

## Διερεύνηση της επιδράσεως της κυκλοσπορίνης επί της ηπατικής αναγεννήσεως (πειραματική μελέτη σε επίμυες)

### I. Φουζας

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Ιατρικό Τμήμα - Σχολή Επιστημών Υγείας, Χειρουργικός Τομέας, Χειρουργική Κλινική Μεταμοσχεύσεων

Η επίπτωση και ο μηχανισμός δράσης της κυκλοσπορίνης (cyclosporine, CsA) επί της αναγεννητικής ικανότητας του ήπατος δεν έχει διευκρινισθεί. Προηγούμενες μελέτες, στο πειραματικό πρότυπο της μερικής 2/3 ηπατεκτομής σε επίμυες [partial hepatectomy 2 / 3 (PH 2 / 3)], υποστηρίζουν την άποψη ότι η ηπατική αναγέννηση ελέγχεται από τους μηχανισμούς της ειδικής ανοσιακής απάντησης. Με βάση τα ανωτέρω, κρίθηκε σκόπιμο να διερευνηθεί η πιθανότητα ότι η CsA παρεμβαίνει στην ανοσιακή απάντηση έναντι του αναγεννώμενου ήπατος, μέσα από την επίδρασή της στην ικανότητα των ηπατοκυττάρων να λειτουργούν ως κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν αντιγόνα (antigen presenting cells, APCs). Μελετήθηκε : α) η επίπτωση της CsA στην ηπατική αναγέννηση, β) η επίπτωση της χορήγησης του SC-19220, αναστολέα του υποδοχέα EP1 της PGE2, στην επίδραση της CsA επάνω στην ηπατική αναγέννηση και γ) η επίπτωση της CsA στην έκφραση των τάξης I και II μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC), από τα ηπατοκύτταρα.

Η CsA (20 mg/Kgr, 4 ημέρες προεγχειρητικά και 1 ημέρα μετεγχειρητικά) προκάλεσε σημαντική αύξηση της ηπατικής αναγέννησης, 48 ώρες μετά από PH 2 / 3 σε επίμυες Wistar, όπως αποδείχθηκε από την αύξηση της σύνθεσης του DNA σε απομονωμένα αναγεννώμενα ηπατοκύτταρα ( $p<0.05$ ), με κυταρομετρία ροής, μετά από χορήγηση BrdUrd (2x50 mg tab, ΥΔ, στις 18 and 42 ώρες μετεγχειρητικά), καθώς και από την αύξηση των μιτώσεων / 50 οπτικά πεδία ( $p<0.05$ ), σε ιστολογικές τομές (AE x 400). Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι CsA αυξάνει την σύνθεση του DNA και στους εικονικά χειρουργηθέντες επίμυες ( $p<0.001$ ). χωρίς όμως διαπιστωθούν μιτώσεις στις πρώτες 48 ώρες μετά την επέμβαση.

Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του SC-19220 (5 mg bolus και 20 mg με οσμωτική μικρο-αντλία, επί 48 h), ανέστειλε, σε πολύ σημαντικό βαθμό, την αυξητική επίδραση της CsA στην σύνθεση

του DNA ( $p<0.001$ ), στον δείκτη σήμανσης ( $p<0.001$ ), καθώς και στον μιτωτικό δείκτη ( $p<0.01$ ).

Η μελέτη με κυταρομετρία ροής των απομονωμένων φυσιολογικών ηπατοκυττάρων έδειξε ότι παρουσιάζουν μέτριας έντασης έκφραση των μορίων τάξης I MHC και χαμηλής έντασης, αλλά σταθερή, έκφραση των μορίων τάξης II MHC. Η PH 2 / 3 προκάλεσε αύξηση της έκφρασης των τάξης I και II μορίων MHC από τα αναγεννώμενα ηπατοκύτταρα ( $p<0.01$ ), η οποία μειώθηκε από την ταυτόχρονη χορήγηση CsA ( $p<0.01$ ), χωρίς όμως να προκληθεί σημαντική αύξηση της σύνθεσης του DNA ( $p>0.05$ ).

Η PH 2 / 3 προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της SGOT ( $p<0.001$ ), η οποία μειώθηκε από την χορήγηση της CsA ( $p<0.05$ ). Η PH 2 / 3 προκάλεσε, επίσης, αύξηση των επιπέδων της αλκαλικής φωσφατάσης ( $p<0.01$ ), της ουρίας ( $p<0.01$ ) και της κρεατινίνης ( $p<0.001$ ), τα οποία αυξήθηκαν περαιτέρω από την χορήγηση της CsA. Τα επίπεδα της ολικής χολερυθρίνης δεν επηρεάστηκαν από την PH 2 / 3, την PH 2 / 3 ή τον SC-19220. Η χορήγηση της CsA προκάλεσε πολύ σημαντική αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης ( $p<0.001$ ) στους εικονικά χειρουργηθέντες επίμυες.

Τελικά, η αυξητική επίδραση της CsA στην ηπατική αναγέννηση είναι έμμεση και μπορεί να αποδοθεί σε αύξηση της σύνθεσης της PGE2, μέσω της δράσης της στον υποδοχέα EP1. Η CsA μειώνει επίσης την αντιγονικότητα του αναγεννώμενου ήπατος, αναστέλλοντας την έκφραση των τάξης I και II μορίων MHC, από τα αναγεννώμενα ηπατοκύτταρα, αν και η δράση της αυτή δεν έχει επίπτωση στην σύνθεση του DNA. Από το εύρημα αυτό συνάγεται ότι στις 48 ώρες μετά τη μερική 2 / 3 ηπατεκτομή δεν έχει ακόμη εκδηλωθεί η ανασταλτική επίδραση του ανοσιακού συστήματος και κατά συνέπεια η αναστολή της από την CsA δεν θα μπορούσε να έχει θετική επίδραση στην ηπατική αναγέννηση. Η άποψη αυτή υποστηρίζεται και από την έλλειψη ενδολοβιακής ή πυλαίας διήθησης από λεμφοκύττα-

ρα ή άλλα φλεγμονώδη κύτταρα στα ιστολογικά παρασκευάσματα, 48 ώρες μετά την PH 2 / 3. Επιπλέον, η CsA επέφερε σημαντική μείωση της δραστικότητας της SGOT και κατά συνέπεια προφύλαξε το αναγεννώμενο ηπατικό κολόβωμα από την ηπατοκυτταρική βλάβη μετά από μερική 2 / 3 ηπατεκτομή.

## THESIS

**Fouzas I. Studies on the mechanism of action of cyclosporine on liver regeneration after 2/3 partial hepatectomy in rats.** Hippokratia 1999, 3(2): 86-87

The effect and the precise mechanism of action of cyclosporine (CsA) on the regenerative capacity of the liver has not been elucidated. Previous findings in the experimental model of 2 / 3 partial hepatectomy (PH 2 / 3), in the rat, support the theory that liver regeneration is controlled by specific immune mechanisms. Therefore, we considered worthwhile to dissect the possibility that CsA intervenes in the immune reaction to the regenerating liver through its influence to hepatocytes as antigen presenting cells (APCs), by studying a) the effect of CsA on liver regeneration, b) the effect of SC-19220 on the influence of CsA on liver regeneration and c) the expression of class I and II MHC molecules on regenerating hepatocytes.

CsA (20 mg/Kgr, 4 days pre-op and 1 day post-op) augmented liver regeneration, 48h after PH 2 / 3, in wistar rats. This was proved by the increase of DNA synthesis in isolated hepatocytes ( $p<0.05$ ), by flow cytometry after BrdUrd administration (2x50 mg tab, SC, at 18 and 42 h post-op), as well as of the number of mitosing hepatocytes / 50 HPFs ( $p<0.05$ ). Moreover, it was found that CsA increases DNA synthesis in the sham operated animals ( $p<0.001$ ), although there were no mitoses in the first 48 h post-op.

The IP administration of SC-19220 (5 mg

bolus and 20 mg by an osmotic minipump for 48 h), inhibited, very significantly, the augmenting action of CsA on DNA synthesis ( $p<0.001$ ), labeling index ( $p<0.001$ ) and number of mitosing hepatocytes / 50 HPFs ( $p<0.01$ ).

Flow cytometry analysis of the isolated normal rat hepatocytes showed medium grade expression of class I and very low but detectable expression of class II MHC molecules. PH 2 / 3 induced the expression of class I and II MHCs by the regenerating hepatocytes ( $p<0.01$ ) and this was reduced by CsA ( $p<0.01$ ), although there was only a small, not significant, increase in DNA synthesis ( $p>0.05$ ).

PH 2 / 3 induced the levels of SGOT ( $p<0.001$ ) which were reduced by CsA ( $p<0.05$ ). PH 2 / 3 increased the levels of alkaline phosphatase ( $p<0.01$ ), blood urea nitrogen (BUN) ( $p<0.01$ ) and serum creatinine (Scr) ( $p<0.001$ ) and they were increased further by the administration of CsA. Total bilirubin levels were not affected by 2 / 3 partial hepatectomy, CsA or SC-19220. The administration of CsA increased, very significantly, the levels of glucose in the sham operated rats ( $p<0.001$ ).

In conclusion, the augmenting action of CsA on hepatocyte proliferation is indirect and can be attributed to an increase of PGE2 synthesis, through its action on EP1 receptor. CsA reduces, also, the immunogenicity of the regenerating liver by inhibiting the expression of class I and II MHCs by the regenerating hepatocytes, although this had no effect on DNA synthesis. At 48 hours after partial hepatectomy, it was probably too early for the cytotoxic immune response to have any impact on liver regeneration and its inhibition by CsA could not have any augmentive effect. This is supported by the fact that light microscopy showed no inflammatory infiltrate or necrosis in the liver lobules and portal tracts of the hepatectomized animals. The reduction of the levels of SGOT after PH 2 / 3 can be considered as an additional protective influence of CsA on the liver remnant.