

Sammanfattning av medicinsk avhandling:

Microdialysis in Liver Ischemia and Reperfusion Injury

Respondent: Anders Winblad

Handledare: Per Sandström och Per Gullstrand

Institutionen för klinisk och experimentell medicin, Hälsouniversitet, samt kirurgiska kliniken i Linköping.

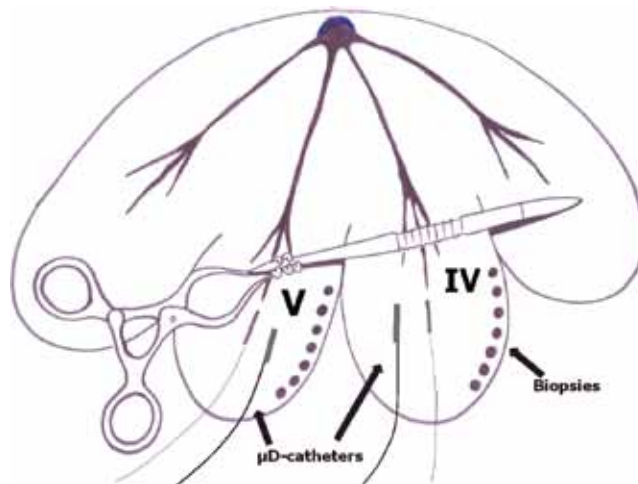
Opponent: Arthur Revhaug, Tromsø, Norge

Bakgrund

Pringles 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 preconditionering (IP), vilket innebär 5–10 minuters ischemi följt av 10–15 minuters reperfusion innan kontinuerlig PM. Därutöver har också farmakologisk preconditionering 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 mikrodiagnostik kan denna kontinuerligt analyseras. Mikrodiagnostik kan liknas vid diffusionen som sker över kapillärväggen i all vävnad. En 0,9 mm tunn mikrodiagnostisk kateter förs in i det parenkym man vill studera och dess yttre kanal perfunderas med en lösning som är isoton med kroppens interstitialvätska. I kateterspets finns ett semipermeabelt membran där mindre mole-



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

kyler kan diffundera drivna av osmotiska gradienter. Dialysatet återhämtas i den inre kanalen, varefter det uppsamlas i en 60 µl mikroviol 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 mikrodiagnostisk kateter kommer den att diffundera till interstitialvätskan beroende av koncentrationsgradienten. Om genombloodningen 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.

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

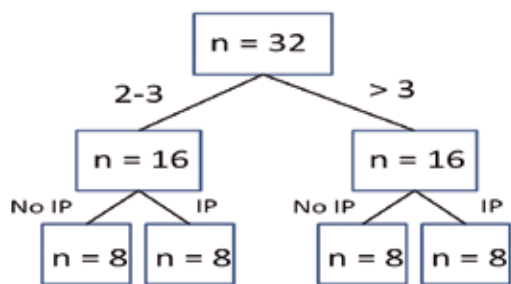
Metod

Arbete I–III:

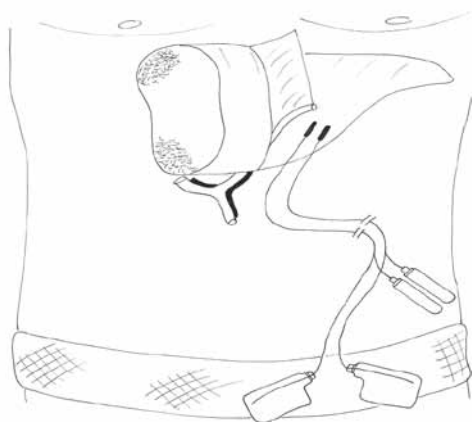
En ny modell för segmentell hepatisk ischemi och reperfusion i gris utvecklades. Kärlförsörjningen till segment 4 stängdes efter 60 minuter, dvs. när ett metabolt "steady state" var uppnått. Segment 4 var ischemiskt under 80 minuter, medan de övriga leversegmenten förblev perfunderade. Reperfusionen följdes sedan i 4 (arbete I och II) respektive 6 timmar (arbete III). Ischemin verifierades med laser Doppler flödesmetri. Blod- och vävnadsprover togs en gång i timmen. En eller två mikrodiagnostisk kateter med 30 mm långa membran och 20 kDalton porstorlek infördes centralt i segment 4 respektive segment 5 samt subkutant. Mikrodiagnostisk samlades var 20:e minut och perfusionshastigheten var 1,0 µl/minut.

Arbete II:

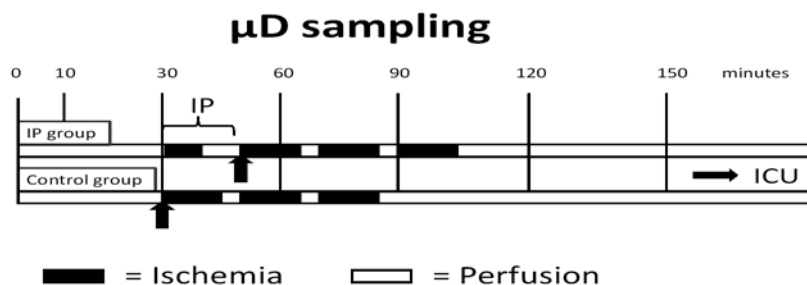
En av mikrodiagnostisk katetrarna i segment 4 →



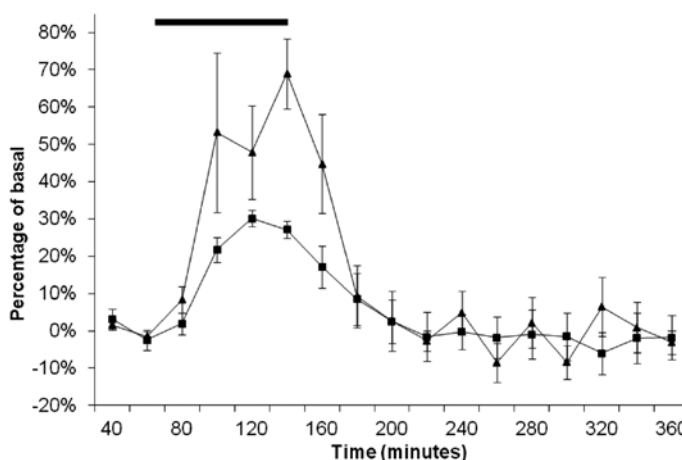
Figur 2. CONSORT-diagram. Studiepopulationen bestod av 32 individer och när beslut tagits om resektionens storlek randomiserades patienterna (IP eller ingen IP).



Figur 4. Mikrodialyskatetrarnas position i leverparenkymet och mikropumparna i midjebältet.



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



Figur 5. Relativa förändringar i nivåerna av etanol (trianglar) och urea (fyrkanter) i mikrodialysat jämfört perfusat. Den ischemiska fasen indikeras med den svarta linjen. Medel (SEM).

perfunderades med etanol (5 mM) och urea (20 mM) med perfusionshastigheten 2,0 µl/minut. Syftet var att värdera om de metaboliska förändringarna som detekteras under ischemi och reperfusion är flödesbetingade.

Arbete III:

N-Acetylcystein (NAC) är en antioxidant som kan binda fria syre- och kväveradikaler. 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 seg-

ment respektive > 3 segment). Hälften av patienterna i varje stratum randomiserades till IP (figur 2).

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

Bloodprover (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 (figur 4).

Mikrodialysat insamlades var 30:e minut under operation och var fjärde timme på avdelningen. Dialysatet analyserades ome-

delbart bed-side avseende nivåerna av laktat, glukos, glycerol och pyruvat. Katetrarna drogs på den fjärde postoperativa dagen (POD) 4.

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 4 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 mikro dialysatet och återvände sedan till nivåer likvärdiga med basalnivån under reperfusionen (figur 5). Etanol- and ureakoncentrationerna i mikro dialysatet 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 reperfusionskada (ALAT, PK-INR, LDH och bilirubin) vid någon tidpunkt. Däremot var ASAT lägre under reperfusionsfasen i NAC-gruppen ($p=0,0099$).

Nitrit- och nitratnivåerna var lägre i NAC- jämfört IR-gruppen. Detta fynd förklarades av att NAC bundit den fria kväveradikalen NO, vilket verifierades *in vitro*.

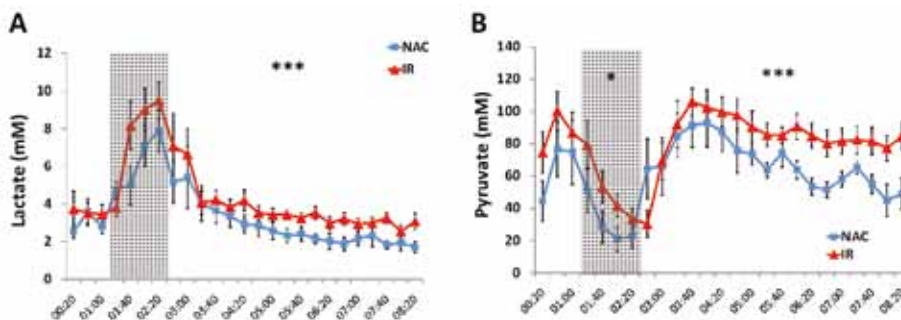
NAC förbättrade glukosmetabolismen i levern under reperfusionen med bland annat minskade laktatnivåer (figur 6) i det ischemiska segmentet och förhöjda ATP-nivåer i det perfunderade segmentet jämfört IR-gruppen. Efter ischemi var levercellernas inlagring av glykogen ökad i både det perfunderade och ischemiska segmentet (figur 7).

Glukos- och glycerolnivåerna steg under ischemi men det var ingen skillnad mellan grupperna.

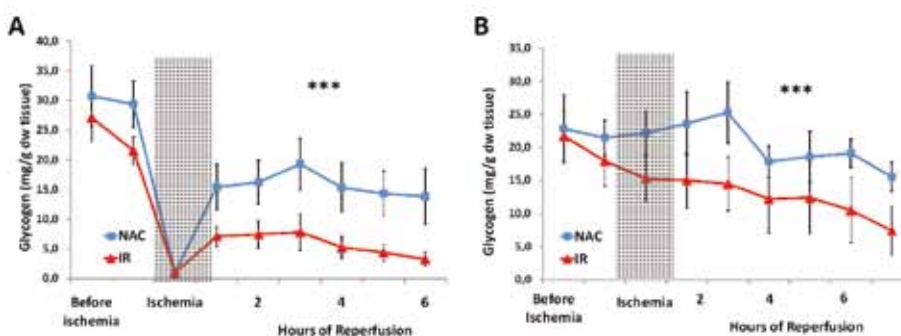
Arbete IV:

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 blödit mer under transektionen, hade högre laktat i serum, PK-INR, längre operationstid och sjukhusvistelse. Komplikationer tillstötte hos 12 patienter (37,5%) 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



Figur 6. Nivåer av laktat (A) och pyruvat (B) i mikro dialysat. Skuggningen representerar den ischemiska fasen. Analys är gjord var 20:e minut. ANOVA. Medel (SEM). *= $p<0,05$, ***= $p<0,001$.



Figur 7. Glykogennivåerna i det ischemiska (A) och det perfunderade (B) segmentet. Åtta grisar behandlades med NAC och 8 hölls som kontroller (IR). ANOVA. Medel (SEM). ***= $p<0,001$.

och laktat lägre i mikro dialysatet hos de pre-konditionerade patienterna ($n=16$) jämfört med kontrollgruppen ($n=16$). 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 mikro dialysat. Vi jämförde också alla patienter som genomgått stora resektioner ($n=16$) med dem som genomgått mindre (2-3 segment, $n=16$), men kunde inte finna några skillnader avseende glukosmetabolismen.

Konklusioner

De huvudsakliga fynden i denna avhandling är:

- Mikro dialys kan enkelt användas för att studera glukosmetabolismen i levern *in vivo*, både experimentellt och kliniskt.
- Glukosmetabolismen i en perfunderade del av levern påverkas ej av ischemi i en intilliggande ischemiskt segment, och kan fungera som kontroll vid djurexperimentella IRI-modeller.
- Urea (tillsatt i perfusatet vid mikro dialys) kan användas som flödesmarkör i levern.
- NAC förbättrar glykogenesen och minskar laktatnivåerna i levern efter IRI.

- Ischemisk pre-konditionering minskar de postoperative laktatnivåerna i levern efter större leverresektioner utförda med intermittenta Pringles manöver.
- Under reperfusion i levern blir både perfunderade och ischemiska delar av levern infiltrerade av polymorfnukleära granulocyter.

Delarbeten:

1. Winbladh A, Sandstrom P, Olsson H, Svanvik J, Gullstrand P. Segmental ischemia of the liver - microdialysis in a novel porcine model. *Eur Surg Res.* 2009;43(3):276-85.
2. Farnebo S, Winbladh A, Zettersten EK, Sandstrom P, Gullstrand P, Samuelsson A, et al. Urea clearance: a new technique based on microdialysis to assess liver blood flow studied in a pig model of ischemia/reperfusion. *Eur Surg Res.* 45(2):105-12.
3. Winbladh A, Bjornsson B, Trulsson L, Bojmar L, Sundqvist T, Gullstrand P, Sandstrom P. N-Acetylcysteine Improves Glycogenesis after Segmental Liver Ischemia and Reperfusion Injury in Pigs. Submitted to *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.
4. Winbladh A, Bjornsson B, Trulsson L, Offensbart K, Gullstrand P, Sandstrom P. Ischemic preconditioning prior to intermittent Pringle maneuver in liver resections. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* Jun 7. (published online)