

Mikrodialys vid leverischemi och reperfusionsskada

Anders Winbladh, kirurgkliniken i Linköping, har försvarat sin avhandling med titeln *Microdialysis in Liver Ischemia and Reperfusion Injury*. Avhandlingen belyser hur levern reagerar vid tillfällig ischemi vid exempelvis Pringels manöver.



ANDERS WINBLADH
Linköping
anders.winbladh@lio.se

Bakgrund

Pringels manöver (PM) kan användas för att minska blödningen vid leverresektioner. Den del av levern som skall vara kvar efter operationen drabbas då av ischemi och reperfusionsskada (IRI). Om patienten har en kronisk leversjukdom eller endast en mindre del av levern lämnas kvar, kan IRI bidra till postoperativ livshotande leversvikt.

Bristen på syre medför anaerob glukosmetabolism med sänkta ATP-nivåer som följd. Vid reperfusionen bildas också fria radikaler som med hög affinitet binder till bland annat lipider, proteiner och DNA med struktur- och funktionsförändringar som följd.

Levern kan skyddas från IRI genom att PM utförs intermittent enligt principen 15 minuter ischemi och 5 minuter reperfusion (15/5). Man har också studerat så kallad ischemisk prekonditionering (IP), vilket innebär fem-tio minuters

ischemi följt av tio-femton minuters reperfusion innan kontinuerlig PM. Därutöver har också farmakologisk prekonditionering med antioxidanter (*radical scavengers*) visat intressanta resultat i djurexperimentella modeller. ASAT och ALAT i serum har använts som mått på IRI, men detta enzymläckage speglar endast en del av de cellulära processerna. Det förefaller logiskt att en välbevarad energimetabolism skulle skydda cellerna mot IRI, men det är föga känt hur IRI påverkar cellernas metabolism.

Den lokala glukosmetabolismen har tidigare varit svårstuderad, men med mikrodialysteknik kan denna kontinuerligt analyseras. Mikrodialystekniken kan liknas vid diffusionen som sker över kapillärväggen i all vävnad. En 0,9 mm tunn mikrodialyskateter förs in det parenkym man vill studera och dess yttre kanal perfunderas med en lösning som är isoton med kroppens interstitialväts-

ska. I kateterns spets finns ett semi-permeabelt membran där mindre molekyler kan diffundera drivna av osmotiska gradienter. Dialysatet återhämtas i den inre kanalen, varefter det uppsamlas i en 60 µl mikrovial och analyseras *bed-side*.

Det finns inga tillförlitliga metoder att kliniskt studera perfusionen i levern. Vid förändringar av de metabola ischemimarkörerna (glukos, laktat, glycerol och pyruvat) är det inte säkert att dessa förändringar beror på en försämrad vävnadsperfusion. En flödesmarkör vore därför önskvärd som kontroll av perfusionen visavi metabolismen. Om en molekyl tillsätts i mikrodialysperfusatet kommer den att diffundera till interstitialvätskan beroende av koncentrationsgradienten. Om genomblödningen i organet är god, minskar koncentrationsgradienten på grund av att ämnet transporteras bort av lokalt blodflöde. Låg vävnadsperfusion innebär således minskad diffusion och ett högt återtag i dialysatet. Etanol har tidigare använts men är metabolt aktivt.

Mål

- Att utveckla en experimentell grismodell för studier av segmentell hepatisk IRI.

FAKTARUTA

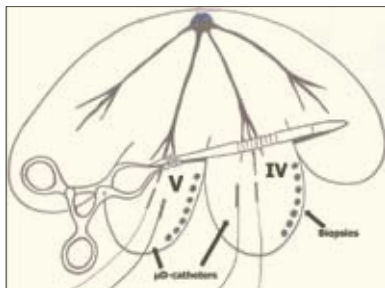
Avhandlingstitel	Microdialysis in Liver Ischemia and Reperfusion Injury
Respondent	Anders Winbladh
Institution	Institutionen för klinisk och experimentell medicin, Hälsouniversitetet, samt kirurgiska kliniken i Linköping.
Handledare	Per Sandström och Per Gullstrand
Opponent	Arthur Revhaug, Tromsø, Norge

- Att undersöka effekterna av IRI på leverns glukosmetabolism med hjälp av mikrodialysteknik.

Metod

Arbete I-III

En ny modell för segmentell hepatisk ischemi och reperfusion i gris utvecklades. Kärlförsörjningen till segment fyra stängdes efter 60 minuter, dvs. när ett metabolt steady state var uppnått. Segment fyra var ischemiskt under 80 minuter, medan de övriga leversegmenten förblev perfunderade. Reperfusionen följdes sedan i fyra (arbete I och II) respektive sex timmar (arbete III). Ischemin verifierades med laser Doppler flödesmetri. Blod- och vävnadsprover togs en gång i timmen. En eller två mikrodialyskatetrar med 30 mm långa membran och 20 kDalton porstorlek infördes centralt i segment fyra respektive segment fem samt subkutant. Mikrodialysat samlades var 20:e minut och perfusionshastigheten var 1.0 µl/minut.



Figur 1. Modell för segmentell IRI i gris lever. En eller två mikrodialys (µD) katetrar lades in i segment 4 och 5. Cirkulationen stängdes till segment 4 under 80 minuter. Biopsier togs varje timme.

Arbete II

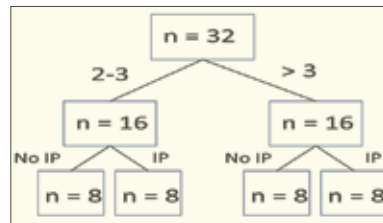
En av mikrodialyskatetrarna i segment fyra perfunderades med etanol (5 mM) och urea (20 mM) med perfusionshastigheten 2,0 µl/minut. Syftet var att värdera om de metabola förändringarna som detekteras under ischemi och reperfusion är flödesberoende.

Arbete III

N-Acetylcystein (NAC) är en antioxidant som kan binda fria syre och kväve radikaler. Nutritionella studier har dessutom visat att NAC förbättrar glukosmetabolismen och glykogeninlagringen i levern. Hälften av djuren (n= 8) behandlades med NAC intravenöst.

Arbete IV

Denna randomiserade singel-blindade kontrollerade kliniska studie inkluderade patienter som planerades för resektion av två eller fler leversegment. Patienterna stratifierades efter resektionens storlek (2-3 segment respektive > 3 segment). Hälften av patienterna i varje stratum randomiserades till IP (figur 2).



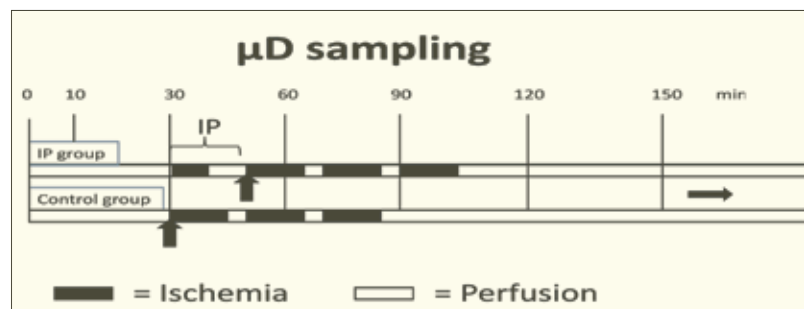
Figur 2. CONSORT diagram. Studiepopulationen bestod av 32 individer och när beslut tagits om resektionens storlek randomiserades patienterna (IP eller ingen IP).

Under operationen genomgick alla patienter intermitterant PM enligt 15/5 och IP-gruppen genomgick dessutom prekonditionering 10/10 före detta (figur 3).

Blodprover (laktat, ASAT, ALAT, Bilirubin, PK-INR, albumin, Hb och LPK) togs dagligen och blodglukos kontrollerades var fjärde timme.

Mikrodialyskatetrarna fördes in i den förväntat kvarvarande leverresten och katetrarna suturerades till Glissons kapsel med 4/0 absorberbar sutur. Katetrarna fästes sedan i hudplanet med tejp och mikropumparna förvarades i ett mjukt midjebälte.

Mikrodialysat insamlades var 30:e minut under operation och var fjärde timme på avdelningen. Dialysatet analyserades omedelbart bedside avseende nivåerna av laktat, glukos, glycerol och pyruvat. Katetrarna drogs på den fjärde postoperativa dagen (POD) 4.



Figur 3. Studieprotokoll i arbete IV. Mikrodialysat analyserades varje halvtimme perioperativt (på IVA varje timme och på avdelning var fjärde timme). Baselinje data analyserades efter 20 minuters insamlande av mikrodialysat (efter 10 minuters steady state). Episoder med Pringles manöver visas som svarta band. IP = ischemisk prekonditionering, µD = mikrodialys.

Statistiska metoder

Mikrodialysat och blodprover grupperades i faser (arbete II-IV), och analyserades med ANOVA inklusive post Hoc analyser om statistiskt signifikanta skillnader hittades.

Resultat

Arbete I

Glukosnivån steg 4-falt (p<0,01), laktat steg 3-falt, (p<0,001) och glycerol 4-falt (p<0,001), medan pyruvat föll till en tiondel av den preischemiska nivån (p<0,001) i det ischemiska segmentet under den ischemiska fasen. Inga sådana förändringar sågs i blodet, subkutant eller i det perfunderade segment 5.

Efter fyra timmars reperfusion hade infiltrationen av neutrofila granulocyter ökat i både det ischemiska och i det perfunderade segmentet.

Arbete II

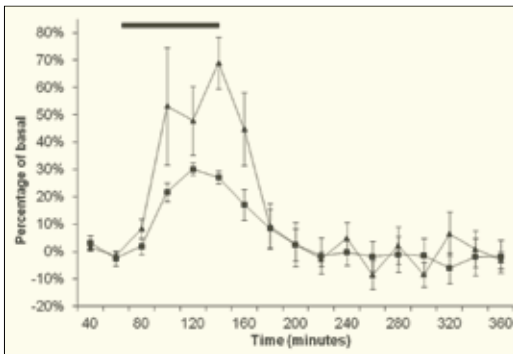
Under den ischemiska fasen steg nivåerna av både etanol och urea i mikrodialysatet och återvände sedan till nivåer likvärdiga med basalnivån under reperfusionen (figur 4).

Etanol och urea koncentrationerna i mikrodialysatet korrelerade med varandra under alla faserna (r=0,77).

Arbete III

Det sågs inga skillnader mellan grupperna avseende cirkulationsfysiologi (medelartär och centralvenöst tryck, puls, syrgasmättnad eller hemoglobinnivåer) eller de traditionella systemiska markörerna för ischemi och reperfusionsskada (ALAT, PK-INR, LDH och bilirubin) vid någon tidpunkt. Däremot var ASAT lägre under reperusionsfasen i NAC-gruppen (p=0,0099).

Nitrit och nitrat nivåerna var lägre i NAC- jämfört IR-gruppen.



Figur 4. Relativa förändringar i nivåerna av etanol (trianglar) och urea (fyrkanter) i mikrodialysat jämfört med perfusat. Den ischemiska fasen indikeras med den svarta linjen. Medel (SEM).

Detta fynd förklarades av att NAC bundit den fria kväve radikalen NO, vilket verifierades in vitro.

NAC förbättrade glukosmetabolismen i levern under reperfusionen med bland annat minskade laktatnivåer (figur 5) i det ischemiska segmentet och förhöjda ATP-nivåer i det perfunderade segmentet jämfört IR gruppen. Efter ischemi var levercellernas inlagring av glykogen ökad i både det perfunderade och ische-

miska segmentet (figur 6). Glukos och glycerolnivåerna steg under ischemi men det var ingen skillnad mellan grupperna.

Arbete IV

Alla randomiserade patienter fullföljde studien enligt *intention to treat* och det var ingen mortalitet inom studien.

Det fanns inga skillnader mellan IP gruppen (n=16) och kontrollerna (n=16)

eller mellan strata (2-3, respektive >3 segment) avseende demografiska data eller blodprover. De patienter som genomgått stora resektioner hade dock blött mer under transektionen, hade högre laktat i serum, PK-INR, längre operationstid och sjukhusvistelse. Komplikationer tillstötte hos tolv patienter (37,5 procent) och dessa skattades enligt Dindo-Clavien, men inga skillnader sågs mellan grupperna.

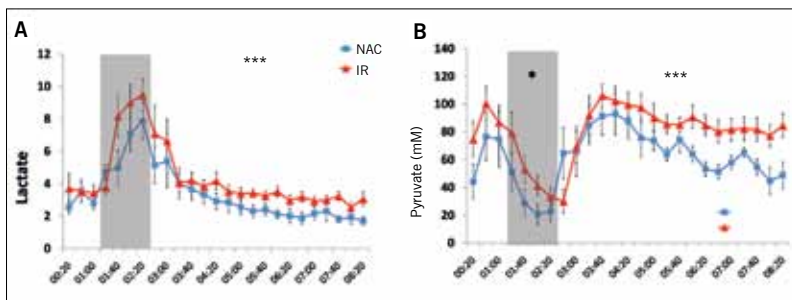
Efter operationen och till och med postoperativ dag 1 var nivåerna av glukos, pyruvat och laktat lägre i mikrodialysat hos de preconditionerade patienterna (n=16) jämfört med kontrollgruppen (n=16), se figur 7 a-c. Dessa skillnader försvann när man jämförde endast de som genomgått små resektioner, men persisterade när man jämförde IP-gruppen (n=8) med kontrollerna (n=8) efter stora resektioner.

Inga skillnader mellan grupperna kunde identifieras avseende glycerol i mikrodialysat. Vi jämförde också alla patienter som genomgått stora resektioner (n=16) med de som genomgått mindre (2-3 segment, n=16), men kunde inte finna några skillnader avseende glukosmetabolismen.

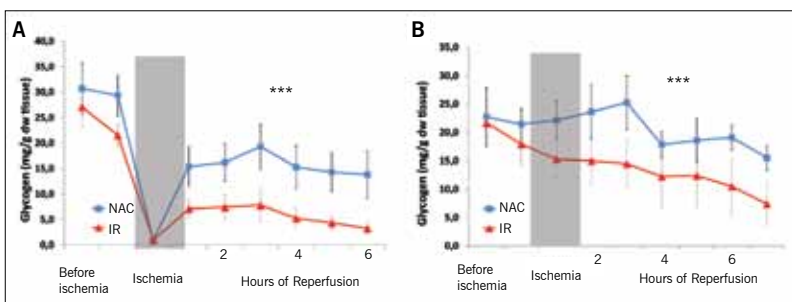
Konklusioner

De huvudsakliga fynden i denna avhandling är:

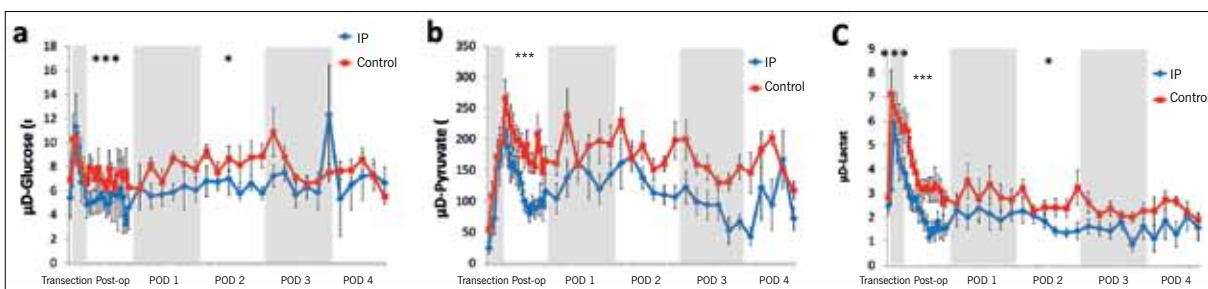
- Mikrodialys kan enkelt användas för att studera glukosmetabolismen i levern in vivo, både experimentellt och kliniskt.
- Glukosmetabolismen i en perfunderad del av levern påverkas ej av ischemi i en intelligande ischemiskt segment, och kan fungera som kontroll vid djurexperimentella IRI modeller.
- Urea (tillsatt i perfusatet vid mikrodialys) kan användas som flödesmarkör i levern.
- NAC förbättrar glykogenesen och minskar laktatnivåerna i levern efter IRI.
- Ischemisk preconditionering minskar de postoperative laktatnivåerna i levern efter större leverresektioner utförda med intermittant Pringles manöver.
- Under reperfusion i levern blir både perfunderade och ischemiska delar av levern infiltrerade av polymorf-nukleära granulocyter. ■



Figur 5. Nivåer av laktat (A) och pyruvat (B) i mikrodialysat. Skuggningen representerar den ischemiska fasen. Analys är gjord var 20:e minut. ANOVA. Medel (SEM). * = p < 0,05, *** = p < 0,001.



Figur 6. Glykogenivåerna i det ischemiska (A) och det perfunderade (B) segmentet. Åtta grisar behandlades med NAC och 8 hölls som kontroller (IR). ANOVA. Medel (SEM). *** = p < 0,001.



Figur 7. Glukos (a), pyruvat (b) och laktat (c) nivåerna i mikrodialysat (µM). IP-gruppen (n=16) och kontrollgruppen (n=16). De skuggade fälten separerar de faser som användes i ANOVAn och de signifikanta skillnader efter Tukey post hoc analys anges som: * = p < 0,05 and *** = p < 0,001. POD = Postoperativ dag.