovius, E.T. Walbeehm, R.W. Selles; "Thermoregulation in peripheral nerve injury induced cold-intolerant rats", *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 65 (2012) 771-779.

50. V. Stojanović, N. Vučković, S. Spasojević, N. Barišić, A. Doronjski, D. Žikić; “The influence of EPO and hypothermia on the kidneys of rats after perinatal asphyxia”, *PediatrNephrol* 27 (2012) 139–144.
51. C. Lay, N. Badjatia; “Therapeutic Hypothermia After Cardiac Arrest”, *Curr. Atheroscler. Rep.*12 (2010) 336–342.
52. D. M. Greer; “Hypothermia for Cardiac Arrest”, *Current Neurology and Neuroscience Reports* 6 (2006) 518–524.
53. W. D. Dietrich, H. M. Bramlett; “The Evidence for Hypothermia as a Neuroprotectant in Traumatic Brain Injury”, *Neurotherapeutics*7(2010) 43–50.
54. A. Farida , E. M. Bershad, T. Emiru, P. Iaizzo, J. Suarez, A. A. Divani; “Therapeutic hypothermia in stroke and traumatic brain injury”, *Frontiers in Neurology* 2 (2011) 1-11.
55. J. Inamasu, Y. Nakamura, K. Ichikizaki; “Induced hypothermia In experimental traumatic spinal cord injury: an update”, *Journal of the Neurological Sciences* 209 (2003) 5560.
56. F. P. González-Ibarra, J. Varon, E. G. López-Mez; “Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action”, *Frontiers in Neurology* 2 (2011) 1-11.
57. M.A. Yenari, T. M. Hemmen; “Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go?”, *Stroke* 41(2010) (Suppl. 10) S72–S74.
58. R.T. Stravitz, F. S. Larsen; “Therapeutic hypothermia for acute liver failure”. *Crit. Care Med.*37(2009) (Suppl. 7) S258–S264.
59. Y.I. Kim, K. Hiratsuka, S. Kitano S, et al.; “Simple in situ hypothermia reduced ischemic injury to human liver during hepatectomy”, *Eur. J. Surg.* 162 (1996) 717–21.
60. C.M. Maier, G.H. Sun, D. Cheng, M. A. Yenari, P.H. Chan, G.K. Steinberg; “Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression, and activity following transient focal cerebral ischemia”, *Neurobiol. Dis.*11 (2002) 28–42.
61. L. Liu, M. A. Yenari; “Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms”, *Front. Biosci.* 12(2007) 816–825.
62. J. E. Merrill, E. N. Benveniste; “Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful”, *Trends Neurosci.* 19 (1996) 331–338.

63. K.H. Polderman; “Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia”, *Crit Care Med* 37 (2009) (Suppl7)S186–S202.
64. A. Kimura, S. Sakurada, H. Ohkuni, Y. Todome, K. Kurata; “Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells”, *Crit. Care Med.* 30 (2002) 1499–1502.
65. R. R. Leker, E. Shohami; “Cerebral ischemia and trauma – different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities”, *Brain Res. Rev.* 39 (2002) 55–73.
66. G. Kvrivishvili; “Glycine and neuroprotective effect of hypothermia in hypoxic-ischemic brain damage”, *Neuroreport* 13(2002) 1995–2000.
67. J. Varon, P. Acosta; “Therapeutic hypothermia. Past, present, and future”, *Chest* 133(2008) 1267–1274.
68. M. A. Lazzaro, S. Prabhakaran; “Induced hypothermia in acute ischemic stroke”, *Expert Opin. Investig. Drugs* 17(2008) 1161–1174.
69. N. Stocchetti, A. Colombo, F. Ortolano, W. Videtta, R. Marchesi, L. Longhi, E. R. Zanier; “Time course of intracranial hypertension after traumatic brain injury”, *J. Neurotrauma* 24 (2007) 1339–1346.
70. L. A. McIntyre, D. A. Fergusson, P. C. Hebert; “Prolonged therapeutic hypothermia after traumatic brain injury in adults”, *JAMA* 289 (2003) 2992–2999.
71. I.F.P. González, F.J.I. Martínez, T.E. García; “Therapeutic hypothermia in traumatic brain injury”, *A. S. Sin.* 3 (2009) 21–26.
72. J.M. Dogné, I. Hanson, X. de Leval, B. Masereel, P. Kolh, B. Pirotte, “New developments on thromboxane modulators”, *Mini Rev. Med. Chem.* 4 (2004) 649–657.
73. J.J. Corry, R. Dhar, T. Murphy, M. N. Diringer; “Hypothermia for refractory status epilepticus”, *Neurocrit. Care* 9 (2008) 189–197.
74. N. Alva, J. Palomeque, T. Carbonell; “Nitric oxide induced by ketamine/xylazine anesthesia maintains hepatic blood flow during hypothermia”, *Nitric Oxide* 15 (2006) 64–69.
75. F. S. Rodrigues, M. Aparecida de Oliveira, J.O. Martins, P. Sannomiya, R. de Cássia Tostes, D. Nigro, M. H. C. Carvalho, Z. B. Fortes; “Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route”, *Life Science* 79 (2006) 1630-1637.
76. X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, *Thermochim. Acta* 461 (2007) 137-144.

77. C. Barba, S. Méndez, M. Martì, J.L. Parra, L. Coderch, *Thermochim.Acta* 494 (2009) 136-140.
78. I. Elmas, M. Kucuk, R. B. Kalayci, A. Cevik, M. Kaya; “Effects of profound hypothermia on the blood-brain barrier permeability in acute and chronically ethanol treated rats”, *Forensic Sci. Int.* 110 (2001) 212-216.
79. C. Urrea, G. H. Danton, H. M. Bramlett W. D. Dietrich; “The beneficial effect of mild hypothermia in a rat model of repeated thromboembolic insults”, *Acta Neuropathol.* 107 (2004) 413–420.
80. I. K. Kolomiytseva, L. N. Markevich, N. I. Perepelkina, O. V. Bykova, D. A. Ignat’ev, E. E. Fesenko; “The Effect of Hypothermia on Membrane Lipids in Rat Neocortex” *Doklady Biochemistry and Biophysics* 427 (2009) 225–228.
81. B. Li, M. S. Lee, R. S. Y. Lee, P. J. Donaldson, J. C. Lim; “Characterization of Glutathione Uptake, Synthesis, and Efflux Pathways in the Epithelium and Endothelium of the Rat Cornea”, *Cornea* 31 (2012) 1304–1312.
82. L. T. Tadzhibova, M. D. Astaeva, J. G. Ismailova, T. N. Daudova, and N. K. Klichkhanov; “Effects of Dalargin on Free Radical Processes in the Blood of Rats Exposed to Moderate Hypothermia”, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 150(2011) 301-301.
83. A. C. Jayasuriya, S. Ghosh, J. I. Scheinbeim, V. Lubkin, G. Bennett, P. Kramer; “A study of piezoelectric and mechanical anisotropies of the human Cornea”, *Biosensors and Bioelectronics* 18 (2003) 381- 387.
84. A. Kotecha, F. Oddone, C. Sinapis, A. Elsheikh, D. Sinapis, A. Sinapis, D. F. Garway-Heath; “Corneal biomechanical characteristics in patients with diabetes mellitus”, *J. Cataract Refract. Surg.* 36 (2010) 1822–1828.
85. S. Ni, J. Yu, F. Bao, J. Li, A. Elsheikh, Q. Wang; “Effect of glucose on the stress-strain behavior of ex-vivo rabbit cornea”, *Experimental Eye Research* 92 (2011) 353-360.
86. F. Xiao, J. Rodriguez, T. C. Arnold, S. Zhang, D. Ferrara, J. Ewing, J. S. Alexander, D. L. Carden, S. A. Conrad; “Near-infrared spectroscopy: a tool to monitor cerebral hemodynamic and metabolic changes after cardiac arrest in rats”, *Resuscitation* 63 (2004) 213–220.
87. T.M.S. Greiling, J.I. Clark; “The transparent lens and cornea in the mouse and zebra fish eye”, *Seminars in Cell and Development Biology* 19 (2008) 94-99.

88. T. Yamada, H. Hirose, Y. Mori, A. Onitsuka, M. Hayashi, S. Senga, N. Futamura, K. Sakamoto, T. Sago, H. Takagi, M. Yasumura, H. Iwata; "Dielectric spectrogram for evaluating ischemic microstructural changes of the liver in simple cold preservation", *Surg. Today* 32 (2002) 1058-1063.
89. A. Ivorra, R. Go´mez, N. Noguera, R. Villa, A. Sola, L. Palacios, G. Hotter, J. Aguiló, "Minimally invasive silicon probe for electrical impedance measurements in small animals", *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 391-399.
90. M. Genesc`a, A. Ivorra, A. Sola, L. Palacios, J. Goujon, T. Hauet, R. Villa, J. Aguiló, G. Hotter; "Electrical bioimpedance measurement during hypothermic rat kidney preservation for assessing ischemic injury", *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1866-1871.
91. L. Rubinsky, N. Raichman, I. Baruchi, M. Shein, J. Lavee, H. Frenk, E. Ben-Jacob, "Study of hypothermia on cultured neuronal networks using multi-electrode arrays"; *J. Neurosci. Methods* 160 (2007) 288.
92. S. Traustason, T. Eysteinnsson, B. A. Agnarsson, E. Stefa´nsson; "GABA agonists fail to protect the retina from ischemia–reperfusion injury", *Experimental Eye Research* 88 (2009) 361–366.
93. M. Arrica, b. Bissonnette; "Therapeutic hypothermia", *Semin. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 11(2007) 6–15.
94. A.Y. Fang, F.F. Gonzalez, R.A. Sheldon, D.M. Ferriero; "Effects of combination therapy using hypothermia and erythropoietin in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia", *Pediatr. Res.* 73 (2013) 12-7.
95. M. Xiong, L.X. Chen, S.M. Ma, Y. Yang, W.H. Zhou; "Short-term effects of hypothermia on axonal injury, preoligodendrocyte accumulation and oligodendrocyte myelination after hypoxia-ischemia in the hippocampus of immature rat brain", *Dev. Neurosci.* 35 (2013) 17-27.
96. P. Kromkhun, M. Katou, H. Hashimoto, M. Terada, C. Moon, T.R. Saito; "Quantitative and qualitative analysis of rat pup ultrasonic vocalization sounds induced by a hypothermic stimulus", *Lab. Anim. Res.* 2013 Jun;29(2):77-83.
97. J.H. Kim, M. Seo, H.S. Han, J. Park, K. Suk; "The neurovascular protection afforded by delayed local hypothermia after transient middle cerebral artery occlusion", *Curr. Neurovasc. Res.* 10 (2013) 134-43.

98. M.S. Damian, D. Ellenberg, R. Gildemeister; "Coenzyme Q10 combined with mild hypothermia after cardiac arrest: a preliminary study", *Circulation* 110 (2004) 3011–3016.
99. M.A. Yenari, H. Zhao, R.G. Giffard, et al.; "Gene therapy and hypothermia for stroke treatment", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 993(2003) 54–68.
100. K. Xu, M.A. Puchowicz, W.D. Lust, et al.; "Adenosine treatment delays postischemic hippocampal CA1 loss after cardiac arrest and resuscitation in rats", *Brain Res.* 1071 (2006) 208–217.
101. J. Amann, G. P. Holley, S.B. LEE, H. F. Edelhauser; "Increased Endothelial Cell Density in the Paracentral and Peripheral Regions of the Human Cornea", *Am. J. Ophthalmol.* 135(2003) 584–590.
102. L. J. Müller, C. F. Marfurt, F. Kruse, T. M.T. Tervo; "Corneal nerves: structure, contents and function", *Experimental Eye Research* 76 (2003) 521–542.
103. W. M. Bourne, J. W. McLaren; "Clinical responses of the corneal endothelium", *Experimental Eye Research* 78 (2004) 561–572.
104. G. Latour, L. Kowalczyk, M. Savoldelli, J. Bourges, K. Plamann, F. Behar-Cohen, M. Schanne-Klein; "Hyperglycemia-Induced Abnormalities in Rat and Human Corneas: The Potential of Second Harmonic Generation Microscopy", *PLoS ONE* 7(11) (2012) 1–11.
105. M. Aldrovani, A.M.A. Guaraldo, B.C. Vidal; "Optical anisotropies in corneal stroma collagen fibers from diabetic spontaneous mice", *Vision Research* 47 (2007) 3229 – 3237.
106. Y. Li, M.V. Netto, R. Shekhar, et al.; "A longitudinal study of LASIK flap and stromal thickness with high-speed optical coherence tomography", *Ophthalmology* 114 (2007) 1124–1132.
107. D. Ortiz, D. Pinero, M.H. Shabayek, F. Arnalich-Montiel, J.L. Alio; "Corneal biomechanical properties in normal, post-laser in situ keratomileusis, and keratoconic eyes", *J. Cataract Refract. Surg.* 33 (2007) 1371–1375.
108. M.C. Chen, N. Lee, N. Bourla, D.R. Hamilton; "Corneal biomechanical measurements before and after laser in situ keratomileusis", *J. Cataract Refract. Surg.* 34 (2008) 1886–1891.

109. F.W. de Medeiros, A. Sinha-Roy, M.R. Alves, S.E. Wilson, W.J. Dupps; “Differences in the early biomechanical effects of hyperopic and myopic laser in situ keratomileusis”, *J. Cataract Refract. Surg.* 36 (2010) 947–953.
110. A. Hager, K. Loge K, M-O. Fu llhas, B. Schroeder, M. Grobherr, W. Wiegand; “Changes in corneal hysteresis after clear corneal cataract surgery”, *Am. J. Ophthalmol.* 144 (2007) 341–346.
111. J.L. Alio´, M.C.C. Agdeppa, J.L. Rodri´guez-Prats, F. Amparo, D.P. Pin˜ero; “Factors influencing corneal biomechanical changes after microincision cataract surgery and standard coaxial phacoemulsification”, *J. Cataract Refract. Surg.* 36 (2010) 890–897.
112. F. Capri, F. Tomei, “Non-invasive electroretinography”, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 60 (2006) 375-379.
113. M.F. Marmor, M.G. Brigell, D.L. McCulloch, C.A. Westall, M. Bach; “ISCEV standard for clinical electro-oculography (2010 update)”, *Doc. Ophthalmol.* 122 (2011) 1-7.
114. A. Peratta; “3D low frequency electromagnetic modeling of the human eye with boundary elements: Application to conductive keratoplasty”, *Engineering Analysis with Boundary Elements* 32 (2008) 726-735.
115. E. Eljarrat-Binstock, A.J. Domb; “Iontophoresis: A non-invasive ocular drug delivery”, *Journal of controlled Release* 110 (2006) 479-489.
116. L. Ma, K. Kuang, R.W. Smith, D. Rittenband, P. Iserovich, F.P.J. Diecke, J. Fischbarg, “Modulation of tight junction properties relevant to fluid transport across rabbit corneal endothelium”, *Exp. Eye Res.* 84 (2007) 790.
117. M. Zhao; “Electrical fields in wound healing- An overriding signal that directs cell migration”, *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20 (2009) 674-682.
118. B. Jo, A. Aksan; “Prediction of the extent of thermal damage in the cornea during conductive keratoplasty”, *Journal of Thermal Biology* 35 (2010) 167-174.
119. A. Guimeraa, A. Ivorrac, G. Gabriela, R. Villa; “Non-invasive assessment of corneal endothelial permeability by means of electrical impedance measurements”, *Medical Engineering & Physics* 32 (2010) 1107–1115.
120. J.R. Hassell, D.E. Birk; “The molecular basis of corneal transparency”; *Exp. Eye Res.* 91 (2010) 326-335.
121. J. A. Bonanno; “Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump”, *Experimental Eye Research* 95(2012) 2-7.

122. S. Mergler, U. Pleyer; "The human corneal endothelium: New insights into electrophysiology and ion channels", *Prog. Retin. Eye Res.* 26 (2007) 359-378.
123. M. A. Woodward, H. F. Edelhauser; "Corneal endothelium after refractive surgery", *J. Cataract Refract Surg.* 37 (2011) 767-777.
124. W. Liu, K. Merrett, M. Griffith, P. Fagerholm, S. Dravida, B. Heyne, J. C. Scaiano, M. A. Watsky, N. Shinozaki, N. Lagali, Re. Munger, F. Li; "Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes", *Biomaterials* 29 (2008) 1147-1158.
125. S. Grimnes, Ø.G. Martinsen; "Bioimpedance and bioelectricity basics", Academic Press (2008).
126. S. Patel, J.L. Alio, J.J. Perez-Santonja; "Change in the refractive index in bovine and human corneal stroma before and after LASIK: a study on virgin and re-treatment corneas with implications on stromal hydration", *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45 (2004) 3523-3530.
127. S. Patel, J. L. Alio, J. Javaloy, J. J. Perez-Santonja, A. Artola, J. Rodriguez-Prats; "Human Cornea Before and After Refractive Surgery Using a New Device: VCH-1", *Cornea* 27 (2008) 1042-1049.
128. S. Merger, M. Valtink, V.J. Coulson-Thomas, D. Lindemann, P.S. Reinach, K. Engelmann, U. Pleyer; "TRPV channels mediate temperature-sensing in human corneal endothelial cells", *Experimental Eye Research* 90 (2010) 758-770.

8. Streszczenie

Wstęp: W omawianej rozprawie zaprezentowano wyniki badań właściwości dielektrycznych rogówki szczura w stanie normotermii i hipotermii. Otrzymane na podstawie tych badań informacje o mechanizmach przewodnictwa i polaryzacji dielektrycznej w rogówce mogą stanowić pomoc w interpretacji aktualnie uzyskiwanych klinicznie wyników badań rogówki ludzkiej za pomocą takich metod elektrodagnostycznych jak keratoplastyka przewodząca, elektretinografia czy elektrookulografia.

Założenia i cel pracy: Celem pracy było porównanie *in vitro* oddziaływania temperatury, wilgotności i częstotliwości pola elektrycznego na właściwości dielektryczne rogówki szczura z grupy kontrolnej i poddanej hipotermii, analiza wpływu hipotermii na mechanizm polaryzacji i przewodnictwa elektrycznego rogówki w odniesieniu do struktury molekularnej układu *nabłonek - istoty właściwa – śródbłonek – woda* oraz ocena przydatności spektroskopii dielektrycznej do pomiaru przewodnictwa elektrycznego rogówki ludzkiej poddanej miejscowemu znieczuleniu *in vivo* przed i po zastosowaniu fotoablacji laserowej. Realizacja powyższego celu wymagała następujących założeń:

- szczury z grupy kontrolnej i badanej posiadały podobną masę ciała;
- szczury poddane hipotermii po zakończonym czasie jej trwania były natychmiast skrwawiane;
- przed wykonaniem badań dielektrycznych rogówki pobrane od szczurów z grupy normotermicznej i hipotermicznej były umieszczone w pojemnikach o tej samej temperaturze i wilgotności otoczenia;
- uwalnianie wody zabsorbowanej z otoczenia przez rogówki z obu grup szczurów odbywało się w tej samej komorze pomiarowej w temperaturze około 140°C;
- czas trwania pomiarów dielektrycznych dla każdej rogówki z obu badanych grup był podobny.

Materiał i metodyka: Badania przeprowadzono na dwóch grupach szczurów szczepu Wistar, samcach o średniej masie ciała 250g. Obie grupy liczyły po 8 zwierząt. Kontrolowano rektalną temperaturę ciała szczurów. Grupa poddana hipotermii posiadała temperaturę

rektalną $27,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Pomiary wykonano przy pomocy analizatora impedancji HIOKI 3522-50 LCR w zakresie częstotliwości f pola elektrycznego 500Hz – 100kHz. Zmierzonymi parametrami elektrycznymi była rezystancja i pojemność rogówki, na podstawie których obliczono właściwości dielektryczne tej tkanki. Badania wykonano w atmosferze powietrza dla rogówek uwodnionych i suchych z obu grup szczurów. Pierwszy stan określony jako „uwodniony” charakteryzował próbki, których wilgotność była w równowadze z wilgotnością otaczającego powietrza o wartości $\sim 70\% \text{RH}$. Drugi stan określony jako „suchy” dotyczył tych samych próbek pozbawionych wody zaabsorbowanej z otoczenia, tzw. wody luźno związanej.

Wyniki: Współczynnik strat dielektrycznych dla rogówki uwodnionej obciążonej hipotermią ma niższe wartości liczbowe w obszarze temperaturowego maksimum związanego z uwalnianiem wody luźno związanej w porównaniu z rogówką kontrolną. Energia aktywacji przewodności właściwej dla uwodnionej rogówki badanej jest mniejsza o 60% i 48% odpowiednio dla częstotliwości 2kHz i 80kHz, w porównaniu do rogówki kontrolnej. Natomiast suche rogówki ujawniają ponad 60% wzrost przenikalności dielektrycznej i strat dielektrycznych w grupie poddanej hipotermii w porównaniu z normotermią dla tej samej temperatury i częstotliwości.

Wnioski: Zmierzone *in vitro* temperaturowe i częstotliwościowe zależności parametrów dielektrycznych rogówki szczura odzwierciedlają mechanizmy polaryzacji i przewodnictwa elektrycznego w strukturze *nabłonka - istoty właściwej - śródbłonka - wody* w stanie normotermii i hipotermii tej tkanki. Rogówki uwodnione z grupy obciążonej hipotermią mają osłabione mechanizmy przewodnictwa elektrycznego w porównaniu z tymi z grupy kontrolnej. Jest to rezultat większego powierzchniowego gromadzenia ładunku w porównaniu z jego transportem w postaci prądu elektrycznego przez głębsze warstwy rogówki będącej w stanie hipotermii. Natomiast w stanie suchym rogówek obu grup, czyli po usunięciu z nich wody luźno związanej mechanizmy przewodnictwa i polaryzacji elektrycznej są większe dla stanu hipotermii niż normotermii tych tkanek. Prawdopodobnie hipotermia powoduje zachwianie równowagi jonowej w nabłonku i śródbłonku, co wpływa na wzrost ruchliwość i większe gromadzenie się ładunku elektrycznego w tych warstwach rogówki.

9. Abstract

Introduction: The thesis presents results of an investigation of dielectric properties of rat cornea in normothermia and hypothermia. The study provided information on dielectric polarization and conductance mechanisms in the cornea which may be helpful in interpreting clinical results of human cornea examination, currently obtained by means of such electrodiagnostic tests as conductive keratoplasty, electroretinography or electrooculography.

Objectives: The purpose of the study was an in vitro comparison of the effect of temperature, humidity and electric field frequency on dielectric properties of cornea of rats from two groups (control and hypothermia), analysis of hypothermia's effect on electric polarization and conductance mechanisms in the cornea with respect to the molecular structure of the *epithelium – stromal – endothelium – water* system, as well as evaluation of dielectric spectroscopy efficiency in measuring electric conductance of human cornea in local anesthesia administered in vivo, before and after laser photoablation. To achieve the said purpose the following requirements had to be met:

- rats from control and study groups had similar body weight;
- hypothermic rats were killed by bleeding immediately on completion of hypothermia;
- prior to dielectric tests, corneas taken from normothermic and hypothermic rats were placed in containers of the same ambient humidity and temperature;
- release of ambient water absorbed by corneas from both rat groups took place in the same measurement chamber, at a temperature of approximately 140°C;
- the duration of dielectric tests was similar for corneas from both groups.

Material and methods: The study involved two groups of Wistar rats (males of average body weight of 250g). Both groups consisted of 8 animals. Rectal body temperature was monitored. The rectal temperature of the hypothermic group was $27.0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Measurements were made with the use of HIOKI 3522-50 LCR impedance meter in the electric field frequency f range

of 500Hz – 100kHz. Measured electric parameters included cornea resistance and capacity, based on which dielectric properties of the tissue were calculated. Tests were conducted in air atmosphere for hydrated and dry corneas from both groups. Corneas were considered “hydrated” when their humidity was equal to the humidity of the surrounding air (~70%RH). The same corneas were considered “dry” when they were free of water absorbed from the environment (so-called loosely bound water).

Results: The dielectric loss coefficient for hydrated hypothermic corneas is lower in the range of maximum temperatures linked to the release of loosely bound water, as compared to control corneas. Specific conductance activation energy for hydrated corneas was lower by 60% and 48% (for frequencies of 2kHz and 80kHz, respectively), as compared to control corneas. In their turn, dry corneas exhibited growth of dielectric permittivity and dielectric losses in the hypothermic group, as compared to the normothermic group at the same temperature and frequency.

Conclusions: In vitro measurements of temperature and frequency dynamics of dielectric parameters of rat cornea reflect electric polarization and conductance mechanisms in the *epithelium – stromal – endothelium – water* system, both for hypothermic and normothermic corneas. Hydrated corneas from the hypothermic group exhibit weakened electric conductance mechanisms, as compared to corneas from the control group. This results from greater electric charge accumulation on the surface as compared to its conductance in the form of electric current through deeper layers of a hypothermic cornea. On the other hand, in dry corneas (i.e. those from which loosely bound water was removed) from both groups electric polarization and conductance mechanisms are greater in hypothermia than in normothermia. It is likely that hypothermia causes ionic imbalance in the epithelium and the endothelium, which contributes to greater mobility and accumulation of electric charge in those layers of the cornea.

10. Spis rycin i tabel

Rycina 1. Model termoregulacyjny człowieka

Rycina 2. Przebiegi temperatury kory człowieka w stanach: homojotermii, hipertermii i hipotermii

Rycina 3. Układ regulacji temperatury w organizmie człowieka

Rycina 4. Mechanizmy fizyczne wymiany ciepła między mózgiem człowieka a jego środowiskiem zewnętrznym

Rycina 5. Zależność temperatury łożyska paznokcia od czasu trwania zanurzenia palca ręki w zimnej wodzie

Rycina 6. Wpływ środków znieczulających na temperaturę kory człowieka

Rycina 7. Wielkość spadku temperatury kory w zależności od czasu trwania znieczulenia

Rycina 8. Mechanizm molekularny działania hipotermii terapeutycznej

Rycina 9. Rogówka z nałożonymi elektrodami stanowiącymi kondensator pomiarowy

Rycina 10a. Temperaturowe zależności logarytmu przenikalności dielektrycznej ϵ' rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej (Δ :2kHz; \blacktriangle :80kHz) i badanej (\square :2kHz; \blacksquare :80kHz)

Rycina 10b. Temperaturowe zależności logarytmu strat dielektrycznych ϵ'' rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej (Δ :2kHz; \blacktriangle :80kHz) i badanej (\square :2kHz; \blacksquare :80kHz)

Rycina 10c. Temperaturowe zależności logarytmu współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$ rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej (Δ :2kHz; \blacktriangle :80kHz) i badanej (\square :2kHz; \blacksquare :80kHz)

Rycina 11a. Zależność logarytmu przenikalności dielektrycznej ϵ' od logarytmu częstotliwości rogówki uwodnionej w temperaturze 25°C (Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)

Rycina 11b. Zależność logarytmu strat dielektrycznych ϵ'' od logarytmu częstotliwości f rogówki uwodnionej w temperaturze 25°C (Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)

Rycina 11c. Zależność logarytmu współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$ od logarytmu częstotliwości f rogówki uwodnionej w temperaturze 25°C (Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)

- Rycina 11d. Zależność logarytmu strat dielektrycznych ϵ'' od logarytmu przenikalności dielektrycznej ϵ' rogówki uwodnionej w temperaturze 25°C (Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)
- Rycina 12. Zależność logarytmu przewodności właściwej σ od odwrotności temperatury dla rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej (Δ : 2kHz; \blacktriangle : 80kHz) i badanej (\square : 2kHz; \blacksquare : 80kHz)
- Rycina 13a. Temperaturowe zależności przenikalności dielektrycznej ϵ' rogówki suchej z grupy kontrolnej (Δ : 2kHz; \blacktriangle : 80kHz) i badanej (\square : 2kHz; \blacksquare : 80kHz)
- Rycina 13b. Temperaturowe zależności strat dielektrycznych ϵ'' rogówki suchej z grupy kontrolnej (Δ : 2kHz; \blacktriangle : 80kHz) i badanej (\square : 2kHz; \blacksquare : 80kHz)
- Rycina 14a. Zależność przenikalności dielektrycznej ϵ' od logarytmu częstotliwości rogówki suchej w temperaturze 25°C (Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)
- Rycina 14b. Zależność strat dielektrycznych ϵ'' od logarytmu częstotliwości rogówki suchej w temperaturze 25°C (Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)
- Rycina 14c. Zależność współczynnika strat dielektrycznych $\tan \delta$ od logarytmu częstotliwości rogówki suchej w temperaturze 25°C (Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)
- Rycina 14d. Zależność strat dielektrycznych ϵ'' od przenikalności dielektrycznej ϵ' rogówki suchej w temperaturze 25°C (Δ : grupa kontrolna; \square : grupa badana) i 40°C (\blacktriangle : grupa kontrolna; \blacksquare : grupa badana)
- Rycina 15. Zależność logarytmu przewodności właściwej σ od odwrotności temperatury dla rogówki suchej z grupy kontrolnej (Δ : 2kHz; \blacktriangle : 80kHz) i badanej (\square : 2kHz; \blacksquare : 80kHz)
- Rycina 16. Mechanizm transportu jonowego w rogówce
- Rycina 17. Różnica potencjałów elektrycznych między podstawą i wierzchołkiem nabłonka (A). Transport jonowy w komórce nabłonka (B)
- Rycina 18. Kanały i pompy jonowe w śródbłonku
- Tabela 1. Współczynnik strat dielektrycznych $\tan \delta$ rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej i badanej dla 2kHz i 80kHz w temperaturze 70°C
- Tabela 2. Wartości liczbowe $\tan \delta$ rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej i badanej w temperaturze 25°C i 40°C i dla częstotliwości 2kHz i 80kHz

Tabela 3. Energia aktywacji ΔH przewodności właściwej rogówki uwodnionej z grupy kontrolnej i badanej dla częstotliwości 2kHz i 80kHz

Tabela 4. Współczynnika strat dielektrycznych $\tan\delta$ rogówki suchej z grupy kontrolnej i badanej dla 2kHz i 80kHz w temperaturze 70°C

Tabela 5. Wartości liczbowe $\tan\delta$ rogówki suchej z grupy kontrolnej i badanej w temperaturze 25°C i 40°C i dla częstotliwości 2kHz i 80kHz

Tabela 6. Energia aktywacji ΔH przewodności właściwej σ rogówki suchej z grupy kontrolnej i badanej dla 2kHz i 80kHz