



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ
ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΙΔΗΡΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΜΕ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗ ΛΙΠΟΦΙΛΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΗΠΑΤΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΑΠΟ ΙΣΧΑΙΜΙΑ-
ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ

Πειραματική μελέτη

ΑΘΗΝΑ Γ. ΜΑΝΤΕΛΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΟΥ ΣΙΔΗΡΟΥ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ
ΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΣΙΔΗΡΟΔΕΣΜΕΥΤΙΚΩΝ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΜΕ
ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΗ ΛΙΠΟΦΙΛΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΗΠΑΤΙΚΗ ΒΛΑΒΗ ΑΠΟ ΙΣΧΑΙΜΙΑ-
ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗ**

Πειραματική μελέτη

ΑΘΗΝΑ Γ. ΜΑΝΤΕΛΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Μαντέλου Αθηνάς: 15/10/2013

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 757α/19-12-2013

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Γκλαντζούνης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γαλάρης Δημήτριος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κάτσιος Χρήστος, Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 30-01-2014

«Μελέτη του ρόλου του σιδήρου και αξιολόγηση της προστατευτικής ικανότητας σιδηροδεσμευτικών σκευασμάτων με διαφορετική λιποφιλικότητα στην ηπατική βλάβη από ισχαιμία-επαναιμάτωση. Πειραματική μελέτη»

Ανασυγκρότηση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Γ.Σ. αριθμ. 1147^α/13-5-2025

Επιβλέπων:

Γκλαντζούνης Γεώργιος, Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Γαλάρης Δημήτριος, Ομότιμος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γούσια Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 1149α/10-06-2025

1. Γκλαντζούνης Γεώργιος, Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Γαλάρης Δημήτριος, Ομότιμος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Γούσια Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Βλάχος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Χριστοδούλου Δημήτριος, Καθηγητής Γαστρεντερολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Μπαρμπούτη Αλεξάνδρα, Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Λώλης Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 07-07-2025

Ιωάννινα 14-11-2025

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Σπυρίδων Κονιτσιώτης

Καθηγητής Νευρολογίας



Η Αναπληρώτρια Γραμματέας του Τμήματος

Ιωάννα Ντούβλη

*Στην οικογένειά μου και στους φίλους
που με στήριξαν*

*Ψαρεύοντας έρχεται η θάλασσα
κι είναι στη μυρωδιά της μέσα που το ψάρι
αστράφτει
μάταια μην ψάχνεις
κάπου ανάμεσα Τρίτη και Τετάρτη
πρέπει να παράπεσε η αληθινή σου μέρα
Οδυσσέας Ελύτης-«Μαρία Νεφέλη»*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ερευνητικό και Πειραματικό Κέντρο της ELPEN στην Αθήνα. Άμεσος επιβλέπων ήταν ο Καθηγητής κ. Γεώργιος Γκλαντζούνης, τον οποίο ευχαριστώ για την πρακτική και ηθική υποστήριξη, τις εύστοχες υποδείξεις και την ακούραστη καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την διάρκεια εκπόνησης της εργασίας αυτής. Υπήρξε πολύτιμος σύμβουλος και αρωγός, παρέχοντας μου όλα εκείνα τα απαραίτητα εφόδια και γνώσεις που οδήγησαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Δημήτριο Γαλάρη για την έμπνευση, τις πολύτιμες συμβουλές και το αμείωτο ενδιαφέρον του για την εξέλιξη της έρευνας. Ακόμη, ευχαριστώ την Καθηγήτρια Άννα Γούσια και την Επίκουρη Καθηγήτρια Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάη για την άψογη συνεργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Βιολόγο, υποψήφια τότε και πλέον Διδάκτορα του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων Παρασκευή Γερογιάννη για την απλόχερη υποστήριξη της στην εκτέλεση του in vitro μέρους του πειράματος. Θα ήθελα, ακόμη, να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη, τον Επίκουρο Καθηγητή Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημίου Αθηνών Στέλιο Κόκκορη και τον Επίκουρο Καθηγητή Χειρουργικής του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης Γεώργιο Παππά-Γώγο για την πολύτιμη βοήθειά τους στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και την ανάλυση της έρευνας, αλλά κυρίως για την άψογη και φιλική συνεργασία που είχαμε. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο του πειραματικού εργαστηρίου της ELPEN Απόστολο Παπαλόη για την υποτροφία για τη διεξαγωγή της έρευνας στο εργαστήριο και τα μέλη της ομάδας του πειραματικού εργαστηρίου της ELPEN για τη συνεργασία που είχαμε αυτό το διάστημα, για τη βοήθειά τους στην αντιμετώπιση προβλημάτων που παρουσιάστηκαν και το όμορφο κλίμα που δημιουργούσαν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου, τον αδελφό μου, τα ξαδέρφια μου, Κωστή και Δήμητρα και τους πολύτιμους φίλους μου για την ηθική και πρακτική υποστήριξη που μου παρείχαν, καθώς και για τη διαρκή ενθάρρυνση χωρίς την οποία δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

■ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	14
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
A.1. Ισχαιμία-επαναιμάτωση (I/R).....	17
A.2. Οξυγόνο και τοξικότητα	20
A.2.1. Εξέλιξη και αμυντικοί μηχανισμοί	21
A.2.2. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (ΔΜΟ) και ελεύθερες ρίζες.....	22
A.2.3. Παραγωγή και εξάλειψη ΔΜΟ in vivo	24
A.2.4. Οξειδωτικό στρες	28
A.3. Ο ρόλος του σιδήρου	
A.3.1. Ο μεταβολισμός του σιδήρου	30
A.3.2. Σίδηρος και ΔΜΟ	31
A.3.3. Σίδηρος, ΔΜΟ και λειτουργία του ήπατος	32
A.4. Χειρουργική ήπατος	
A.4.1. Ιστορική αναδρομή	34
A.4.2. Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης	37
A.4.3. Ισχαιμία-επαναιμάτωση του ήπατος	38
A.4.4. Σίδηρος και ηπατική βλάβη από I/R	40
A.4.5. Σιδηροδεσμευτικές ενώσεις	42
Σκοπός της μελέτης	45
B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	46
B.1. Πείραμα in vitro	
B.1.1. Εισαγωγή	47

B.1.2. Υλικά	49
B.1.3. Μέθοδοι	50
i. Διατήρηση κυτταρικών σειρών	50
ii. Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας	50
iii. Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων	51
iv. Επώαση των κυττάρων	51
v. Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Single Cell Gel Electrophoresis ή Comet assay)	52
vi. Πειραματική διαδικασία	53
vii. Οπτική παρατήρηση και αξιολόγηση των σχάσεων	54
viii. Εκτίμηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασταθούς σιδήρου ...	55
B.1.4. Αποτελέσματα	
i. Προστασία έναντι της οξειδωτικής βλάβης του πυρηνικού DNA	56
ii. Δέσμευση της ενδοκυττάριας δεξαμενής ασταθούς σιδήρου	59
B.1.5. Συζήτηση	60
B.2. Πείραμα in vivo	
B.2.1. Εισαγωγή	62
B.2.2. Υλικά	69
B.2.3. Μέθοδοι	70
i. Τόπος διεξαγωγής-Άδεια πειραματισμού	70
ii. Ζωικό πρότυπο	70
iii. Επιλογή ζωικού προτύπου και κριτήρια σχεδιασμού αναισθησιολογικού και χειρουργικού πρωτοκόλλου	70
iv. Πιλοτική εφαρμογή πρωτοκόλλου αναισθησίας	71

v. Πρωτόκολλο αναισθησίας	72
vi. Πρωτόκολλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης ήπατος	74
vii. Πειραματικό πρωτόκολλο και ομάδες	75
viii. Ανάλυση βασικών παραμέτρων	76
ix. Μέτρηση βιοχημικών παραμέτρων ηπατικής βλάβης	76
x. Ιστοπαθολογική εξέταση	77
xi. Στατιστική ανάλυση	77
B.2.4 Τροποποίηση πειραματικού πρωτοκόλλου	78
B.2.5. Αποτελέσματα	
i. Χαρακτηριστικά των ζώων πριν την έναρξη του πειράματος	80
ii. Παρακολούθηση κατά τη διάρκεια του πειράματος	80
iii. Παράμετροι ηπατοκυτταρικής βλάβης	83
iv. Ιστολογικά ευρήματα	88
B.2.6. Συζήτηση	92
B.3. Πείραμα ex vivo	
B.3.1. Εισαγωγή	94
B.3.2. Μέθοδοι	95
i. Πρωτόκολλο λήψης μοσχεύματος, κρυοσυντήρησης και υπο-νορμοθερμικής μηχανικής κυκλοφορίας	96
ii. Πειραματικό πρωτόκολλο και ομάδες	97
iii. Μέτρηση βιοχημικών παραμέτρων ηπατικής βλάβης	98
iv. Ιστολογική εξέταση	98
v. Στατιστική ανάλυση	98

Β.3.3. Αποτελέσματα	99
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	101
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	109
SUMMARY	111
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ-ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ	114
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	115

▪ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

I/R	Ισχαιμία και επαναιμάτωση-Ischemia and reperfusion
ΔΜΟ	Δραστικές Μορφές Οξυγόνου-Reactive Oxygen Species-ROS
O₂^{•-}	Ανιόν του σουπεροξειδίου
H₂O₂	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
Fe⁺²	Ανηγμένη μορφή σιδήρου, ελεύθερος, ασταθής, οξειδοαναγωγικά ενεργός ή δεσμεύσιμος σίδηρος
Fe⁺³	Οξειδωμένη μορφή σιδήρου, οξειδοαναγωγικά αδρανής ή μη δεσμεύσιμος σίδηρος
LIP	Labile iron pool-Δεξαμενή ασταθούς σιδήρου
DFO	Δεσφериοξαμίνη-desferrioxamine
DFP	Δεφεριπρόνη-deferiprone
DFX	Δεφερασιρόξη-deferasirox
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη-adenosine triphosphate
SODs	Δισμουτάσες του υπεροξειδίου του υδρογόνου-superoxide dismutases
CATs	Καταλάσες-Catalases
GPx	Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης
Prx	Περοξυρεδοξίνες
HepG2	Human hepatocellular liver carcinoma cell line
GO	Οξειδάση της γλυκόζης-glucose oxidase
ALT	Αμινοτρανσφεράση της αλανίνης
AST	Ασπαρτική αμινοτρανσφεράση
ALP	Αλκαλική φωσφατάση
γGT	γ-γλουταμύλοτρανσφεράση

A

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A.1. Ισχαιμία- επαναιμάτωση

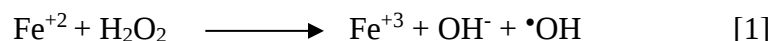
Το φαινόμενο της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης (Ischemia and Reperfusion-I/R) έχει απασχολήσει για πολλές δεκαετίες την επιστημονική κοινότητα καθώς συναντάται σε πολλές κλινικές καταστάσεις. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, η αιμορραγική καταπληξία, οι ηπατεκτομές, η καρδιακή ανακοπή και το τραύμα είναι όλες καταστάσεις στις οποίες η μερική ή ολική ισχαιμία ενός ιστού ή οργάνου ακολουθείται από αποκατάσταση της αιματικής ροής (επαναιμάτωση). Το ίδιο φαινόμενο συναντάται στη μεταμόσχευση συμπαγών οργάνων και στις καρδιοχειρουργικές επεμβάσεις, όπου χρησιμοποιείται εξωσωματική κυκλοφορία χαμηλής ροής. Παρόλο που η επαναιμάτωση είναι ζωτικής σημασίας για τη διάσωση ενός ιστού, οδηγεί ταυτόχρονα σε επιδείνωση της ιστικής βλάβης που έχει προκύψει από την ισχαιμία και σχετίζεται με αύξηση της νοσηρότητας και της θνητότητας. Οι μηχανισμοί βλάβης είναι παρόμοιοι σε όλες τις παραπάνω καταστάσεις, όμως υπάρχουν διαφορετικές κλινικές επιπτώσεις μεταξύ της συστηματικής επαναιμάτωσης μετά από καρδιακή ανακοπή ή αιμορραγική καταπληξία και της επαναιμάτωσης ενός μόνο οργάνου. Αξίζει να σημειωθεί πως ακόμη και στην επαναιμάτωση ενός μόνο οργάνου, η φλεγμονώδης αντίδραση μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια και άλλων απομακρυσμένων οργάνων. Και στις δύο περιπτώσεις η βλάβη που προκύπτει μετά την επαναιμάτωση εξαρτάται από τη διάρκεια και την έκταση της ισχαιμίας (1).

Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας οι ιστοί στερούνται της απαραίτητης παροχής οξυγόνου και οδηγούνται σε αναερόβια παραγωγή ενέργειας. Κατά την επαναιμάτωση και επανοξυγόνωση των ιστών αποκαθίσταται η αερόβια παραγωγή ενέργειας, αλλά παράλληλα τα κύτταρα εκτίθενται αιφνίδια σε αυξημένες συγκεντρώσεις οξειδωτικών παραγόντων που προκαλούν βλάβες σε δομικά και λειτουργικά συστατικά τους (2). Στη βλάβη από I/R συμμετέχουν πολλοί μηχανισμοί, ενώ η έρευνα για την πληρέστερη περιγραφή τους συνεχίζεται. Παρ' όλα αυτά, η έκρηξη παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ)-(Reactive Oxygen Species-ROS) που συμβαίνει κατά τη διάρκεια των πρώτων λίγων λεπτών της επαναιμάτωσης με την επανείσοδο του οξυγόνου σε έναν προηγουμένως ισχαιμικό (υποξικό) ιστό αναγνωρίζεται στη βιβλιογραφία ως η βασική αιτία πρόκλησης κυτταρικής βλάβης, αλλά και πυροδότησης πολλών μηχανισμών που συμμετέχουν στην βλάβη τις επόμενες ώρες ή ημέρες (3,4).

Οι ΔΜΟ προέρχονται από το οξυγόνο και είναι μόρια πιο δραστικά από το οξυγόνο. Σχηματίζονται από την μερική αναγωγή του O_2 με ένα ηλεκτρόνιο κάθε φορά μέχρι τον τελικό σχηματισμού νερού (H_2O) και οι ενδιάμεσες ΔΜΟ χαρακτηρίζονται από διαφορετική δραστηριότητα. Η μερική αναγωγή του οξυγόνου και ο σχηματισμός ΔΜΟ είναι μία συνεχής και αναπόφευκτη διαδικασία που λαμβάνει χώρα υπό φυσιολογικές συνθήκες κατά τον αερόβιο μεταβολισμό (5,6). Η συγκέντρωση αυτών των ΔΜΟ ρυθμίζεται από εξειδικευμένα ένζυμα και έτσι, παρά τη συνεχόμενη παραγωγή τους, τα επίπεδα τους παραμένουν ελεγχόμενα. Οι ενδιάμεσες αυτές μορφές του O_2 δεν αποτελούν απλά απόβλητα του αερόβιου μηχανισμού, καθώς ορισμένες από αυτές συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σημάτων που ρυθμίζουν ζωτικές βιολογικές διεργασίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η μετανάστευση. Όταν όμως η παραγωγή τους αυξηθεί σε επίπεδα όπου οι δυνατότητες του ρυθμιστικού ενζυμικού συστήματος υπερκεραστούν, τότε προκύπτει οξειδωτικό στρες που οδηγεί σε κυτταρική βλάβη (5,7).

Το επίκεντρο της παραγωγής ΔΜΟ της στιγμή της επαναιμάτωσης και τα πρώτα λεπτά μετά από αυτή είναι τα μιτοχόνδρια (8,9). Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει πως η αυξημένη αυτή παραγωγή δεν είναι αποτέλεσμα μιας μη ειδικής διαταραχής της λειτουργίας της αναπνευστικής αλυσίδας, αλλά προκύπτει από συσσώρευση συγκεκριμένων μεταβολιτών του κύκλου του κιτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και συγκεκριμένα του σουκινικού ή ηλεκτρικού οξέος (succinate), το οποίο οξειδώνεται ταχέως με την επανοξυγόνωση οδηγώντας σε αυξημένη και αιφνίδια παραγωγή ΔΜΟ (10).

Το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$) και το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) είναι οι δύο πρώτες ΔΜΟ που προκύπτουν διαδοχικά από την αναγωγή του O_2 με ένα και δύο ηλεκτρόνια, αντίστοιχα. Καμία από τις δύο δεν είναι αρκετά δραστική ώστε να οδηγήσει σε οξείδωση βασικών κυτταρικών μακρομορίων, όπως τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και οι υδατάνθρακες. Ωστόσο, όταν στο περιβάλλον του H_2O_2 υπάρξει οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (Fe^{+2}), ο τελευταίος καταλύει την αναγωγή του H_2O_2 σε ρίζα του υδροξυλίου ($\bullet OH$), διαμέσου της αντίδρασης Fenton (Αντίδραση [1]).



Η $\bullet OH$ είναι μια εξαιρετικά δραστική μορφή οξυγόνου που μπορεί να οξειδώσει ουσιαστικά οποιαδήποτε χημική ομάδα βρίσκεται στο άμεσο περιβάλλον της. Έτσι τα κύτταρα, εκτός από τα ενζυμικά συστήματα που ρυθμίζουν τα επίπεδα των ΔΜΟ, προλαμβάνουν τη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών μορφών οξυγόνου φροντίζοντας ο σίδηρος να παραμένει στην αδρανή

μορφή του (Fe^{+3}) δεσμευμένος σε ενεργά κέντρα πρωτεϊνών ή αποθηκευμένος στη φερριτίνη. Στα κύτταρα υπάρχει, ωστόσο, μικρή ποσότητα ελεύθερου (οξειδοαναγωγικά ενεργού) σιδήρου (Fe^{+2}), που ονομάζεται δεξαμενή ασταθούς σιδήρου (Labile Iron Pool-LIP). Ο ελεύθερος αυτός σίδηρος, υπό φυσιολογικές συνθήκες, παραμένει περιορισμένος σε κυτταρικά διαμερίσματα, ώστε να μην είναι προσβάσιμος ως καταλύτης (7).

Χαρακτηριστική ιδιότητα του ασταθούς (ελεύθερου) σιδήρου είναι πως μπορεί να δεσμευτεί από σιδηροδεσμευτικές ενώσεις. Η δυνατότητα δέσμευσής του από τέτοιες ενώσεις έχει προσφέρει εδώ και τουλάχιστον τέσσερις δεκαετίες καλύτερη επιβίωση σε ασθενείς με υπερσιδήρωση λόγω ανάγκης συχνών μεταγγίσεων στα πλαίσια συγγενούς αναιμίας. Η καταλυτική συμμετοχή του ελεύθερου σιδήρου στο σχηματισμό εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών από H_2O_2 και οργανικά υπεροξειδία, οδήγησε στην υπόθεση πως η χρήση σιδηροδεσμευτικών παραγόντων θα μπορούσε να μειώσει την παραγωγή αυτών των ριζών και συνεπώς την οξειδωτική βλάβη (7,8).

Διάφορες σιδηροδεσμευτικές ενώσεις έχουν ελεγχθεί τις τελευταίες δεκαετίες για την προστασία που προσφέρουν έναντι της κυτταρικής βλάβης σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (oxidative stress) σε in vitro πειράματα (11–14) και της βλάβης από I/R σε in vivo πειράματα (15–23). Στην κλινική πράξη και σε καταστάσεις υπερσιδήρωσης χρησιμοποιείται κυρίως η δεσφερριοξαμίνη (desferrioxamine-DFO) και ακολουθούν η δεφεριπρόνη (deferiprone-DFP) και η δεφερασιρόξη (deferasirox-DFX) (7). Η DFO είναι υδρόφιλο μόριο και ως εκ τούτου είναι απαραίτητη η χορήγηση της παρεντερικά, καθώς δεν διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες και δεν απορροφάται από το ενδοθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα. Η DFP και η DFX είναι λιπόφιλα μόρια και χορηγούνται από το στόμα. Από την άλλη πλευρά η DFO σχηματίζει ισχυρούς δεσμούς με το σίδηρο, εμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδρασή του με υπεροξειδία στο περιβάλλον του, ενώ για τη DFP και τη DFX οι δεσμοί αυτοί δεν είναι ισχυροί και απαιτούνται περισσότερα του ενός μόρια των ενώσεων αυτών για την «θωράκιση» ενός ατόμου σιδήρου (7,24).

Η παρούσα έρευνα βασίστηκε στην υπόθεση πως η συνδυασμένη χορήγηση μιας υδρόφιλης σιδηροδεσμευτικής ένωσης που σχηματίζει σταθερούς δεσμούς με τον Fe^{+2} και μιας λιπόφιλης ένωσης που διαπερνά ευχερώς την κυτταρική μεμβράνη θα προσφέρει καλύτερη προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες που προκύπτει κατά την επαναιμάτωση. Έχει ήδη περιγραφεί σε in vitro πειράματα πως ουσίες που διαθέτουν τις δύο παραπάνω ιδιότητες διαθέτουν και ισχυρότερη προστατευτική ικανότητα (25,26). Στις επόμενες παραγράφους ακολουθεί

ανάλυση όλων των παραπάνω όρων, συμπεριλαμβάνοντας ιστορικούς σταθμούς που συνέβαλλαν στην εξέλιξη και καλύτερη κατανόηση τους.

A.2. Οξυγόνο και τοξικότητα

Το 1772 και 1774 οι Carl Wilhelm Scheele και Joseph Priestley, αντίστοιχα, περιέγραψαν το αέριο που ένα χρόνο αργότερα, το 1775, ο Antoine-Laurent Lavoisier, αναπαράγοντας το πείραμα του Priestley, θα ονόμαζε «οξυγόνο» (οξύ+γεννώ), καθώς είχε παρατηρήσει τη δημιουργία οξέων όταν το έφερνε σε επαφή με διαφορετικές ουσίες και συμπέρανε πως το οξυγόνο αποτελεί συστατικό όλων των οξέων. Και οι τρεις παραπάνω επιστήμονες παρήγαγαν οξυγόνο από τη θερμική αποσύνθεση οξειδίου του υδραργύρου. Ο Scheele περιέγραψε πως το παραγόμενο αέριο έκανε τη φλόγα ενός κεριού να καίει πιο έντονα και το ονόμασε «αέρα της φωτιάς» (“fire-air”). Ο Priestley παρατήρησε επιπλέον πως ένα ποντίκι επιβίωνε για περισσότερο χρόνο σε ένα σφραγισμένο δοχείο που περιείχε το νέο αέριο, σε σύγκριση με ένα δοχείο που περιείχε κοινό αέρα και ονόμασε το νέο αέριο «αποφλογισμένο αέρα», βασισμένος στη θεωρία του «φλόγιστρου», η οποία υποστήριζε πως όλα τα καύσιμα υλικά περιέχουν το συστατικό «φλόγιστρο», το οποίο κατά τη θέρμανση του υλικού μετατρέπεται σε φωτιά. Ο Lavoisier ήταν αυτός που αναγνώρισε το οξυγόνο ως το συστατικό του αέρα που παίρνει μέρος στην καύση/ανάφλεξη και καταναλώνεται.

Ο Priestley ήταν ακόμη από τους πρώτους επιστήμονες που υπέθεσαν πως το οξυγόνο μπορεί, εκτός από ευεργετικές, να έχει και βλαπτικές επιδράσεις σε ζωντανούς οργανισμούς. Συγκεκριμένα, έγραψε: «παρόλο που ο καθαρός αποφλογισμένος αέρας [οξυγόνο] μπορεί να φανεί χρήσιμος ως φάρμακο [για νοσούντες], μπορεί να μην είναι κατάλληλο για εμάς στη συνήθη υγιή κατάσταση του σώματος· καθώς, όπως ένα καιγόμενο κερί εξαντλείται πολύ πιο γρήγορα μέσα σε αποφλογισμένο αέρα απ’ ότι σε κοινό αέρα, έτσι κι εμείς, μπορεί κανείς να πει, πεθαίνουμε πιο γρήγορα, και οι δυνάμεις των ζώων εξαντλούνται γρήγορα μέσα σε αυτό το καθαρό είδος αέρα» (27).

Έναν αιώνα περίπου αργότερα, το 1878, ο Γάλλος φυσιολόγος Paul Bert έδειξε πως το οξυγόνο σε πιέσεις πολλαπλάσιες της ατμοσφαιρικής ήταν εξαιρετικά τοξικό για τους ζωντανούς οργανισμούς. Πτηνά (κορυδαλλοί) που εκτίθονταν σε πιέσεις 15-20 ατμοσφαιρών αέρα παρουσίαζαν επιληπτικούς σπασμούς και πέθαιναν. Με μία σειρά πειραμάτων έδειξε πως η πίεση του αέρα ή οποιουδήποτε μίγματος αζώτου και οξυγόνου, και συνεπώς η μερική πίεση του οξυγόνου στο μίγμα, ήταν αυτή που καθόριζε και την τοξικότητά του. Στη δύση του ίδιου αιώνα, το 1899, ο σκωτσέζος παθολογοανατόμος James Lorrain Smith έδειξε με τα πειράματά

του σε ζώα πως η εισπνοή οξυγόνου μέτρια αυξημένης πίεσης για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα προκαλούσε σοβαρή και εν τέλει θανατηφόρο πνευμονική βλάβη. Ακόμη και σήμερα, η επίδραση του υπερβαρικού οξυγόνου στο κεντρικό νευρικό σύστημα, καθώς και η τοξικότητα του οξυγόνου στους πνεύμονες ονομάζονται φαινόμενο Paul Bert και Lorrain Smith αντίστοιχα (27).

Το οξυγόνο χρησιμοποιήθηκε στην κλινική πράξη για πάνω από δύο αιώνες πριν η τοξικότητά του αναγνωριστεί ως ένα σημαντικό κλινικό πρόβλημα (27). Αναφορές περιπτώσεων οπισθοφακικής ινοπλασίας ή αμφιβληστροειδοπάθειας των νεογνών υπήρχαν από την δεκαετία του 1940 σε πρόωρα νεογνά (28). Η συσχέτιση της κλινικής αυτής κατάστασης με τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων O_2 στις θερμοκοιτίδες των νεογνών έγινε, όμως, μόλις το 1954 (28,29). Έκτοτε, η μετριασμένη χρήση του οξυγόνου, μόνο όταν κρινόταν απαραίτητο, μείωσε τα ποσοστά της αμφιβληστροειδοπάθειας. Η ευαλωτότητα των πρόωρων νεογνών στην κατάσταση αυτή οφείλεται στην ανεπαρκή ανάπτυξη αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (30). Τις επόμενες δεκαετίες περιγράφηκε η τοξικότητα του οξυγόνου στους πνεύμονες, τους οφθαλμούς, το ήπαρ, την καρδιά, τους νεφρούς, το αίμα και τους ενδοκρινείς αδένες (27).

A. 2.1. Εξέλιξη και αμυντικοί μηχανισμοί

Το οξυγόνο (O) είναι ένα μη μεταλλικό χημικό στοιχείο του περιοδικού πίνακα. Είναι το πιο άφθονο στοιχείο του φλοιού της γης. Το οξυγόνο βρίσκεται στην ατμόσφαιρα στο μεγαλύτερο ποσοστό του ως διατομικό μόριο (O_2) και το 99% αποτελείται από το ισότοπο οξυγόνο-16, ενώ το υπόλοιπο από ίχνη των ισοτόπων οξυγόνο-17 και οξυγόνο-18. Στην ατμόσφαιρα το O_2 καταλαμβάνει το 21% σε όγκο, στο θαλασσίνο νερό το 89% σε βάρος, ενώ σε πετρώματα είναι συνδεδεμένο με μεταλλικά και μη μεταλλικά στοιχεία στη μορφή όξινων και βασικών οξειδίων, καθώς και στη μορφή αλάτων που προκύπτουν από τα παραπάνω οξείδια (31,32). Τα επίπεδα του οξυγόνου παρουσίασαν διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια των γεωλογικών εποχών αναγκάζοντας τις εκάστοτε μορφές ζωής να αναπτύξουν μηχανισμούς επιβίωσης ή οδηγώντας τις σε εξαφάνιση (32).

Κάποιοι από τους οργανισμούς αυτούς επιβίωσαν επιλέγοντας αναερόβια περιβάλλοντα ώστε να αποφύγουν την τοξική, για αυτούς, επίδραση του O_2 , ενώ άλλοι προσαρμόστηκαν αναπτύσσοντας αμυντικούς μηχανισμούς για την αποφυγή ή τον μετριασμό αυτών των επιδράσεων και αργότερα μεταβολικά μονοπάτια που τους επέτρεπαν το ταυτόχρονο πλεονέκτημα του αερόβιου μεταβολισμού, δηλαδή την παραγωγή περισσότερης ενέργειας με τη μορφή του ATP (adenosine triphosphate) από ένα μόριο γλυκόζης. Από τους τελευταίους

αυτούς οργανισμούς προέκυψαν στην πορεία της εξέλιξης και οι πιο πολύπλοκες μορφές ζωής που γνωρίζουμε σήμερα (7,33).

A. 2.2. Δραστικές μορφές οξυγόνου και ελεύθερες ρίζες

Οι ΔΜΟ αποτελούν άτομα ή μόρια που προέρχονται από το οξυγόνο και είναι πιο δραστικά από το ίδιο το οξυγόνο (34). Η δραστικότητα (reactivity) των ΔΜΟ ποικίλει σημαντικά και ο όρος αυτός χρησιμοποιείται συχνά για να περιγράψει τόσο άτομα ή μόρια τα οποία δεν είναι δραστικά ή με πολύ χαμηλή δραστικότητα όσο και μόρια που είναι εξαιρετικά δραστικά.

Ο όρος «ελεύθερη ρίζα» (**free radical**) εκφράζει κάθε άτομο ή μόριο που έχει την ικανότητα ανεξάρτητης ύπαρξης (ελεύθερη) και έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (ρίζα) και ως εκ τούτου είναι έντονα ασταθές και υψηλής δραστικότητας (34). Τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, κατά κανόνα, έχουν ως αποτέλεσμα την ισχυρή τάση των ελευθέρων ριζών να αποσπούν ή να δωρίζουν ηλεκτρόνια από ή σε άλλες ενώσεις, ενεργώντας ως οξειδωτικοί ή αναγωγικοί παράγοντες, αντίστοιχα (34,35).

Η ιστορία των ελευθέρων ριζών ξεκινάει επίσημα το 1900 σε εργαστήριο οργανικής χημείας στο Michigan, όπου ο M. Gomberg επιβεβαίωσε την ύπαρξη μιας σταθερής, τρισθενούς οργανικής «ελεύθερης ρίζας», της τριφαινυλο-μεθυλενικής ρίζας (36). Η χημεία των ελευθέρων ριζών βρήκε και βρίσκει εφαρμογή στη σύνθεση οργανικών πολυμερών (πολυαιθυλένια, πολυστυρένια), όπου έχουν αναγνωριστεί ως σημαντικές ενδιάμεσες ενώσεις της σύνθεσης των πολυμερών (37,38). Ένα άλλο πεδίο μελέτης και κατανόησης του ρόλου των ελευθέρων ριζών αποτέλεσε από τις πρώτες δεκαετίες του προηγούμενου αιώνα η οξείδωση των λιπών, η οποία μελετήθηκε εκτενώς στην παραγωγή, προετοιμασία και αποθήκευση των τροφίμων (38–43). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ύπαρξη των ελευθέρων ριζών είναι γνωστή από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα (36). Λόγω της υψηλής δραστικότητας και αστάθειας των μορίων τους, υπήρξε η πεποίθηση πως οι ελεύθερες ρίζες δε συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες. Όμως, το 1946 ο L. Michaelis στο *in vitro* πείραμα που δημοσίευσε περιέγραψε τις ελεύθερες ρίζες ως ενδιάμεσα προϊόντα αντιδράσεων οξείδωσης οργανικών μορίων (44). Τα επόμενα χρόνια η ανάλυση των χημικών αντιδράσεων σε βιολογικά συστήματα φαινόταν να ευσταθεί περισσότερο με τη συμμετοχή ελευθέρων ριζών ως ενδιάμεσα προϊόντα σε αυτές τις αντιδράσεις. Το 1954 ο Commoner και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν την έρευνά τους με την οποία επιβεβαίωσαν, με τη μέθοδο του παραμαγνητικού συντονισμού, την παρουσία ελευθέρων ριζών σε φυτικά και ζωικά βιολογικά συστήματα (34,45). Το ίδιο έτος η R. Gerschman και οι συνεργάτες της πρότειναν πιο συγκεκριμένα τις

ελεύθερες ρίζες με βάση το οξυγόνο ως κοινό μηχανισμό βλάβης της τοξικότητας του οξυγόνου και των ακτίνων-X (46).

Ουσιαστικά, το ίδιο το μόριο του οξυγόνου αποτελεί, σύμφωνα με τον παραπάνω ορισμό, ελεύθερη ρίζα, καθώς διαθέτει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια αυτά, όμως, κινούνται σε διαφορετικές τροχιές με παράλληλη στροφορμή και αυτό προσδίδει στο διατομικό μόριο του οξυγόνου σταθερότητα, καθώς για να αποσπάσει ταυτόχρονα δύο ηλεκτρόνια από άλλο άτομο ή μόριο και να καλύψει τα κενά των τροχιών των ασύζευκτων ηλεκτρονίων του, αυτά θα πρέπει να έχουν την ίδια στροφορμή, πράγμα αδύνατο για ηλεκτρόνια ατόμου ή μορίου που ανήκουν στην ίδια τροχιά. Αυτός είναι ο λόγος που το μόριο του οξυγόνου προτιμά να δέχεται ένα ηλεκτρόνιο τη φορά και αντιδρά εξαιρετικά βραδέως με ενώσεις που δεν αποτελούν οι ίδιες ελεύθερες ρίζες (32).

Οι όροι «ελεύθερες ρίζες» και «δραστικές μορφές» οξυγόνου χρησιμοποιήθηκαν αρχικά και χρησιμοποιούνται ακόμη πολλές φορές ως ταυτόσημοι, χωρίς να είναι σε όλες τις περιπτώσεις σωστό (34). Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε πως όλες οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι ΔΜΟ, όμως δεν είναι όλες οι ΔΜΟ ελεύθερες ρίζες. Προς αποφυγή σύγχυσης κάποιοι συγγραφείς προτιμούν τη χρήση του όρου «μορφές προερχόμενες από το οξυγόνο»-“oxygen derived species” (32). Δυο σημαντικές επιστημονικές αναφορές των επόμενων δεκαετιών βοήθησαν στην πρόοδο της μελέτης του ρόλου των ΔΜΟ σε βιολογικά συστήματα. Αυτές ήταν η ανακάλυψη της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου του υδρογόνου (superoxide dismutase-SOD) από τους Joe McCord και Irwin Fridovich το 1968 (47) και η περιγραφή παραγωγής H_2O_2 από ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα με βακτηριοκτόνο δράση από τον Bernie Babior το 1973 (48). Πολύ γρήγορα, λοιπόν, οι ΔΜΟ ως προϊόντα αναγωγής του οξυγόνου, ενοχοποιήθηκαν για διάφορες παθολογικές καταστάσεις (49–57), καθώς και για τη διαδικασία της γήρανσης (58–62).

Δραστικές μορφές και ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν με κέντρο διάφορα ατομικά στοιχεία, όπως το οξυγόνο, ο άνθρακας, το άζωτο κ.α., ενώ και τα μέταλλα μετάπτωσης αποτελούν ελεύθερες ρίζες, στα πλαίσια του ευρύτερου παραπάνω ορισμού. Στη βιολογία έχουν εισαχθεί οι όροι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS), δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species-RNS), δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species-RCS, δραστικές μορφές βρωμίου (reactive bromine species-RBS), δραστικές μορφές θείου (reactive sulphur species-RSS).

Οι μέθοδοι εντοπισμού και έμμεσης μέτρησης της βλάβης από τη δράση των ελεύθερων ριζών σε βιολογικά συστήματα ήταν αρχικά δανεισμένες από την έρευνα στο πεδίο της βιομηχανίας τροφίμων και επικεντρωμένες στην οξείδωση των λιπιδίων. Το γεγονός αυτό αποπροσανατόλισε για χρόνια την επιστημονική κοινότητα από τη μελέτη προϊόντων της αλληλεπίδρασης των ΔΜΟ με άλλα κυτταρικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, DNA και συγκεκριμένων λιπιδίων, καθώς και των βιολογικών επακόλουθων αυτής της αλληλεπίδρασης. Η μεθοδολογία σε αυτό το πεδίο έχει, πλέον, εμπλουτισθεί σε μεγάλο βαθμό, δίνοντας τη δυνατότητα ακριβούς μοριακού προσδιορισμού της οξειδωτικής βλάβης και προσφέροντας πλούτο πληροφοριών για μοριακούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στη διαδικασία της γήρανσης και διαφόρων νόσων. Τα επόμενα χρόνια άρχισε, επιπλέον, μέσα από την έρευνα να ενισχύεται η πεποίθηση πως ο ρόλος των ΔΜΟ δεν είναι μόνο βλαπτικός και πως αυτές συμμετέχουν σε στοχευμένες και οργανωμένες κυτταρικές διεργασίες, ακόμη και με ευεργετικές ή προστατευτικές για τους οργανισμούς επιδράσεις (32,52).

A.2.3. Παραγωγή και εξάλειψη δραστικών μορφών οξυγόνου

in vivo

ΔΜΟ παράγονται *in vivo* διαμέσου μιας ποικιλίας φυσιολογικών βιολογικών διεργασιών, όπως ο αερόβιος μεταβολισμός και αμυντικοί μηχανισμοί (34). Η παραγωγή ενέργειας με τη μορφή ATP στους αερόβιους οργανισμούς λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Η ενέργεια προέρχεται από την οξείδωση συστατικών της τροφής, όπως υδατάνθρακες, λίπη και πρωτεΐνες. Τα ηλεκτρόνια που αποδίδονται έχουν ως τελικό αποδέκτη το O_2 , το οποίο ανάγεται από την κυτοχρωμική οξειδάση c ή σύμπλοκο IV της αναπνευστικής αλυσίδας απευθείας με τέσσερα ηλεκτρόνια για να προκύψουν δύο μόρια νερού. Πριν φτάσουν σε αυτό το τελευταίο σύμπλοκο της αναπνευστικής αλυσίδας και αποθηκευθούν με ασφάλεια σε μόρια H_2O , τα ηλεκτρόνια που προκύπτουν από την οξείδωση των θρεπτικών συστατικών έχουν ως ενδιάμεσους σταθμούς τα ανηγμένα νουκλεοτίδια NADH και $FADH_2$, τα οποία με τη σειρά τους οξειδώνονται αποδίδοντας χημική ενέργεια. Όλες αυτές οι διεργασίες λαμβάνουν χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Η παραγωγή του ATP γίνεται στο σύμπλοκο V της αναπνευστικής αλυσίδας το οποίο χρησιμοποιεί το ηλεκτροχημικό δυναμικό που έχει δημιουργηθεί μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής πλευράς της εσωτερικής μεμβράνης για τη φωσφορυλίωση του ADP (adenosine diphosphate) σε ATP (38).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω στο σύμπλοκο IV η αναγωγή του οξυγόνου γίνεται απευθείας με τέσσερα ηλεκτρόνια με αποτέλεσμα την παραγωγή H_2O και την αποφυγή παραγωγής ΔΜΟ. Σε προηγούμενα όμως σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας μπορεί να υπάρξει διαρροή ηλεκτρονίων προς το O_2 με αποτέλεσμα την παραγωγή $\text{O}_2^{\bullet-}$. Η διαρροή αυτή των ηλεκτρονίων αυξάνεται σε υψηλές συγκεντρώσεις O_2 (63), καθώς και σε αύξηση την συγκέντρωσης των ανηγμένων ενδιάμεσων προϊόντων της αναπνευστικής αλυσίδας. Μόρια που αναστέλλουν τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας (ροτενόνη, αντιμυκίνη Α και κυανίδια) αυξάνουν την διαρροή ηλεκτρονίων και την παραγωγή $\text{O}_2^{\bullet-}$ αυξάνοντας τόσο τα επίπεδα των ανηγμένων ενδιάμεσων μορίων, όσο και τα επίπεδα του $\text{O}_2^{\bullet-}$ (64).

Κατά τον αερόβιο μεταβολισμό το 90% περίπου του οξυγόνου καταναλώνεται αναγόμενο από την οξειδάση του κυτοχρώματος c με τέσσερα ηλεκτρόνια απευθείας σε νερό (H_2O), χωρίς την απελευθέρωση ενδιάμεσων ΔΜΟ (34). Υπολογίζεται πως *in vivo* μόνο το 0,1-0,2% του συνολικού οξυγόνου που καταναλώνεται στα μιτοχόνδρια θα αναχθεί σε $\text{O}_2^{\bullet-}$. Πειραματικά το ποσοστό αυτό μετράται υψηλότερο καθώς τα μιτοχόνδρια σε κυτταρικές καλλιέργειες είναι εκτεθειμένα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις οξυγόνου (περιβάλλοντος) από αυτές που επικρατούν στα μιτοχόνδρια των ιστών *in vivo*. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις O_2 στα μιτοχόνδρια είναι και ένας τρόπος που οι αερόβιοι οργανισμοί περιορίζουν την παραγωγή $\text{O}_2^{\bullet-}$. Η διαρροή e^- στα μιτοχόνδρια περιορίζεται επιπλέον από τη διάταξη των μεταφορέων e^- της αναπνευστικής αλυσίδας σε συμπλέγματα και από τις πρωτεΐνες αποσύνδεσης (uncoupling proteins-UCPs) (32).

Εκτός από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, άλλες *in vivo* πηγές παραγωγής $\text{O}_2^{\bullet-}$ είναι η ενζυματική δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (xanthine oxidase-XO), της οξειδάσης της αλδεϋδης (aldehyde oxidase-AO), των μονοοξυγενασών του κυτοχρώματος P450, της λιποοξυγενάσης, της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου και της NADPH οξειδάσης (65).

Το ανιόν του σουπεροξειδίου $\text{O}_2^{\bullet-}$ είναι το προϊόν αναγωγής του O_2 με ένα ηλεκτρόνιο, έχει τα χαρακτηριστικά ελεύθερης ρίζας κάτω όμως από φυσιολογικές συνθήκες, χαρακτηρίζεται από μέτρια δραστικότητα. Μπορεί να αντιδράσει με μικρό αριθμό κυτταρικών συστατικών, κυρίως με πρωτεΐνες που διαθέτουν προσθετικές ομάδες με άτομα σιδήρου (Fe), όπως τα μόρια της αίμης και τα σύμπλοκα σιδήρου-θείου, προκαλώντας αλλαγές σε αμινοξέα εγγύς των προσθετικών ομάδων, απελευθέρωση ατόμων σιδήρου και τελικά μεταβολές στη λειτουργικότητα αυτών των πρωτεϊνών (9,35). Άλλη αντίδραση στην οποία συμμετέχει το $\text{O}_2^{\bullet-}$

και επηρεάζει την κυτταρική βιολογία είναι αυτή με το μονοξειδίο του αζώτου ή νιτρικό οξείδιο (NO[•]), από την

οποία σχηματίζεται το περοξυνιτρώδες (ONOO⁻), μία ισχυρή προοξειδωτική ένωση, η οποία προκαλεί βλάβη σε βασικά κυτταρικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες και DNA (9,66).

Τα αερόβια κύτταρα απομακρύνουν το O₂^{•-} ταχέως με τις SODs, οι οποίες καταλύουν το σχηματισμό ενός μορίου H₂O₂, και ενός μορίου O₂ από δύο μόρια O₂^{•-}. Σε αυτή την αντίδραση το ένα μόριο O₂^{•-} δέχεται ένα ηλεκτρόνιο (αναγωγή) και μαζί με 2 άτομα H⁺ παράγει το H₂O₂, το επόμενο προϊόν αναγωγής του O₂, ενώ το δεύτερο μόριο O₂^{•-} οξειδώνεται δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο του και μεταπίπτει ξανά σε O₂ (35). Συνεπώς, η παραγωγή O₂^{•-} οδηγεί αναπόφευκτα στην παραγωγή H₂O₂ (32,35).



Το H₂O₂ αποτελεί λοιπόν το προϊόν αναγωγής του O₂ με δύο ηλεκτρόνια και αποτελεί μία σημαντική ενδιάμεση μορφή αναγωγής του οξυγόνου. H₂O₂ παράγεται ακόμη από ενζυμικές αντιδράσεις κατά τις οποίες γίνεται απευθείας μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο O₂. Τέτοια ένζυμα (οξειδάσες) είναι η μονοάμινο οξειδάση (MAO) στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, η οξειδάση της ξανθίνης και η οξειδάση των D-αμινοξέων στα υπεροξυσώματα και η πρωτεΐνη p66hc στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων (32,35,67). Το H₂O₂ αποτελεί, λοιπόν, προϊόν του αερόβιου μεταβολισμού και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ο ρυθμός παραγωγής του στο ήπαρ έχει υπολογιστεί σε 50 nmol/min/g ιστού. Σε αυτή την κατάσταση οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης για την παραγωγή του H₂O₂ καταναλώνεται περίπου το 2% του οξυγόνου που χρησιμοποιείται στο ήπαρ (67).

Το H₂O₂ αποτελεί οξειδωτικό μόριο, όχι όμως ελεύθερη ρίζα και αντιδρά περιορισμένα ή καθόλου με τα περισσότερα βιολογικά μόρια. Οι αντιδράσεις του με πολλά μόρια μπορεί να είναι θερμοδυναμικά εφικτές αλλά γίνονται με πολύ αργούς ρυθμούς ή καθόλου, λόγω της υψηλής ενέργειας ενεργοποίησης που απαιτεί η χημική κινητική τους (68). Παρ'όλα αυτά, μπορεί να αποσπάσει ηλεκτρόνια από κυτταρικά μόρια που περιέχουν θειολικές ομάδες (-SH), σύμπλοκα Fe-S, μόρια αίμης, καθώς και από κετοξέα (35,67,68). *In vitro*, η προσθήκη H₂O₂ οδηγεί σε βλάβες κυτταρικών συστατικών και μπορεί να επιφέρει ακόμη και τον κυτταρικό θάνατο. Οι βλάβες εντοπίζονται κυρίως στο DNA, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες, μόρια με τα οποία το H₂O₂ δεν αντιδρά άμεσα. Καθώς το H₂O₂ δεν διαθέτει ηλεκτρικό φορτίο, έχει τη δυνατότητα να διαχέεται διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών. Έτσι, είναι πιθανό στον

ενδοκυττάριο χώρο να έρχεται σε επαφή με κέντρα μετάλλων μετάπτωσης, τα οποία καταλύουν τη διάσπασή του και τη δημιουργία $\cdot\text{OH}$ ή άλλων εξαιρετικά οξειδωτικών παραγόντων. Επομένως, η οξειδωτική βλάβη μετά την προσθήκη H_2O_2 στο θεραπευτικό υλικό κυτταρικών καλλιέργειών είναι, κατά κύριο λόγο, έμμεση και δεν προκύπτει από την άμεση αντίδραση του H_2O_2 με τα κυτταρικά συστατικά (25,26,69).

Για δεκαετίες τα προϊόντα αναγωγής του O_2 αντιμετωπιζόνταν ως τοξικά παραπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και ενοχοποιήθηκαν για πολλές παθολογικές καταστάσεις, μέχρι που παρατηρήθηκε πως τα κύτταρα παράγουν περιορισμένες ποσότητες ΔΜΟ ως απάντηση στην επαφή τους με συγκεκριμένα μόρια και εν τέλει ελέγχουν κυτταρικές λειτουργίες, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση διαμέσου ενεργοποίησης/απενεργοποίησης ενζύμων, έκφρασης γονιδίων και σύνθεσης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, το H_2O_2 με το μικρό μοριακό του βάρος και το γεγονός πως δεν διαθέτει ηλεκτρικό φορτίο, χαρακτηριστικά που του επιτρέπουν να διαχέεται διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών, συγκεντρώνει, αν συνυπολογίσουμε και τη χαμηλή δραστηριότητά του, όλες τις ιδιότητες που του επιτρέπουν να δρα ως δεύτερος διαβιβαστής (second messenger) στην μεταγωγή σημάτων εντός του κυττάρου. Επομένως, η δραστηριότητα ενζύμων που το δημιουργούν τροποποιείται με ακρίβεια ώστε να επιτρέπεται η πρόσκαιρη συσσώρευσή του, η μεταγωγή του σήματος και στη συνέχεια αυτό να απομακρύνεται από συγκεκριμένα πάλλινζυμα (35,67,68,70–72).

Τα ένζυμα αυτά είναι οι καταλάσες (CATs), οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης-GPx και οι περοξυρεδοξίνες-Pxh, τα οποία και συνθέτουν μία εικόνα πολυμέτωπης άμυνας έναντι του H_2O_2 . Παρόλο που όλα αυτά τα ένζυμα αντιδρούν εξαιρετικά γρήγορα με το H_2O_2 , αυτό συνεχίζει να έχει τη δυνατότητα να αντιδρά και με άλλους στόχους. Η πιο σύγχρονη υπόθεση είναι πως τα ένζυμα αυτά λειτουργούν όχι απλά εξουδετερώνοντας το H_2O_2 αλλά ως ανιχνευτές και ρυθμιστές των επιπέδων του εντός του κυττάρου, ελέγχοντας έτσι τη συμμετοχή του σε μεταβολικά και σηματοδοτικά μονοπάτια, καθώς και τη δράση του ως παράγοντα που προκαλεί οξειδωτικές βλάβες (68,73).

Η μελέτη των αναερόβιων οργανισμών έχει αποκαλύψει πολλές πληροφορίες για την εξέλιξη αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Είναι γνωστό πως τόσο το O_2 , αλλά κυρίως προϊόντα αναγωγής του ή ΔΜΟ αναστέλλουν το μεταβολισμό αναερόβιων οργανισμών μέσω οξείδωσης βασικών κυτταρικών συστατικών, όπως ένζυμα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι αερόβιοι οργανισμοί διαθέτουν αμυντικούς (αντιοξειδωτικούς) μηχανισμούς, παρ' όλ' αυτά, σε αυξημένες

συγκεντρώσεις O_2 βασικά ένζυμα του μεταβολισμού τους απενεργοποιούνται κυρίως από το παραγόμενο $O_2^{\bullet-}$ (32,38).

Συμπερασματικά, ΔΜΟ παράγονται και απομακρύνονται συνεχώς ακόμη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και είναι απαραίτητες για διεργασίες, όπως η μεταγωγή ενδοκυττάρων μηνυμάτων, αμυντικούς μηχανισμούς και τη ρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού (65,67,74). Όταν όμως η συγκέντρωσή τους ξεπεράσει έναν συγκεκριμένο ουδό, είτε λόγω αυξημένης παραγωγής τους είτε ανεπαρκούς απομάκρυνσης, το κύτταρο οδηγείται στην κατάσταση που ονομάζουμε οξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες και να απειλήσει την κυτταρική ακεραιότητα (9,35,65).

A. 2.4. Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες στην ιατρική και βιολογική έρευνα περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1985 από τους Sies και Cadenas. Όπως περιγράφεται και παραπάνω αποτελεί διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων υπέρ των πρώτων οδηγώντας σε βλαπτικές επιδράσεις σε δομικά και λειτουργικά συστατικά των κυττάρων (75). Οποιαδήποτε μεταβολή της ομοιόστασης των οργανισμών οδηγεί, διαμέσου διάφορων μηχανισμών, σε υπεροχή των οξειδωτικών παραγόντων (76).

Οι υγιείς αερόβιοι οργανισμοί διατηρούν μία ισορροπία μεταξύ παραγωγής ΔΜΟ και αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών. Οι αμυντικοί αυτοί μηχανισμοί δεν εξουδετερώνουν πλήρως τις ΔΜΟ, αλλά ελέγχουν τα επίπεδά τους. Αυτό συνεπάγεται πως ακόμη και τα χαμηλά επίπεδα που διατηρούνται προκαλούν συνεχώς βλάβες σε κυτταρικά συστατικά, τις οποίες όμως το κύτταρο έχει τη δυνατότητα να επιδιορθώνει, όσο αυτή η ισορροπία παραμένει ελεγχόμενη. Η πλήρης εξουδετέρωση όλων των ΔΜΟ που παράγονται σε διάφορες θέσεις ενδοκυττάρια θα ήταν ενεργειακά πολύ κοστοβόρα για τον κυτταρικό μεταβολισμό και επιπλέον η εξουδετέρωση συγκεκριμένων δραστικών μορφών, όπως για παράδειγμα του $\bullet OH$, είναι πρακτικά αδύνατη. Ιδιαίτερα σημαντική είναι, όμως, η διατήρηση ελεγχόμενων επιπέδων δραστικών μορφών, καθώς αυτές, όπως αναφέρθηκε παραπάνω για το $O_2^{\bullet-}$ και το H_2O_2 , συμμετέχουν σε βασικές κυτταρικές διεργασίες (32).

Έτσι, το 2007 οι Helmut Sies και Dean Jones, προσάρμοσαν τον ορισμό του οξειδωτικού στρες προσθέτοντας στις επιπτώσεις του τη διαταραχή της μεταγωγής μηνυμάτων διαμέσου οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων (77).

Έτσι, στους αερόβιους οργανισμούς υπάρχει μια σταθερή κατάσταση οξειδοαναγωγικής ισορροπίας και οποιαδήποτε παρέκκλιση είτε από αυξημένη παραγωγή ΔΜΟ είτε μειωμένη διαθεσιμότητα ή λειτουργικότητα των αντιοξειδωτικών συστημάτων θεωρείται στρες για τον οργανισμό (οξειδωτικό), και αυτό οδηγεί σε απάντηση του οργανισμού στο στρες (78).

Θα πρέπει να σημειωθεί εδώ πως υπάρχουν και φυσιολογικές (ήπιες) παρεκκλίσεις από τη σταθερή κατάσταση που είναι απαραίτητες για τη συνήθη μεταγωγή σημάτων διαμέσου οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Οι αντιδράσεις αυτές συμμετέχουν σε ένα πολύπλοκο δίκτυο ρύθμισης κυτταρικών διεργασιών και «συνομιλούν» με άλλα συστήματα ρύθμισης αυτών των διεργασιών, όπως το σύστημα φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης πρωτεϊνών.

Πιο έντονες παρεκκλίσεις από τη δυναμική σταθερή κατάσταση οδηγούν σε οξειδωτικές βλάβες σε κυτταρικά συστατικά, οι συνέπειες των οποίων εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου ή ιστού, καθώς και από την ένταση και τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες (78).

Αυτές μπορεί να είναι:

- 1) **Αύξηση του πολλαπλασιασμού.**
- 2) **Προσαρμογή** του κυττάρου ή του οργανισμού διαμέσου ενίσχυσης των αμυντικών μηχανισμών. Η προσαρμογή αυτή μπορεί να προστατεύσει πλήρως ή μερικώς έναντι της οξειδωτικής βλάβης ή και να προσφέρει ανθεκτικότητα των κυττάρων ή του οργανισμού έναντι ενός επερχόμενου επεισοδίου οξειδωτικού στρες μεγαλύτερης έντασης.
- 3) **Κυτταρική βλάβη** που μπορεί να περιλαμβάνει βλάβες σε κάποια ή όλα τα κυτταρικά συστατικά (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες), οι οποίες μπορεί κάποιες φορές να οδηγήσουν σε προσαρμογή.
- 4) **Γήρανση**, που σημαίνει πως το κύτταρο επιβιώνει, χωρίς να έχει, όμως, πλέον την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται.
- 5) **Κυτταρικός θάνατος**. Εάν το κύτταρο δεν καταφέρει να επιδιορθώσει πλήρως ή μερικώς τις οξειδωτικές βλάβες και να επιβιώσει τότε μπορεί να οδηγηθεί στο θάνατο με διαδικασία ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση, φερρόπτωση) (32,35).

Μηχανισμοί προστασίας έναντι του οξειδωτικού στρες

Την ισχυρότερη γραμμή άμυνας έναντι του οξειδωτικού στρες αποτελούν οι οικογένειες των **αντιοξειδωτικών ενζύμων** (SODs, CATs, GPx, Prx) που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Τα ένζυμα αυτά συνεργάζονται για την μετατροπή των ενδιάμεσων μορφών αναγωγής του O_2 στο τελικό προϊόν αναγωγής του, δηλαδή το H_2O .

Αναπόφευκτα, κάποιες από αυτές τις ενδιάμεσες μορφές αναγωγής θα συμμετάσχουν στη δημιουργία ελεύθερων ριζών και την οξείδωση κυτταρικών συστατικών. Οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά δραστικές ενώσεις και από τη στιγμή που θα δημιουργηθούν αντιδρούν ακαριαία με οποιοδήποτε μόριο βρίσκεται στο άμεσο περιβάλλον τους.

Έτσι έναν επιπρόσθετο μηχανισμό αποτροπής της δημιουργίας τους αποτελούν πρωτεΐνες που δεσμεύουν μόρια-καταλύτες αντιδράσεων που οδηγούν σε δημιουργία ελεύθερων ριζών. Τέτοια μόρια είναι τα ιόντα σιδήρου, ιόντα χαλκού, η αίμη κ.α., τα οποία δεσμεύονται από την τρανσφερίνη, φερριτίνη, σερουλοπλασμίνη και απτοσφαιρίνη (35).

A. 3. Ο ρόλος του σιδήρου

A. 3.1. Μεταβολισμός του σιδήρου

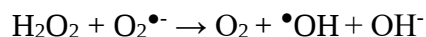
Ο σίδηρος ανήκει στην ομάδα των μετάλλων μετάπτωσης και μεταπίπτει εύκολα σε μία από τις δύο μορφές που μπορεί να πάρει ως ιόν, την ανηγμένη μορφή Fe^{+2} (ferrous iron) και την οξειδωμένη μορφή Fe^{+3} (ferric iron). Αποτελεί απαραίτητο θρεπτικό συστατικό και η παρουσία του προαπαιτείται για τη δομή και λειτουργία πρωτεϊνών που εντοπίζουν μεταβολές των επιπέδων του οξυγόνου-oxygen sensing proteins (Hypoxia inducible factor-HIF), μηχανισμών μεταφοράς οξυγόνου (αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη), ενζύμων για τη σύνθεση του DNA (αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων-ribonucleotide reductase) και πρωτεϊνών της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, απαραίτητων για την κυτταρική αναπνοή. Συνολικά, στο σώμα ενός μέσου ενήλικα υπάρχουν 3-5 γραμμάρια (gr) σιδήρου. Το μεγαλύτερο ποσοστό αυτής της ποσότητας (περίπου 70%) είναι δομικό συστατικό της αιμοσφαιρίνης (7). Εκτός από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και την αιμοσφαιρίνη, ικανές ποσότητες σιδήρου βρίσκονται στο ήπαρ (φερριτίνη), στους σκελετικούς μύες (μυοσφαιρίνη) και στα μακροφάγα κύτταρα (32). Ο ενδοκυττάριος σίδηρος που δεν χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πρωτεϊνών αποθηκεύεται ως Fe^{+3} στη φερριτίνη (7). Γενικά σε βιολογικά συστήματα ο σίδηρος υπάρχει κυρίως στην οξειδωμένη του μορφή- Fe^{+3} , στην οποία είναι οξειδοαναγωγικά αδρανής. Η αναγωγή του στην οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή Fe^{+2} είναι απαραίτητη για την κινητοποίηση και τη μεταφορά του διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών με τελικό στόχο τη χρήση του για τη σύνθεση της αίμης και άλλων πρωτεϊνών ή την δέσμευσή του από τη φερριτίνη (79).

Η συνολική ποσότητα σιδήρου που διακινείται διαμέσου του πλάσματος του αίματος καθημερινά υπολογίζεται περίπου σε 35 mg. Ο σίδηρος στο πλάσμα συνδέεται με την

τρανσφερρίνη και έτσι καθίσταται οξειδοαναγωγικά αδρανής. Το μεγαλύτερο μέρος αυτού μεταφέρεται στον μυελό των οστών και χρησιμοποιείται για την αιμοποίηση. Σε μια δεδομένη χρονική στιγμή η τρανσφερρίνη του πλάσματος είναι συνδεδεμένη με περίπου 3 mg σιδήρου, ποσότητα που αποδίδεται προς χρήση και ανανεώνεται περίπου 10 φορές ημερησίως. Η τροφοδοσία της τρανσφερρίνης του πλάσματος σε σίδηρο γίνεται κυρίως από φαγοκυττάρωση γηρασμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων και την αποδόμηση της αίμης από την οξυγενάση της αίμης (heme oxygenase 1-HO-1). Συνεπώς, στο ανθρώπινο σώμα γίνεται ουσιαστικά ανακύκλωση του σιδήρου. Απώλειες σιδήρου προκύπτουν μόνο από επιθηλιακά κύτταρα (π.χ. του εντερικού βλεννογόνου) που αποπίπτουν, καθώς και από επεισόδια αιμορραγίας. Η εψιδίνη, μια πεπτιδική ορμόνη, ρυθμίζει την τροφοδοσία του πλάσματος (τρανσφερρίνης) σε σίδηρο, ανάλογα με τις απώλειες αλλά και τις ανάγκες του οργανισμού σε σίδηρο, είτε κινητοποιώντας σίδηρο από τα μακροφάγα και άλλα κύτταρα, είτε αυξάνοντας την απορρόφησή του από τον βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου. Αντίστοιχα, υπάρχουν ρυθμιστικοί μηχανισμοί που ελέγχουν την είσοδο του σιδήρου από το πλάσμα στα κύτταρα και την αποθήκευση του ενδοκυττάριου σιδήρου στη φερριτίνη ή την κινητοποίηση του δεσμευμένου σιδήρου από αυτή. Οι μηχανισμοί αυτοί (iron regulatory proteins-IRP1, IRP2 και iron-responsive elements-IRE) ελέγχουν τη μετάφραση και συνεπώς τα επίπεδα πρωτεϊνών, όπως ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης (Transferrin receptor-TfR1), η φερριτίνη, η φερροπορτίνη και άλλες (7).

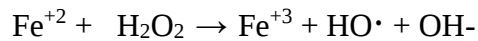
A. 3.2. Σίδηρος και δραστικές μορφές οξυγόνου

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ούτε το $O_2^{\bullet-}$ ούτε το H_2O_2 είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες. Πρώιμες in vitro έρευνες πάνω στην κυτταρική τοξικότητα του $O_2^{\bullet-}$ διαπίστωσαν πως η κυτταρική προστασία σχετιζόταν με την προσθήκη SODs, αλλά και CATs και εκκαθαριστών (scavengers) της $\bullet OH$. Το ερώτημα που προέκυψε ήταν πως σχηματίζονται οι ρίζες $\bullet OH$. Η αρχική υπόθεση ήταν πως το $O_2^{\bullet-}$ αντιδρά άμεσα με το H_2O_2 σχηματίζοντας $\bullet OH$.



Η αντίδραση αυτή είναι γνωστή ως αντίδραση Haber-Weiss από τη δεκαετία του 1930. Η σταθερά ρυθμού αντίδρασης της εν λόγω αντίδρασης σε διάλυμα ύδατος είναι σχεδόν μηδενική. Ωστόσο, διαπιστώθηκε πως η παραγωγή $\bullet OH$ γίνεται εφικτή όταν η παραπάνω αντίδραση καταλύεται από μέταλλα μετάπτωσης (32). Η αντίδραση αυτή είχε ουσιαστικά περιγραφεί το 1894 από τον H.J.H. Fenton, πριν ακόμη την ανακάλυψη ύπαρξης των

ελεύθερων ριζών. Στο πείραμά του περιέγραψε την εμφάνιση ενός εντυπωσιακού βιολετί χρώματος με την ανάμειξη μίας σταγόνας δισθενούς θειικού σιδήρου (FeSO_4) με μια σταγόνα H_2O_2 μετά την προσθήκη καυστικής σόδας (αλκαλικό περιβάλλον). Ο καθηγητής Fenton είχε αναγνωρίσει στην αντίδραση αυτή την καταλυτική δράση του σιδήρου. Μετά την διαπίστωση ύπαρξης των ελεύθερων ριζών για την ερμηνεία του πειράματος του Fenton προτάθηκε η αντίδραση που σήμερα ονομάζουμε «αντίδραση Fenton» και περιγράφει, στην απλουστευμένη της μορφή, τον σχηματισμό $\bullet\text{OH}$ κατά την αναγωγή του H_2O_2 (35,80).



Για την παραγωγή της $\bullet\text{OH}$ in vivo η έρευνα επικεντρώθηκε στο σίδηρο και χαλκό, οπότε και τη δεκαετία του 1980 οι Halliwell και Gutteridge πρότειναν την παραγωγή του $\bullet\text{OH}$ in vivo με την καταλυτική δράση του σιδήρου (Fe) (32). Όταν καταλυτικά ενεργός ή ελεύθερος ή οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος (Fe^{+2}) είναι διαθέσιμος τότε η αντίδραση Fenton, λαμβάνει χώρα οδηγώντας στην παραγωγή της εξαιρετικά δραστικής $\bullet\text{OH}$ (9,81,82).

Έτσι, τα κύτταρα χρησιμοποιούν τη δέσμευση και απομόνωση του σιδήρου σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα ως μηχανισμούς διαχείρισης (αδρανοποίησης) του σιδήρου και αποφυγής καταστροφικών αντιδράσεων (9,83,84).

A. 3.3. Σίδηρος, δραστικές μορφές οξυγόνου και λειτουργία του ήπατος

Το ήπαρ είναι το όργανο που καλείται να ανταποκριθεί στο μεγαλύτερο μέρος των μεταβολικών αναγκών του οργανισμού και είναι το βασικό όργανο μεταβολισμού και αδρανοποίησης ενδογενών και εξωγενών παραγόντων (φάρμακα, τοξίνες, βακτήρια). Η διαδικασία αυτή στις περισσότερες περιπτώσεις διενεργείται με τη βοήθεια οξειδωτικών αντιδράσεων από τα ισοένζυμα του κυτοχρώματος P450-cytochrome P450 (CYP), τα οποία παράγουν ΔΜΟ, κυρίως $\text{O}_2\bullet^-$ (79). Το CYP αποτελείται από αιμοπρωτεΐνες συνδεδεμένες στην κυτταρική μεμβράνη που κατέχουν κεντρικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό, τον μεταβολισμό ξеноβιοτικών ουσιών και την ομοιόσταση (85). Σε αύξηση της παραγωγής ΔΜΟ στο ήπαρ οδηγούν ακόμη παθολογικές καταστάσεις όπως η μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα, λοιμώξεις από ηπατοτρόπους ιούς, η αλλόθεση βακτηριακών τοξινών από τον εντερικό αυλό και η απελευθέρωση φλεγμονωδών κυτταροκινών από το σπλαχνικό λίπος παχύσαρκων

ατόμων. Συνεπώς, το ήπαρ είναι ένα όργανο όπου δυνητικά μπορούν να παραχθούν μεγάλες ποσότητες ΔΜΟ και ένα λιγότερο ή περισσότερο επιβλαβές γεγονός μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες (79).

Το γεγονός ότι οι μεγαλύτερες αποθήκες σιδήρου (περίπου 1gr) (32) βρίσκονται στα ηπατοκύτταρα και τα κύτταρα Kupffer καθιστά το ήπαρ ιδιαίτερα επιρρεπές σε οξειδωτική βλάβη, όπως σε καταστάσεις υπερσιδήρωσης (79). Στα ηπατοκύτταρα ο σίδηρος αποθηκεύεται στο κυτταρόπλασμα, το ενδοπλασματικό δίκτυο, τα μιτοχόνδρια και λυσοσωμάτια κυρίως ως σίδηρος συνδεδεμένος στη φερριτίνη (Fe^{+3}) (79) ή είναι ενσωματωμένος σε ενεργά κέντρα ενζύμων ή άλλων πρωτεϊνών (αίμη, σύμπλοκα Fe-S) και δεν είναι σε θέση να αντιδράσει με το H_2O_2 (9). Το μέρος αυτό του ολικού σιδήρου ονομάζεται επίσης «μη δεσμεύσιμο», καθώς δεν μπορεί να κινητοποιηθεί και να δεσμευθεί από εξωγενείς σιδηροδεσμευτικούς παράγοντες, όπως η δεσφερριόξαμίνη. Μόνο το 0,2-5% του ολικού ενδοκυττάριου σιδήρου θεωρείται ότι βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή του (Fe^{+2}), είτε ως ελεύθερος-ασταθής σίδηρος (labile iron), είτε χαλαρά συνδεδεμένος σε διάφορα ανιονικά ενδοκυττάρια μόρια και αποτελεί το «δεσμεύσιμο» μέρος του ολικού σιδήρου (2,26,79,86,87). Το οξειδοαναγωγικά ενεργό αυτό μέρος του ενδοκυττάριου σιδήρου αποτελεί σίδηρο που, είτε έχει κινητοποιηθεί από την αποθηκευμένη του μορφή στη φερριτίνη για να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση πρωτεϊνών και κυρίως στην ερυθροποίηση, είτε προέρχεται από αποδόμηση μεταλλοπρωτεϊνών και αίμης και πρόκειται να ανακυκλωθεί ή να μεταφερθεί για αποθήκευση στη φερριτίνη (7,79). Συμπερασματικά, η ενδοκυττάρια δεξαμενή ελεύθερου ή ασταθούς σιδήρου αποτελεί δεξαμενή σε δυναμική κατάσταση όπου σίδηρος Fe^{+2} εισέρχεται ή εξέρχεται ανάλογα με τις ανάγκες των κυττάρων για πρωτεϊνοσύνθεση, αποδόμηση πρωτεϊνών, απορρόφηση ή αποθήκευση σιδήρου.

Η ενδοκυττάρια δεξαμενή Fe^{+2} περιλαμβάνει μικρότερες δεξαμενές σιδήρου (labile iron pools-LIPs) περιορισμένες σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα, όπως η κυτταροπλασματική LIP, που περιλαμβάνει και τον πυρηνικό «ελεύθερο» σίδηρο, η μιτοχονδριακή LIP και η ένδο- και λυσοσωματική LIP που συνολικά περιέχουν 6-16 μM σιδήρου, κυρίως ως Fe^{+2} (88). Ο «δεσμεύσιμος» σίδηρος έχει υπολογιστεί επίσης από τους Ma et al στα $5.4\pm 1.3\mu\text{M}$ και τους Petrat et al στα $6.2\pm 1.8\mu\text{M}$ με τη χρήση διαφορετικών σιδηροδεσμευτικών παραγόντων (89,90). Οι Zhang και Lemasters υπολόγισαν τον «δεσμεύσιμο» σίδηρο σε ηπατοκύτταρα επίμυων κάτω από αερόβιες συνθήκες σε 5-10 μM (87).

Στα ηπατοκύτταρα η κύρια LIP αποτελείται από σίδηρο που εντοπίζεται στα ενδο- και λυσοσωμάτια, καθώς ο σίδηρος εισέρχεται στο κύτταρο με τη βοήθεια του υποδοχέα της

τρανσφερρίνης-1 (transferrin receptor-1-TfR-1) με το μηχανισμό της ενδοκύτωσης ως σίδηρος συνδεδεμένος στην τρανφερίνη (transferrin bound iron-TBI) (79,87). Δεσμεύσιμος σίδηρος στα λυσοσωμάτια προέρχεται, επίσης, μετά από φαγοκυττάρωση και αποδόμηση κυτταροπλασματικής φερριτίνης, άλλων πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο ή φαγοκυττάρωση μιτοχονδρίων που έχουν υποστεί βλάβη (79). Την ενδοκυττάρωση του συνδεδεμένου με τρανσφερίνη σιδήρου ακολουθεί η αύξηση της οξύτητας εντός του ενδοσωματίου, πτώση του pH σε 5,5, με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση της σύνδεσης του σιδήρου με την τρανσφερίνη και την αποσύνδεσή του από αυτή. Στην συνέχεια, ο σίδηρος ανάγεται σε Fe^{+2} και απελευθερώνεται από το ενδοσωμάτιο στο κυτταρόπλασμα ή μεταφέρεται ελεγχόμενα στα μιτοχόνδρια, όπου και στις δύο περιπτώσεις θα χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση σιδηροπρωτεϊνών (32,79). Έτσι, η παραπάνω διαδικασία αποτελεί μία δυναμική κατάσταση κατά την οποία η LIP αποτελεί μια δεξαμενή διερχόμενου σιδήρου από τη στιγμή που αυτός θα αποδεσμευθεί από πρωτεΐνες και πριν χρησιμεύσει εκ νέου στη σύνθεση νέων σιδηροπρωτεϊνών. Τα επίπεδα ελεύθερου σιδήρου στις δεξαμενές αυτές εξαρτώνται από τις ανάγκες του κυττάρου σε σίδηρο για τη σύνθεση πρωτεϊνών (91,92).

Οι LIP που εξυπηρετούν την ανακύκλωσή του σιδήρου αποτελούν πηγή Fe^{+2} που μπορεί να καταλύσει την αντίδραση Fenton και την παραγωγή της εξαιρετικά δραστηκής ρίζας του υδροξυλίου $\bullet\text{OH}$ (79). Τέτοια καταστροφικά συμβάντα περιορίζονται από την αυστηρή ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου, που εξασφαλίζει πως το μεγαλύτερο μέρος του ενδοκυττάρου σιδήρου είναι αποθηκευμένο στη φερριτίνη, όταν αυτό δεν χρησιμοποιείται για πρωτεϊνική σύνθεση. Κάθε μόριο φερριτίνης μπορεί να φιλοξενήσει μερικές χιλιάδες άτομα σιδήρου στην σταθερή τους οξειδωμένη μορφή (Fe^{+3}), που δεν μπορεί να πάρει μέρος στην αντίδραση Fenton. Ένα μικρό μέρος ενδοκυττάρου σιδήρου βρίσκεται πάντα στην οξειδοαναγωγικά ενεργή μορφή, αλλά ακόμη και αυτό σε μεγάλο ποσοστό περιορίζεται σε συγκεκριμένα κυτταρικά διαμερίσματα (9,79).

A. 4. Χειρουργική ήπατος

A. 4.1. Ιστορική αναδρομή

Από την αρχαία ελληνική μυθολογία είναι γνωστός ο μύθος του Προμηθέα και η αναγεννητική ικανότητα του ήπατος. Σύμφωνα με το μύθο, ο Τιτάνας Προμηθέας έδωσε τη φωτιά στους ανθρώπους, και ο Δίας εξοργισμένος τον τιμώρησε αλυσοδέοντάς τον στο όρος Καύκασος

και στέλνοντας έναν τεράστιο αητό να τρώει το ήπαρ του κατά τη διάρκεια της ημέρας. Ο μύθος περιγράφει πως το ήπαρ αναγεννιόταν κατά τη διάρκεια της νύχτας και το μαρτύριο του Προμηθέα ξεκινούσε κάθε μέρα από την αρχή.

Σε συγγράμματα του Ιπποκράτη του Κώου υπάρχουν ξεκάθαρες αναφορές σε χειρουργικές επεμβάσεις στην κοιλιακή χώρα και συγκεκριμένα σε χειρουργικές παθήσεις του ήπατος (αποστήματα, αιμορραγία, ασκитική συλλογή) για τις οποίες ως θεραπείες περιγράφονται η διάνοιξη, ο καυτηριασμός, η απολίνωση και η παροχέτευση. Παρόλα αυτά δεν υπάρχει κάποια ξεκάθαρη αναφορά ή μαρτυρία της αναγεννητικής ικανότητας του ήπατος (93,94). Αξίζει να σημειωθεί η ετυμολογία της λέξης *ήπαρ* από το ρήμα *ηπάομαι*, το οποίο σημαίνει *διορθώνω, επισκευάζω*, στοιχείο που, επίσης, υποδηλώνει πως οι αρχαίοι Έλληνες γνώριζαν την αναγεννητική ικανότητα του ήπατος (95).

Οι Βαβυλώνιοι περίπου το 2000 π.Χ. αναγνώριζαν ήδη το ήπαρ ως σημαντικό ζωτικό όργανο και το θεωρούσαν έδρα της ψυχής (95). Έλληνες ιατροφιλόσοφοι της αρχαιότητας πίστευαν, επίσης, πως το ήπαρ αποτελούσε την έδρα της ψυχής, γεγονός που πιθανότατα σχετιζόταν με την αναγνώριση της σημασίας του οργάνου στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού (94). Ιστορικά, υπάρχουν μεμονωμένες περιγραφές χειρουργικών επεμβάσεων ήπατος σε τραυματίες πολέμου, οι οποίες αφορούσαν κυρίως εκτομή τμημάτων ήπατος που προέβλεπε από κάποιο κοιλιακό τραύμα (95,96). Η πρώτη τέτοια περιγραφή εντοπίζεται το έτος 1716, οπότε και ο Berta αφαίρεσε τμήμα ήπατος που προέπιπτε από τραύμα στην κοιλιά από μαχαίρι και παρόμοια περιγραφή γίνεται το 1870 από τον Von Bruns, ο οποίος αφαίρεσε νεκρωμένο τμήμα ήπατος σε ασθενή με τραυματική ρήξη και ο ασθενής ανάρρωσε (96–98). Ο C. Beck το 1902 περιγράφει ακόμη πως υπήρξαν και αναφορές συντηρητικής αντιμετώπισης τραυματικών βλαβών του ήπατος με τους τραυματίες να αναρρώνουν καλώς (97).

Στην πραγματικότητα, η χειρουργική ήπατος και χοληφόρων έγινε εφικτή μόνο μετά την πρόοδο που παρατηρήθηκε στους τομείς της αναισθησίας, αντισηψίας και του ελέγχου λοιμώξεων στα τέλη του 19^{ου} αιώνα (95,99). Έτσι, το 1882 ο Langenbuch διενήργησε την πρώτη επιτυχημένη χολοκυστεκτομή και τέσσερα χρόνια αργότερα, το 1886, ο Lius επιχείρησε την πρώτη μερική ηπατεκτομή σε γυναίκα 67 ετών με αδένωμα ήπατος. Η εξεργασία ήταν μεγάλου μεγέθους και για την αφαίρεσή της χρησιμοποιήθηκε καυτηριασμός. Ωστόσο, η ασθενής κατέληξε έξι ώρες αργότερα λόγω μετεγχειρητικής αιμορραγίας (99). Ακολούθησαν σποραδικές αναφορές ηπατεκτομών, μεταξύ άλλων, από τον Langenbuch και Bruns το 1888, από τον Tiffany το 1890, τον Lucke το 1891, τον Eiselberg το 1893, ενώ ο

Keen το 1899 δημοσίευσε την πρώτη μεγάλη σειρά 76 ηπατεκτομών (σφηνοειδών εκτομών ήπατος), 37 από τις οποίες διενεργήθηκαν για εκτομή καλοήθων ή κακοήθων εξεργασιών (95,96,99,100).

Οι Rex και Cantlie το 1888 και 1897, αντίστοιχα, μελέτησαν την ανατομία του ήπατος και πιο συγκεκριμένα τις λεπτομέρειες της αρχιτεκτονικής του καθορίζοντας τη δομή του ήπατος σε λοβούς και τμήματα και κυρίως τα ανάγγεια και ελεύθερα χοληφόρων επίπεδα (planes) του οργάνου. Το 1954 ο Claude Couinaud περιέγραψε πρώτος τα οχτώ, λειτουργικά ανεξάρτητα, τμήματα του ήπατος. Η περιγραφή του Couinaud βασίστηκε σε εκμαγεία του πυλαίου φλεβικού συστήματος που ανέδειξαν με λεπτομέρεια τις διακλαδώσεις της πυλαίας φλέβας στα ανεξάρτητα ηπατικά τμήματα και την αποχέτευση από αυτά διαμέσου των τριών κύριων ηπατικών φλεβών στην κάτω κοίλη φλέβα (96,101,102).

Το έργο των παραπάνω ερευνητών συνέβαλε στη διενέργεια ασφαλέστερων ηπατεκτομών και στη θεμελίωση της σύγχρονης χειρουργικής ήπατος. Το ήπαρ παρέμενε, ωστόσο, για τους χειρουργούς ένα όργανο εύθρυπτο με υψηλό κίνδυνο αιμορραγίας. Στόχος πολλών τεχνικών που περιεγράφηκαν τις επόμενες δεκαετίες ήταν η συρραφή του ήπατος και η εκτομή τμημάτων του με όσο το δυνατόν μικρότερες απώλειες αίματος (96,101,102).

Το 1908 ο Χειρουργός Pringle από τη Γλασκώβη είχε δημοσιεύσει μία πρωτοποριακή τεχνική διαχείρισης της αιμορραγίας του ήπατος. Περιέγραψε πως κατά τη διάρκεια λαπαροτομίας σε ασθενείς με τραυματικές κακώσεις ήπατος κατάφερε να ελέγξει την αιμορραγία αποκλείοντας με τα δάκτυλα την αιματική ροή στην πυλαία φλέβα και την ηπατική αρτηρία. Προτείνει την τεχνική ως πρώτη κίνηση μετά τη διάνοιξη της κοιλιάς σε ασθενείς με υποψία αιμορραγίας από το ηπατικό παρέγχυμα και με στόχο να κερδηθεί χρόνος για παρασκευή του πεδίου και προσπάθεια για οριστικό έλεγχο της αιμορραγίας. Ελάχιστοι από τους ασθενείς αυτούς επέζησαν. Ο Pringle είχε καταφέρει, ωστόσο, να περιγράψει τρεις επιτυχημένες μερικές ηπατεκτομές σε κόνικλους, εφαρμόζοντας την παραπάνω τεχνική κατά την διάρκεια της εκτομής και της τοποθέτησης των απολινώσεων, επιτυγχάνοντας ελάχιστη απώλεια αίματος. Όλα τα πειραματόζωα επέζησαν για λίγες ημέρες, οπότε και οδηγήθηκαν σε ευθανασία (103). Η τεχνική χρησιμοποιείται ευρέως ακόμη και σήμερα τόσο για τον έλεγχο τραυματικής αιμορραγίας όσο και για τον περιορισμό της απώλειας αίματος κατά τη διάρκεια ηπατεκτομών (96,99,100).

Τα επόμενα χρόνια και κυρίως στα τέλη της δεκαετίας του 1940 υπήρξε έρευνα που βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση της ανατομίας του χοληφόρου δέντρου καθώς και της λειτουργικής ανατομίας του ήπατος. Ακόμη, προτάθηκαν και υιοθετήθηκαν χειρουργικές τεχνικές διατομής και αγγειακού αποκλεισμού του ήπατος. Οι Kaven το 1948 και Lortat-Jacob το 1952 πραγματοποίησαν την πρώτη αριστερή και δεξιά ανατομική ηπατεκτομή, αντίστοιχα, ενώ το 1963 διενεργήθηκε η πρώτη ορθότοπη μεταμόσχευση ήπατος σε άνθρωπο από την ομάδα του Starzl (98). Επιπρόσθετα, η συνεχής βελτίωση των χειρουργικών τεχνικών και οι εξελίξεις στο πεδίο της διαγνωστικής απεικόνισης επέτρεψαν την περαιτέρω ανάπτυξη της χειρουργικής ήπατος και χοληφόρων (96).

A.4.2. Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης αποτελεί δυνητικά παθολογική κατάσταση κατά την οποία η αρχικά μειωμένη ή απύουσα ροή αίματος σε τμήμα ιστού ή σε ολόκληρο όργανο ακολουθείται από αποκατάσταση της παροχής αίματος. Η φάση της ισχαιμίας συνοδεύεται από μειωμένη κάλυψη των μεταβολικών αναγκών του ιστού και οδηγεί σε υποξία, ενώ η φάση της επαναιμάτωσης οδηγεί σε αποκατάσταση της οξυγόνωσης. Παραδόξως, η αποκατάσταση της αιματικής ροής και της οξυγόνωσης ακολουθείται από επιδείνωση της ιστικής βλάβης και έντονη φλεγμονώδη απάντηση (1,104).

Το φαινόμενο περιγράφηκε αρχικά από ερευνητές τη δεκαετία του 1930. Οι R. Tennant και C. Wiggers σε πειραματική μελέτη σε σκύλους το 1935 περιγράφουν σε ένα από τα συμπεράσματά τους πλήρη αναστροφή των διαταραχών κινητικότητας του μυοκαρδίου μετά από την επαναιμάτωση, με την προϋπόθεση πως ο χρόνος ισχαιμίας δεν ήταν μεγάλος (105). Ο Jennings και οι συνεργάτες του το 1960, επίσης σε πειραματική μελέτη, αναφέρουν τη νέκρωση του μυοκαρδιακού ιστού μετά από ισχαιμία και επαναιμάτωση (106). Το 1973, ο Hearse και οι συνεργάτες του περιγράφουν την απελευθέρωση ενζύμων που ακολουθεί την επαναιμάτωση ισχαιμίου μυοκαρδίου, καθώς και την επιδείνωση της ιστικής βλάβης σε κυτταρικό επίπεδο και αποδίδουν τη βλάβη αυτή στην επανείσοδο οξυγόνου στον ιστό. Στο άρθρο τους χρησιμοποιείται ίσως για πρώτη φορά ο όρος «βλάβη από επαναιμάτωση» (“reperfusion injury”) (104,107).

Το φαινόμενο της ισχαιμίας που ακολουθείται από επαναιμάτωση αντιπροσωπεύει μία αλληλουχία γεγονότων που συναντάται συχνά σε ποικίλες κλινικές καταστάσεις, οι οποίες επηρεάζουν διαφορετικά όργανα και ιστούς και συνοδεύονται από σημαντική νοσηρότητα και θνητότητα. Το έμφραγμα του μυοκαρδίου, η χειρουργική των στεφανιαίων αγγείων (bypass),

το ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, οι ηπατεκτομές, οι μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων, η αιμορραγική καταπληξία, μεταξύ άλλων, χαρακτηρίζονται από μερική ή πλήρη ισχαιμία ακολουθούμενη από επαναιμάτωση (1,4,9,108,109). Συνεπώς, το ενδιαφέρον για τους υποκείμενους μηχανισμούς δημιουργίας της βλάβης, καθώς και την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπευτικών στρατηγικών υπήρξε μεγάλο και το πεδίο έρευνας διαρκώς επεκτεινόμενο (1,4,8,10,104,110).

Διάφοροι μηχανισμοί βλάβης έχουν παρατηρηθεί μετά από επαναιμάτωση ισχαιμικών ιστών. Οι μηχανισμοί αυτοί έχουν ποικίλη χρονική και χωρική εντόπιση, αποτελούν μέρος ή ενεργοποιούν μοριακά μονοπάτια, ενώ δεν είναι, επί του παρόντος, πλήρως κατανοητοί. Από εκτεταμένη έρευνα πάνω σε πειραματικά μοντέλα υπάρχουν δεδομένα που προτείνουν πως η ενεργοποίηση των περισσότερων από αυτούς τους μηχανισμούς σχετίζεται με το «οξειδωτικό στρες», που προκύπτει λόγω της αυξημένης παραγωγής ΔΜΟ και δραστικών μορφών Αζώτου (ΔΜΑ) κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, ή ακριβέστερα επανοξυγόνωσης (9,10,111). Παρόλο που ΔΜΟ παράγονται και κατά τη διάρκεια της φάσης της ισχαιμίας, η παραγωγή τους είναι πολύ πιο περιορισμένη εξαιτίας της έλλειψης οξυγόνου (4,9). Κατά τη διάρκεια των πρώτων λίγων δευτερολέπτων μετά την αποκατάσταση της παροχής αίματος και οξυγόνου προκύπτει μία έκρηξη παραγωγής ΔΜΟ. Η ιστική και κυτταρική βλάβη μπορεί να είναι άμεση εξαιτίας της τοξικής δράσης πολλών ΔΜΟ ή έμμεση, καθώς κάποιες από αυτές δρουν ως μεσολαβητές και ενεργοποιούν πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια (112,79). Ανάλογα με την ένταση της έκρηξης παραγωγής ΔΜΟ, η ενδοκυττάρια σηματοδότηση μπορεί να δράσει ευεργετικά για την κυτταρική επιβίωση κατά τη διάρκεια μιας επικείμενης πιο έντονης οξειδωτικής απειλής. Αυτό συμβαίνει όταν τα κύτταρα έρχονται αντιμέτωπα για μικρά χρονικά διαστήματα με χαμηλές συγκεντρώσεις ΔΜΟ, οι οποίες μεσολαβούν σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς έναντι μελλοντικών μείζονων οξειδωτικών συμβάντων (9,112).

A. 4.3. Ισχαιμία-επαναιμάτωση του ήπατος

Η ανάπτυξη που παρατηρήθηκε στο πεδίο της χειρουργικής ήπατος και των μεταμοσχεύσεων έφερε τη χειρουργική κοινότητα αντιμέτωπη με το φαινόμενο της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση. Στην παθολογία του ήπατος το φαινόμενο αναγνωρίστηκε και περιγράφηκε ως επιπλοκή πειραματικών μοντέλων μεταμόσχευσης ήπατος το 1975 από τους Toledo-Pereyra και συνεργάτες, οι οποίοι μελέτησαν και τη φαρμακευτική προστασία του μοσχεύματος (113).

Τη δεκαετία του 1980 ο όρος «βλάβη από επαναιμάτωση» (“reperfusion injury”) άρχισε να χρησιμοποιείται πλέον συστηματικά στη βιβλιογραφία των μεταμοσχεύσεων ήπατος (9,104). Το φαινόμενο της I/R είναι ο κυριότερος μηχανισμός κυτταρικής βλάβης που συνοδεύει τις επεμβάσεις ηπατεκτομής και μεταμόσχευσης ήπατος. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η κυτταρική βλάβη ξεκινά κατά τη φάση της ισχαιμίας, και πολλαπλασιάζεται με την επανείσοδο του οξυγόνου κατά την επαναιμάτωση και επανοξυγόνωση (8,114).

Το φαινόμενο περιγράφεται σε δύο διαφορετικές φάσεις καθώς έχει αναγνωριστεί πως αυτές χαρακτηρίζονται από διαφορετικούς μηχανισμούς βλάβης. Κατά την πρώιμη φάση της επαναιμάτωσης (< 2 ώρες) έχει περιγραφεί η ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer του ήπατος, τα οποία παράγουν και εκλύουν ΔΜΟ και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως ο παράγοντας TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α) και η ιντερλευκίνη 1β (IL-1β). Κατά την πρώιμη αυτή φάση προκαλείται μια άμεση και ήπια βλάβη των ηπατοκυττάρων και παράλληλα επάγεται η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων των κολποειδών και η παραγωγή των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) και VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1). Τα μόρια αυτά οδηγούν στην επιστράτευση και ενεργοποίηση ουδετερόφιλων κυττάρων, τα οποία επίσης απελευθερώνουν ΔΜΟ και πρωτεάσες, προκαλώντας ακόμη πιο βαριά κυτταρική βλάβη, κατά τη διάρκεια της όψιμης πλέον φάσης της επαναιμάτωσης (μέχρι 48 ώρες) (8,9,104,108). Το οξειδωτικό περιβάλλον και οι κυτταροκίνες αυξάνουν την έκφραση των μορίων προσκόλλησης ακόμη και στην κυτταρική μεμβράνη των ουδετεροφίλων με αποτέλεσμα την επιστράτευση ακόμη περισσότερων και τη διατήρηση της οξειδωτικής πίεσης και διαιώνιση αυτού του φαύλου κύκλου (9).

Η ηπατική ισχαιμία μπορεί να είναι είτε θερμή είτε ψυχρή ανάλογα με τη θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η ισχαιμία. Αν και στην κλινική πράξη η θερμοκρασία κατά το χρόνο ισχαιμίας δεν είναι πάντα ελεγχόμενη, η θερμή ισχαιμία συμβαίνει στους 37 °C και συναντάται σε ηπατεκτομές για αφαίρεση εξεργασιών, στην υποογκαιμική καταπληξία και στη λαπαροσκοπική χειρουργική. Η ψυχρή ισχαιμία εφαρμόζεται κατά την συντήρηση του οργάνου από τη λήψη μέχρι τη μεταμόσχευση του και συμβαίνει μεταξύ 4 και 7 °C (4,9). Το ήπαρ υποβάλλεται, έτσι, στη διαδικασία της κρυοσυντήρησης κατά την οποία στερείται αιματικής ροής και τοποθετείται σε πάγο με στόχο την ελαχιστοποίηση του κυτταρικού μεταβολισμού. Την κρυοσυντήρηση ακολουθεί, κατά την μεταμόσχευση στον λήπτη, χρόνος θερμής ισχαιμίας μέχρι την επαναιμάτωση του οργάνου (115). Παρόλο που, όπως έχει ήδη σημειωθεί, η ένταση της κυτταρικής βλάβης εκτινάσσεται κατά την επαναιμάτωση, αυτή

εξαρτάται τόσο από τη διάρκεια της ισχαιμίας όσο και από τα επίπεδα της θερμοκρασίας που επικρατούν στο όργανο (4,115). Τα ποσοστά δυσλειτουργίας και απόρριψης του μοσχεύματος μπορούν να περιοριστούν με τη μείωση του χρόνου ψυχρής ισχαιμίας και τον περιορισμό της βλάβης κατά την επαναιμάτωση (115).

A. 4.4. Σίδηρος και ηπατική βλάβη από ισχαιμία/επαναιμάτωση

Η βλάβη από I/R είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την παραγωγή ΔΜΟ και το οξειδωτικό στρες (10,116–118). Στις προηγούμενες παραγράφους περιγράφηκε, επιπλέον, ο καταλυτικός ρόλος του σιδήρου στην παραγωγή της εξαιρετικά δραστικής $\bullet\text{OH}$ με την αντίδραση Fenton. Αναφέρθηκε, ακόμη, πως τα κύτταρα διαχειρίζονται με εξαιρετική λεπτομέρεια και πολύπλοκους μηχανισμούς τον σίδηρο με το μεγαλύτερο μέρος του να αποτελεί δομικό συστατικό πρωτεϊνών ή να είναι αποθηκευμένο σε αυτές, ενώ το ασταθές μέρος του, που είναι και οξειδοαναγωγικά ενεργό (Labile iron pool-LIP), βρίσκεται κυρίως περιορισμένο σε κυτταρικά διαμερίσματα, όπως λυσοσώματα και ενδοσώματα. Τι συμβαίνει όμως σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες και πιο συγκεκριμένα κατά την I/R του ήπατος;

Έχει παρατηρηθεί σε πειραματικά μοντέλα πως κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, αλλά κυρίως της επανοξυγόνωσης του ήπατος, όπως και σε κυτταρικά μοντέλα προσομοίωσης οξειδωτικού στρες πως οξειδο-αναγωγικά ενεργός σίδηρος εντοπίζεται σε αυξημένες συγκεντρώσεις, αλλά και σε διαφορετικές θέσεις. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει απελευθέρωση σιδήρου που ήταν προηγουμένως δεσμευμένος ή/και μετακίνηση μη δεσμευμένου, ασταθούς σιδήρου σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και είχε περιγραφεί ήδη από την πρώτη δεκαετία μελέτης του φαινομένου της I/R (9). Οι πρώτες έρευνες επιβεβαίωναν την αύξηση των επιπέδων του σιδήρου μετά την επανοξυγόνωση στο αίμα ή στο έκπλυμα *ex vivo* πειραμάτων, χωρίς να περιγράφουν τους μηχανισμούς κινητοποίησης του σε κυτταρικό επίπεδο (119–121). Τόσο στις πρώτες αυτές έρευνες όσο και σε πολυάριθμες που ακολούθησαν, η προστασία που παρατηρήθηκε πως προσφέρουν διάφορες σιδηροδεσμευτικές ενώσεις επαλήθευε τον καθοριστικό ρόλο του σιδήρου στην παθοφυσιολογία της βλάβης από I/R (21,22,122–128).

Ως πηγή αύξησης του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου αναγνωρίστηκαν τα λυσοσώματα και ενδοσώματα (13,129–131). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις σιδήρου εντός των λυσοσωμάτων, απαιτούν και υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτονίων εντός αυτών, δηλαδή διαφορετικού pH μεταξύ των μεμβρανών του οργανιδίου, γεγονός που, με τη σειρά του, απαιτεί κατανάλωση ενέργειας υπό την μορφή ATP (86). Κατά τη διάρκεια, επομένως, της φάσης της ισχαιμίας, οπότε και η διαθεσιμότητα του ATP σταδιακά περιορίζεται, το κύτταρο

αδυνατεί να διατηρήσει τη διαφορά συγκέντρωσης ιόντων υδρογόνου, δηλαδή pH, μεταξύ κυτταροπλάσματος και λυσοσωμάτων/ενδοσωμάτων και έτσι ακολουθεί η απελευθέρωση ασταθούς σιδήρου από αυτά. Ο μηχανισμός αυτός επιβεβαιώθηκε σε *in vitro* μελέτες και *in vivo* μελέτες (86,87). Ακολούθως, έχειδειχθεί πως ο σίδηρος που απελευθερώνεται από τα λυσο- και ενδοσώματα κατά τη φάση της ισχαιμίας εισέρχεται στα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια του μιτοχονδριακού μονομεταφορέα ασβεστίου (mitochondrial Ca^{+2} uniporter-MCU), που εδρεύει στην εσωτερική μεμβράνη αυτών (86,87,132).

Δραστικές μορφές οξυγόνου και κατά κύριο λόγο $\text{O}_2^{\bullet-}$ παράγονται και κατά τη διάρκεια της φάσης της ισχαιμίας, παρά την περιορισμένη διαθεσιμότητα O_2 (4,9,118). Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τα αυξημένα επίπεδα ανηγμένων ενδιάμεσων προϊόντων της αναπνευστικής αλυσίδας (αυξημένος λόγος NADH/NAD) κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, τα οποία οδηγούν στη διαφυγή ηλεκτρονίων προς το O_2 . Οι Chouchani et al περιέγραψαν πρώτοι πιο ειδικά τη συσσώρευση του σουκινικού ή ηλεκτρικού οξέος κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας που προκύπτει από την αναγωγή του φουμαρικού οξέος και οδηγεί με την οξείδωσή του κατά την επανοξυγόνωση των ιστών σε έκρηξη παραγωγής $\text{O}_2^{\bullet-}$ και άλλων ΔΜΟ (2,10). Τα αυξημένα επίπεδα $\text{O}_2^{\bullet-}$ και συνεπώς H_2O_2 κατά την διάρκεια της ισχαιμίας δρουν ως δευτερογενείς αγγελιοφόροι ενεργοποιώντας μεταγραφικούς παράγοντες (HIF-hypoxia-inducible factor, NF- κB , AP1, p53) (118,133–135), μπορούν όμως να αντιδράσουν και με πρωτεΐνες που περιέχουν σύμπλοκα σιδήρου-θείου και να οδηγήσουν στην απελευθέρωση σιδήρου που πλέον καθίσταται οξειδοαναγωγικά ενεργός (136,137). Η αύξηση του καταλυτικά ενεργού σιδήρου κατά την περίοδο της ισχαιμίας παίζει καθοριστικό ρόλο στην πρόκληση βλάβης σε κυτταρικά συστατικά κατά την επανοξυγόνωση των ιστών. Η επανοξυγόνωση συνοδεύεται από έκρηξη παραγωγής $\text{O}_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 και συνεπώς οι θέσεις του οξειδοαναγωγικά ενεργού αυτού σιδήρου καθίστανται εξαιρετικά ευάλωτες σε οξειδωτική βλάβη (2).

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή ΔΜΟ κατά την επαναιμάτωση (3,10,118,132). Έτσι, κατά την επαναιμάτωση τα μιτοχόνδρια έχουν δεχθεί ουσιαστικά δύο «χτυπήματα»: την αύξηση του οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου στο εσωτερικό τους και την έκρηξη παραγωγής ΔΜΟ ($\text{O}_2^{\bullet-}$ και H_2O_2) κατά την επανοξυγόνωση, ο συνδυασμός των οποίων οδηγεί στην παραγωγή της εξαιρετικά δραστικής $\cdot\text{OH}$, την αύξηση της διαπερατότητας της μιτοχονδριακής μεμβράνης (mitochondrial permeability transition-MPT) και τον κυτταρικό θάνατο. Σημαντικό εύρημα αποτελεί η παρατήρηση πως το κάθε «χτύπημα» από μόνο του δεν οδηγεί σε μιτοχονδριακή βλάβη και κυτταρικό θάνατο, αλλά τα δύο αυτά γεγονότα δρουν

συνεργικά. Επιπλέον, η προστασία που φάνηκε πως προσφέρει ο σιδηροδεσμευτικός παράγοντας δεσφερριοξαμίνη επιβεβαιώνει τον καταστροφικό ρόλο του σιδήρου στην βλάβη από I/R (86,87).

Την τελευταία δεκαετία έχει μελετηθεί εκτενώς το φαινόμενο της φερρόπτωσης (ferroptosis) στη βλάβη από I/R, αλλά και σε άλλες παθολογίες του ήπατος. Η φερρόπτωση αποτελεί ένα τύπο ελεγχόμενου κυτταρικού θανάτου, τα χαρακτηριστικά του οποίου διαφέρουν από αυτά της απόπτωσης, της νέκρωσης και της αυτοφαγίας και στον οποίο ο ενδοκυττάριος σίδηρος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Το φαινόμενο χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα ασταθούς σιδήρου, διαταραχή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του κυττάρου με αυξημένη παραγωγή ΔΜΟ και οξειδωτική βλάβη των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Έχει δειχθεί πειραματικά πως απενεργοποίηση του ενζύμου GPX4 (Glutathione Peroxidase 4), το οποίο δρα προστατευτικά έναντι της υπεροξειδωσης των λιπιδίων αποτελεί έναν βασικό μηχανισμό πρόκλησης φερρόπτωσης (7,138–141). Έχουν περιγραφεί διάφορα μόρια που οδηγούν τα κύτταρα σε φερρόπτωση (139). Ο ρόλος όμως παραγόντων, όπως τα υψηλά επίπεδα σιδήρου, φωσφολιπιδίων, πολυακόρεστων λιπιδίων ή αντίθετα των χαμηλών επιπέδων γλουταθειόνης (GSH-glutathione), GPX4 ή άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών, στην πρόκληση φερρόπτωσης δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (139). Από την άλλη πλευρά, έχουν ταυτοποιηθεί μόρια που αναστέλλουν τη διαδικασία της φερρόπτωσης καταστέλλοντας το σχηματισμό λιπιδικών υπεροξειδίων. Ενδιαφέρον για την παρούσα έρευνα παρουσιάζει το γεγονός πως μια κατηγορία αναστολέων της φερρόπτωσης αποτελούν μόρια που δεσμεύουν τον σίδηρο με αντιπροσωπευτικότερο αυτών τη δεσφερριοξαμίνη. Ο συγκεκριμένος τύπος κυτταρικού θανάτου απαιτεί περαιτέρω έρευνα όσον αφορά τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που τον διέπουν, καθώς και το ρόλο που παίζει στην παθοφυσιολογία των διάφορων παθήσεων του ήπατος, ώστε να μελετηθούν ακολούθως κλινικές εφαρμογές των παραγόντων που το επηρεάζουν (139).

A. 4.5. Σιδηροδεσμευτικές ενώσεις

Οι σιδηροδεσμευτικές ή χηλικές ενώσεις (iron chelators) είναι χημικές ενώσεις που δεσμεύουν ιόντα μετάλλων. Η χημική τους δομή ποικίλει, τυπικά όμως περιέχουν άτομα οξυγόνου, αζώτου ή θείου που σχηματίζουν δεσμούς συντονισμού με άτομα σιδήρου ή άτομα άλλων μετάλλων προσφέροντας ηλεκτρόνια στα μεταλλικά ιόντα (142). Ετυμολογικά ο όρος «χηλικός» προέρχεται από τη «χηλή», δηλαδή δαγκάνα των καβουριών, ακριβώς επειδή

σχηματικά στα σύμπλοκα των ενώσεων αυτών με τα μέταλλα, τα άτομα του μετάλλου μοιάζουν σαν πιασμένα στη δαγκάνα ενός καβουριού (32,143).

Οι σιδηροδεσμευτικές ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την αντιμετώπιση της υπερσιδήρωσης που συναντάται σε πολυμεταγγιζόμενους ασθενείς με δρεπανοκυτταρική αναιμία, μείζονα β-θαλασσαιμία, σιδηροβλαστική αναιμία, ελλείψεις ενζύμων (πυροσταφυλική κινάση, G6PD)-σε σπάνιες διαταραχές πρωτεϊνών μεταφοράς (ατρανσφερριναίμία, ασερουλοπλασμιναιμία-νόσος Wilson), την κληρονομική αιμοχρωμάτωση που οδηγούν σε υπερσιδήρωση ή αυξημένα επίπεδα χαλκού, καθώς και σε χρόνια ηπατίτιδα (142,144).

Ωστόσο, πολλές από αυτές τις ενώσεις έχουν μελετηθεί σε ένα μεγάλο φάσμα παθολογικών καταστάσεων και έχουν δείξει προστατευτικές ιδιότητες σε παθολογίες της καρδιάς, του κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς και αντικαρκινικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (142).

Πολυάριθμες είναι, ακόμη, οι μελέτες που έχουν δείξει προστασία από βλάβη μετά από I/R σε διάφορα όργανα, όπως ο εγκέφαλος, το μυοκάρδιο, οι νεφροί και το ήπαρ. Σιδηροδεσμευτικοί παράγοντες, όπως η δεσφεριοξαμίνη και η 2,2'-διυριδίνη, έχει περιγραφεί πως έχουν προστατευτικές για τους ιστούς ιδιότητες σε συνθήκες I/R (16,18–21,145–150).

Ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιούμενους στην κλινική πράξη χηλικός παράγοντας είναι η δεσφεριοξαμίνη (desferrioxamine-DFO). Η DFO απομονώθηκε από τον *Streptomyces pilosus* και περιγράφηκε το 1960 από τον Bickel, ενώ το 1962 ο Prelog και οι συνεργάτες του περιέγραψαν την πρώτη μέθοδο σύνθεσής της (151). Η DFO ήταν το πρώτο φάρμακο που πήρε έγκριση στα τέλη της δεκαετίας του 1970 για χρήση ως θεραπεία αποσιδήρωσης στη β-θαλασσαιμία και άλλες καταστάσεις υπερσιδήρωσης, καθώς και σε δηλητηριάσεις με άλατα μετάλλων (144,152,153). Δεσμεύει με σημαντική ειδικότητα και ισχύ το σίδηρο (Fe^{+3}) και λιγότερο ισχυρά άλλα μέταλλα, όπως αργίλιο- Al^{+3} (αλουμίνιο), χαλκό- Cu^{+2} και ψευδάργυρο- Zn^{+2} (32). Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της DFO είναι το υψηλό κόστος για τη σύνθεσή της και η μη απορρόφησή της από το γαστρεντερικό σύστημα, εξαιτίας της εξαιρετικά υδρόφιλης φύσης της. Για αυτό το λόγο χορηγείται στην κλινική πράξη υποδόρια, γεγονός που σχετίζεται και με κακή συμμόρφωση των ασθενών (32,152).

Συνεπώς, υπήρξε ερευνητικό ενδιαφέρον για σχεδιασμό οικονομικότερων φαρμάκων, τα οποία ιδανικά θα μπορούσαν να χορηγηθούν από του στόματος. Μία τέτοια ένωση είναι η 1,2-διμεθυλ-3-υδροξυπυριδίν-4-όνη ή δεφεριπρόνη (DFP), στη βιβλιογραφία αναφέρεται και ως L1 ή ferriprox, η οποία ανήκει στην κατηγορία των 3-υδροξυπυριδ-4-ονών (32). Την

κατηγορία αυτή σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων μελέτησαν πρώτοι στα τέλη της δεκαετίας του 1980 ο Hider και οι συνεργάτες του (154,155). Για περισσότερο από δύο δεκαετίες η DFP έχει λάβει έγκριση και χορηγείται σε ασθενείς με θαλασσαιμικά σύνδρομα και υπερσιδήρωση λόγω συχνών μεταγγίσεων (156,157). Βασικό χαρακτηριστικό της DFP είναι πως τόσο ο ίδιος ο σιδηροδεσμευτικός παράγοντας όσο και το σύμπλοκό του με τον τρισθενή σίδηρο (Fe^{+3}) παρουσιάζουν ουδέτερο ηλεκτρικό φορτίο και ως εκ τούτου είναι ικανά να διαπερνούν ελεύθερα τις κυτταρικές μεμβράνες, να δεσμεύουν σίδηρο στον ενδοκυττάριο χώρο και να τον μεταφέρουν εκτός των κυττάρων. Αξίζει να σημειωθεί πως η συνδυαστική χορήγηση της DFP με τη DFO, χρησιμοποιείται όλο και συχνότερα, καθώς έχει δείξει καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με τη μονοθεραπεία με DFO ή DFP στην απέκκριση πλεονάζοντος σιδήρου, στη μείωση της υπερφόρτωσης με σίδηρο του ήπατος και του μυοκαρδίου, καθώς και στην αναστροφή της καρδιακής ανεπάρκειας σε θαλασσαιμικούς ασθενείς (142,158). Η πιο αποτελεσματική αυτή δράση του συνδυασμού των δυο φαρμάκων μπορεί να ερμηνευθεί με το «φαινόμενο της μεταπήδησης» (shuttle effect), κατά το οποίο η DFP αποκτώντας ευχερή πρόσβαση στα κύτταρα, κινητοποιεί ελεύθερο σίδηρο, μη προσβάσιμο στην DFO, τον οποίο παραλαμβάνει στη συνέχεια στον εξωκυττάριο χώρο η DFO. Η DFO δεσμεύει ισχυρά τα ιόντα σιδήρου και βοηθά στην αποτελεσματική αποβολή τους από τον οργανισμό (159,160) .

Σκοπός της μελέτης

Υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, όπως για παράδειγμα κατά την επαναιμάτωση/επανοξυγόνωση των ιστών, τα επίπεδα του ελεύθερου Fe^{+2} διαδραματίζουν καταλυτικό ρόλο στη μετατροπή οξειδωτικών μορίων με χαμηλή δραστικότητα, όπως το H_2O_2 , σε εξαιρετικά δραστικές μορφές, όπως η $\cdot\text{OH}$. Ο οξειδοαναγωγικά ενεργός αυτός σίδηρος εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και στο εσωτερικό άλλων κυτταρικών οργανιδίων, όπως τα λυσοσωμάτια και τα μιτοχόνδρια. Η παρούσα μελέτη στηρίχθηκε στην υπόθεση πως ο συνδυασμός σιδηροδεσμευτικών παραγόντων με διαφορετική λιποφιλικότητα και ικανότητα σύνδεσης με τα ιόντα σιδήρου θα μπορούσε να προσφέρει μεγαλύτερη προστασία έναντι της βλάβης από I/R σε σύγκριση με τους μεμονωμένους παράγοντες. Πυρήνα αυτής της υπόθεσης αποτέλεσε το γεγονός πως οι λιπόφιλοι παράγοντες διαθέτουν την ικανότητα εύκολης πρόσβασης στο εσωτερικό του κυττάρου, αλλά και εξόδου από αυτό, διαπερνώντας ανεμπόδια τις κυτταρικές μεμβράνες. Έτσι, για τη μελέτη επιλέχθηκε ο συνδυασμός της δεφεριπρόνης-DFP, μίας λιπόφιλης ένωσης που διαπερνά εύκολα την κυτταρική μεμβράνη, με τη δεσφεριοξαμίνη-DFO, που, ως υδρόφιλο μόριο, δεν διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, δημιουργεί όμως σταθερά σύμπλοκα με τον Fe^{+3} .

Ο συνδυασμός και τα μεμονωμένα φάρμακα μελετήθηκαν αρχικά *in vitro* (σε ηπατοκύτταρα HepG2 υπό συνθήκες οξειδωτικής πίεσης) με τα αποτελέσματα να υποστηρίζουν την αρχική υπόθεση. Στη συνέχεια, ο συνδυασμός και τα μεμονωμένα φάρμακα χρησιμοποιήθηκαν *in vivo* σε πειραματικό μοντέλο τμηματικής ηπατικής ισχαιμίας και επαναιμάτωσης σε κόνικλους, καθώς και *ex vivo* σε μοντέλο κρυοσυντήρησης ηπατικού μοσχεύματος κόνικλου.

Β
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B.1. Πείραμα *in vitro*

B. 1.1. Εισαγωγή

Όπως συζητήθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο το μέρος του ενδοκυττάριου σιδήρου που είναι οξειδοαναγωγικά ενεργό φαίνεται πως παίζει καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική βλάβη που προκαλείται κάτω από συνθήκες οξειδωτικής πίεσης (7,11,112,161). Ο «ελεύθερος» αυτός σίδηρος καταλύει τη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών μορφών οξυγόνου, όπως η $\bullet\text{OH}$ που έχουν ως αποτέλεσμα τη μη ειδική οξειδωτική βλάβη κυτταρικών συστατικών.

Είναι σημαντικό να τονισθεί ξανά εδώ πως ο σίδηρος που μπορεί να συμμετάσχει στην αντίδραση Fenton αποτελεί μία πολύ μικρή δεξαμενή αθωράκιστου και οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, σε σύγκριση με τον ολικό ενδοκυττάριο σίδηρο. Ένα μεγάλο μέρος του ενδοκυττάριου σιδήρου είναι με ασφάλεια αποθηκευμένο στην φερριτίνη ως Fe^{+3} ή είναι ενσωματωμένος στη δομή πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο και δεν είναι διαθέσιμο για συμμετοχή σε αντιδράσεις τύπου Fenton με το H_2O_2 ή άλλα υδροϋπεροξειδία. Ο σίδηρος που δεν είναι αποθηκευμένος στη φερριτίνη και δεν έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή πρωτεϊνών αποτελεί τη LIP που υπάρχει υπό φυσιολογικές συνθήκες στα κύτταρα και τα επίπεδα του σιδήρου σε αυτή ρυθμίζονται με μεγάλη ακρίβεια σύμφωνα με τις ανάγκες του κυττάρου. Η δεξαμενή αυτή δεν είναι ενιαία αλλά αποτελείται από μικρότερες δεξαμενές σιδήρου, περιορισμένου σε διαφορετικά κυτταρικά οργανίδια. Στα ηπατοκύτταρα ασταθής σίδηρος εντοπίζεται στα λυσοσώματα, στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ενώ μικρότερες συγκεντρώσεις του υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα (24).

Χαρακτηριστικά της δεξαμενής ασταθούς σιδήρου, εκτός της δυνατότητας συμμετοχής του σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, είναι πως αυτός είναι ανταλλάξιμος, μπορεί δηλαδή να μετακινηθεί μεταξύ φυσικών συνδετών (ligands) και μεταξύ κυτταρικών διαμερισμάτων, και παράλληλα μπορεί να δεσμευτεί από χηλικούς παράγοντες. Αυτό είναι και το τμήμα του ολικού σιδήρου των κυττάρων που μπορεί να τροποποιηθεί φαρμακολογικά με τη χορήγηση σιδηροδεσμευτικών παραγόντων (7,162).

Η έκθεση κυττάρων *in vitro* σε H_2O_2 επιφέρει βλάβες που εντοπίζονται στο DNA, σε λιπίδια και πρωτεΐνες. Οι βλάβες αυτές φαίνεται πως είναι έμμεσες και δεν τις προξενεί το ίδιο το H_2O_2 , μιας και σε φυσιολογικά επίπεδα δεν αντιδρά άμεσα με αυτά τα μόρια. Καθώς το H_2O_2 μπορεί να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, αποκτά πρόσβαση σε κυτταρικά διαμερίσματα και στον πυρήνα του κυττάρου και έρχεται σε επαφή με κέντρα μετάλλων μετάπτωσης (σίδηρο ή και χαλκό) και μέσω της αντίδρασης Fenton παράγει $\bullet\text{OH}$. Η $\bullet\text{OH}$ είναι μία εξαιρετικά δραστική ελεύθερη

ρίζα, η οποία αντιδρά με οποιοδήποτε κυτταρικό συστατικό βρίσκεται πολύ κοντά της, πράγμα που κάνει αδύνατη τη διάχυση και δράση της σε σημεία διαφορετικά από αυτό του σχηματισμού της (25,32). Το ερώτημα που προκύπτει είναι εάν τα προαναφερθέντα μέταλλα μετάπτωσης βρίσκονται φυσιολογικά σε αυτά τα σημεία και σε ποια μορφή. Οξειδοαναγωγικά ενεργός σίδηρος μπορεί να βρίσκεται χαλαρά συνδεδεμένος με μόρια χαμηλού μοριακού βάρους, αλλά και με μεγαλύτερα μόρια όπως πρωτεΐνες, DNA, RNA και υδατάνθρακες (25). Επιπλέον, μετά από έκθεση κυττάρων σε H_2O_2 έχει περιγραφεί αύξηση του ασταθούς σιδήρου και ένα πιθανός μηχανισμός είναι το ίδιο το οξειδωτικό στρες. Οξειδωτικοί παράγοντες, που σε συνθήκες οξειδωτικής πίεσης βρίσκονται σε περίσσεια ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2), προκαλούν απόσπαση ιόντων σιδήρου από πρωτεΐνες που περιέχουν σύμπλοκα σιδήρου (όπως η αίμη, η φερριτίνη και πρωτεΐνες με σύμπλοκα σιδήρου-θείου) ή προκαλούν βλάβη σε κυτταρικές δομές, όπως τα λυσοσώματα και το ενδοπλασματικό δίκτυο, οδηγώντας σε απελευθέρωση της LIP που αυτά περιέχουν. Τα ελεύθερα αυτά ιόντα, τα οποία είναι οξειδοαναγωγικά ενεργά (redox active) μπορούν στη συνέχεια να συνδεθούν με το DNA, καθιστώντας το στόχο για το H_2O_2 και εμμέσως για την $\bullet OH$ (32,163).

Επομένως, η ικανότητα των σιδηροδεσμευτικών παραγόντων να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες (λιποφιλικότητα) αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της αποτελεσματικότητά τους στη δέσμευση του ελεύθερου σιδήρου τόσο στο κυτταρόπλασμα, όσο και σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα, όπως ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια και τα λυσοσώματα. Καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της δράσης τους παίζει επίσης η σταθερότητα με την οποία δεσμεύουν το σίδηρο (26).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο σιδηροδεσμευτικοί παράγοντες, η DFO και η DFP, μόρια με διαφορετική λιποφιλικότητα, μοριακό βάρος και τρόπο δέσμευσης με το σίδηρο (Fe^{+3}). Τα σκευάσματα αυτά είναι εγκεκριμένα εδώ και δεκαετίες και χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση του σιδήρου σε περιπτώσεις υπερσιδήρωσης ή και δηλητηρίασης (164). Η DFO λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους και της υδρόφιλης δομής της δεν μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες. Εισέρχεται στα κύτταρα με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης υγρής φάσης και συσσωρεύεται στα λυσοσώματα. Παρόλο που η DFO δεν έχει άμεση πρόσβαση σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα φαίνεται πως επηρεάζει τα επίπεδα ασταθούς σιδήρου και σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα και δρα προστατευτικά για τα κύτταρα σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, γεγονός που δείχνει τον καθοριστικό ρόλο που κατέχει η LIP των λυσοσωμάτων στην ενδοκυττάρια διακίνηση του σιδήρου, καθώς και στην οξειδωτική βλάβη των κυττάρων (9,12,130,131). Η λιπόφιλη DFP με μοριακό βάρος 139 g/mol διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές

μεμβράνες και δημιουργεί με το σίδηρο σταθερό σύμπλοκο μόνο σε αναλογία $\text{Fe}^{+3} : \text{DFP} 1:3$ (165), σε αντίθεση με την DFO που δεσμεύει σταθερά και σε αναλογία 1:1 τα ιόντα σιδήρου (164,166). Προηγούμενες μελέτες του παρόντος εργαστηρίου έδειξαν πως η DFO είναι ικανή να αποσπά από την DFP τον ενδοκυττάριο σίδηρο που αυτή έχει κινητοποιήσει εισερχόμενη στα κύτταρα και να τον διατηρεί οξειδοαναγωγικά ανενεργό. Σε απουσία της DFO τα μόρια σιδήρου δεσμεύονται από την τρανφερίνη, αναδιανέμονται και επιστρέφουν στην δεξαμενή ασταθούς σιδήρου (167). Η παραπάνω υπόθεση μελετήθηκε αρχικά *in vitro* σε ηπατοκύτταρα HepG2 στα οποία εξετάστηκε η προστατευτική ικανότητα των δύο σιδηροδεσμευτικών παραγόντων και του συνδυασμού τους έναντι της οξειδωτικής βλάβης των κυττάρων.

B. 1.2. Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στο *in vitro* μέρος της παρούσας έρευνας προέρχονται από τις παρακάτω εταιρείες:

Sigma Company (St. Luis, MO, USA)

Διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide, DMSO), οξειδάση της γλυκόζης (glucose oxidase, GO) από *aspergillus niger*, 18000 units/g, δωδεκυλοθειϊκό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS), Triton X-100, χρωστική Hoechst 33342 και δεφεριπρόνη (deferiprone, DFP ή 3-Hydroxy-1,2-dimethyl-4(1H)-pyridone).

Novartis Hellas (Αττική, Ελλάδα)

Δεσφериοξαμίνη μεθανοσουλφονική (desferrioxamine mesylate, DFO).

Menzel-Glaset (Menzel, Germany)

Αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου (microscope super frosted glass-slides).

Gibco GRL (Grand Island, NY, USA)

Ορός από έμβρυο βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), αгарόζη χαμηλού σημείου τήξεως, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, πλαστικά για τις κυτταροκαλλιέργειες.

Serva GmbH (Heidelberg, Germany)

Αγαρόζη φυσιολογικού σημείου τήξεως.

Για την παρασκευή διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν χημικές ουσίες αναλυτικού βαθμού καθαρότητας.

B. 1.3. Μέθοδοι

Το παρακάτω πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων με υπεύθυνο τον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας Δημήτριο Γαλάρη.

i. Διατήρηση κυτταρικών σειρών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HepG2 (Human hepatocellular liver carcinoma cell line), η οποία προέρχεται από ηπατοκύτταρα ασθενούς με καρκίνο του ήπατος. Η μακροχρόνια διατήρηση της κυτταρικής σειράς έγινε σε δοχεία τα οποία περιέχουν υγρό άζωτο (-196 °C). Για τη διατήρηση των κυττάρων ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: τα κύτταρα στην εκθετική τους φάση ανάπτυξης συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 250 x g (Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau, Germany) για 10 λεπτά. Ακολούθησε επαναιώρηση σε 5 ml PBS και φυγοκέντρωση όπως προηγουμένως. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε στο διάλυμα κατάψυξης, που αποτελείται από 90% εμβρυϊκό ορό μόσχου (FCS) και 10% διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Ένα ml του μίγματος αυτού ($5-7,5 \times 10^6$ κύτταρα) μεταφέρθηκε σε ειδικά σωληνάρια κατάψυξης (cryotubes), τα οποία ψύχθηκαν σταδιακά. Αρχικά τοποθετήθηκαν στους 4 °C για 10 λεπτά, στη συνέχεια σε καταψύκτη στους -80 °C για 48 ώρες και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο υγρό άζωτο, όπου και διατηρήθηκαν μέχρι τη χρήση τους. Για την επανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς, τα κύτταρα μεταφέρθηκαν γρήγορα από το υγρό άζωτο σε θερμοκρασία 37 °C. Το περιεχόμενο των ειδικών σωληναρίων κατάψυξης μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα με 9 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 250 x g. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10 ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού και στη συνέχεια τοποθετήθηκε σε τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας όπου και καλλιεργήθηκε στις συνήθεις συνθήκες καλλιέργειας για 24 ώρες.

ii. Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας

Τα κύτταρα HepG2 έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται σε σταθερό υπόστρωμα και αναπτύσσονται μέχρι τη δημιουργία πλήρους ταπήτου, σχηματίζοντας αποφύδες. Η ανάπτυξη αυτή έγινε σε πλήρες καλλιεργητικό μέσο DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), με L-

γλουταμίνη, το οποίο περιέχει 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), καθώς και 100 U/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη για εξασφάλιση στείρων συνθηκών.

Ο χειρισμός των κυτταρικών σειρών πραγματοποιήθηκε σε εστία κάθετης νηματικής ροής, ώστε να εξασφαλίζεται περιβάλλον απομονωμένο από την ατμόσφαιρα για αποφυγή μολύνσεων. Η ανάπτυξη των κυττάρων έγινε σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific), που παρείχε σταθερή θερμοκρασία 37 °C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO₂, για να διατηρείται σταθερό το pH στο καλλιεργητικό υλικό. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν περισσότερες από μία φορές αποστειρώθηκαν στους 120 °C για μία ώρα. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά των κυττάρων σε αραιώση 1 προς 6.

iii. Μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

Η βιωσιμότητα είναι το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων στο σύνολο αυτών που μετρήθηκαν. Η μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο του αποκλεισμού της χρωστικής κυανού του τροπανίου (trypan blue dye exclusion) από τα ζωντανά κύτταρα, η οποία δεν διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,25% χρωστικής σε 0,15 M NaCl. Σε ένα μέρος εναιωρήματος κυττάρων προστέθηκε ένα μέρος διαλύματος της χρωστικής, το μίγμα μεταφέρθηκε σε αιματοκυτταρόμετρο τύπου Neubauer και παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Τα ζωντανά κύτταρα φαίνονταν φωτεινά και διάφανα, ενώ τα νεκρά εμφανίζονταν βαθύ μπλε.

iv. Επώαση των κυττάρων

Κύτταρα στην εκθετική φάση ανάπτυξης συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση (250 x g, 10 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου), επαναιωρήθηκαν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό σε συγκέντρωση 1,5 x 10⁶ κύτταρα/ml και αφέθηκαν για 1,5 ώρα σε σταθερές συνθήκες καλλιέργειας. Στη συνέχεια, τα κύτταρα προεπώστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις DFO και DFP, διαλυμένων σε δισαπεσταγμένο νερό, για τα ενδεικνυόμενα σε κάθε περίπτωση χρονικά διαστήματα. Στο τελικό μίγμα προεπώασης η μέγιστη συγκέντρωση του διαλύτη δεν ξεπερνούσε το 3%. Η συγκέντρωση αυτή επιλέχτηκε, ούτως ώστε να μην επηρεάζει τη μελέτη κυτταρικής βλάβης που περιγράφεται παρακάτω. Ακολούθησε έκθεση των κυττάρων σε οξειδάση της γλυκόζης (glucose oxidase-GO). Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τη γλυκόζη του θρεπτικού υλικού (5 mM) και O₂ και παράγει γλυκονικό οξύ και H₂O₂ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η συγκέντρωση GO που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,6 μg/ml, η οποία παράγει 10 μM H₂O₂ ανά λεπτό και ο χρόνος έκθεσης ήταν 10 λεπτά.

v. Ηλεκτροφόρηση του DNA μεμονωμένων κυττάρων (Single Cell Gel Electrophoresis ή Comet assay)

Η εκτίμηση των βλαβών στο κυτταρικό DNA από το H₂O₂ έγινε με την τεχνική της «ηλεκτροφόρησης μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης», η οποία είναι γνωστή και ως «comet assay». Η comet assay είναι μία απλή, εύχρηστη και ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης σχάσεων σε μονές αλυσίδες του DNA. Η μέθοδος αυτή διαθέτει το πλεονέκτημα ότι δίνει τη δυνατότητα να μελετηθεί η βλάβη του κάθε κυττάρου ξεχωριστά. Η πρώτη περιγραφή της «comet assay» πραγματοποιήθηκε από τους Ostling και Johanson, οι οποίοι δημοσίευσαν μία μέθοδο για την ανίχνευση των βλαβών στο κυτταρικό DNA μετά από έκθεση των κυττάρων σε ιονίζουσα ακτινοβολία (168). Το 1988 ο Singh και οι συνεργάτες του (169) τροποποίησαν την αρχική τεχνική των Ostling και Johanson και έβαλαν τη βάση για τη μετέπειτα εξέλιξη της μεθόδου. Από την πρώτη περιγραφή της μέχρι σήμερα, η μέθοδος έχει υποστεί διάφορες τροποποιήσεις, με τις οποίες αυξήθηκαν σημαντικά τόσο η ευαισθησία όσο και η χρησιμότητά της. Έτσι, ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες, η comet assay ανιχνεύει σχάσεις στις μονές ή διπλές αλυσίδες του DNA, αλλά και οξειδωμένες βάσεις του DNA, οι οποίες μετά από επώαση με κατάλληλα ένζυμα που τις αναγνωρίζουν, απομακρύνονται έχοντας ως αποτέλεσμα σχάσεις στο DNA, τις οποίες και ανιχνεύει η μέθοδος αυτή.

Με την παραλλαγή της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, εκτιμήθηκαν οι σχάσεις στις μονές αλυσίδες του DNA. Προκειμένου να γίνει αυτό, το DNA ηλεκτροφορήθηκε κάτω από ισχυρά αλκαλικές συνθήκες (pH>13), με αποτέλεσμα τη λύση των δεσμών υδρογόνου και αποδιάταξη του δίκλωνου DNA προς μονόκλωνο. Η παρουσία σχάσεων στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA επιτρέπει τη μετατόπιση του αρνητικά φορτισμένου DNA προς την άνοδο κατά την ηλεκτροφόρηση, με αποτέλεσμα να προκύπτουν διάφοροι σχηματισμοί του DNA που μοιάζουν με κομήτες. Μάλιστα, το ποσοστό του DNA που μετατοπίζεται είναι ανάλογο με τον αριθμό των σχάσεων του. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανιχνεύονται επίσης και απουρινικές ή απουριμινδικές περιοχές (AP sites), οι οποίες σε υψηλό pH μετατρέπονται σε σχάσεις (alkali labile sites). Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι δίκλωνες αλυσίδες του DNA, που δεν έχουν μετατοπιστεί με

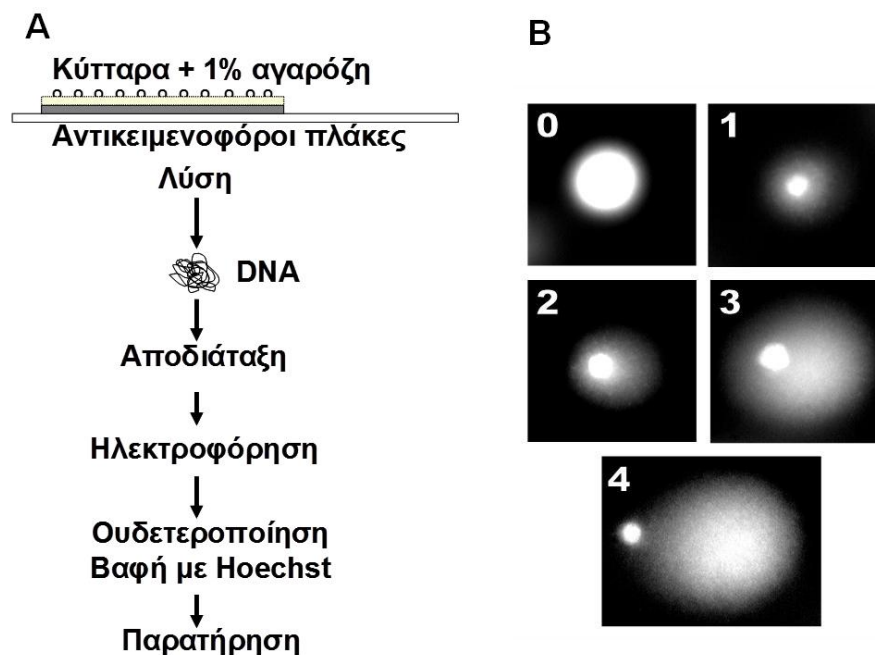
την ηλεκτροφόρηση, επανασχηματίζονται. Έτσι, οι σχηματισμοί που παρατηρούνται στο μικροσκόπιο μετά από τη χρώση του DNA, είναι στην πράξη «θηλιές» του DNA, που απελευθερώνονται από ένα υψηλά υπερελικωμένο σύμπλοκο DNA-πρωτεϊνών (nucleoids).

vi. Πειραματική διαδικασία

Κύτταρα HepG2 (80.000/φρεάτιο) τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 24 φρεατίων και αφέθηκαν να ηρεμήσουν για 24 ώρες. Στη συνέχεια, μετά την προεπώαση των κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις DFO, DFP και του συνδυασμού τους, ακολούθησε έκθεση ή μη έκθεση των κυττάρων για 10 λεπτά σε οξειδάση της γλυκόζης (Glucose Oxidase, G.O.), 0,6 µg/ml, ποσότητα ικανή να παράγει 10 µM H₂O₂ ανά λεπτό. Έπειτα, τα κύτταρα συλλέχθηκαν, και αφού αναμίχθηκαν με κρύο PBS (με αναλογία 1:10), φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στα 400 x g (centrifuge 5415D, Eppendorf). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100µl διαλύματος αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξεως (1% σε PBS) και μεταφέρθηκε σε αντικειμενοφόρες πλάκες μικροσκοπίου, οι οποίες προηγουμένως είχαν επιστρωθεί με αγαρόζη κανονικού σημείου τήξεως (1 % σε PBS), και καλύφθηκε με καλυπτρίδα 2 x 2 cm. Οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 4 °C για 10 λεπτά, ώστε να σχηματιστεί η πηκτή και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν για 60 λεπτά σε διάλυμα λύσης (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 µM Tris σε pH 10 και 1 % Triton-X 100 v/v) στους 4 °C. Στο στάδιο αυτό, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και τα περισσότερα κυτταρικά συστατικά απομακρύνονται και παραμένει μόνο το πυρηνικό DNA εγκλωβισμένο στην πηκτή της αγαρόζης, υπερελικωμένο και συσκευασμένο σε μια πυρηνοειδή (nucleus-like) δομή. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε μονή σειρά σε μια οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, που περιείχε ψυχρό διάλυμα αποελίκωσης (unwinding solution: 0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH~13) στους 4 °C για 40 λεπτά, έτσι ώστε να ξεδιπλωθούν οι αλυσίδες του κυτταρικού DNA (αλκαλική αποελίκωση). Η ηλεκτροφόρηση του DNA πραγματοποιήθηκε στο ίδιο διάλυμα, στα 30 V (1V/cm) και 300 mA, για 30 λεπτά και ακολούθησε ουδετεροποίηση με 0.4 M Tris (pH 7.5, 4 °C) τρεις φορές από 5 λεπτά η κάθε μία (170), πριν τη χρώση του κυτταρικού DNA με προσθήκη 20µl διαλύματος της φθορίζουσας χρωστικής Hoechst 33342 (25 µg/ml σε PBS) ανά πλάκα και παραμονή στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, οι πλάκες εμβαπτίστηκαν σε PBS και η πηκτή καλύφθηκε με καλυπτρίδα.

vii. Οπτική παρατήρηση και αξιολόγηση των σχάσεων

Οι πλάκες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού με φίλτρο διέγερσης 490 nm και σε μεγέθυνση 400 x. Η βλάβη δεν είναι ομοιογενής και η οπτική της εκτίμηση για κάθε δείγμα, βασίζεται στο χαρακτηρισμό 100 τυχαίων σχηματισμών. Οι σχηματισμοί του πυρηνικού DNA που έχουν υποστεί βλάβη, παρουσιάζουν χαρακτηριστική μορφολογία, η οποία μοιάζει με την κεφαλή και την ουρά ενός κομήτη. Κάθε σχηματισμός κατατάχθηκε σε μια από τις 5 τάξεις (0-4), ανάλογα με τα μορφολογικά του γνωρίσματα (Εικόνα 1). Οι 5 τάξεις αντιπροσωπεύουν αυξανόμενη έκταση βλάβης του DNA. Η βλάβη σε κάθε δείγμα εκφράστηκε αθροιστικά, πολλαπλασιάζοντας το ποσοστό των σχηματισμών ανά τάξη με τον αριθμό της τάξης που ανήκε και εκφράζοντας τη βλάβη σε αυθαίρετες μονάδες. Έτσι, η βλάβη του DNA μπορεί να λάβει τιμές από 0 (όταν όλοι οι σχηματισμοί ανήκουν στην τάξη 0) έως 400 αυθαίρετες μονάδες, όταν όλοι οι σχηματισμοί ανήκουν στην τάξη 4. Με αυτόν τον τρόπο η ολική βλάβη στο DNA ενός κυτταρικού πληθυσμού μπορεί να εκφραστεί σε αυθαίρετες μονάδες (170).



Εικόνα 1: (A) Απεικόνιση των διαδοχικών σταδίων της πειραματικής διαδικασίας της τεχνικής «comet assay» και (B) μορφολογία των σχηματισμών του DNA σε κάθε μία από τις πέντε τάξεις κατά την οπτική παρατήρηση.

viii. Εκτίμηση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασταθούς σιδήρου

Τα επίπεδα της ενδοκυττάριας LIP εκτιμήθηκαν με τη φθορισμομετρική μέθοδο της φθορίζουσας ουσίας καλσεΐνη σύμφωνα με μέθοδο που έχει περιγραφεί από το ίδιο εργαστήριο και με ελάχιστες τροποποιήσεις αυτής (13). Κύτταρα HepG2 επωάστηκαν με 0.15 μ M καλσεΐνης-AM (ακετοξυ-μεθυλεστέρας) για 15 λεπτά στους 37°C σε διάλυμα PBS που περιείχε 1mg/ml αλβουμίνη ορού βοός (BSA) και 20 mM ρυθμιστικού διαλύματος Hepes με pH=7.3. Ακολούθως, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 2.2 ml του προηγούμενου ρυθμιστικού διαλύματος χωρίς καλσεΐνη-AM και τοποθετήθηκε σε, υπό ανάδευση, θερμοστατούμενη κυβέτα (37°C) φασματόμετρου φθορισμού (F-2500 Hitachi). Ο φθορισμός της καλσεΐνης καταγράφηκε με τη χρήση μήκους κύματος διέγερσης 488nm και μήκους κύματος εκπομπής 517nm. Τα κύτταρα που έχουν επωασθεί με καλσεΐνη φθορίζουν και αυτός ο φθορισμός μειώνεται όταν αυτή συνδέεται με σίδηρο. Ακολούθως, προστέθηκαν 90 μ M του ειδικού σιδηροδεσμευτικού παράγοντα SIH (Salicylaldehyde Isonicotinoyl Hydrazone), ο οποίος διαπερνά εύκολα την πλασματική μεμβράνη, αποσπά το σίδηρο από την καλσεΐνη και οδηγεί σε αύξηση του φθορισμού της. Η διαφορά του φθορισμού της καλσεΐνης πριν και μετά την προσθήκη του SIH επιτρέπει την ποσοτικοποίηση σε αυθαίρετες μονάδες του ενδοκυττάριου σιδήρου που δεσμεύει η καλσεΐνη, δηλαδή της δεξαμενής ασταθούς σιδήρου (LIP-labile iron pool). Η βιωσιμότητα των κυττάρων με τη μέθοδο αποκλεισμού της χρωστικής κυανούν του τροπανίου ήταν >95% και παρέμεινε αμετάβλητη σε όλη τη διάρκεια του πειράματος.

Πριν την προσθήκη του SIH στην υπό ανάδευση κυβέτα προστέθηκαν οι ενώσεις DFO και DFP. Η αύξηση του φθορισμού που παρατηρήθηκε δείχνει την ικανότητα αυτών των ενώσεων να αποσπούν σίδηρο από την καλσεΐνη. Ως τελευταίο στάδιο του πειράματος, προστέθηκε ο ειδικός σιδηροδεσμευτής SIH ώστε να ελεγχθεί από τη διαφορά του φθορισμού αν οι ενώσεις αυτές είναι ικανές να αποσπούν ολόκληρη της ποσότητα του σιδήρου που είναι συνδεδεμένη με την καλσεΐνη.

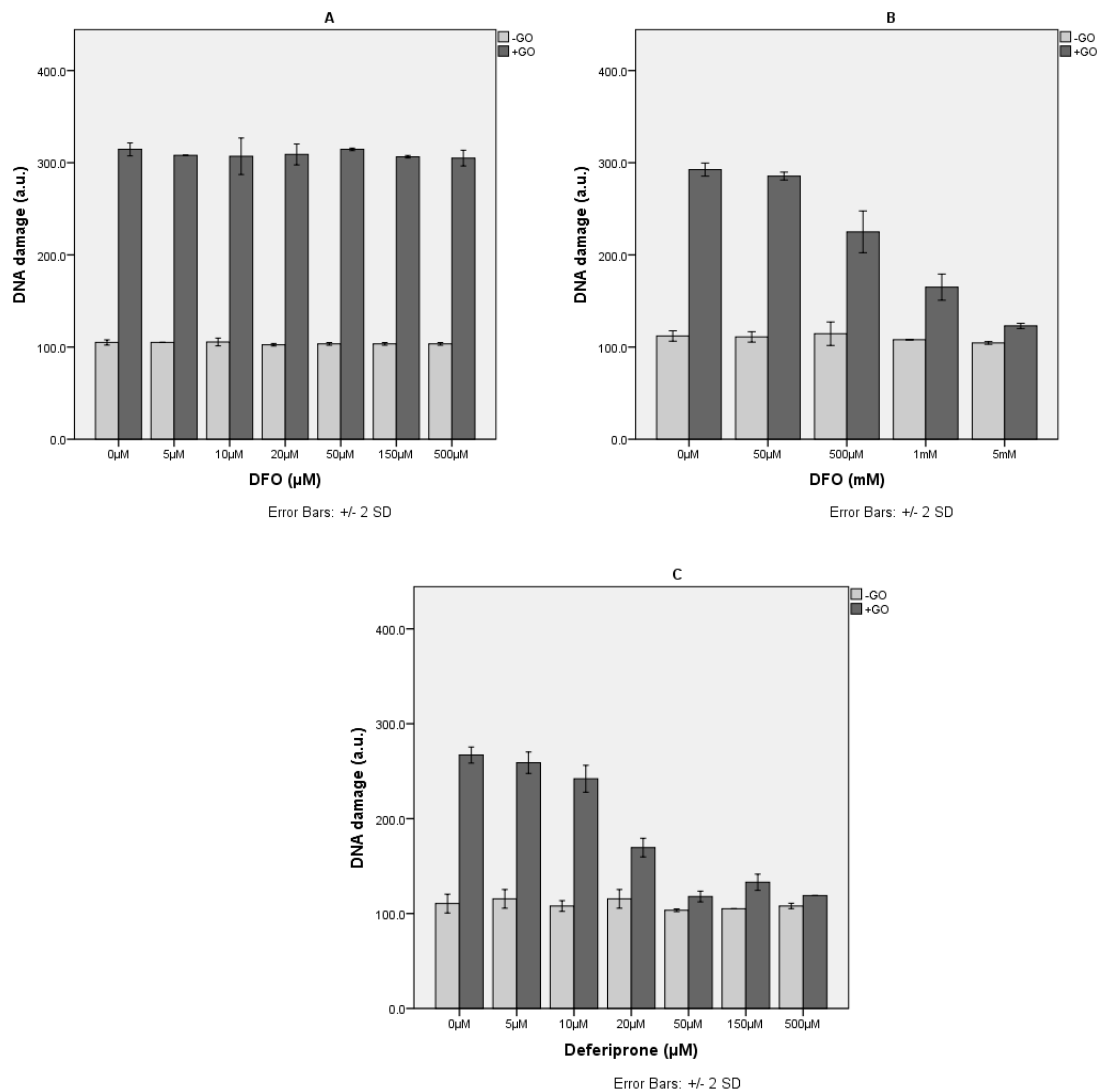
B. 1.4. Αποτελέσματα

i. Προστασία έναντι της οξειδωτικής βλάβης του πυρηνικού DNA

Σε αυτό το στάδιο της μελέτης ελέγχθηκε η ικανότητα των δύο σιδηροδεσμευτικών παραγόντων να προστατεύουν το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σε H_2O_2 . Καρκινικά κύτταρα HepG2 προεπώσθησαν για 20 λεπτά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις DFO (0, 5, 10, 20, 50, 150 και 500 μ M), DFP (0, 5, 10, 20, 50, 150 και 500 μ M) και 2 ώρες με αυξανόμενες και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις DFO (0, 50 μ M, 500 μ M, 1 και 5 mM) και στη συνέχεια εκτέθηκαν για 10 λεπτά στο ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (G.O.) με στόχο της παραγωγή H_2O_2 και τη δημιουργία περιβάλλοντος οξειδωτικού στρες. Τέλος, ακολούθησε αξιολόγηση των σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA μεμονωμένων κυττάρων σε πηκτή αγαρόζης (comet assay), όπως περιγράφεται στην παράγραφο «Οπτική παρατήρηση και αξιολόγηση των σχάσεων».

Η προεπώαση των κυττάρων με DFO για 20 λεπτά δεν παρατηρήθηκε να προσφέρει προστασία έναντι της βλάβης του πυρηνικού DNA σε καμία από τις συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν (Διάγραμμα 1-A). Προστασία παρατηρήθηκε, ωστόσο, μετά από επώαση των κυττάρων με υψηλές συγκεντρώσεις DFO (500 μ M-5mM) και παρατεταμένο χρόνο επώασης 2 ωρών (Διάγραμμα 1-B). Αντιθέτως, η δεφεριπρόνη παρατηρήθηκε να προσφέρει προστασία από συγκεντρώσεις των 5 και 10 μ M, η οποία έγινε ιδιαίτερα εμφανής στη συγκέντρωση των 20 μ M και σε υψηλότερες αυτής (Διάγραμμα 1-C).

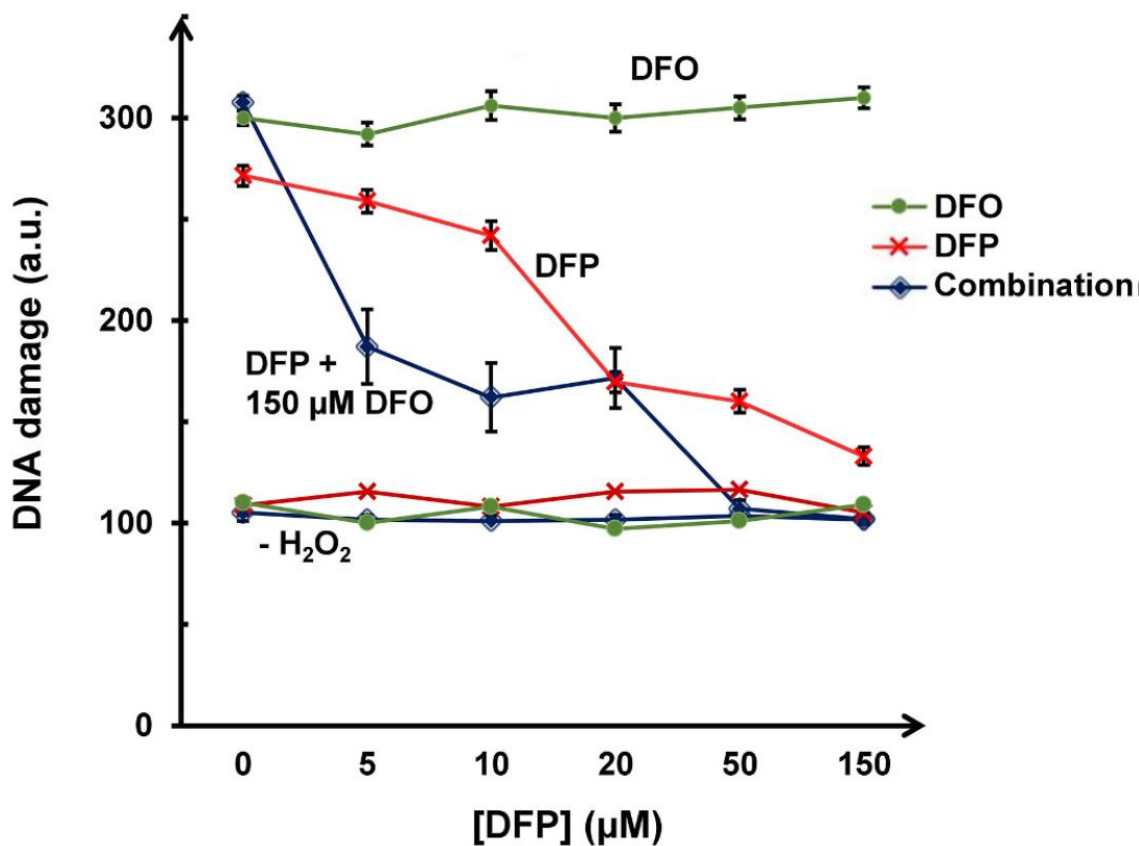
Τα ευρήματα αυτά ερμηνεύονται από το γεγονός πως η DFO είναι ένα υδρόφιλο και μεγάλου μοριακού βάρους μόριο (656.8g/mol) που δεν μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα με παθητική διάχυση, αλλά με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης υγρής φάσης που απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο έκθεσης και υψηλότερες συγκεντρώσεις (12). Η DFP διαθέτει πολύ μικρότερο μοριακό βάρος και λιπόφιλη μοριακή δομή ώστε να μπορεί να εισέρχεται γρήγορα στον ενδοκυττάριο χώρο και να δεσμεύει ελεύθερο σίδηρο, προσφέροντας προστασία.



Διάγραμμα 1: Έλεγχος της προστατευτικής δράσης της δεσφερριοξαμίνης και της δεφεριπρόνης σε διαφορετικούς χρόνους και συγκεντρώσεις επώασης ενάντια στη βλάβη που προκαλεί το H₂O₂ στο πυρηνικό DNA. Κύτταρα HepG2 (80.000 ανά φρεάτιο) προεπωάστηκαν για 20 λεπτά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφερριοξαμίνης (A) ή για 2 ώρες με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεσφερριοξαμίνης (B) ή για 20 λεπτά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης (C). Στη συνέχεια, εκτέθηκαν για 10 λεπτά (σκουρόχρωμες στήλες) ή δεν εκτέθηκαν (ανοιχτόχρωμες στήλες) σε H₂O₂ (παραγόμενο από τη δράση 0,6μg/ml οξειδάσης της γλυκόζης-GO). Ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA αξιολογήθηκε με τη μέθοδο «comet assay». Η βλάβη του DNA εκφράστηκε σε αυθαίρετες μονάδες όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι». Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή ± SD διπλών μετρήσεων σε τρία διαφορετικά πειράματα.

Τέλος, εξετάστηκε η προστασία που προσφέρουν οι δύο σιδηροδεσμευτικοί παράγοντες όταν χορηγούνται ταυτόχρονα, με την υπόθεση πως ο συνδυασμός των παραπάνω ιδιοτήτων τους πιθανόν να προσφέρει ενισχυμένη προστασία έναντι της οξειδωτικής βλάβης.

Κύτταρα HepG2 προεπώσθηκαν για 2 ώρες με 150 μM DFO (μη προστατευτική δράση μεμονωμένα) με την προσθήκη στη συνέχεια DFP σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (5, 10, 20, 50 και 100 μM). Έπειτα, προστέθηκε για 10 λεπτά το ένζυμο G.O. και αξιολογήθηκε η βλάβη του πυρηνικού DNA με τη μέθοδο comet assay. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 2 η προσθήκη DFO σε συγκεντρώσεις 0-150 μM για 2 ώρες πρόσφερε από μόνη της αμελητέα προστασία έναντι της βλάβης του πυρηνικού DNA. Ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων, αντιθέτως, έδειξε σημαντικού βαθμού προστασία ήδη από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις DFP των 5 ή 10 μM . Πιο συγκεκριμένα, με την προσθήκη 5 μM DFP σε κύτταρα που είχαν ήδη προεπωαστεί για 2 ώρες με 150 μM DFO η προστασία αυξήθηκε περίπου 45% (από 15% σε 60%) και με την προσθήκη 10 μM DFP παρατηρήθηκε αύξηση 50% (από 20% σε 75%). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν συμπληρωματική δράση των δύο σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων και επιβεβαιώνουν την υπόθεση της παρούσας μελέτης. (Διάγραμμα 2).

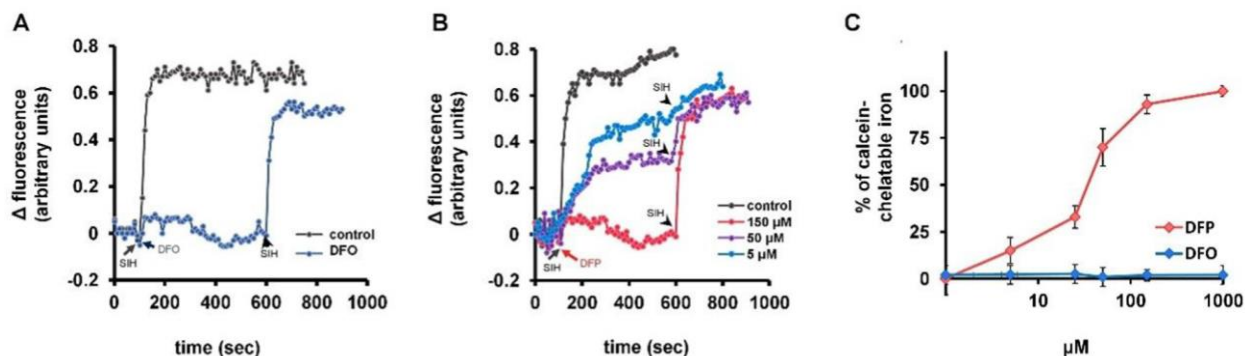


Διάγραμμα 2: Προστασία της δεσφερριοξαμίνης, δεφεριπρόνης και του συνδυασμού τους έναντι της βλάβης που προκαλεί το H_2O_2 στο πυρηνικό DNA. Κύτταρα HepG2 (80.000 ανά φρεάτιο) προεπώσθηκαν **α)** για 2 ώρες με 150 μM δεσφερριοξαμίνης (DFO, πράσινες γραμμές), **β)** για 20 λεπτά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης (DFP, κόκκινες γραμμές), ή **γ)** για 2 ώρες με 150 μM δεσφερριοξαμίνης και στη συνέχεια για 20 λεπτά με αυξανόμενες συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης

(Combination-μπλε γραμμές). Ακολούθως, τα κύτταρα εκτέθηκαν ή δεν εκτέθηκαν ($-H_2O_2$) για 10 λεπτά σε H_2O_2 (παραγόμενο από τη δράση $0,6\mu g/ml$ οξειδάσης της γλυκόζης-GO). Ο σχηματισμός σχάσεων στις μονές αλυσίδες του DNA αξιολογήθηκε με τη μέθοδο «comet assay». Η βλάβη του DNA εκφράστηκε σε αυθαίρετες μονάδες όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και μέθοδοι». Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή $\pm$ SD διπλών μετρήσεων σε τρία διαφορετικά πειράματα.

ii. Δέσμευση της ενδοκυττάριας δεξαμενής ασταθούς σιδήρου

Όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως η αδυναμία της DFO να προστατεύσει τα κύτταρα έναντι του οξειδωτικού στρες σχετίζεται με την δυσκολία με την οποία αυτή εισέρχεται στον ενδοκυττάριο χώρο, καθώς δεν μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες με διάχυση, σε αντίθεση με την DFP που αποκτά πολύ εύκολα πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου (12,159). Η θεωρία αυτή επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη με τη χρήση της μεθόδου της καλσεΐνης που περιγράφεται στο κεφάλαιο B.1.3. Μέθοδοι, παράγραφος viii. Εκτίμηση των επιπέδων του ενδοκυττάρια ασταθούς σιδήρου. Η μέθοδος επιτρέπει την σε πραγματικό χρόνο εκτίμηση της ενδοκυττάριας LIP μετά από προσθήκη των σιδηροδεσμευτικών παραγόντων DFO και DFP. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 3-A, η προσθήκη $150\mu M$ DFO στα υπό καλλιέργεια κύτταρα HepG2 δεν επηρέασε τα επίπεδα της ενδοκυττάριας LIP, όπως επιβεβαιώνεται και από την επακόλουθη προσθήκη του ειδικού σιδηροδεσμευτικού παράγοντα SIH, με γνωστή ικανότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη. Αντιθέτως, η προσθήκη DFP στις κυτταρικές καλλιέργειες οδήγησε σε αύξηση του φθορισμού εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση του φαρμάκου και συνεπώς σε μείωση του δεσμεύσιμου από τον SIH σιδήρου (Διάγραμμα 3-B και C). Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν διάχυση της DFP διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών και τη δράση της, με τη δέσμευση του ασταθούς σιδήρου, στον ενδοκυττάριο χώρο. Σημειώνεται πως η DFO φάνηκε να μη δεσμεύει την ενδοκυττάρια LIP ακόμη και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 3-C, μπλε γραμμή).



Διάγραμμα 3: Επίδραση της DFO και DFP στα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασταθούς σιδήρου. Τα επίπεδα της ενδοκυττάριας δεξαμενής ασταθούς σιδήρου εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο της καλσεΐνης. Κύτταρα HepG2 (150.000 ανά ml) αποκολλήθηκαν από τον πυθμένα δισκίων Petri και μεταφέρθηκαν σε κυβέτα του φασματόμετρου φθορισμού. Οι αλλαγές του φθορισμού καταγράφηκαν σε πραγματικό χρόνο. **(A,B)** Σε κύτταρα μάρτυρες (γκρι γραμμή) η προσθήκη SIH-salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (γκρι βέλος) οδήγησε σε αύξηση του φθορισμού που είναι ανάλογη της ποσότητας του σιδήρου που δεσμεύει η καλσεΐνη. **(A)** Αντιθέτως, η προσθήκη DFO (μπλε βέλος) δεν οδήγησε σε κάποια εμφανή αλλαγή του φθορισμού, όπως φαίνεται και από την επακόλουθη προσθήκη SIH (κοντό βέλος). **(B)** Σε αντίθεση με την DFO, η προσθήκη αυξανόμενων συγκεντρώσεων DFP στα κύτταρα (κόκκινο βέλος) οδήγησε σε αντίστοιχη μείωση του φθορισμού, καταδεικνύοντας την ενδοκυττάρια δράση του φαρμάκου, που επιβεβαιώθηκε από την αντίστοιχη αύξηση μετά την προσθήκη SIH (κοντά βέλη). **(C)** Διάγραμμα που δείχνει τη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της DFO ή της DFP και του ποσοστού (%) της δεξαμενής ασταθούς σιδήρου που δεσμεύεται από το κάθε φάρμακο. Κάθε σημείο (τιμή) αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τριών διαφορετικών πειραμάτων.

B. 1.5. Συζήτηση

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα ο συνδυασμός δύο σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων με διαφορετική λιποφιλικότητα προσφέρει καλύτερη προστασία έναντι της οξειδωτικής βλάβης των ηπατοκυττάρων. Η προστατευτική ικανότητα των ενώσεων που δεσμεύουν τον σίδηρο σχετίζεται με δύο χαρακτηριστικά αυτών: α) την ικανότητά τους να εισέρχονται στο εσωτερικό των κυττάρων και β) την ικανότητά τους να δεσμεύουν τον σίδηρο. Όπως επιβεβαιώνεται και από το πείραμα της επίδρασης του κάθε φαρμάκου στα επίπεδα του ενδοκυττάριου σιδήρου, η DFP αποκτά εύκολη πρόσβαση και δεσμεύει ενδοκυττάριας δεξαμενές οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου, ενώ δεν ισχύει το ίδιο για τη DFO ακόμη και για υψηλές συγκεντρώσεις αυτής.

Η DFO αποτελεί μόριο με μεγάλο μοριακό βάρος και χαμηλή λιποφιλικότητα ($K_{part}=0,02$), χαρακτηριστικά που δεν βοηθούν την πρόσβασή της στον ενδοκυττάριο χώρο με διάχυση διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης (171). Έχει περιγραφεί πως η DFO εισέρχεται στα κύτταρα

με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης υγρής φάσης και συσσωρεύεται στα λυσοσώματα (12). Η τελευταία αποτελεί μια μη ειδική διαδικασία με την οποία τα κύτταρα ενδοκυτταρώνουν υγρό από το περιβάλλον τους μαζί με τα εκάστοτε συνυπάρχοντα μόρια. Ως εκ τούτου, για την DFO απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις και μεγάλος χρόνος προεπώασης ώστε να εισέλθει στο κύτταρο και να δράσει προστατευτικά σε καλλιέργειες κυττάρων (11,12).

Όπως παρατηρήθηκε, όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν για 20 λεπτά με DFO στις ενδεικνυόμενες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε κάποια προστασία από τη βλάβη των κυττάρων στο πυρηνικό DNA (Διάγραμμα 1-A). Η DFO για να προσφέρει προστασία, χρειάστηκε τα κύτταρα να προεπωαστούν με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυτής (0,5 έως 5 mM) αλλά και για μεγαλύτερο χρόνο επώασης (2 ώρες)-Διάγραμμα 1-B, καθώς η διαδικασία της ενδοκύττωσης υγρής φάσης απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις και κάποιο χρονικό διάστημα προκειμένου να διεκπεραιωθεί. Αντιθέτως, όταν τα κύτταρα προεπώαστηκαν για 20 λεπτά με DFP παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της βλάβης από τις συγκεντρώσεις των 5μM, η οποία έγινε πιο έντονη στη συγκέντρωση των 20 μM DFP (Διάγραμμα 1-C).

Η DFP χαρακτηρίζεται από υψηλότερη λιποφιλικότητα ($K_{part}=0,19$) και μοριακό βάρος μόλις 139. Συνεπώς έχει την ικανότητα τα διεισδύει διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών στο κύτταρο, αποκτώντας πρόσβαση στις ενδοκυττάρια δεξαμενές ασταθούς σιδήρου (171).

Τέλος, φάνηκε πως η συνδυασμένη προεπώαση των κυττάρων με σταθερή συγκέντρωση DFO και αυξανόμενες συγκεντρώσεις DFP προσέφερε προστασία που ήταν μεγαλύτερη σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις DFP (μεταξύ 5 και 10μM) σε σύγκριση με την προστασία που προσέφερε η DFP μεμονωμένα.

Στην περίπτωση συνδυασμού των δύο φαρμάκων η DFO μπορεί και αποσπά τον σίδηρο (Fe^{+3}) που είναι συνδεδεμένος με τη DFP στον εξωκυττάριο χώρο. Αυτό συμβαίνει καθώς η DFO παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια για τον Fe^{+3} και ως εξασχιδής δεσμευτικός παράγοντας συνδέει τον Fe^{+3} με μεγαλύτερη ισχύ και σταθερότητα σε σύγκριση με τη δεφεριπρόνη (δισχιδής παράγοντας), λειτουργώντας με αυτό τον τρόπο ως μια δεξαμενή όπου ο σίδηρος δεσμεύεται με ασφάλεια. Το αποτέλεσμα είναι η μείωση του ενδοκυττάρου οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου και η προστασία των κυττάρων σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. *In vivo* ο δεσμευμένος αυτός σίδηρος αποβάλλεται από τον οργανισμό (159,167).

B.2. Πείραμα *in vivo*

B.2.1. Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε ήδη στο Γενικό Μέρος, παράλληλα με την πρόοδο της χειρουργικής του ήπατος (ηπατεκτομές, μεταμοσχεύσεις) προέκυψε και η ανάγκη διαχείρισης και μετριασμού της βλάβης από I/R, φαινόμενο που αποτελεί σημαντικό παράγοντα νοσηρότητας και θνητότητας στη χειρουργική του ήπατος. Ο αποκλεισμός της ηπατικής αρτηρίας και της πυλαίας φλέβας στο ύψος της πύλης του ήπατος, γνωστός και ως χειρισμός Pringle, και συνεπώς η θερμή ισχαιμία του οργάνου, αποτελεί τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά κατά τη διάρκεια ηπατεκτομών με σκοπό τον περιορισμό της απώλειας αίματος διεγχειρητικά. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μεταμόσχευσης του ήπατος το όργανο υποβάλλεται τόσο σε θερμή, όσο και σε ψυχρή ισχαιμία. Οι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στους δύο τύπους ισχαιμίας είναι πολύπλοκοι, αλλά σε μεγάλο βαθμό παρόμοιοι (8,108).

i. Αιμάτωση του ήπατος

Το ήπαρ διαθέτει διπλή παροχή αίματος, λαμβάνοντας το 75% της αιματικής παροχής από την πυλαία φλέβα και το 25% αυτής από την ηπατική αρτηρία. Η κοινή ηπατική αρτηρία εκφύεται από την κοιλιακή αρτηρία ή τρίποδα του Haller από την οποία εκφύονται ακόμη η σπληνική και η αριστερή γαστρική αρτηρία. Σε ποσοστό 76% η ηπατική αρτηρία διχάζεται στη δεξιά και αριστερή ηπατική αρτηρία, ενώ στο 24% των περιπτώσεων συναντώνται ποικίλες παραλλαγές (95). Η πυλαία φλέβα σχηματίζεται από τη συμβολή της σπληνικής με την άνω μεσεντέριο φλέβα. Πριν την συμβολή τους, στην σπληνική φλέβα εκβάλλει και η κάτω μεσεντέριος φλέβα. Η πυλαία φλέβα διχάζεται σε δεξιό και αριστερό κλάδο. Από την αριστερή πυλαία φλέβα εκφύονται κλάδοι που τροφοδοτούν τα τμήματα του αριστερού λοβού (II, III, IVA, IVB), καθώς και τον κερκοφόρο λοβό. Ο δεξιός κλάδος της πυλαίας φλέβας τροφοδοτεί τα τμήματα του δεξιού λοβού του ήπατος (V, VI, VII και VIII). Η πυλαία φλέβα συγκεντρώνει στο ήπαρ το φλεβικό αίμα από το στομάχο, το πάγκρεας, το σπλήνα, το λεπτό έντερο και το μεγαλύτερο μέρος του παχέος εντέρου. Το αίμα αυτό διαμέσου των ηπατικών κολποειδών, των κεντρικών φλεβιδίων των ηπατικών λοβίων και εν τέλει των τριών κύριων ηπατικών φλεβών, που εκβάλλουν στην κάτω κοίλη φλέβα, επιστρέφει στη συστηματική κυκλοφορία (95,172). Υπάρχουν τρεις ηπατικές φλέβες (δεξιά, μέση και αριστερή), οι οποίες παροχετεύουν το αίμα από το ήπαρ στο υπερηπατικό τμήμα της κάτω κοίλης φλέβας και εν συνεχεία το δεξιό κόλπο.

ii. Σύνδεσμοι του ήπατος

Το ήπαρ περιβάλλεται από την ινώδη κάψα του Glisson και συγκρατείται στη θέση του από τους παρακάτω συνδέσμους:

- ο δρεπανοειδή σύνδεσμο, ο οποίος έχει οβελιαία πορεία από το πρόσθιο κοιλιακό τοίχωμα και το διάφραγμα (άνωθεν του ομφαλού) προς την πρόσθια και διαφραγματική επιφάνεια του ήπατος και περιγραφικά το χωρίζει σε δεξιό και αριστερό λοβό. Λειτουργικά, ωστόσο, χωρίζει τον αριστερό λοβό του ήπατος σε πλάγιο και έσω τομέα
- ο στρογγύλο σύνδεσμο, ο οποίος αποτελεί υπόλειμμα της ομφαλικής φλέβας και αποτελεί το κάτω χείλος του δρεπανοειδούς συνδέσμου
- ο δεξιό και αριστερό στεφανιαίο σύνδεσμο, οι οποίοι αποτελούν ανάκαμψη του τοιχωματικού περιτοναίου μεταξύ του διαφράγματος και της οπίσθιας και άνω επιφάνειας του ήπατος. Οι σύνδεσμοι αυτοί αποτελούνται από δύο πέταλα. Στον αριστερό λοβό του ήπατος τα δύο πέταλα συγχωνεύονται μετά από βραχεία πορεία και σχηματίζουν τον αριστερό τρίγωνο σύνδεσμο, ενώ στην οπίσθια επιφάνεια του δεξιού λοβού πορεύονται απομακρυσμένα το ένα από το άλλο, αφήνοντας μεγάλο μέρος της επιφάνειας αυτής ακάλυπτο από περιτόναιο, έως ότου συγχωνευθούν για το σχηματισμό του δεξιού τρίγωνου συνδέσμου.
- ο δεξιό και αριστερό τρίγωνο σύνδεσμο, οι οποίοι συνδέουν το δεξιό και αριστερό έξω πλάγιο τμήμα του ήπατος, αντίστοιχα, με το διάφραγμα (172).

Οι παραπάνω σύνδεσμοι μπορούν όλοι να διαταμούν σε ανάγγειο επίπεδο με στόχο την πλήρη κινητοποίηση του ήπατος (95).

Σε αντίθεση με τους ανάγγειους συνδέσμους ο ηπατοδωδεκαδακτυλικός και ηπατογαστρικός σύνδεσμος φιλοξενούν σημαντικά σπλαχνικά αγγεία. Οι δύο σύνδεσμοι είναι συνέχεια ο ένας του άλλου και αποτελούν το έλασσον επίπλουν. Ο ηπατογαστρικός σύνδεσμος εκτείνεται από την σπλαχνική επιφάνεια του ήπατος έως το έλασσον τόξο του στομάχου και εντός του πορεύονται η αριστερή γαστρική αρτηρία και φλέβα και ο ηπατικός κλάδος του πνευμονογαστρικού νεύρου. Ο ηπατοδωδεκαδακτυλικός σύνδεσμος εκτείνεται ανάμεσα στην πύλη του ήπατος και την πρώτη μοίρα του δωδεκαδακτύλου και σχηματίζει το ελεύθερο χείλος του ελάσσονος επιπλόου. Περιέχει τον χοληδόχο πόρο, την ηπατική αρτηρία, την πυλαία φλέβα, καθώς και κλάδους του ηπατικού αυτόνομου νευρικού συστήματος και λεμφαδένες (172). Πίσω (ραχιαία) από το ελεύθερο χείλος του ελάσσονος επιπλόου βρίσκεται το τρήμα του Winslow ή επιπλοϊκό τρήμα που αποτελεί την

είσοδο στον ελάσσονα επιπλοϊκό θύλακα. Η δίοδος αυτή δίνει πρόσβαση για τον πλήρη αγγειακό αποκλεισμό του ήπατος με την εφαρμογή του χειρισμού Pringle (95).

Όπως αναφέρθηκε ήδη στο Γενικό Μέρος, η ισχαιμία και επαναιμάτωση του ήπατος συναντάται σε ποικίλες κλινικές καταστάσεις και αποτελεί μέχρι και σήμερα πεδίο συνεχιζόμενης έρευνας, καθώς δεν υπάρχει ακόμη ευρέως αποδεκτή μέθοδος περιορισμού της βλάβης από I/R (173).

iii. Πειραματικές μελέτες μείωσης της βλάβης από ισχαιμία-επαναιμάτωση του ήπατος

Από τα υπάρχοντα δεδομένα της εκτεταμένης έρευνας στο πεδίο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης του ήπατος, κύριο συμπέρασμα παραμένει πως οι υπεύθυνοι μηχανισμοί της βλάβης είναι εξαιρετικά πολύπλοκοι. Σε αυτούς εμπλέκονται ΔΜΟ, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως τα ουδετερόφιλα και μακροφάγα, καθώς και διαταραχές της μικροκυκλοφορίας, ενώ από τη βιβλιογραφία προκύπτουν και αντικρουόμενες ερμηνείες της παθοφυσιολογίας που οδηγεί στη βλάβη (174).

Οι μηχανισμοί που οδηγούν στη βλάβη μπορεί να διαφοροποιούνται ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν κατά την I/R του ήπατος. Έτσι, ο τύπος της ισχαιμίας (θερμή ή ψυχρή), η έκταση του ηπατικού παρεγχύματος που υποβάλλεται σε ισχαιμία, ο χρόνος ισχαιμίας, καθώς και αν συνυπάρχει εκτομή ήπατος που ενεργοποιεί μηχανισμούς αναγέννησης του παρεγχύματος, δημιουργούν διαφορετικούς συνδυασμούς μηχανισμών που συμμετέχουν στη βλάβη. Επιπλέον, στρατηγικές μείωσης της βλάβης οδηγούν σε διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες I/R (174).

Το πρώτο, ίσως, πειραματικό μοντέλο στο οποίο μελετήθηκε η δυνατότητα προστασίας του ήπατος από τη βλάβη μετά από I/R ήταν αυτό των Toledo-Pereyga και συνεργατών, που δημοσιεύτηκε το 1975. Οι συγγραφείς μελέτησαν την προστατευτική ικανότητα της ισοπροτερενόλης, της αλλοπουρινόλης, της ηπαρίνης και του συνδυασμού τους σε μοντέλο επικουρικής μεταμόσχευσης ήπατος σε σκύλους.

Μεγάλο μέρος της έρευνας για την προστασία έναντι της ηπατικής βλάβης από I/R επικεντρώθηκε τις επόμενες δεκαετίες στον περιορισμό της οξειδωτικής βλάβης με τη χορήγηση διαφόρων φαρμάκων. Οι προστατευτικές παρεμβάσεις είχαν τρεις κύριους στόχους:

- Την ενίσχυση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών
- Την εξουδετέρωση των δραστικών μορφών που έχουν δημιουργηθεί
- Την παρεμπόδιση σχηματισμού ΔΜΟ

Η ενίσχυση των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων της SOD και της CAT έχει μελετηθεί τόσο με εξωγενή χορήγησή τους όσο και με γενετικό χειρισμό της έκφρασής τους. Ο τελευταίος φαίνεται να είναι και πιο αποτελεσματικός. Επιπλέον, έχει μελετηθεί η χημική τροποποίηση των παραπάνω ενζύμων με στόχο την παράταση του χρόνου ζωής τους και την πλοήγησή τους προς τα κύτταρα του ήπατος (9,175). Οι βιταμίνες E και C έχουν επίσης μελετηθεί τόσο σε κλινικές μελέτες όσο και σε πειραματικά μοντέλα, δείχνοντας προστατευτική δράση έναντι της βλάβης από I/R. Η τελευταία αποδίδεται κύρια στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν δραστικές μορφές, ωστόσο είναι πιθανό να συμμετέχουν και άλλοι μηχανισμοί. Στην έρευνα για την προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες, όπως για παράδειγμα για τις προστατευτικές ιδιότητες συστατικών φυτικής προέλευσης που εμπεριέχονται στη μεσογειακή διαίτα (176,177), η βασική υπόθεση αρχικά ήταν πως δρουν εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες ή άλλους οξειδωτικούς παράγοντες και περιεγράφηκαν ως «αντιοξειδωτικές ουσίες» (antioxidants or free radical scavengers) (7). Η υπόθεση αυτή, ωστόσο, δεν επιβεβαιώθηκε σε μελέτες για ουσίες που εμπεριέχονται στη διαίτά μας και που είναι γνωστό πως παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, μεταξύ των οποίων η βιταμίνη E και η βιταμίνη C (178–181). Οι ελεύθερες ρίζες, όπως η $\cdot\text{OH}$, είναι ισχυροί οξειδωτικοί παράγοντες και αντιδρούν εξαιρετικά γρήγορα με συστατικά που βρίσκονται στο άμεσο περιβάλλον τους. Συνεπώς, είναι εξαιρετικά απίθανο ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας, που χορηγείται εξωγενώς, να βρεθεί την κατάλληλη στιγμή, στο σωστό σημείο και σε επαρκή συγκέντρωση, ώστε να αντιδράσει με μία ελεύθερη ρίζα, πριν αυτή αντιδράσει με κυτταρικά συστατικά (7,179). Παράλληλα, *in vitro* πειραματικές μελέτες συστατικών της μεσογειακής διατροφής έδειξαν πως για πολλές από αυτές η «αντιοξειδωτική» τους δράση στηρίζεται στην δέσμευση του ελεύθερου ή χαλαρά συνδεδεμένου σιδήρου και συνεπώς στην αποτροπή σχηματισμού ελεύθερων ριζών (12,25,26,163,182–184). Ωστόσο, καθώς τα συστατικά αυτά *in vivo* προσλαμβάνονται σε μικρές ποσότητες και ακολουθεί αραίωσή τους στο πλάσμα του αίματος-γεγονός που καθιστά τη δέσμευση του σιδήρου ασταθή και επιτρέπει τη συμμετοχή του σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις-δεν μπορεί να αποκλεισθεί πως διαθέτουν παράλληλα την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται (7). Επιπλέον, έχουν

μελετηθεί ουσίες που διαθέτουν σουλφυδρυλικές ομάδες και παρουσιάζουν προστατευτικές ιδιότητες, οι οποίες σχετίζονται με την ικανότητά τους διατηρούν χαμηλά τα επίπεδα του H_2O_2 , ενισχύοντας μηχανισμούς απομάκρυνσής του. Αναφορικά, τέτοιες ουσίες είναι η γλουταθειόνη (GSH), η N-ακέτυλοκυστεΐνη (NAC), η βουκιλαμίνη και η γ-γλουταμύλ-κυστεΐνη (9,185–190). Επιπρόσθετα, διάφορες φυσικές ή συνθετικές ενώσεις που παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vitro* έχουν μελετηθεί για τις προστατευτικές τους ιδιότητες έναντι της βλάβης από επαναιμάτωση του ήπατος. Για την ερμηνεία του μηχανισμού δράσης της κάθε ουσίας χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή καθώς η δράση τους μπορεί να επηρεάζεται από τις πειραματικές συνθήκες και η *in vivo* δράση τους σε πολύπλοκα πλέον βιολογικά συστήματα, να διαφέρει από την *in vitro* (9). Τέλος, μεγάλο μέρος της έρευνας έχει στραφεί στη μελέτη μηχανισμών που παρεμποδίζουν το σχηματισμό ΔΜΟ. Συγκεκριμένα, η αναστολή των NADPH οξειδασών και συνεπώς η παρεμπόδιση παραγωγής $O_2^{\bullet-}$, φαίνεται πως προστατεύει έναντι της βλάβης από I/R. Η αναστολή της λειτουργίας των NADPH οξειδασών μπορεί να γίνει είτε με γενετική τροποποίηση των γονιδίων που τις εκφράζουν και γονιδίων που αναστέλλουν τη λειτουργία τους είτε φαρμακολογικά (9,117,191–193).

Το 1986 ο C.E. Murry και οι συνεργάτες του περιέγραψαν το φαινόμενο της ισχαιμικής προετοιμασίας (ischemic preconditioning-IPC) που παρατήρησαν πειραματικά πως προσφέρει προστασία στο μυοκάρδιο σκύλων (194). Η ισχαιμική προετοιμασία μελετήθηκε τα επόμενα χρόνια εκτενώς και στο ήπαρ και φαίνεται πως, σε πειραματικό τουλάχιστον επίπεδο, προσφέρει προστασία έναντι της ηπατικής βλάβης από I/R. Πρόκειται για έκθεση του ήπατος σε σύντομα επεισόδια ισχαιμίας, τα οποία αυξάνουν την αντοχή του έναντι ενός επακόλουθου και μεγαλύτερου ισχαιμικού συμβάντος. Πιο πρόσφατα περιεγράφηκε η απομακρυσμένη ισχαιμική προετοιμασία (remote ischemic preconditioning-RIPC), μέθοδος κατά την οποία εφαρμόζονται επαναλαμβανόμενα, σύντομα επεισόδια ισχαιμίας σε ένα άκρο πριν από την έναρξη της ηπατικής ισχαιμίας ή άλλου οργάνου στόχου. Οι μικρές ποσότητες ΔΜΟ που παράγονται κατά την ισχαιμική προετοιμασία δρουν ως διαμεσολαβητές ενεργοποίησης αμυντικών μηχανισμών που κατά τη διάρκεια ενός μεγαλύτερου επεισοδίου ισχαιμίας θα περιορίσουν την παραγωγή ΔΜΟ με αποτέλεσμα μειωμένα επίπεδα DAMPs (damage-associated molecular patterns (DAMPs), περιορισμό της ενεργοποίησης των κυττάρων Kupffer και ακολούθως των ουδετερόφιλων και των $CD4^+$ T-κυττάρων. Στους προστατευτικούς μηχανισμούς έχουν ακόμη περιγραφεί η ενίσχυση αντιοξειδωτικών συστημάτων των κυττάρων, η επαγωγή της HO-1 (heme oxygenase-1) και της αναγέννησης του ήπατος με την ενεργοποίηση της οικογένειας πρωτεϊνών p38 των MAP κινασών

(mitogen-activated protein kinases) (195,196). Και για τις δύο μεθόδους ισχαιμικής προετοιμασίας, ενώ τα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν την προστατευτική τους δράση έναντι της ηπατικής βλάβης από I/R, στην κλινική πράξη τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα (196–198).

Εκτός από την ισχαιμική προετοιμασία του ήπατος να δεχθεί ένα μεγαλύτερο ισχαιμικό συμβάν, έχει αναπτυχθεί έρευνα πάνω στην φαρμακευτική προετοιμασία του ήπατος να αναπτύξει αμυντικούς μηχανισμούς για ένα επερχόμενο και ισχυρότερο συμβάν ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Η φαρμακευτική προετοιμασία βασίζεται στην ίδια λογική με αυτή της ισχαιμικής πως όταν τα κύτταρα εκτεθούν σε σύντομα και ήπια επεισόδια οξειδωτικού στρες, οδηγούνται σε επαναπρογραμματισμό γονιδίων και έκφραση πρωτεϊνών που δρουν προστατευτικά έναντι της οξειδωτικής βλάβης και έτσι επιβιώνουν και ανταπεξέρχονται καλύτερα σε ένα μελλοντικό και ισχυρότερο επεισόδιο οξειδωτικού στρες (35,199,200). Στα πλαίσια αυτά μελετήθηκαν η χορήγηση υπερβαρικού οξυγόνου, οι θυρεοειδικές ορμόνες (T_3), η δοξορουβικίνη και ο σίδηρος πριν την πρόκληση I/R του ήπατος, δείχνοντας σε πειραματικό επίπεδο προστατευτικές δυνατότητες (199–202).

Πολλοί από τους φαρμακευτικούς παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά για την προετοιμασία (preconditioning) του ήπατος, προέκυψαν από μηχανισμούς που περιεγράφηκαν σε μελέτες πάνω στην ισχαιμική προετοιμασία του ήπατος και φάνηκε να προσφέρουν προστασία έναντι της I/R (203–206). Χρησιμοποιήθηκαν ακόμη παράγοντες, όπως η σιμβαστατίνη, που επηρεάζοντας την έκφραση γονιδίων, έδειξαν αντιφλεγμονώδη δράση κατά τη χρήση τους σε άλλες παθολογίες (207).

Τέλος, ένα μεγάλο μέρος της έρευνας για την προστασία έναντι της βλάβης από I/R αποτελεί η δέσμευση του σιδήρου, που αποτελεί μία σημαντική γραμμή άμυνας για την αποφυγή σχηματισμού ΔΜΟ και συγκεκριμένα της $\bullet OH$ και της επακόλουθης οξειδωτικής βλάβης κυτταρικών συστατικών (9). Η προσέγγιση αυτή έχει μελετηθεί από πλήθος ερευνητών και σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα. Η DFO που αποτελεί έναν ισχυρό αλλά και ειδικό για το σίδηρο χηλικό παράγοντα χρησιμοποιείται εδώ και δεκαετίες στην κλινική πράξη σε καταστάσεις υπερφόρτωσης με σίδηρο και έχει μελετηθεί εκτενώς σε *in vivo* μοντέλα I/R του ήπατος, δείχνοντας προστατευτικές ιδιότητες έναντι της βλάβης μετά την επαναιμάτωση (19,22,122,124,126–128,208,209). Επιπλέον, η DFO ανήκει στους φαρμακευτικούς παράγοντες

που αναστέλλουν και το φαινόμενο της φερρόπτωσης (139,210). Στην έρευνα για την προστασία του ήπατος έναντι της βλάβης από την επαναιμάτωση έχουν δοκιμασθεί και άλλες ουσίες που έδειξαν προστασία και οι οποίες πιθανόν δρουν δεσμεύοντας ιόντα σιδήρου (123,125,211–213).

Παρόμοια προστασία έχει περιγραφεί και με πειραματική υπερέκφραση (με τη χρήση ανασυνδυασμένου αδενοϊού) της βαριάς αλυσίδας της φερριτίνης που συμμετέχει στο σχηματισμό των αποθηκευτικών συμπλεγμάτων της φερριτίνης, αναδεικνύοντας τον ρόλο του ενδοκυττάριου ασταθούς σιδήρου στη βλάβη από I/R (214). Τέλος, έχει περιγραφεί πως τα υψηλά επίπεδα φερριτίνης ορού και συνεπώς σιδήρου σε ζώντες δότες ήπατος συσχετίστηκαν ανεξάρτητα με υψηλότερα ποσοστά ηπατικής βλάβης μετά τη μεταμόσχευση του οργάνου. Επιπλέον, δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε σίδηρο οδηγεί σε επιδείνωση της ηπατικής βλάβης από I/R (138).

Όπως τονίστηκε στο *in vitro* μέρος του πειράματος, η πρόσβαση των σιδηροδεσμευτικών παραγόντων στις επιμέρους δεξαμενές ασταθούς ή οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου καθορίζει και τις προστατευτικές τους ικανότητες. Επιπρόσθετα, καθώς κατά τη διάρκεια των πρώτων λίγων λεπτών μετά την επαναιμάτωση επέρχεται έκρηξη παραγωγής ΔΜΟ είναι σημαντικός και ο χρόνος χορήγησης των παραγόντων αυτών. Ο χρόνος αυτός φαίνεται πως θα πρέπει να ξεκινά πριν τη στιγμή της επαναιμάτωσης, έτσι ώστε ο παράγοντας να μπορεί να είναι την κατάλληλη χρονική στιγμή στο κατάλληλο μέρος. Ιδανικά, λοιπόν, οι σιδηροδεσμευτικοί παράγοντες θα πρέπει να βρίσκονται σε ικανοποιητικές συγκεντρώσεις μέσα στα κύτταρα ή και μέσα σε ενδοκυττάρια οργανίδια τη στιγμή της επαναιμάτωσης (12,13,26). Από τα παραπάνω, προκύπτει εύλογα η υπόθεση πως ο συνδυασμός σιδηροδεσμευτικών παραγόντων και συνεπώς των ιδιοτήτων τους θα ήταν πιο αποτελεσματικός από τους μεμονωμένους παράγοντες στην προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες κατά την επαναιμάτωση.

iv. Σχεδιασμός πρωτοκόλλου

Το παρόν πρωτόκολλο βασίστηκε στην υπόθεση πως η μείωση του διαθέσιμου οξειδοαναγωγικά σιδήρου κατά την επανοξυγόνωση του ήπατος θα μειώσει την παραγωγή της εξαιρετικά δραστηρής ρίζας του υδροξυλίου $\text{HO}^\bullet$ και συνεπώς την έκταση της ηπατικής βλάβης. Τα αποτελέσματα της *in vitro* μελέτης επιβεβαίωσαν την υπόθεση πως η συνδυασμένη χορήγηση της DFO και της DFP, δύο σιδηροδεσμευτικών παραγόντων με διαφορετική λιποφιλικότητα, προσφέρει καλύτερη προστασία από τους μεμονωμένους παράγοντες έναντι της οξειδωτικής βλάβης των κυττάρων.

Επιπλέον, μελετήθηκε η υπόθεση πως μικρά επεισόδια οξειδωτικής βλάβης ενεργοποιούν αμυντικούς μηχανισμούς προστασίας έναντι ενός ισχυρότερου επεισοδίου οξειδωτικού στρες, εν προκειμένω επεισοδίου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης.

Έτσι, αποφασίστηκε να ερευνηθεί:

- η πιθανή μείωση της ηπατικής βλάβης από I/R με χορήγηση των δύο σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων μεμονωμένα αλλά και σε συνδυασμό πριν την έναρξη της ισχαιμίας, αλλά και μετά την άρση αυτής.
- η πιθανή μείωση της βλάβης του ήπατος από I/R μετά από την φαρμακευτική προετοιμασία των ζώων με τη χορήγηση σιδήρου ενδοπεριτοναϊκά (199).

B.2.2. Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στο *in vivo* μέρος της παρούσας έρευνας προέρχονται από τις παρακάτω εταιρείες:

VUAB Pharma a.s. (Roztoky, Czech Republic)

Νατριούχος θειοπεντάλη (®Thiopental VUAB inj. plv.sol. 1.0 g). Παρασκευή και χορήγηση σύμφωνα με το φύλλο οδηγιών του φαρμάκου.

AbbVie Pharmaceuticals S.A. (Νέο Ηράκλειο, Ελλάδα)

Σεβοφλουράνιο (®Sevorane, 100% w/w sevoflurane).

Vetronic (Abbotskerswell, Devon, UK)

Merlin Small Animal Ventilator

Intervet Hellas (Αλιμος, Ελλάδα)

Βουτορφανόλη (®Dolorex 10 mg/ml).

Sigma Company (St. Luis, MO, USA)

Δεφεριπρόνη (deferiprone, DFP ή 3-Hydroxy-1,2-dimethyl-4(1H)-pyridone), σε μορφή σκόνης, χορηγήθηκε ενδοφλέβια μετά από διάλυση σε φυσιολογικό ορό 0.9%.

Novartis Hellas (Αττική, Ελλάδα)

Δεσφερριοξαμίνη μεθανοσουλφονική (desferrioxamine mesylate, DFO). Παρασκευή και χορήγηση σύμφωνα με το φύλλο οδηγιών του φαρμάκου.

Demo A.B.E.E. (Αττική, Ελλάδα)

Iron III hydroxide dextran complex

B.2.3. Μέθοδοι

i. Τόπος διεξαγωγής-Άδεια πειραματισμού

Το *in vivo* μέρος της έρευνας πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό και Πειραματικό Κέντρο ELPEN (Πικέρμι, Αττική), το οποίο συμμορφώνεται με την οδηγία 2010/63/EU του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς. Το ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων του Ερευνητικού και Πειραματικού Κέντρου ELPEN και αδειοδοτήθηκε από την Κτηνιατρική Υπηρεσία της Περιφερειακής Ενότητας Ανατολικής Αττικής (Αριθμός άδειας: 7492 20/11/2014).

ii. Ζωικό πρότυπο

Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί κόνικλοι Νέας Ζηλανδίας, σωματικού βάρους 2,8-3,2 kg. Οι κόνικλοι στεγάστηκαν μεμονωμένα σε ανοξείδωτα μεταλλικά κλουβιά υπό σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία 20-21°C, 45-65% σχετική υγρασία, εναλλαγή φωτός-σκότους ανά 12 ώρες) και τους δόθηκε χρόνος 7 ημερών για προσαρμογή στο περιβάλλον του εργαστηρίου πριν από την έναρξη του πειράματος. Είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες (12C Pezzulo, Nutrir®, Eboli, Italy) και νερό και δεν παρέμειναν σε στέρηση τροφής πριν την έναρξη του πειράματος.

iii. Επιλογή ζωικού προτύπου και κριτήρια σχεδιασμού αναισθησιολογικού και χειρουργικού πρωτοκόλλου.

Παρόλο που τα ποντίκια και οι αρουραίοι είναι ζώα εύκολα διαχειρίσιμα για πειραματικούς ερευνητικούς σκοπούς, για την παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν οι κόνικλοι, καθώς διαθέτουν συγκεκριμένα πλεονεκτήματα. Βασικό πλεονέκτημα και καίριας σημασίας για το παρόν πρωτόκολλο είναι η δυνατότητα αιμοληψίας σε διαφορετικά χρονικά σημεία χωρίς να προκύπτουν μεταβολικές διαταραχές, επιπρόσθετες των διαταραχών της οξεοβασικής ισορροπίας που σχετίζονται με την υποβολή των ζώων σε ηπατική ισχαιμία και επαναιμάτωση (215). Η ανατομία

του ήπατος του κόνικλου, το οποίο διαθέτει πολλούς λοβούς, καθιστά πιο εύκολο τον εντοπισμό αγγειακών δομών και συνεπώς τον εκλεκτικό αποκλεισμό της παροχής του αίματος. Οι κόνικλοι είναι, βέβαια, ζώα ιδιαίτερα ευαίσθητα και διαθέτουν ανατομία που καθιστά τον αεραγωγό τους δύσκολο για διασωλήνωση. Ο ανώτερος αεραγωγός των κόνικλων χαρακτηρίζεται από μεγάλους κοπτήρες οδόντες, ογκώδη γλώσσα, περιορισμένη κινητικότητα της κάτω γνάθου και στενό στοματοφάρυγγα. Όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά συμβάλουν σε υψηλό ποσοστό αποτυχίας διασωλήνωσης σε αυτά τα ζώα. Επιπλέον, είναι ζώα που μπορούν εύκολα να παρουσιάσουν λαρυγγόσπασμο κατά τη διάρκεια χειρισμών του αεραγωγού, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχία διασωλήνωσης ή και σε τραυματισμό του λάρυγγα (216).

Στόχος του παρόντος πρωτοκόλλου ήταν η μελέτη του προστατευτικού ρόλου σιδηροδεσμευτικών παραγόντων και της προετοιμασίας (preconditioning) με χορήγηση σιδήρου έναντι της όψιμης ηπατικής βλάβης. Το χρονικό σημείο αξιολόγησης της όψιμης ηπατικής βλάβης ορίστηκε στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση. Με το δεδομένο, λοιπόν, της αφύπνισης και παρακολούθησης των ζώων για 24 ώρες αποφασίστηκε η χορήγηση της αναισθησίας με σεβοφλουράνιο να διενεργείται διαμέσου στοματοτραχειακού σωλήνα και όχι τραχειοστομίας, με στόχο τη μείωση του μετεγχειρητικού πόνου. Με βάση το ίδιο δεδομένο, χρησιμοποιήθηκαν αναισθητικοί παράγοντες βραχείας δράσης, τόσο για την εισαγωγή στην αναισθησία, όσο και για τη διατήρηση αυτής.

iv. Πιλοτική εφαρμογή πρωτοκόλλου αναισθησίας

Η παρούσα έρευνα είχε ως στόχο την εφαρμογή ενός πειραματικού μοντέλου γενικής αναισθησίας με στοματοτραχειακή διασωλήνωση και την εφαρμογή μηχανικού αερισμού σε κόνικλους για την μελέτη της ηπατικής βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση και πιο συγκεκριμένα της όψιμης φάσης αυτής. Ως εκ τούτου το ιδανικό μοντέλο αναισθησίας θα έπρεπε να προσφέρει αιμοδυναμική σταθερότητα, να προλαμβάνει την υποξία και την οξέωση. Επιπλέον, θα έπρεπε να είναι ασφαλές, ελάχιστα επεμβατικό και ατραυματικό ώστε να επιτρέπει την αφύπνιση και παρακολούθηση των ζώων για 24 ώρες. Το παρόν μοντέλο αναισθησίας προσαρμόστηκε στον διαθέσιμο εξοπλισμό του εργαστηρίου και σχεδιάστηκε ώστε να συμφωνεί κατά το δυνατό με τις αρχές του πειραματισμού: την αντικατάσταση, τη μείωση στο ελάχιστο δυνατό του αριθμού των ζώων και τη βελτίωση της φροντίδας των ζώων, καθώς και των μεθόδων που χρησιμοποιούνται με στόχο τον ελάχιστο δυνατό πόνο και αγωνία. Οι παραπάνω αρχές είναι γνωστές και ως «the Three Rs» (replace, reduce and refine) (217).

Πριν την έναρξη της εφαρμογής του πρωτοκόλλου το προσωπικό του εργαστηρίου και τα μέλη της έρευνας εκπαιδεύτηκαν στη διασωλήνωση κονίκλων που είχαν υποβληθεί σε ευθανασία μετά την ολοκλήρωση άλλων πειραματικών πρωτοκόλλων στο ίδιο εργαστήριο. Ακολούθησε πιλοτική εφαρμογή τόσο του αναισθητικού όσο και του μοντέλου ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του ήπατος σε 3 ζώα με στόχο την επίλυση τεχνικών προβλημάτων και την μεταβολική και κλινική σταθερότητα του πειραματικού μοντέλου.

v. Πρωτόκολλο αναισθησίας

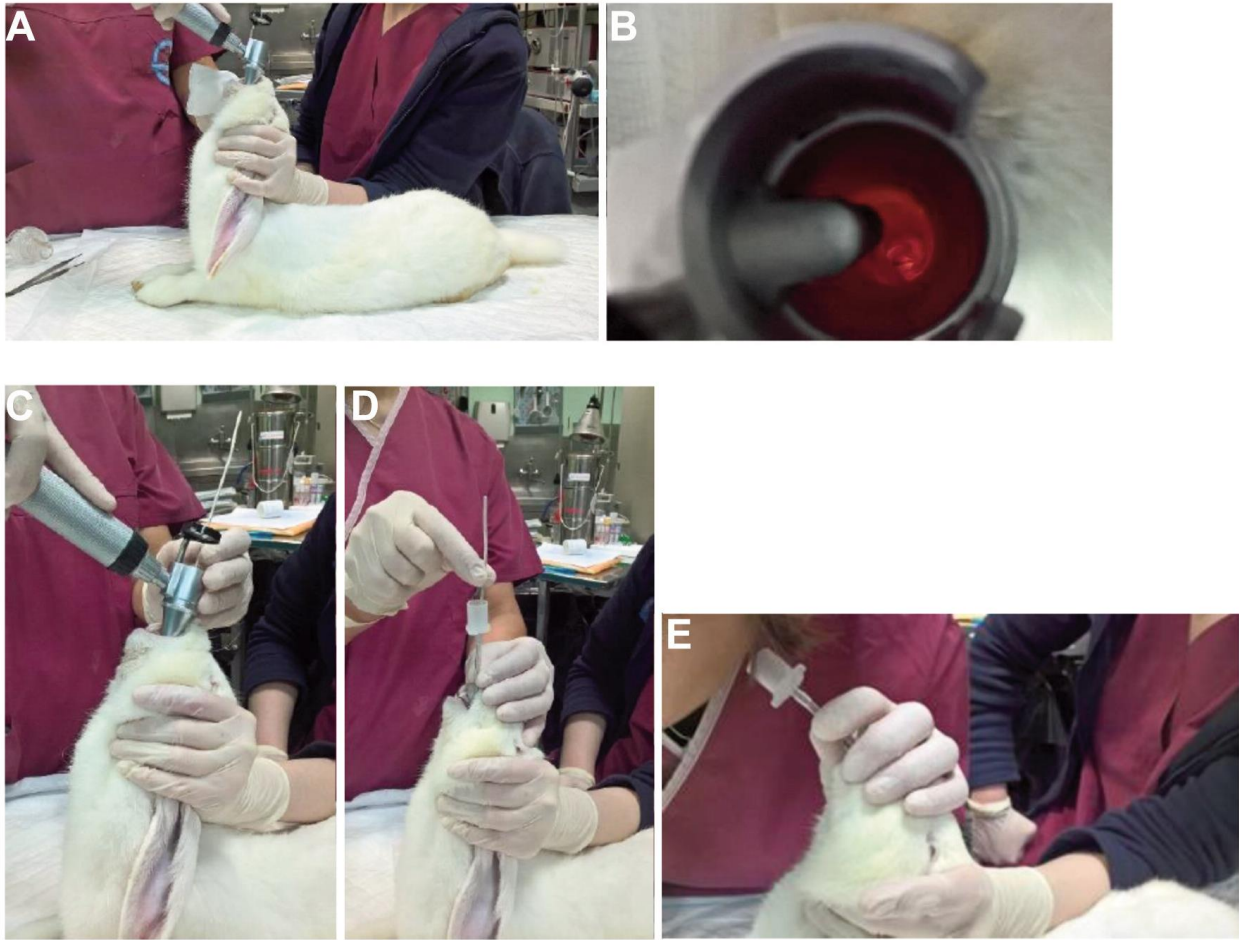
Πριν την έναρξη του πειράματος τοποθετούταν φλεβοκαθετήρας 22 G στην επιχείλια φλέβα του περυγίου του ωτός για χορήγηση φαρμάκων και ενυδάτωση και καθετήρας 20 G στην κεντρική αρτηρία του ωτός για λήψη δειγμάτων αίματος και συνεχή μέτρηση της αρτηριακής πίεσης.

Η εισαγωγή στην αναισθησία γινόταν με νατριούχο θειοπεντάλη (30-50 mg/kg) ενδοφλεβίως. Το αναισθητικό φάρμακο χορηγούνταν αργά, σε μικρές εφάπαξ δόσεις, για την αποφυγή αναπνευστικής ανακοπής. Το βάθος της αναισθησίας καθοριζόταν από το βαθμό χαλάρωσης της κάτω γνάθου. Ακολουθούσε τοποθέτηση του ζώου σε στερνική θέση με τον βοηθό να υποστηρίζει την κεφαλή με το δείκτη και τον αντίχειρα στις γωνίες της κάτω γνάθου και να εκτείνει την αυχενική μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Μετά το άνοιγμα του στόματος και έλξη της γλώσσας με τη βοήθεια μιας γάζας έξω από τη στοματική κοιλότητα ακολουθούσε προώθηση ενός ωτοσκοπίου στη στοματική κοιλότητα και φάρυγγα του κονίκλου. Η επισκόπηση των φωνητικών χορδών ήταν εφικτή ύστερα από μικρή περαιτέρω έκταση της κεφαλής. Σε αυτό το σημείο, ένας εύκαμπτος οδηγός προωθούνταν διαμέσου του ωτοσκοπίου μέσα στην τραχεία. Ακολουθούσε απόσυρση του ωτοσκοπίου και προώθηση ενδοτραχειακού σωλήνα (3.0 mm ID, χωρίς αεροθάλαμο ασφαλείας-cuff) πάνω από τον οδηγό με ήπιες στροφικές κινήσεις (Εικόνα 2). Η παρουσία υδρατμών στο εσωτερικό του σωλήνα και η αίσθηση εξόδου του εκπνεόμενου αέρα αποτελούσαν σημεία επιβεβαίωσης σωστής θέσης του ενδοτραχειακού σωλήνα. Επιπρόσθετα, έμμεσα σημεία σωστής θέσης του τραχειοσωλήνα ήταν η παρουσία βήχα και το σταύρωμα των μπροστινών άκρων του ζώου. Η διαδικασία τη διασωλήνωσης είχε διάρκεια περίπου 2-3 λεπτά και υπήρχε συνεχής παρακολούθηση παρουσίας αυτόματης αναπνοής. Δεν παρατηρήθηκε κανένα επεισόδιο λαρυγγόσπασμου κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Το ζώο τοποθετούταν στη συνέχεια προσεκτικά σε πλάγια θέση και ο τραχειοσωλήνας σταθεροποιούνταν στα 14 εκατοστά από τους κοπήρες, μήκος που αντιστοιχεί σε θέση υψηλότερη από το διχασμό της τραχείας. Ακολουθούσε χορήγηση βουτορφανόλης 0,5 mg/kg ενδοφλεβίως, σύνδεση του ενδοτραχειακού σωλήνα στο κύκλωμα του αναπνευστήρα, έναρξη ελεγχόμενου

μηχανικού αερισμού με όγκο 35-40 ml ανά αναπνοή και αριθμό αναπνοών 42 ανά λεπτό και επανέλεγχος της θέσης του σωλήνα με ακρόαση για παρουσία αναπνευστικού ψιθυρίσματος αμφοτερόπλευρα. Η διατήρηση της αναισθησίας έγινε με σεβοφλουράνιο 3-4% και FiO_2 0,7. Οι κόνικλοι τοποθετούνταν στη συνέχεια σε ύπτια θέση και ακολουθούσε ξύρισμα και αντισηψία με ιωδιούχο ποβιδόνη 10%.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος υπήρχε συνεχής παρακολούθηση του καρδιακού ρυθμού, ηλεκτροκαρδιογραφήματος, αρτηριακής πίεσης, κορεσμού της αιμοσφαιρίνης σε οξυγόνο και θερμοκρασίας. Το μηδενικό σημείο και το επίπεδο του μορφομετατροπέα ρυθμίζονταν πλάγια και στη μεσότητα του θώρακα. Η χορήγηση υγρών γινόταν με ρυθμό 10 ml/kg/h. Τα υγρά που χορηγήθηκαν ήταν D/W 5% για την πρώτη ώρα και Ringer's Lactate εμπλουτισμένο με χλωριούχο κάλιο για την τελευταία ώρα της επαναιμάτωσης. Τα ζώα παρέμεναν πάνω σε θερμαντική κουβέρτα με παρακολούθηση της θερμοκρασίας ορθού και διατήρησή της μεταξύ 38 και 38,5° C. Η αφύπνιση και ανάνηψη όλων των κονίκλων έγινε χωρίς επιπλοκές με επιστροφή αυτόματης αναπνοής λίγα λεπτά μετά τη διακοπή της χορήγησης του αναισθητικού αερίου. Μόλις τα ζώα ήταν ικανά να ανασηκώσουν την κεφαλή και να καταπιούν ακολουθούσε αφαίρεση του τραχειοσωλήνα. Οι κόνικλοι παρέμεναν στη χειρουργική αίθουσα με μάσκα οξυγόνου μέχρι να είναι ικανοί να διατηρήσουν στερνική θέση. Σε αυτό το σημείο χορηγούταν μία επιπλέον δόση βουτορφανόλης (0,5 mg/kg) υποδορίως, αφαίρεση των αγγειακών καθετήρων και μεταφορά των ζώων στα κλουβιά τους με ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή. Ίδιες δόσεις βουτορφανόλης επαναλαμβάνονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα.



Εικόνα 2: Στοματοτραχειακή διασωλήνωση κονίκλων με τη χρήση ωτοσκοπίου και εύκαμπτου οδηγού. Η διαδικασία παρουσιάζεται βήμα-βήμα (εικόνες Α-Ε), όπως περιγράφεται στην παράγραφο vi. Πρωτόκολλο αναισθησίας και όπως εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη.

vi. Πρωτόκολλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης ήπατος

Μετά την ολοκλήρωση της αναισθησίας και αντισηψίας ακολουθούσε μέση υπερ-υπομφάλιος τομή, διατομή του δρεπανοειδούς συνδέσμου του ήπατος και αναδίπλωση των ηπατικών λοβών κεφαλικά, η οποία αποκάλυπτε την πύλη του ήπατος. Η εγκατάσταση της ισχαιμίας γινόταν με περίσφιξη των προσαγωγών αγγείων (πυλαία φλέβα και ηπατική αρτηρία) του αριστερού πλάγιου, αριστερού μέσου, δεξιού μέσου και τετράπλευρου λοβού του ήπατος (70% του ηπατικού παρεγχύματος) μετά την έκφυση του κλάδου του κερκοφόρου λοβού του ήπατος με τη χρήση αγγειακού βρόγχου (Rummel tourniquet). Η ισχαιμία επιβεβαιωνόταν με επισκόπηση του ήπατος και έλεγχο αλλαγής του χρώματος του παρεγχύματος, ενώ ο κερκοφόρος λοβός διατηρούσε φυσιολογικό χρώμα. Λόγω του μερικού αποκλεισμού της ροής της πυλαίας φλέβας προς το ήπαρ δεν παρατηρήθηκε σπλαχνική συμφόρηση. Η ισχαιμία διαρκούσε 45 λεπτά, οπότε και ακολουθούσε άρση του αποκλεισμού των αγγείων. Η άρση του αποκλεισμού σηματοδοτούσε και

την έναρξη της περιόδου επαναιμάτωσης, διάρκειας 24 ωρών. Η αναισθησία διατηρήθηκε για 2 ώρες μετά την επαναιμάτωση, οπότε και έγινε συλλογή δειγμάτων αίματος και ηπατικού ιστού. Τα ιστικά τεμάχια λήφθηκαν από λοβό που είχε υποβληθεί σε ισχαιμία και ήταν ο ίδιος για όλα τα πειραματόζωα. Ακολούθησε αφύπνιση των ζώων όπως περιγράφεται παραπάνω.

Εικοσιτέσσερις ώρες μετά την επαναιμάτωση τα ζώα υποβάλλονταν εκ νέου σε αναισθησία, σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο και σε λαπαροτομία διαμέσου της προηγηθείσας μέσης τομής. Πριν τη συλλογή δειγμάτων γινόταν έλεγχος της περιτοναϊκής κοιλότητας για αιμορραγία ή άλλες επιπλοκές. Ακολουθούσε συλλογή δειγμάτων αίματος και λήψη δειγμάτων ηπατικού ιστού, τόσο από λοβό ήπατος που είχε υποβληθεί σε ισχαιμία, όσο και από λοβό (δεξιός πλάγιος) που δεν συμμετείχε στο 70% του παρεγχύματος που υποβλήθηκε σε ισχαιμία. Με τη λήξη του πειράματος ακολουθούσε ευθανασία των ζώων.

vii. Πειραματικό πρωτόκολλο και ομάδες

Η έρευνα που παρουσιάζεται στο παρόν πειραματικό πρωτόκολλο αποτελεί μία προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη σε κονίκλους (rabbits). Η τυχαιοποίηση τους σε 5 ομάδες ($n=7$) έγινε με απλή τυχαιοποίηση. Τα ζώα στην ομάδα εικονικής επέμβασης (SHAM) υποβλήθηκαν μόνο σε γενική αναισθησία και λαπαροτομία, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται παραπάνω. Η ομάδα ελέγχου (CONTROL) υποβλήθηκε σε 45 λεπτά τμηματική ισχαιμία (70%) του ηπατικού παρεγχύματος και επαναιμάτωση. Στις ομάδες παρέμβασης χορηγήθηκαν 100mg/kg δεσφερριοξαμίνης (ομάδα DFO), 50mg/kg δεφεριπρόνης (ομάδα DFP) ή και τα δύο φάρμακα ταυτόχρονα, 100 mg/kg δεσφερριοξαμίνης και 50 mg/kg δεφεριπρόνης (ομάδα DFO+DFP), σε συνεχή ενδοφλέβια έγχυση. Η χορήγηση των παραπάνω φαρμάκων ξεκίνησε 30 λεπτά πριν την έναρξη της ηπατικής ισχαιμίας και ο ρυθμός χορήγησης προσαρμόστηκε έτσι ώστε το 60% της ποσότητας του εκάστοτε φαρμάκου ή του συνδυασμού τους να έχει χορηγηθεί μέχρι τη στιγμή της επαναιμάτωσης και η έγχυση συνεχίστηκε με χαμηλότερο ρυθμό για 2 ώρες μετά την επαναιμάτωση. Σε αυτό το χρονικό σημείο χορηγήθηκε υποδορίως εφάπαξ δόση του εκάστοτε φαρμάκου ή του συνδυασμού τους ίση με το ήμισυ της αρχικής. Στην ομάδα ελέγχου η ίδια ποσότητα φυσιολογικού ορού, που χρησιμοποιήθηκε για τη διάλυση των σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων στις ομάδες παρέμβασης, χορηγήθηκε με τον ίδιο ρυθμό ενδοφλέβια.

Τέλος, στην ομάδα παρέμβασης (FE), $n=6$, στα ζώα χορηγήθηκαν 6 δόσεις των 50mg/kg τρισθενούς σιδήρου σε σύμπλεγμα οξειδίων δεξτράνης (ferric hydroxide dextran complex) ενδοπεριτοναϊκά κάθε δεύτερη ημέρα για 10 ημέρες (199), πριν αυτά υποβληθούν στο παραπάνω μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης του ήπατος 48 ώρες μετά την 6^η δόση τρισθενούς σιδήρου. Η

τελευταία ομάδα συγκρίθηκε με την ομάδα CONTROL για τον έλεγχο μείωσης της ηπατικής βλάβης μετά από φαρμακευτική προετοιμασία του ήπατος με χορήγηση σιδήρου (πρόκληση ήπιων επεισοδίων οξειδωτική βλάβης πριν την I/R).

Στην ομάδα εικονικής επέμβασης υπολογίστηκε στο χρόνο διατήρησης της αναισθησίας η διάρκεια κάθε σταδίου του πειράματος (χορήγηση σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων, ισχαιμία και επαναιμάτωση) έτσι ώστε ο χρόνος αυτός να είναι ίσος για όλες τις ομάδες. Δείγματα αίματος για ανάλυση αερίων αίματος και μέτρηση παραμέτρων ηπατικής βλάβης συλλέχθηκαν πριν την έναρξη του πειράματος, στις 2 και στις 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση. Δείγματα ηπατικού παρεγχύματος προς ιστολογική ανάλυση συλλέχθηκαν από το παρέγχυμα που υποβλήθηκε σε ισχαιμία στις 2 ώρες και 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση, ενώ στις 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση συλλέχθηκε επιπλέον δείγμα από το ηπατικό παρέγχυμα που δεν υποβλήθηκε στη διαδικασία της I/R.

viii. Ανάλυση βασικών παραμέτρων

Πριν την είσοδο στην αναισθησία και την έναρξη του πειράματος έγινε λήψη δείγματος αίματος και προσδιορίστηκαν η αιμοσφαιρίνη (Haemoglobin-Hb), τα λευκά αιμοσφαίρια (White blood cells-WBCs), τα αιμοπετάλια (Platelets-PLTs), η αλβουμίνη (albumin-ALB), η ολική χολερυθρίνη (Total bilirubin-TBL), ο χρόνος ενεργοποιημένης μερικής θρομβοπλαστίνης (activated partial thromboplastin time-aPTT) και το διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο (International normalized ratio-INR). Ο προσδιορισμός των βασικών παραμέτρων είχε ως στόχο, σε συνδυασμό με την κλινική εξέταση των ζώων, τον έλεγχο για αποκλεισμό διαταραχών που να υποδηλώνουν κάποια παθολογική κατάσταση.

ix. Μέτρηση βιοχημικών παραμέτρων ηπατικής βλάβης

Λήψεις δειγμάτων αρτηριακού αίματος για βιοχημικό έλεγχο έγιναν πριν από την έναρξη του πειράματος (βασικές τιμές-baseline), στις 2 και 24 ώρες (λήξη του πειράματος) μετά την επαναιμάτωση. Μετά τη συλλογή ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά στις 3000 στροφές το λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου προς διαχωρισμό του ορού και αποθήκευση δειγμάτων στους 4 και -80°C. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ενζύμων: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) και gamma-glutamyl transferase (γ-GT) με τον αυτόματο βιοχημικό αναλυτή Siemens Dimension ARx.

x. Ιστοπαθολογική εξέταση

Όπως περιγράφηκε και παραπάνω, δείγματα ηπατικού ιστού λήφθηκαν από ηπατικό παρέγχυμα που είχε υποβληθεί σε ισχαιμία στις 2 και 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση και από παρέγχυμα που δεν είχε υποβληθεί σε ισχαιμία στις 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση. Μέρος των ιστικών τεμαχίων τοποθετήθηκε άμεσα στους -80°C και μέρος τους σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Τα τελευταία στη συνέχεια αφυδατώθηκαν και εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Οι κύβοι παραφίνης κόπηκαν σε τομές των 4 μm , βάφτηκαν με χρώση αιματοξυλλίνης-ηωσίνης και ακολουθούσε εξέταση με φωτομικροσκόπιο. Η μικροσκοπική εκτίμηση των δειγμάτων έγινε από δύο ειδικούς παθολογοανατόμους στους οποίους δεν γνωστοποιήθηκε η κατανομή των δειγμάτων στις ομάδες του πειραματικού πρωτοκόλλου (blinded).

Εκτιμήθηκαν παράμετροι ηπατοκυτταρικής βλάβης με τη χρήση ημιποσοτικής βαθμολογικής κλίμακας, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως (218,219). Με μία κλίμακα 4 επιπέδων βαθμολογήθηκαν η διάταση των κολποειδών, η συμφόρηση, ο σχηματισμών κενотоπίων στα ηπατοκύτταρα (ballooning) και η απόπτωση (απουσία: 0 βαθμοί, ήπια/εστιακή <5%: 1 βαθμός, μέτρια 5-10%: 2 βαθμοί, σοβαρή >10%: 3 βαθμοί). Η παρουσία πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων (PMNs) εκτιμήθηκε εντός και εκτός των κολποειδών, τόσο ως μεμονωμένων κυττάρων (απουσία: 0 βαθμοί, 1-4 κύτταρα: 1 βαθμός, 5-20 κύτταρα: 2 βαθμοί, >20 κύτταρα: 3 βαθμοί), όσο και ως συστάδων κυττάρων (απουσία: 0 βαθμοί, 1-2 συστάδες: 1 βαθμός, 3-5 συστάδες: 2 βαθμοί, >5 συστάδες: 3 βαθμοί). Τέλος, εκτιμήθηκε η συνολική επιφάνεια νεκρωτικού ιστού που εκφράστηκε ως ποσοστό της συνολικής επιφάνειας κάθε δείγματος (0%: 0 βαθμοί, <30%: 5 βαθμοί, 30-60%: 10 βαθμοί, >60%: 20 βαθμοί). Η συνολική βαθμολογία για κάθε δείγμα ήταν το άθροισμα των βαθμολογιών όλων των παραπάνω παραμέτρων. Όλες οι παράμετροι αξιολογήθηκαν σε 5 πεδία υψηλής ισχύος (αντικειμενικός φακός 400x) σε κάθε δείγμα ιστού.

xi. Στατιστική ανάλυση

Λόγω μη κανονικής κατανομής των τιμών των μεταβλητών για τη σύγκριση αυτών μεταξύ των ομάδων εφαρμόστηκαν μη παραμετρικές δοκιμασίες. Η κανονικότητα των κατανομών ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Shapiro-Wilk. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως διάμεσες τιμές (median) και ενδοτεταρτημοριακά εύρη (IQR: interquartile range). Οι διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων

εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis για ανεξάρτητα δείγματα. Οι διαφορές μεταξύ δύο ομάδων εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία Mann-Whitney για ανεξάρτητα δείγματα. Για τη σύγκριση τιμών μεταξύ των τριών χρονικών σημείων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Friedman. Οι υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS Statistics 23.0 IBM, Armonk, NY, USA και η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε σε $p < 0.05$.

B.2.4. Τροποποίηση πειραματικού πρωτοκόλλου

Το αρχικό πρωτόκολλο της παρούσας έρευνας στηρίχθηκε σε μοντέλο που εφαρμόστηκε σε πειραματικές μελέτες I/R ήπατος σε κόνικλους Νέας Ζηλανδίας, στις οποίες συμμετείχε ο επιβλέπων της παρούσας μελέτης. Ο χρόνος ηπατικής ισχαιμίας που είχε χρησιμοποιηθεί ήταν 60 λεπτά στο 70% του ηπατικού παρεγχύματος και η διατήρηση της αναισθησίας γινόταν με χορήγηση 0,5-3% ισοφλουρανίου διαμέσου τραχειοστομίας, ενώ τα ζώα δεν αφυπνίζονταν και υποβάλλονταν σε ευθανασία με τη λήξη του πειράματος στις 6 ή 7 ώρες από την επαναιμάτωση του ήπατος (111,185,186,220–222).

Με στόχο τη μελέτη τη όψιμης ηπατικής βλάβης στις 24ώρες από την επαναιμάτωση και βιβλιογραφικά δεδομένα πως η τμηματική (70%) ισχαιμία είναι συμβατή με την επιβίωση των ζώων στις 24 ώρες (223,224), το αρχικό πρωτόκολλο προέβλεπε την υποβολή των ζώων σε 70 λεπτά τμηματικής ισχαιμίας, διατήρηση της αναισθησίας για 2 ώρες από την επαναιμάτωση, λήψη δειγμάτων αίματος, ανάνηψη και παρακολούθηση για 24 ώρες από την επαναιμάτωση, οπότε και τα ζώα θα υποβάλλονταν εκ νέου σε γενική αναισθησία για λήψη δειγμάτων αίματος και ιστού. Ο χρόνος των 70 λεπτών τμηματικής ηπατικής ισχαιμίας επιλέχθηκε με στόχο υψηλότερες τιμές ηπατικών ενζύμων από αυτές που περιγράφονται στα παραπάνω δημοσιευμένα άρθρα με στόχο τη σύγκριση αυτών με αυτές των ομάδων παρέμβασης.

Το πείραμα ολοκληρώθηκε σύμφωνα με το παραπάνω πρωτόκολλο σε 13 θηλυκούς κόνικλους Νέας Ζηλανδίας, κατανεμημένους στις ομάδες όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Η συνολική δριμύτητα του πειράματος είχε χαρακτηριστεί με βάση τη βιβλιογραφία ως μέτρια. Η εκτίμηση αυτή αναιρέθηκε μετά τη διενέργεια των αρχικών πειραμάτων και επανεκτιμήθηκε σε βαριά, καθώς το ποσοστό θνητότητας στις 24 ώρες ανήλθε συνολικά στο 50% για τις ομάδες που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία και επαναιμάτωση του ήπατος. Στα τρία ($n=3$) ζώα της ομάδας εικονικής παρέμβασης SHAM, τα οποία υποβλήθηκαν σε γενική αναισθησία και λαπαροτομία, χωρίς πρόκληση ηπατικής ισχαιμίας η επιβίωση ήταν 100% στις 24 ώρες με τα ζώα να βρίσκονται σε καλή κλινική κατάσταση. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται ο χρόνος ισχαιμίας σε κάθε πείραμα, η επιβίωση και οι τιμές των τρανσαμινασών (ALT, AST) στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση στα

ζώα που επιβίωσαν. Οι μικρότεροι χρόνοι ισχαιμίας μελετήθηκαν καθώς τα πρώτα ζώα που υποβλήθηκαν σε 70 λεπτά ισχαιμίας παρουσίασαν κακή γενική κατάσταση στις 24 ώρες. Παρ' όλα αυτά, ακόμη και στους μικρότερους χρόνους ισχαιμίας η θνητότητα και νοσηρότητα ήταν υψηλές.

Ομάδα	Όνομα	Χρόνος ισχαιμίας (λεπτά)	ALT (U/L) 24 ώρες	AST (U/L) 24 ώρες
SHAM	SHAM 1	-	72.4	14
	SHAM 2	-	38.8	12,3
	SHAM 3	-	129.7	70,4
CONTROL	CONTROL 1	70	2028.9	7280
	CONTROL 2	62	Θάνατος πριν τις 24 ώρες	
	CONTROL 3	62	7436.6	12576
	CONTROL 4	55	Θάνατος πριν τις 24 ώρες	
DFO	DFO 1	70	2050	3755
	DFO 2	65	Θάνατος πριν τις 24 ώρες	
	DFO 3	60	Θάνατος πριν τις 24 ώρες	
DFP	DFP 1	60	1463.9	5376
FE	FE 1	65	Θάνατος πριν τις 24 ώρες	
	FE 2	65	2558.4	6612.1

Πίνακας 1: Ακριβείς χρόνοι ισχαιμίας, θάνατοι και επίπεδα τρανσαμινασών των 13 ζώων στα οποία ολοκληρώθηκε το πείραμα πριν την επαναξιολόγηση και τροποποίηση του πρωτοκόλλου I/R του ήπατος.

Τα μόνα ζώα που υποβλήθηκαν σε I/R και επιβίωσαν με καλή γενική κατάσταση ήταν τα FE 2 και DFP 1. Η υψηλή νοσηρότητα και θνητότητα των ζώων είναι πιθανό να σχετίζεται με την έντονη συστηματική φλεγμονώδη απάντηση λόγω του παρατεταμένου χρόνου ισχαιμίας, η οποία οδήγησε σε υπόταση και επιπλέον ισχαιμική βλάβη του ήπατος. Όπως προαναφέρθηκε στη βιβλιογραφία περιγράφεται ηπιότερη ηπατική βλάβη (223,224) για τον ίδιο χρόνο ισχαιμίας και επαναιμάτωσης. Οι διαφορές αυτές πιθανόν να σχετίζονται και με το θήλυ φύλο των ζώων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα αρχική μελέτη, καθώς στο σύνολο της βιβλιογραφίας τα πειραματόζωα είναι αρσενικού φύλου, εκτός κι αν μελετώνται διαφορές μεταξύ των δύο φύλων (225–229).

Στο σημείο αυτό ζητήθηκε επαναξιολόγηση από την Επιτροπή Αξιολόγησης Πρωτοκόλλων του εργαστηρίου και τροποποίηση του πρωτοκόλλου. Προτάθηκε και εγκρίθηκε η διενέργεια του πειράματος αρχικά σε τρία αρσενικά ζώα, που θα ανήκαν στην ομάδα ελέγχου CONTROL και θα υποβάλλονταν σε χρόνο ισχαιμίας 45 λεπτών στο 70% του ηπατικού παρεγχύματος και μετά από επαναξιολόγηση σε επιπλέον 15 ζώα, 3 ζώα για κάθε μία από τις υπόλοιπες 5 ομάδες του

πρωτοκόλλου. Η θνητότητα των αρσενικών κονίκλων με χρόνο ισχαιμίας 45 λεπτών στις 24 ώρες ήταν 7%, καθώς μόνο ένα ζώο δεν επιβίωσε στις 24 ώρες.

Προσδιορισμός μεγέθους δείγματος

Το μέγεθος του δείγματος υπολογίστηκε με βάση τα επίπεδα της ALT (πρωτογενές καταληκτικό σημείο-primary outcome) στον ορό των 15 ζώων και 80% στατιστική ισχύ. Κριτήριο εισαγωγής στην μελέτη ήταν η επιβίωση για 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση του ήπατος.

B.2.5. Αποτελέσματα

i. Χαρακτηριστικά των ζώων πριν την έναρξη του πειράματος

Πριν την έναρξη του πειράματος (χρονικό σημείου 0 ή baseline) λήφθηκαν δείγματα αίματος για γενική εξέταση αίματος, έλεγχο της πήξης και βιοχημική ανάλυση. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των τιμών των παραμέτρων μεταξύ των ομάδων του πειραματικού πρωτοκόλλου (Πίνακας 2).

	SHAM	CONTROL	DFO	DFP	DFO+DFP	p-values
Hb (mg/dl)	12.4 (2.4)	12.7(1.6)	12.9 (1.8)	13 (1.1)	12.7 (1.8)	0.317
WBCs (x10³/μl)	8.15 (2.4)	8.05(3.1)	7.9 (1.9)	8.9 (1.6)	7.5 (3.7)	0.617
PLTs (x10³/μl)	265 (149)	242(85)	318 (189)	268 (114)	305 (97)	0.297
ALB (gr/dl)	1.7 (0.5)	1.65 (0.5)	1.6 (0.1)	1.7 (0.1)	1.7 (0.1)	0.951
TBil (mg/dl)	0.14 (0.49)	0.17(0.13)	0.18 (0.06)	0.1 (0.09)	0.12 (0.09)	0.757
INR	0.79 (0.04)	0.78(0.01)	0.78 (0.02)	0.78 (0)	0.78 (0.02)	0.373

Πίνακας 2: Βασικά χαρακτηριστικά των ζώων σε κάθε ομάδα πριν την έναρξη του πειράματος

Hb: αιμοσφαιρίνη, WBCs: λευκά αιμοσφαίρια, PLTs: αιμοπετάλια, ALB: αλβουμίνη, TBil: ολική χολερυθρίνη, INR: διεθνές κανονικοποιημένο πηλίκο. *p-value της δοκιμασίας Kruskal-Wallis για τη σύγκριση των 5 ομάδων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως διάμεσες τιμές (ενδοτεταρτημοριακό εύρος-IQR).

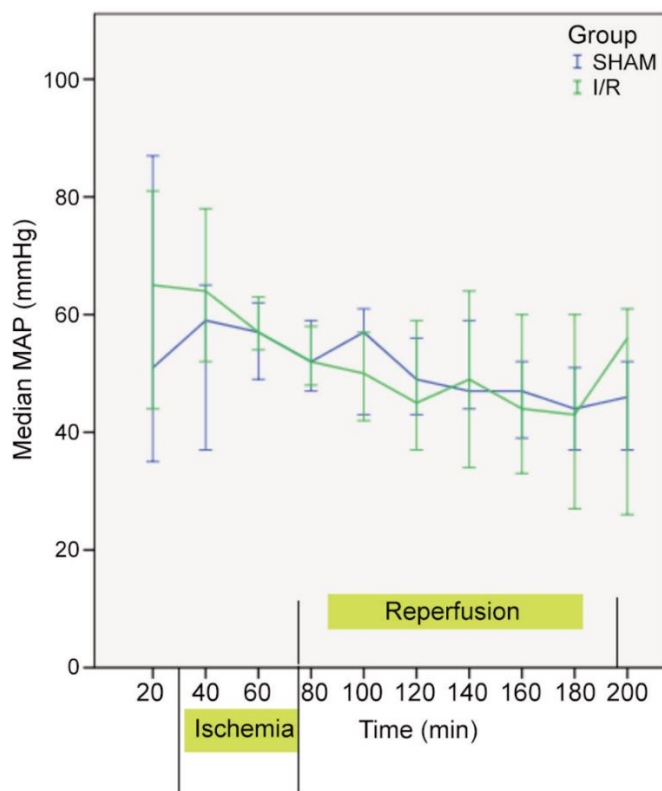
ii. Παρακολούθηση (monitoring) κατά τη διάρκεια του πειράματος

Κατά τη διάρκεια του πειράματος υπήρχε συνεχής παρακολούθηση και καταγραφή του καρδιακού ρυθμού, του ηλεκτροκαρδιογραφήματος, αρτηριακής πίεσης, κορεσμού της αιμοσφαιρίνης σε οξυγόνο και θερμοκρασίας. Επιπλέον, έγινε μέτρηση αερίων αρτηριακού αίματος και γαλακτικού

πριν την έναρξη του πειράματος (baseline), στις 2 ώρες μετά την επαναιμάτωση και στις 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση και πριν την νέα είσοδο των κονίκλων στην αναισθησία. Ο κορεσμός της αιμοσφαιρίνης σε οξυγόνο κυμάνθηκε για όλα τα πειραματόζωα σε φυσιολογικά επίπεδα > 96%. Δεν παρατηρήθηκαν ηλεκτροκαρδιογραφικές διαταραχές και η θερμοκρασία διατηρήθηκε με τη χρήση κουβέρτας θέρμανσης μεταξύ 38 και 38,5°C.

Μέση αρτηριακή πίεση

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις των τιμών της μέσης αρτηριακής πίεσης (ΜΑΠ) κατά τη διάρκεια του πειράματος για την ομάδα εικονικής παρέμβασης και την ομάδα ελέγχου. Η σύγκριση μεταξύ των δύο παραπάνω ομάδων έγινε ώστε να ελεγχθεί εάν το εφαρμοζόμενο μοντέλο αναισθησίας επηρεάζει σημαντικά την αιμοδυναμική κατάσταση των ζώων. Μετά την έναρξη της ηπατικής ισχαιμίας ή του αντίστοιχου χρονικού σημείου έναρξης της εικονικής ισχαιμίας για την ομάδα εικονικής παρέμβασης παρατηρήθηκε μείωση των διάμεσων τιμών της ΜΑΠ. Οι τιμές όμως, δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων κατά το χρονικό σημείο άρσης της ισχαιμίας και στις δύο ώρες μετά την επαναιμάτωση. Πιο συγκεκριμένα, στις δύο ώρες μετά την επαναιμάτωση η ομάδα ελέγχου παρουσίασε υψηλότερες τιμές ΜΑΠ σε σύγκριση με την ομάδα εικονικής παρέμβασης, ενώ και οι δύο ομάδες παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με τις μετρήσεις κατά την έναρξη του πειράματος (Διάγραμμα 4). Το εύρημα αυτό μπορεί να αποδοθεί στο βάθος της αναισθησίας και στην έλλειψη επώδυνων ερεθισμάτων κατά τη διάρκεια της φάσης της ισχαιμίας και των δύο πρώτων ωρών της επαναιμάτωσης.



Διάγραμμα 4: Διάμεσες τιμές της μέσης αρτηριακής πίεσης (ΜΑΠ) κατά τη διάρκεια του πειράματος για την ομάδα εικονικής παρέμβασης (SHAM) και την ομάδα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (I/R). Οι ράβδοι αντιπροσωπεύουν διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

Αερισμός

Τα επίπεδα της μερικής πίεσης του διοξειδίου του άνθρακα (pCO_2) που μετρήθηκαν για κάθε ομάδα στα 3 παραπάνω χρονικά σημεία φαίνονται στον Πίνακα 3. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των τιμών μεταξύ των ομάδων ή μεταξύ των τριών διαδοχικών μετρήσεων για κάθε ομάδα.

Ομάδα	pCO_2 -baseline (mmHg)	pCO_2 -2 ώρες (mmHg)	pCO_2 -24 ώρες (mmHg)
SHAM	35 (38-28)	40 (45-34)	31 (37-27)
CONTROL	37 (42-35)	41 (55-36)	31 (36-27)
DFO	42 (49-30)	37 (49-32)	32 (37-28)
DFP	39 (39-35)	43 (44-36)	35 (38-31)
DFO+DFP	36 (41-32)	41 (51-38)	34 (38-27)

Πίνακας 3: Μερική πίεση διοξειδίου του άνθρακα- pCO_2 (mmHg) για κάθε ομάδα του πειραματικού πρωτοκόλλου πριν την έναρξη του πειράματος (pCO_2 -baseline), στις 2 ώρες μετά την επαναιμάτωση (pCO_2 -2 ώρες) και στις 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση (pCO_2 -24 ώρες). Αναγράφονται οι διάμεσες τιμές και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος-median (Interquartile range). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των τιμών μεταξύ των ομάδων ή μεταξύ των τριών διαδοχικών μετρήσεων για κάθε

ομάδα. Για τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες Kruskal-Wallis και Friedman. Στατιστική σημαντικότητα όταν $p < 0,05$.

Επίπεδα γαλακτικού οξέος

Τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος που μετρήθηκαν για κάθε ομάδα στα 3 χρονικά σημεία φαίνονται στον Πίνακα 4. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των τιμών μεταξύ των ομάδων ή μεταξύ των τριών διαδοχικών μετρήσεων για κάθε ομάδα.

Ομάδα	Lactate-baseline (mmol/L)	Lactate-2 ώρες (mmol/L)	Lactate-24 ώρες (mmol/L)
SHAM	1,59 (2,22-0,96)	1,78 (2,01-1,31)	2,59 (3,56-1,17)
CONTROL	3,16 (4,09-2,40)	2,10 (3,17-1,91)	2 (2,68-0,85)
DFO	2,21 (4,53-1,41)	2,67 (3,58-2,09)	1,64 (2,10-0,98)
DFP	4,10 (4,45-1,14)	2,50 (2,99-2,04)	2,30 (2,65-1,10)
DFO+DFP	2,98 (4,16-2,22)	2,55 (3,22-1,88)	1,19 (3,99-1,12)

Πίνακας 4: Επίπεδα γαλακτικού οξέος (mmol/L) για κάθε ομάδα του πειραματικού πρωτοκόλλου πριν την έναρξη του πειράματος (baseline), στις 2 ώρες μετά την επαναιμάτωση (Lactate-2 ώρες) και στις 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση (Lactate-24 ώρες). Αναγράφονται οι διάμεσες τιμές και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος-median (Interquartile range-IQR). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των τιμών μεταξύ των ομάδων ή μεταξύ των τριών διαδοχικών μετρήσεων για κάθε ομάδα. Για τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες Kruskal-Wallis και Friedman. Στατιστική σημαντικότητα όταν $p < 0,05$.

iii. Παράμετροι ηπατοκυτταρικής βλάβης

Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν στο χρόνο μηδέν (πριν την είσοδο στην αναισθησία), στις 2 και 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση και στα οποία προσδιορίστηκαν οι τιμές των ενζύμων: αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT), ασπαρτική αμινοτρανσφεράση (AST), γ-γλουταμυλοτρανσφεράση (γ-GT) και αλκαλική φωσφατάση (ALP).

Αποτελέσματα χορήγησης σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων

Επίπεδα ALT

Πριν την έναρξη του πειράματος (χρόνος μηδέν) δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 5 ομάδων για όλες τις παραπάνω παραμέτρους. Επιπλέον, για την ομάδα εικονικής παρέμβασης (SHAM) δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των τιμών των ενζύμων ALT, ASL,

ALP και γ -GT μεταξύ των μετρήσεων στον χρόνο μηδέν (pre I/R), στις 2 (2 h post I/R) και 24 (24 h post I/R) ώρες μετά την επαναιμάτωση (Διάγραμμα 5)

Οι κόνικλοι της ομάδας ελέγχου (CONTROL), που υποβλήθηκαν σε 45 λεπτά μερικής (70%) ηπατικής ισχαιμίας και εν συνεχεία επαναιμάτωσης, παρουσίασαν σημαντική ηπατική βλάβη όπως αυτό υποδεικνύεται από την απότομη αύξηση των τιμών της ALT στον ορό (Διάγραμμα 5-ALT), από 41.8 (68.6-32.3) IU/ml σε 215.3 (230.8-156.9) IU/ml στις 2 ώρες και σε 507.7 (642.2-225.5) IU/ml στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση. Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ του χρόνου μηδέν και των 24 ωρών από την επαναιμάτωση ($p=0,001$).

Στατιστικά σημαντική ήταν ακόμη η διαφορά των επιπέδων της ALT μεταξύ της ομάδας SHAM και της ομάδας CONTROL στις 2 ώρες, 35.6 (39.5–27.1) και 215.3 (230.8–156.9) IU/ml, αντίστοιχα, καθώς και στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση, 70.4 (115.9–55.7) και 507.7 (642.2–225.5) IU/ml, αντίστοιχα, ($p = 0.016$ και 0.014 στις 2 και 24 ώρες, αντίστοιχα), (Διάγραμμα 5-ALT).

Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών της ALT στον ορό μεταξύ της ομάδας CONTROL και των ομάδων παρέμβασης DFO, DFP και DFO+DFP στις 2 και 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση. Ωστόσο, στις 24 ώρες, η ομάδα παρέμβασης DFO+DFP παρουσίασε τις χαμηλότερες τιμές, χωρίς αυτές να διαφέρουν σημαντικά από αυτές της ομάδας CONTROL [ALT = 301.6 (367.1–233.8) IU/ml] για την ομάδα DFO + DFP και 507.7 (642.2–225.5) για την ομάδα CONTROL], δείχνοντας μία τάση προστασίας έναντι της ηπατικής βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση (I/R injury). Αξίζει σε αυτό το σημείο να τονισθεί πως τα επίπεδα της ALT στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση για τις ομάδες CONTROL, DFO και DFP ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με αυτά της ομάδας SHAM ($p<0,05$), υποδεικνύοντας σημαντική ηπατική βλάβη. Αντιθέτως, τα επίπεδα της ALT για την ομάδα του συνδυασμού των φαρμάκων (DFO+DFP) στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά σε σύγκριση με αυτά της ομάδας SHAM (Διάγραμμα 5-ALT).

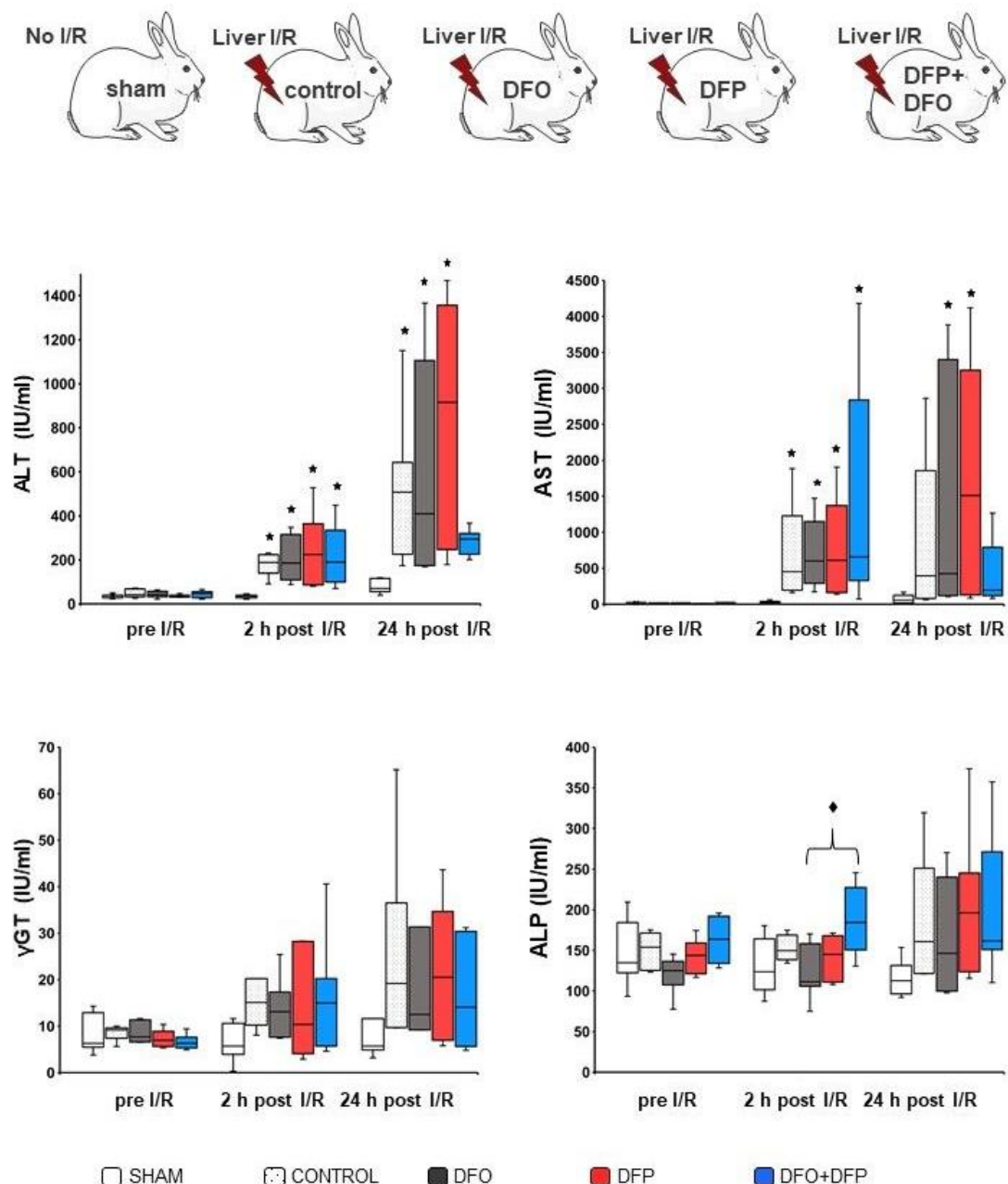
Επίπεδα AST

Τα επίπεδα της AST για την ομάδα CONTROL μεταξύ των τριών χρονικών σημείων ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα μόνο στις 2 ώρες από την επαναιμάτωση σε σύγκριση με τον χρόνο μηδέν, 453.8 (1227.7–193.6) και 16.1 (19–13.7) IU/ml, αντίστοιχα (Διάγραμμα 5-AST). Μεταξύ της ομάδας SHAM και της ομάδας CONTROL τα επίπεδα της AST διέφεραν στατιστικά σημαντικά στις 2 ώρες από την επαναιμάτωση, 28.6 (40–17.1) και 453.8 (1227.7–193.6) IU/ml, αντίστοιχα.

Μεταξύ της ομάδας CONTROL και των ομάδων παρέμβασης DFO, DFP και DFO+DFP δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των επιπέδων της AST στις 2 και 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση. Όπως και τα επίπεδα της ALT, στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση, η ομάδα DFO+DFP παρουσίασε τις χαμηλότερες, χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά [195.1 (792.9–120.4) IU/ml) για την ομάδα DFO + DFP και 394 (1857.4–81.3) IU/ml για την ομάδα CONTROL]-(Διάγραμμα 5-AST).

Επίπεδα ALP και γ-GT

Τα επίπεδα των ενζύμων ALP και γ-GT δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε κανένα χρονικό σημείο μεταξύ της ομάδας SHAM και της ομάδας CONTROL ούτε μεταξύ των τριών χρονικών σημείων για την ομάδα CONTROL. Ακόμη, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές των δύο ενζύμων, ούτε στις 2, ούτε στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση, μεταξύ της ομάδας CONTROL και των ομάδων DFO, DFP και DFO+DFP. Όλες οι ομάδες παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα των 2 ενζύμων και στα δύο χρονικά σημεία, γεγονός που αποκλείει συμμετοχή της χολόστασης κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας στην ηπατοκυτταρική βλάβη (Διάγραμμα 5-γGT, ALP).



Διάγραμμα 5: Η επίδραση της DFP και DFO στις τιμές της ALT, AST, γGT και ALP σε κονίκλους που υποβλήθηκαν σε ηπατική I/R. Στα ζώα χορηγήθηκαν DFO (100mg/kg), DFP (50mg/kg) ή ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων DFO+DFP (100mg/kg+50mg/kg) ή δεν χορηγήθηκε κανένα φάρμακο (CONTROL) πριν την πρόκληση μερικής (70%) ηπατικής ισχαιμίας και ακολούθως επαναιμάτωσης. Τα ζώα στην ομάδα εικονικής παρέμβασης (SHAM) υποβλήθηκαν σε γενική αναισθησία και λαπαροτομία χωρίς την πρόκληση ισχαιμίας. Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν πριν την πρόκληση της ισχαιμίας (pre I/R), στις 2 (2 h) και στις 24 ώρες (24 h) από την επαναιμάτωση. Σε όλες τις πειραματικές ομάδες μετρήθηκαν τα επίπεδα ALT, AST, γGT και ALP στον ορό και εκφράστηκαν ως διάμεσες τιμές και ενδοτεταρτημοριακά εύρη-medians (IQR-Interquartile range). Στο διάγραμμα με ★ σημειώνονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές $p < 0,05$ SHAM vs όλων των άλλων ομάδων για ALT και AST στις 2 h, SHAM vs CONTROL, DFO και DFP για ALT στις 24 h και SHAM

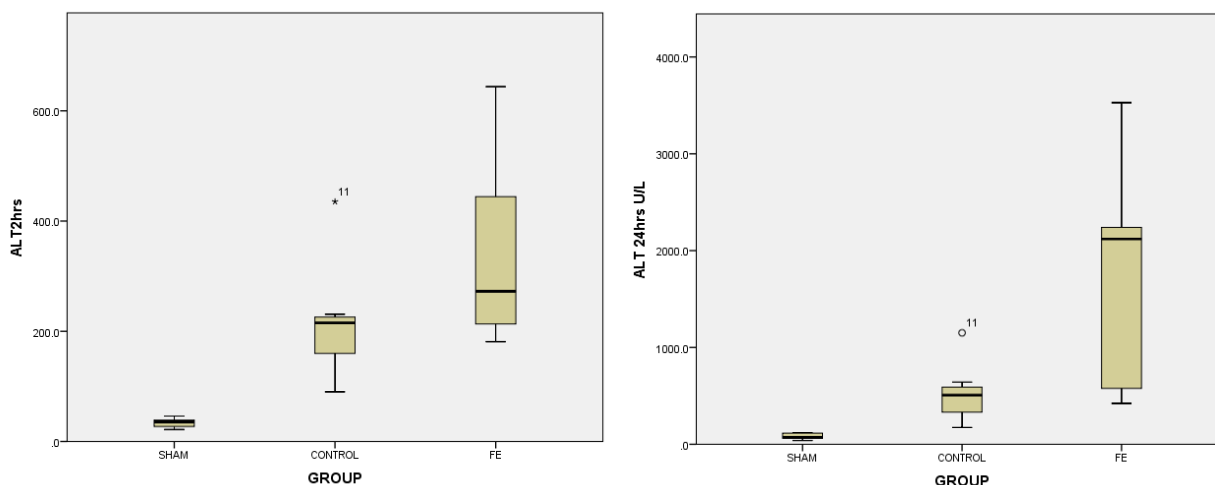
vs DFO και DFP για AST στις 24 h. Για τις τιμές της ALP με ♦ σημειώνεται στατιστικά σημαντική διαφορά DFO vs DFO+DFP στις 2 h.

Αποτελέσματα προετοιμασίας ήπατος με χορήγηση σιδήρου ενδοπεριτοναϊκά

Στο μέρος αυτό το πρωτοκόλλου η σύγκριση έγινε μεταξύ της ομάδας εικονικής παρέμβασης (SHAM), της ομάδας ελέγχου (CONTROL) και της ομάδας προετοιμασίας (preconditioning) με χορήγηση σιδήρου (FE).

Επίπεδα AST και ALT

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών της AST και ALT στον ορό μεταξύ της ομάδας CONTROL και της ομάδας FE στις 2 και 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση. Τόσο στις δύο, όσο και στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση η προετοιμασία των ζώων με χορήγηση σιδήρου δεν έδειξε τάση προστασίας έναντι της ηπατικής βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση, καθώς η ομάδα FE παρουσίασε υψηλότερες τιμές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου CONTROL (Διάγραμμα 6).



Διάγραμμα 6: Επίδραση της προετοιμασίας με χορήγηση σιδήρου στις τιμές της ALT σε κόνικλους που υποβλήθηκαν σε ηπατική I/R. Στην ομάδα παρέμβασης (FE) στα ζώα χορηγήθηκαν 6 δόσεις των 50mg/kg τρισθενούς σιδήρου σε σύμπλεγμα οξειδίων δεξτράνης (ferric hydroxide dextran complex) ενδοπεριτοναϊκά κάθε δεύτερη ημέρα για 10 ημέρες, πριν αυτά υποβληθούν σε μερική (70%) ηπατική ισχαιμία και επαναιμάτωση (I/R) 48 ώρες μετά την τελευταία δόση. Τα ζώα στην ομάδα CONTROL υποβλήθηκαν σε I/R χωρίς προηγούμενη παρέμβαση, ενώ τα ζώα στην ομάδα εικονικής παρέμβασης (SHAM) υποβλήθηκαν σε γενική αναισθησία και λαπαροτομία χωρίς την πρόκληση ισχαιμίας. Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν πριν την πρόκληση της ισχαιμίας (pre I/R), στις 2 (2 h) και στις 24 ώρες (24 h) από την επαναιμάτωση. Τα επίπεδα της ALT εκφράζονται ως διάμεσες τιμές και ενδοτεταρτημοριακά εύρη-medians (IQR-Interquartile range).

iv. Ιστολογικά ευρήματα

Αποτελέσματα χορήγησης σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων

Δείγματα ηπατικού ιστού εξετάστηκαν στις 2 και 24 ώρες από την επαναιμάτωση σε ηπατικό παρέγχυμα που είχε υποβληθεί σε ισχαιμία και στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση σε παρέγχυμα που δεν είχε υποβληθεί σε ισχαιμία. Χρησιμοποιήθηκε ημιποσοτική κλίμακα για τη βαθμολόγηση παραμέτρων ηπατοκυτταρικής βλάβης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Μέθοδοι». Τα αποτελέσματα της κλίμακας παρουσιάζονται ως διάμεσες τιμές (ενδοτεταρτημοριακό εύρος-IQR). Δεν παρατηρήθηκε αύξηση της συνολικής βαθμολογίας για την ομάδα εικονικής παρέμβασης (SHAM) μεταξύ των 2 και 24 ωρών από την επαναιμάτωση. Η συνολική βαθμολογία ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη για την ομάδα ελέγχου (CONTROL) σε σύγκριση με την ομάδα εικονικής παρέμβασης SHAM στις 2 ώρες [2 (3-1) έναντι 8 (11-8)] και 24 ώρες [2 (3-2) έναντι 12 (19-5)], $p = 0.001$ and 0.009 αντίστοιχα (Πίνακας 5-e,h).

Ισχαιμικός (αριστερός) λοβός στις 2 ώρες από την επαναιμάτωση					
Ομάδες	Ηπατοκυτταρική βλάβη ^a median (IQR)	PMNs εντός των κολποειδών median (IQR)	PMNs εκτός των κολποειδών median (IQR)	Νέκρωση median (IQR)	Συνολική βαθμολογία median (IQR)
SHAM	2 (3-1)	0 (1-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	2 (3-1)
CONTROL	6 (7-6) ^b	1 (1-1)	1 (3-0)	0 (0-0)	8 (11-8) ^e
DFO	4 (5-3)	2 (3-1) ^c	0 (1-0)	0 (0-0)	6 (8-6)
DFP	2 (4-2)	1 (2-1)	0 (1-0)	0 (0-0)	5 (7-3)
DFO+DFP	4 (5-3)	2 (2-1) ^c	1 (2-1) ^d	0 (0-0)	7 (8-6) ^e
Ισχαιμικός (αριστερός) λοβός στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση					
SHAM	2 (3-2)	0 (1-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	3 (3-2)
CONTROL	8 (10-3)	1 (3-1) ^g	1 (6-0)	0 (5-0)	12 (19-5) ^h
DFO	4 (6-1)	1 (2-1) ^g	1 (3-0)	0 (5-0)	9 (13-4)
DFP	3 (4-2)	2 (2-1) ^g	0 (2-0)	0 (5-0)	5 (13-4)
DFO+DFP	2 (3-1) ^f	1 (1-1)	1 (2-0)	0 (0-0)	4 (5-3)

Πίνακας 5: Βαθμολόγηση παραμέτρων ηπατοκυτταρικής βλάβης με ημιποσοτική κλίμακα για όλες τις ομάδες στις 2 και 24 ώρες από την επαναιμάτωση.

PMNs: polymorphonuclear leukocytes – πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα, **DFO:** δεσφερριοξαμίνη, **DFP:** δεφεριπρόνη, **IQR:** interquartile range – ενδοτεταρτημοριακό εύρος.

a: υποσύνολο βαθμολογίας για την εκτίμηση της διάτασης των κολποειδών, της συμφόρησης, του σχηματισμού κενотоπιών στα ηπατοκύτταρα (ballooning) και της απόπτωσης (Πίνακας 6). Όλες οι παράμετροι βαθμολογήθηκαν με κλίμακα 4 επιπέδων (βλέπε κεφάλαιο «Μέθοδοι»)

b: CONTROL vs SHAM, $p = 0,004$

c: DFO και DFO + DFP vs SHAM, $p = 0,003$ και $0,008$ αντίστοιχα

d: DFO + DFP vs SHAM, $p = 0,008$

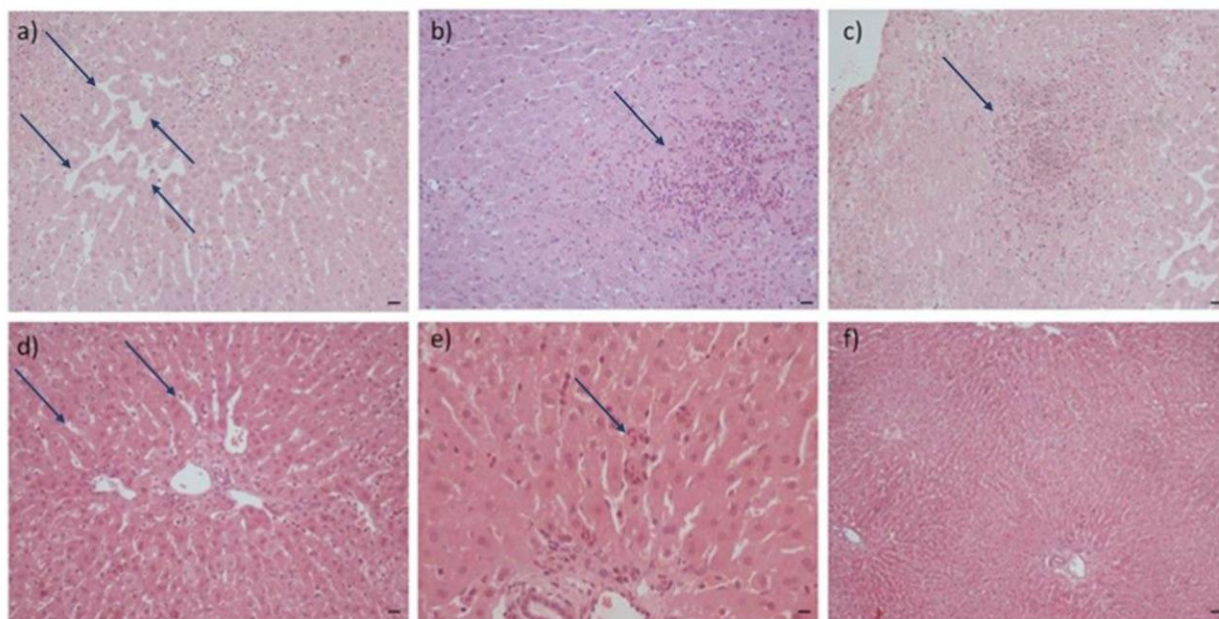
e: CONTROL και DFO + DFP vs SHAM, $p = 0,001$ και $0,012$ αντίστοιχα

f: DFO + DFP vs CONTROL, $p = 0,05$

g: CONTROL, DFO + DFP vs SHAM, $p = 0,038$ and $0,019$ αντίστοιχα

h: CONTROL vs SHAM, $p = 0,009$. Για όλες τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Kruskal-Wallis.

Στις 2 ώρες παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές των πέντε ομάδων μόνο σε σύγκριση με την ομάδα εικονικής παρέμβασης (SHAM), όπως φαίνεται στον Πίνακα 5-c,d,e. Στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση, χρονικό σημείο που αποτέλεσε το κομβικό σημείο ελέγχου για την παρούσα μελέτη, τα ιστολογικά ευρήματα για την ομάδα ελέγχου περιλάμβαναν διάταση των κολποειδών, μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφοπύρρηνων μέσα και έξω από τα κολποειδή και μεγαλύτερες περιοχές νέκρωσης (Εικόνα 3-a,b,c), με συνολική βαθμολογία [12 (19-5)]. Στο ίδιο χρονικό σημείο η ομάδα παρέμβασης DFO+DFP παρουσίασε τη χαμηλότερη συνολική βαθμολογία [4 (5-3)] μεταξύ των ομάδων που υποβλήθηκαν σε ισχαιμία, με ιστολογικά ευρήματα που περιλάμβαναν ήπια και εστιακή διάταση των κολποειδών, χαμηλό αριθμό πολυμορφοπύρρηνων και καμία περιοχή νέκρωσης (Εικόνα 3-d,e,f). Η ομάδα παρέμβασης DFO παρουσίασε συνολική βαθμολογία [9 (13-4)] και η ομάδα DFP [5 (13-4)]. Ωστόσο, οι παραπάνω διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.



Εικόνα 3: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ιστολογικών τομών ηπατικού ιστού που λήφθηκε 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση (Χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης). Στην ομάδα ελέγχου, παρατηρήθηκε μεγαλύτερος βαθμός διάταση των κολποειδών (βέλη στην φωτογραφία a, μεγέθυνσηx200), μεγαλύτερος αριθμός πολυμορφοπύρηνων (βέλος στην φωτογραφία b, μεγέθυνσηx200) και περισσότερες περιοχές νέκρωσης (βέλος στην φωτογραφία c, μεγέθυνσηx200) σε σύγκριση με την ομάδα παρέμβασης DFO + DFP. Στην ομάδα παρέμβασης DFO+DFP το ηπατικό παρέγχυμα ήταν καλά διατηρημένο, παρουσιάζοντας ήπια και εστιακή διάταση των κολποειδών (βέλη στην φωτογραφία d, μεγέθυνσηx200), μικρό αριθμό πολυμορφοπύρηνων (βέλος στην φωτογραφία e, μεγέθυνσηx400), χωρίς περιοχές νέκρωσης (φωτογραφία f, μεγέθυνσηx100).

Στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση η σύγκριση των επιμέρους βαθμολογιών των πέντε ομάδων στην κλίμακα 4 επιπέδων για την εκτίμηση της ηπατοκυτταρικής βλάβης (διάταση κολποειδών, συμφόρηση, σχηματισμός κενотоπίων στα ηπατοκύτταρα και απόπτωση) ανέδειξε ότι η ομάδα συνδυασμένης χορήγησης των δύο σιδηροδεσμευτικών παραγόντων DFO+DFP παρουσίασε τη χαμηλότερη βαθμολογία [2 (3-1)] στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση. Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.05$ -δοκιμασία Kruskal Wallis). Η επιμέρους βαθμολογία για την ομάδα ελέγχου στο ίδιο χρονικό σημείο ήταν [8 (10-3)], για την ομάδα DFO [4 (6-1)] και για την ομάδα DFP [3 (4-2)]-Πίνακας 6. Οι επιμέρους βαθμολογίες εκτίμησης του αριθμού των πολυμορφοπύρηνων κυττάρων μέσα και εκτός των κολποειδών παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο σε σύγκριση με την ομάδα εικονικής παρέμβασης SHAM (Πίνακας 5-c,d,g), ενώ οι βαθμολογίες εκτίμησης της έκτασης ιστικής νέκρωσης δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των πέντε ομάδων.

Οι βαθμολόγηση των ιστικών δειγμάτων από τον ηπατικό λοβό που δεν υποβλήθηκε σε ισχαιμία, τα οποία συλλέχθηκαν 24 ώρες από την επαναιμάτωση δεν ανέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των πέντε ομάδων, τόσο στην συνολική όσο και στις επιμέρους βαθμολογίες.

Παράμετροι ηπατοκυτταρικής βλάβης στις 24 ώρες						
Ομάδες	Διάταση κολποειδών median (IQR)	Συμφόρηση median (IQR)	Σχηματισμός κενοτοπίων median (IQR)	Μίτωση median (IQR)	Απόπτωση median (IQR)	Σύνολο βαθμολογίας median (IQR)
SHAM	1 (1-1)	0 (1-0)	0 (1-0)	0 (1-0)	0 (0-0) ^c	2 (3-2)
CONTROL	2 (3-1)	3 (3-2) ^b	2 (3-0)	0 (1-0)	0 (1-0)	8 (10-3)
DFO	1 (2-0)	2 (2-1)	1 (1-0)	0 (0-0)	0 (0-0) ^c	4 (6-1)
DFP	1 (2-1)	1 (1-1)	1 (1-1)	0 (0-0)	0 (0-0) ^c	3 (4-2)
DFO + DFP	0 (1-0) ^a	1 (1-1)	1 (1-0)	0 (0-0)	0 (0-0) ^c	2 (3-1) ^d

Πίνακας 6: Ανάλυση των επιμέρους παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της ηπατοκυτταρικής βλάβης στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση.

DFO: δεσφερριοξαμίνη, **DFP:** δεφεριπρόνη, **IQR:** ενδοτεταρτημοριακό εύρος-interquartile range. Όλες οι παράμετροι (διάταση κολποειδών, συμφόρηση, σχηματισμός κενотоπίων, μίτωση και απόπτωση) βαθμολογήθηκαν με κλίμακα 4 επιπέδων (βλέπε κεφάλαιο «Μέθοδοι»).

a: DFO + DFP vs CONTROL, $p = 0,008$

b: CONTROL vs SHAM, $p = 0,006$

c: SHAM, DFO, DFP και DFO + DFP vs CONTROL, $p = 0,048$

d: DFO + DFP vs CONTROL, $p = 0,05$. Για όλες τις συγκρίσεις χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Kruskal-Wallis.

Αποτελέσματα προετοιμασίας ήπατος με χορήγηση σιδήρου ενδοπεριτοναϊκά

Τα αποτελέσματα της ημιποσοτικής κλίμακας που χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμολόγηση των ιστολογικών ευρημάτων (βλέπε κεφάλαιο «Μέθοδοι») παρουσιάζονται ως διάμεσες τιμές (ενδοτεταρτημοριακό εύρος-IQR). Η σύγκριση έγινε μεταξύ των ομάδων SHAM, CONTROL και FE με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis.

Δεν παρατηρήθηκε αύξηση της συνολικής βαθμολογίας για την ομάδα εικονικής παρέμβασης (SHAM) μεταξύ των 2 και 24 ωρών από την επαναιμάτωση. Η συνολική βαθμολογία ήταν

στατιστικά σημαντικά υψηλότερη για την ομάδα ελέγχου (CONTROL) σε σύγκριση με την ομάδα SHAM στις 2 ώρες και 24 ώρες, $p = 0.002$ and 0.006 αντίστοιχα.

Η ομάδα FE παρουσίασε χαμηλότερη συνολική βαθμολογία σε σύγκριση με την ομάδα CONTROL στις 2 και 24 ώρες από την επαναιμάτωση, χωρίς όμως οι διαφορές αυτές να είναι στατιστικά σημαντικές. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη σύγκριση των 3 ομάδων για τις επιμέρους παραμέτρους ηπατοκυτταρικής βλάβης (διάταση κολποειδών, συμφόρηση, σχηματισμός κενотоπιών στα ηπατοκύτταρα και απόπτωση).

B.2.6. Συζήτηση

Σκοπός του *in vivo* μέρους της παρούσας έρευνας ήταν να μελετήσει την προστασία που μπορεί να προσφέρει ο συνδυασμός σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων με διαφορετική λιποφιλικότητα έναντι της βλάβης από I/R του ήπατος και πιο συγκεκριμένα η προστασία κατά την όψιμη φάσης της βλάβης από I/R. Η βαρύτητα της όψιμης αυτής βλάβης που ξεκινά μετά τις 4 ώρες περίπου από την επαναιμάτωση εξαρτάται από την ένταση της έκρηξης ΔΜΟ κατά τη στιγμή και λίγα λεπτά μετά την επαναιμάτωση, δηλαδή επανοξυγόνωση του ιστού. Δεδομένου του ρόλου του ελεύθερου ή οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου στην παραγωγή της εξαιρετικά δραστικής $\cdot\text{OH}$ σε συνθήκες οξειδωτικού στρες, ο σχεδιασμός της έρευνας στόχευσε στη χορήγηση των σιδηροδεσμευτικών παραγόντων σε ικανό χρόνο πριν την επαναιμάτωση, ώστε αυτοί να είναι παρόντες κατά τη στιγμή της επαναιμάτωσης. Ακόμη, στα ζώα χορηγήθηκε και $2^{\text{η}}$ δόση φαρμάκου μετά την ανάνηψη, περίπου στις τρεις ώρες από την επαναιμάτωση προκειμένου η προστασία να παραμείνει και κατά τη διάρκεια των πρώτων ωρών της όψιμης φάσης της βλάβης από I/R, όπου ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και T-λεμφοκύτταρα αναλαμβάνουν τη διατήρηση της παραγωγής ΔΜΟ (9).

Η προστασία που προσφέρει ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων είναι καλύτερη από την προστασία που προσφέρει ο κάθε παράγοντας μεμονωμένα στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση, όπως φαίνεται από την τάση των τιμών της ηπατικής βιοχημείας, αλλά κυρίως από την ιστολογική εικόνα, όπου στην ομάδα του συνδυασμού των δύο φαρμάκων παρατηρείται, σε σαφώς μικρότερο βαθμό, διάταση των κολποειδών, συμφόρηση, δημιουργία κενотоπιών και περιοχές νέκρωσης.

Παρόλο που η προστατευτική ικανότητα του συνδυασμού σε σύγκριση με τα μεμονωμένα φάρμακα είναι σαφής τόσο στο *in vitro* όσο και στο *in vivo* μέρος του πειράματος, στο τελευταίο παρατηρήθηκαν ακραίες τιμές και μεγάλη διασπορά των τιμών στις μετρήσεις των τρανσαμινασών ALT και AST σε όλες τις ομάδες του πρωτοκόλλου, τόσο στις 2 όσο και στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση (Διάγραμμα 5-ALT, AST). Για το χρονικό διάστημα στο οποίο τα ζώα βρίσκονταν υπό γενική αναισθησία, το οποίο αφορά στα δείγματα που λήφθηκαν στις 2 ώρες από την

επαναιμάτωση, οι αποκλίσεις αυτές δεν μπορούν να ερμηνευθούν από αποκλίσεις της αρτηριακής πίεσης ή της οξυγόνωσης, δηλαδή επιπρόσθετης ιστικής υποξίας. Για το χρονικό διάστημα που ακολουθούσε την ανάνηψη των ζώων μέχρι και τη νέα είσοδο στην αναισθησία στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση για τη λήψη δειγμάτων δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο κάποια από τα ζώα να παρουσίασαν χαμηλότερες τιμές αρτηριακής πίεσης, σε έδαφος έντονης συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης (Systematic Inflammatory Response Syndrome-SIRS). Επιπλέον, δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η κατανομή των φαρμάκων να επηρεάστηκε από παράγοντες που δεν μπορούν να εντοπιστούν από τα δεδομένα που έχουν καταγραφεί στην παρούσα μελέτη. Κανένα από τα ζώα δεν παρουσίασε εικόνα αιμορραγίας στην περιτοναϊκή κοιλότητα ή υποξυγοναιμίας κατά την επανεκτίμηση στις 24 ώρες και πριν την εκ νέου είσοδο σε γενική αναισθησία.

Για την ομάδα της DFP που παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές ALT σε σύγκριση με τις υπόλοιπες ομάδες τόσο στις 2 όσο και στις 24 ώρες (Διάγραμμα 5-ALT) θα μπορούσε να ενοχοποιηθεί η ασταθής δέσμευση του σιδήρου από την DFP όταν η αναλογία DFP:Fe είναι μικρότερη από 3:1. Κάθε μόριο σιδήρου διαθέτει έξι θέσεις συντονισμού, θέσεις δηλαδή στις οποίες μπορούν να δημιουργηθούν δεσμοί. Κάθε μόριο DFP μπορεί να συνδεθεί με δύο θέσεις συντονισμού σε ένα μόριο σιδήρου (δισχιδής δεσμευτικός παράγοντας). Έτσι, για την πλήρη και σταθερή δέσμευση κάθε μορίου σιδήρου απαιτούνται τρία μόρια DFP. Όταν η αναλογία είναι μικρότερη ο σίδηρος είναι εκτεθειμένος και μπορεί να συμμετάσχει ως καταλύτης και να οδηγήσει στη δημιουργία *OH (230). Συμπερασματικά, ο συνδυασμός των ιδιοτήτων των δύο σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων με διαφορετική λιποφιλικότητα και ισχύ σύνδεσης με τον σίδηρο προσφέρει μεγαλύτερη προστασία έναντι της οξειδωτικής βλάβης *in vitro* και της βλάβης από ισχαιμία-επαναιμάτωση *in vivo*. Ωστόσο, σε *in vivo* πειράματα επιπλέον παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την κατανομή και δραστηριότητα των χορηγούμενων φαρμάκων ή και την ίδια την ηπατική βλάβη.

Περιορισμοί

Η στενή παρακολούθηση των ζωτικών σημείων των ζώων περιοριζόταν στην διάρκεια της γενικής αναισθησίας (περίπου 3,5 ώρες).

Τα ζώα δεν ήταν ελεύθερα συγκεκριμένων παθογόνων (SPF-Specific pathogen-free animals). Ο έλεγχος των ζώων για πιθανή νόσο ήταν κλινικός κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού τους στο εργαστήριο.

Ο χρόνος των 24 ωρών ίσως να μην είναι ικανός για εντοπισμό πιθανών επιπλοκών της ενδοτραχειακής διασωλήνωσης. Συμπτώματα όπως αναπνευστική δυσχέρεια ή λοίμωξη σε έδαφος

τραυματικής κάκωσης της τραχείας ή στένωσης αυτής μπορεί να εμφανιστούν σε μεταγενέστερο χρονικό σημείο.

B.3. Πείραμα *ex vivo*

B.3.1. Εισαγωγή

Η μεταμόσχευση ενός οργάνου αποτελεί την αποτελεσματικότερη θεραπεία για ασθενείς με νόσο τελικού σταδίου διάφορων οργάνων και τη μόνη αποτελεσματική θεραπεία για διατήρηση της ζωής ασθενών με ηπατική ανεπάρκεια τελικού σταδίου. Η βελτίωση των μεθόδων συντήρησης των οργάνων, των χειρουργικών τεχνικών, της ανοσοκατασταλτικής αγωγής και της φροντίδας μετά τη μεταμόσχευση έχει οδηγήσει σε αύξηση των επιτυχημένων μεταμοσχεύσεων (231).

Παράλληλα, λόγω της μακράς αναμονής των ασθενών και της μεγάλης ανάγκης για αλλομοσχεύματα κρίθηκε αναγκαία η χρήση μοσχευμάτων από δότες με διευρυμένα κριτήρια καταλληλότητας (extended criteria donors-ECDs), καθώς και η χρήση οργάνων που υπέστησαν παρατεταμένους χρόνους ισχαιμίας. Τα όργανα με τα παραπάνω χαρακτηριστικά σχετίζονται με υψηλότερα ποσοστά πρωτοπαθούς μη λειτουργίας (primary non function-PNF) και καθυστερημένης λειτουργίας του μοσχεύματος (delayed graft function-DGF) και συνεπώς με μεγαλύτερο κίνδυνο απόρριψης. Με αυτά τα δεδομένα η έρευνα στράφηκε εκ νέου στην βελτιστοποίηση της συντήρησης των μοσχευμάτων μετά τη λήψη και πριν τη μεταμόσχευση (232). Η μέθοδοι συντήρησης των μοσχευμάτων έχουν ως στόχο να διατηρήσουν την ποιότητα των οργάνων, πολύ περισσότερο αυτών που προέρχονται από δότες με διευρυμένα κριτήρια, ενώ παράλληλα προσφέρουν το χρονικό περιθώριο για την προετοιμασία του λήπτη, την οργάνωση του απαραίτητου προσωπικού και των δομών, τη μεταφορά του μοσχεύματος και τη διενέργεια εργαστηριακών εξετάσεων (231).

Κρυοσυντήρηση: Η κυρίαρχη μέθοδος συντήρησης είναι η κρυοσυντήρηση, δηλαδή η φύλαξη των μοσχευμάτων σε ειδικά διαλύματα συντήρησης, όπως το University of Wisconsin (UW), σε θερμοκρασία περί τους 4°C. Στόχος είναι η ελαχιστοποίηση των μεταβολικών αναγκών των κυττάρων και της κυτταρικής βλάβης κατά τη φάση της ψυχρής ισχαιμίας (21,233).

Υποθερμική μηχανική κυκλοφορία: με την τεχνική αυτή διατηρείται στο όργανο μηχανικά συνεχής κυκλοφορία ψυχρού διαλύματος συντήρησης (4-12°C). Βοηθά στη βελτίωση της οξυγόνωσης, στη παροχή θρεπτικών συστατικών στο όργανο και την απομάκρυνση αποβλήτων

του μεταβολισμού, μειώνοντας πιθανώς της κυτταρική βλάβη σε σύγκριση με τη στατική κρυοσυντήρηση (234,235).

Νορμοθερμική μηχανική κυκλοφορία: με αυτή τη μέθοδο τα όργανα συντηρούνται σε θερμοκρασία σώματος κατά τη διάρκεια κυκλοφορίας ενός πλούσιου σε θρεπτικά συστατικά διαλύματος. Βοηθά στη διατήρηση των μεταβολικών λειτουργιών του οργάνου, δίνει τη δυνατότητα αξιολόγησης της βιωσιμότητας του πριν τη μεταμόσχευση και τη διενέργεια θεραπευτικών παρεμβάσεων *ex vivo* (21,235).

Υπό-νορμοθερμική μηχανική κυκλοφορία: η μέθοδος αυτή επιτρέπει την πιο σταδιακή επαναθέρμανση του μοσχεύματος και πιο σταδιακή αύξηση των μεταβολικών του αναγκών. Λόγω διατήρησης της θερμοκρασίας $< 37^{\circ}\text{C}$ διατηρεί τις μεταβολικές ανάγκες του μοσχεύματος χαμηλά, ενώ παράλληλα αυξάνει το μεταβολισμό μεταβολισμό (σε σύγκριση με την προηγούμενη υποθερμική κατάσταση) και επιτρέπει την αξιολόγηση της βιωσιμότητας και τη βελτίωση της λειτουργίας του μοσχεύματος. Αποτελεί γέφυρα μεταξύ υποθερμικής και νορμοθερμικής μηχανικής κυκλοφορίας (235,236).

Ο ρόλος του σιδήρου στην παραγωγή ΔΜΟ, το οξειδωτικό στρες και την κυτταρική βλάβη κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, κρυοσυντήρησης και επαναιμάτωσης οργάνων, όπως το ήπαρ, η καρδιά και οι νεφροί έχει επιβεβαιωθεί σε πολυάριθμες μελέτες τις τελευταίες δεκαετίες (21,23,234,237–239). Τα επίπεδα του σιδήρου έχει μάλιστα περιγραφεί πως αυξάνονται κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης του ήπατος και έχουν συσχετισθεί με δυσμενή έκβαση των μοσχευμάτων (233,237). Η DFO έχει δοκιμασθεί τόσο σε μοντέλα στατικής συντήρησης του ήπατος όσο και σε μοντέλα μηχανικής κυκλοφορίας-αιμάτωσης μειώνοντας το οξειδωτικό στρες, προστατεύοντας από την κυτταρική βλάβη και οδηγώντας σε καλύτερα λειτουργικά αποτελέσματα για τα ηπατικά μοσχεύματα (21,23,125). Η δέσμευση του ασταθούς, οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου έχει ακόμη μελετηθεί ως προστατευτικός παράγοντας έναντι του φαινομένου της φερρόπτωσης που έχει αναγνωρισθεί πως συμμετέχει στην βλάβη των οργάνων κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης και της επακόλουθης επαναιμάτωσης (210).

B.3.2. Μέθοδοι

Ο τόπος διεξαγωγής, η άδεια πειραματισμού, το ζωικό πρότυπο και το πρωτόκολλο αναισθησίας περιγράφονται στο *in vivo* μέρος του πειράματος και ισχύουν και για το *ex vivo*.

ι. Πρωτόκολλο λήψης μοσχεύματος, κρυοσυντήρησης και υπο-νορμοθερμικής μηχανικής κυκλοφορίας

Μετά την ολοκλήρωση της αναισθησίας και αντισηψίας ακολουθούσε μέση υπερ-υπομφάλιος τομή και διατομή του δρεπανοειδούς συνδέσμου του ήπατος. Ακολουθούσε απολίνωση της γαστροδωδεκαδακτύλικής αρτηρίας και της σπληνικής φλέβας, παρασκευή και καθετηριασμός του χοληδόχου πόρου (ΧΠ), παρασκευή και αποκλεισμός κάτω κοίλης φλέβας (ΚΚΦ) υπερηπατικά, καθετηριασμός της πυλαίας φλέβας και της κοιλιακής αορτής πάνω από τις νεφρικές αρτηρίες. Μετά τη χορήγηση 2500IU ηπαρίνης ενδοφλέβια, αποκλεισμός θωρακικής αορτής, διάνοιξη υπερηπατικής κάτω κοίλης φλέβας και έναρξη έκπλυσης αρχικά με 500ml διαλύματος Ringer's lactate και στη συνέχεια με διάλυμα University of Wisconsin (UW) με ή χωρίς σιδηροδεσμευτικό παράγοντα. Στη συνέχεια αφαίρεση του μοσχεύματος και βύθιση σε διάλυμα UW με ή χωρίς σιδηροδεσμευτικό παράγοντα για 20 ώρες στους 2-4°C. Μετά το πέρας του χρόνου κρυοσυντήρησης το ήπαρ παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά και στη συνέχεια συνδεόταν σε αντλία εξωσωματικής κυκλοφορίας σφυγμικής ροής (Stockert roller pump). Η κυκλοφορία γινόταν με διάλυμα UW (εμπλουτισμένου με 10mmol/l γλυκόζη, 10IU/l ινσουλίνη, 100mmol/l Na⁺ και 5000IU ηπαρίνη) διαμέσου καθετήρα από την πυλαία φλέβα με στόχο μέσης πίεσης 8-10mmHg. Το διάλυμα συλλεγόταν από την υπερηπατική ΚΚΦ σε δοχείο και μεταγγιζόταν κάθε 30 λεπτά μετά τη συλλογή των δειγμάτων στο δοχείο παροχής της αντλίας. Το διάλυμα εμπλουτιζόταν συνεχώς με οξυγόνο (1L/min) και η θερμοκρασία του μοσχεύματος και του διαλύματος διατηρούταν μεταξύ 24 και 26°C. Το μόσχευμα ήταν τοποθετημένο πάνω σε αιώρα από γάζα αναρτημένη από τέσσερα σημεία ενός κλειστού, διαφανούς κιβωτίου ώστε να είναι εφικτή η συλλογή του εκρεόμενου από την ΚΚΦ διαλύματος (Εικόνα 4).





Εικόνα 4: Κύκλωμα υπο-νορμοθερμικής μηχανικής κυκλοφορίας σε ηπατικά μοσχεύματα κονίκλων. Η μηχανική κυκλοφορίας διατηρήθηκε για 3 ώρες, ενώ είχα προηγηθεί κρυοσυντήρηση των μοσχευμάτων σε διάλυμα UW για 20 ώρες.

ii. Πειραματικό πρωτόκολλο και ομάδες

Η παρούσα έρευνα αποτελεί μία προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη σε κονίκλους (rabbits). Η τυχαιοποίηση τους σε 5 ομάδες ($n=7$) έγινε με απλή τυχαιοποίηση. Τα μοσχεύματα στην ομάδα ελέγχου (C) συντηρήθηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω χωρίς την προσθήκη σιδηροδεσμευτικού φαρμάκου. Στις ομάδες παρέμβασης προστέθηκαν στο διάλυμα UW που χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση, κρυοσυντήρηση και μηχανική κυκλοφορία δεσφεριριξαμίνη σε συγκέντρωση 1mmol/L (ομάδα O), δεφεριπρόνη σε συγκέντρωση $250\mu\text{mol/L}$ (ομάδα P) ή συνδυασμός των δύο φαρμάκων στις παραπάνω συγκεντρώσεις (ομάδα O+P). Τέλος, στην ομάδα F η παρέμβαση έγινε πριν τη λήψη του ηπατικού μοσχεύματος με την χορήγηση σιδήρου ενδοπεριτοναϊκά (preconditioning), όπως περιγράφεται στο *in vivo* μέρος του πειράματος. Η ομάδα F περιλαμβάνει αποτελέσματα από 6 ζώα, καθώς ένα εξ αυτών δεν επιβίωσε της προετοιμασίας με χορήγηση FE ενδοπεριτοναϊκά.

Δείγματα του διαλύματος για μέτρηση παραμέτρων ηπατικής βλάβης και σιδήρου συλλέχθηκαν από το διάλυμα κρυοσυντήρησης, από τα πρώτα 10ml μετά την έναρξη της μηχανικής κυκλοφορίας και κάθε 30min για 3 ώρες μηχανικής κυκλοφορίας. Δείγματα ηπατικού παρεγχύματος προς ιστολογική ανάλυση συλλέχθηκαν στο τέλος του πειράματος. Για κάθε μόσχευμα ήπατος καταγράφηκε το βάρος του αμέσως μετά την έκπλυση και λήψη του.

iii. Μέτρηση βιοχημικών παραμέτρων ηπατικής βλάβης

Μετά τη συλλογή των δειγμάτων ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στις 10.000 στροφές το λεπτό σε θερμοκρασία 4°C και αποθήκευση των δειγμάτων στους 4 και -80°C. Στα δείγματα διαλύματος UW προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ενζύμων: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) και lactate dehydrogenase (LDH), καθώς και τα επίπεδα της γλυκόζης και του σιδήρου με αυτόματο βιοχημικό αναλυτή Siemens Dimension ARx.

iv. Ιστολογική εξέταση

Όπως περιγράφηκε και παραπάνω δείγματα ηπατικού ιστού λήφθηκαν από τα μοσχεύματα μετά τη λήξη της μηχανικής επανακυκλοφορίας. Μέρος των ιστικών τεμαχίων τοποθετήθηκε άμεσα στους -80°C και μέρος τους σε διάλυμα φορμαλδεΰδης 10% και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Τα τελευταία στη συνέχεια αφυδατώθηκαν και εγκλείστηκαν σε παραφίνη. Οι κύβοι παραφίνης κόπηκαν σε τομές των 4 μm , βάφτηκαν με χρώση αιματοξυλλίνης-ηωσίνης και ακολουθούσε εξέταση με φωτοmikροσκοπιο. Η μικροσκοπική εκτίμηση των δειγμάτων έγινε από δύο ειδικούς παθολογοανατόμους στους οποίους δεν γνωστοποιήθηκε η κατανομή των δειγμάτων στις ομάδες του πειραματικού πρωτοκόλλου (blinded).

Εκτιμήθηκαν παράμετροι ηπατοκυτταρικής βλάβης με τη χρήση ημιποσοτικής βαθμολογικής κλίμακας 4 επιπέδων, όπως έχει περιγραφεί στο *in vivo* μέρος του πειραματικού πρωτοκόλλου στο κεφάλαιο «Μέθοδοι».

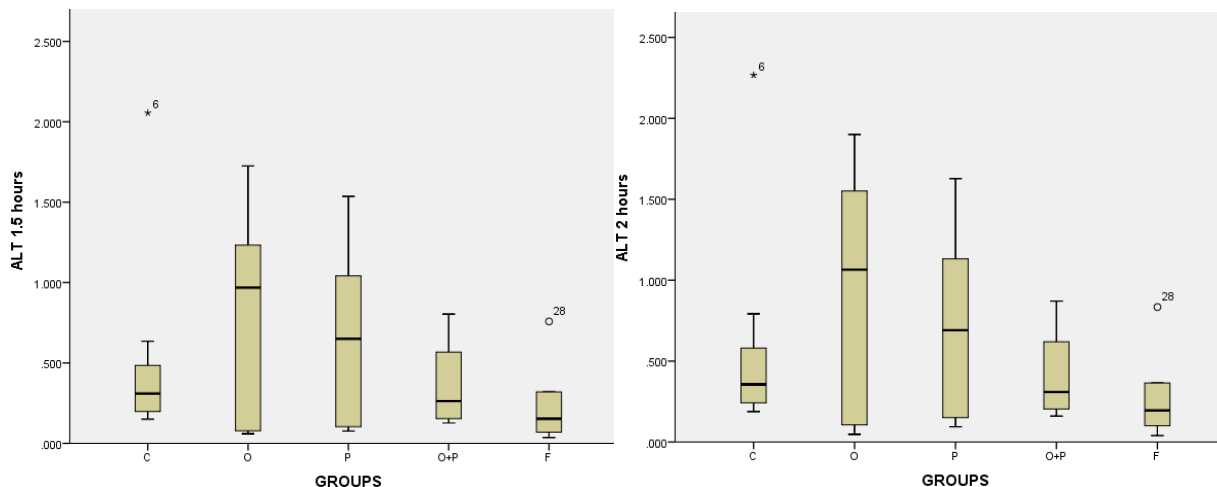
v. Στατιστική ανάλυση

Λόγω μη κανονικής κατανομής των τιμών των μεταβλητών για τη σύγκριση αυτών μεταξύ των ομάδων εφαρμόστηκαν μη παραμετρικές δοκιμασίες. Η κανονικότητα των κατανομών ελέγχθηκε με τη δοκιμασία Shapiro-Wilk. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως διάμεσες τιμές (median) και ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR: interquartile range). Οι διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία Kruskal-Wallis για ανεξάρτητα δείγματα. Οι διαφορές μεταξύ δύο ομάδων εκτιμήθηκαν με τη δοκιμασία Mann-Whitney για ανεξάρτητα δείγματα. Για τη σύγκριση τιμών μεταξύ των τριών χρονικών σημείων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία Friedman. Οι υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος SPSS Statistics 23.0 IBM, Armonk, NY, USA και η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε σε $p < 0.05$.

B.3.3. Αποτελέσματα

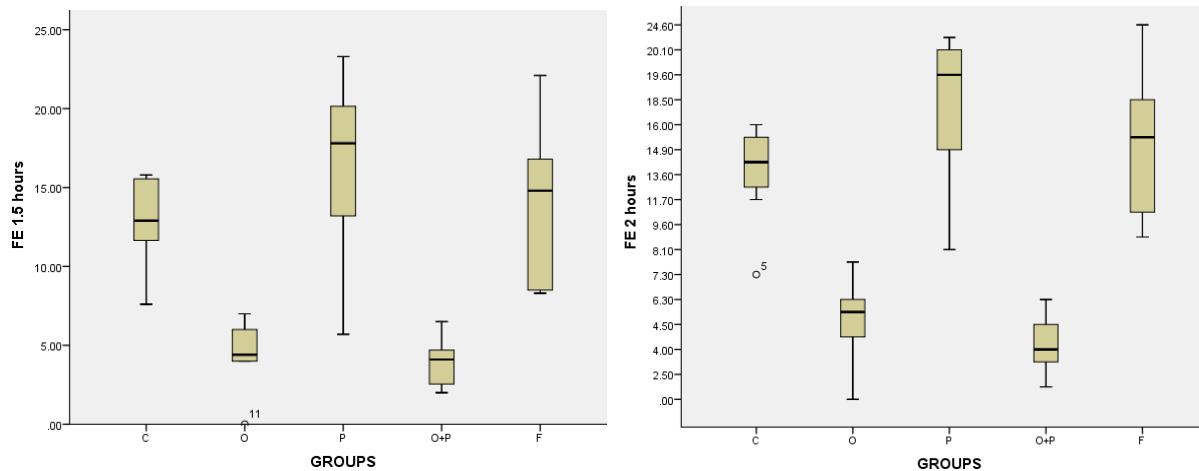
Αρχικά έγινε σύγκριση μεταξύ της ομάδας ελέγχου (C) και των ομάδων παρέμβασης με σιδηροδεσμευτικούς παράγοντες (O, P, O+P) και στη συνέχεια σύγκριση της ομάδας ελέγχου (C) με την ομάδα προετοιμασίας (preconditioning) με σίδηρο (F).

Για την παράμετρο ηπατοκυτταρικής βλάβης ALT στο διάλυμα UW δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων σε κανένα χρονικό σημείο του πειράματος. Παρ' όλ' αυτά, αξίζει να σημειωθεί πως η ομάδα του συνδυασμού των σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων παρουσίασε χαμηλότερες τιμές σε σύγκριση με τα μεμονωμένα φάρμακα, ενώ η ομάδα προετοιμασίας με σίδηρο φαίνεται να παρουσιάζει ακόμη χαμηλότερες τιμές. Στο Διάγραμμα 7 παρουσιάζονται οι τιμές της ALT παρουσιάζονται οι τιμές της ALT για όλες τις ομάδες του πειράματος μετά από 1,5 και 2 ώρες μηχανικής κυκλοφορίας.



Διάγραμμα 7: Επίδραση της χορήγησης σιδηροδεσμευτικών παραγόντων με διαφορετική λιποφιλικότητα αλλά και της προετοιμασίας των κονίκλων με χορήγηση σιδήρου ενδοπεριτοναϊκά στις τιμές της ALT σε ηπατικά μοσχεύματα που υποβλήθηκαν σε κρυοσυντήρηση 20 ωρών και στη συνέχεια 3 ώρες μηχανικής κυκλοφορίας. Παρουσιάζονται οι τιμές της ALT μετά από 1,5 και 2 ώρες υπο-νορμοθερμικής μηχανικής κυκλοφορίας. Στην ομάδα παρέμβασης (F) στα ζώα χορηγήθηκαν 6 δόσεις των 50mg/kg τριθενούς σιδήρου σε σύμπλεγμα οξειδίων δεξτράνης (ferric hydroxide dextran complex) ενδοπεριτοναϊκά κάθε δεύτερη ημέρα για 10 ημέρες πριν τη λήψη του μοσχεύματος 48 ώρες μετά την τελευταία δόση. Τα ζώα στην ομάδα (C) υποβλήθηκαν σε λήψη του μοσχεύματος χωρίς προηγούμενη παρέμβαση. Στις ομάδες O και P προστέθηκαν στο διάλυμα UW που χρησιμοποιήθηκε για την έκπλυση, κρυοσυντήρηση και μηχανική κυκλοφορία δεσφερριζαμίνη σε συγκέντρωση 1mmol/L και δεφεριπρόνη σε συγκέντρωση 250μmol/L, αντίστοιχα. Τα επίπεδα της ALT εκφράζονται ως διάμεσες τιμές και ενδοτεταρτημοριακά εύρη-medians (IQR-Interquartile range). Οι τιμές που παρουσιάζονται υπολογίστηκαν από τις τιμές των ενζύμων που μετρήθηκαν στο διάλυμα UW διαιρώντας με το βάρος σε γραμμάρια του κάθε μοσχεύματος.

Όσον αφορά τη δέσμευση του σιδήρου στο διάλυμα κρυσυντήρησης και επανακυκλοφορίας οι χαμηλότερες τιμές σιδήρου μετρήθηκαν στην ομάδα του συνδυασμού των φαρμάκων (O+P) και στην ομάδα της δεσφερριοξαμίνης (O). Η ομάδα του συνδυασμού των φαρμάκων O+P παρουσίασε στατιστικά χαμηλότερες τιμές από την ομάδα ελέγχου C και την ομάδα της δεφεριπρόνης P, ενώ η ομάδα της δεσφερριοξαμίνης παρουσίασε στατιστικά χαμηλότερες τιμές σε σύγκριση με την ομάδα P. Τις υψηλότερες τιμές σιδήρου παρουσίασαν οι ομάδες της δεφεριπρόνης P και η ομάδα προετοιμασίας με σίδηρο F.



Διάγραμμα 8: Επίπεδα σιδήρου στο διάλυμα UW της μηχανικής κυκλοφορίας των ηπατικών μοσχευμάτων για όλες τις ομάδες του πειραματικού πρωτοκόλλου. Παρουσιάζονται οι τιμές μετά από 1,5 και 2 ώρες υπο-νορμοθερμικής μηχανικής κυκλοφορίας. Τα επίπεδα του Fe εκφράζονται ως διάμεσες τιμές και ενδοτεταρτημοριακά εύρη-medians (IQR-Interquartile range). Στη 1,5 ώρα κυκλοφορίας: O+P vs C και P ($p=0,018$ και $0,002$ αντίστοιχα), O vs P, $p=0,008$, στις 2 ώρες κυκλοφορίας O+P vs C και P ($p=0,016$ και $0,001$ αντίστοιχα) και O vs P, $p=0,006$.

1. Περιορισμοί

Το κύκλωμα που χρησιμοποιήθηκε για την μηχανική κυκλοφορία στα υπό μελέτη ηπατικά μοσχεύματα δεν αποτελούσε κλειστό κύκλωμα κυκλοφορίας και ως εκ τούτου η πίεση στα αγγεία του μοσχεύματος, όπως και η ροή του διαλύματος συντήρησης (ml/min) δεν ήταν πλήρως ελεγχόμενη. Χρησιμοποιήθηκε αντλία σφυγμικής και όχι συνεχούς ροής για την μηχανική κυκλοφορία διαμέσου της πυλαίας φλέβας. Επιπλέον, υπήρχαν σημαντικές διακυμάνσεις των τιμών εντός των επιμέρους ομάδων, οι οποίες δεν μπορούν να ερμηνευθούν από παρεκκλίσεις στην εκτέλεση των πειραμάτων.

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το φαινόμενο της I/R συναντάται σε πολλά όργανα, συμπεριλαμβανομένων του ήπατος, της καρδιάς και του νεφρού και αποτελεί μία σημαντική αιτία νοσηρότητας και θνητότητας. Αποτελεί ακόμη σταθερή απειλή στις μεταμοσχεύσεις συμπαγών οργάνων, καθώς και σε άλλες κλινικές συστηματικές καταστάσεις. Εντατικές ερευνητικές προσπάθειες με στόχο τον εντοπισμό των υποκείμενων παθοφυσιολογικών μηχανισμών συγκλίνουν στο συμπέρασμα πως η αυξημένη παραγωγή ΔΜΟ (ελεύθερων ριζών και άλλων ενδιάμεσων προϊόντων αναγωγής του O_2) κατά τη διάρκεια των πρώτων λίγων λεπτών της επαναιμάτωσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη βλάβη από I-R (240). Οι υποκείμενοι αυτοί μηχανισμοί παραγωγής ΔΜΟ εντοπίστηκαν πρόσφατα στο σύμπλεγμα I της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας (10,241). Η ανακάλυψη αυτή έδωσε νέες κατευθύνσεις για την ανάπτυξη θεραπειών για την αποτροπή ή τον περιορισμό της παραγωγής ΔΜΟ (241,242). Άλλες πιθανές θεραπείες προσανατολίζονται στην αντίθετη κατεύθυνση, αυτή της εξουδετέρωσης των ΔΜΟ, όπως διάφοροι αντιοξειδωτικοί παράγοντες που δοκιμάστηκαν για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ΔΜΟ μετά το σχηματισμό τους (9). Θα πρέπει να τονισθεί, ωστόσο, ότι οι ΔΜΟ συμπεριλαμβάνουν τόσο μέτριας δραστηριότητας οξειδωτικούς παράγοντες (όπως το $O_2^{\bullet-}$ και το H_2O_2), όσο και υψηλής δραστηριότητας (όπως η $\bullet OH$) με την $\bullet OH$ να είναι εξαιρετικά απίθανο να εξουδετερωθεί, λόγω των μεγάλων σταθερών του ρυθμού της αντίδρασης.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή των εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών είναι η παρουσία διαθέσιμου ασταθούς σιδήρου (7), ο οποίος δρα ως καταλύτης για την μετατροπή του H_2O_2 σε $\bullet OH$. Η ελεύθερη αυτή ρίζα είναι ο πιο ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που μπορεί να σχηματισθεί *in vivo* και προκαλεί μη ελεγχόμενες οξειδώσεις σε όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά οδηγώντας σε ιστική βλάβη. Ο ιστός που επανοξυγονώνεται έρχεται αντιμέτωπος με απότομη, αλλά παροδική αύξηση των επιπέδων του H_2O_2 . Στην διάρκεια αυτής της αύξησης, τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασταθούς σιδήρου πιθανόν τα διαδραματίζουν αποφασιστικό ρόλο και να καθορίζουν την ποσότητα της $\bullet OH$ που παράγεται και, κατά συνέπεια, το βαθμό της επακόλουθης ιστικής βλάβης (243).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, υποθέσαμε ότι οι φαρμακολογικές παρεμβάσεις που μειώνουν τον ενδοκυττάριο ασταθή σίδηρο κατά την επαναιμάτωση θα μπορούσαν να αποτελέσουν αποτελεσματική στρατηγική προστασίας έναντι της επακόλουθης ιστικής βλάβης. Η πρόκληση που προκύπτει για τη επίτευξη αυτού του στόχου είναι να βρεθούν οι κατάλληλοι σιδηροδесμευτικοί παράγοντες στην κατάλληλη θέση (ενδοκυττάρια) και στον κατάλληλο χρόνο (επαναιμάτωση/επανοξυγόνωση).

Για να ελέγξουμε την παραπάνω υπόθεση επιλέξαμε δύο σιδηροδεσμευτικούς παράγοντες, που είναι εγκεκριμένοι για κλινική χρήση, τη δεσφερριοξαμίνη (DFO) και τη δεφεριπρόνη (DFP). Οι δυνάμεις πρόσδεσης (log σταθεράς σταθερότητας) του τρισθενή (Fe^{+3}) και δισθενή (Fe^{+2}) σιδήρου για την DFO (έξι θέσεις πρόσδεσης για κάθε άτομο σιδήρου) είναι $30,6 \text{ M}^{-1}$ και $7,2 \text{ M}^{-1}$, ενώ για την DFP (δύο θέσεις πρόσδεσης) είναι $37,2 \text{ M}^{-1}$ και $12,1 \text{ M}^{-1}$, αντίστοιχα (244). Από τη στιγμή που οι σταθερές σταθερότητας ορίζονται ως τα πηλίκα των συγκεντρώσεων, οι μονάδες τους διαφέρουν λόγω των διαφορετικών θέσεων πρόσδεσης σε κάθε άτομο σιδήρου, και έτσι δεν μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση μεταξύ εξασχιδών (εξαδοντικών-hexadentate) και δισχιδών (διδοντικών-bidentate) χηλικών παραγόντων. Τα εξασχιδή συμπλέγματα DFO και Fe^{+2} , ωστόσο, είναι κινητικά πιο ευνοημένα σε σύγκριση με τα δισχιδή συμπλέγματα της DFP με τον Fe^{+2} . Εκτός από την ικανότητα πρόσδεσης, υπάρχουν και επιπρόσθετες σημαντικές παράμετροι, όπως η λιποφιλικότητα και το μοριακό βάρος που μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα ενός χηλικού παράγοντα να επιδρά στα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασταθούς σιδήρου και στη διαμερισματοποίησή του. Η DFP που χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη λιποφιλικότητα (K_{ow} 0,19 και 0,02 για την DFP και την DFO, αντίστοιχα) και μικρότερο μοριακό βάρος (139 και 561 για την DFP και DFO, αντίστοιχα) (171), διαπερνά πιο εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες και δεσμεύει τον ενδοκυττάριο ασταθή σίδηρο. Η συμβολή της DFO σε αυτό το σχήμα είναι να αποσπάσει το σίδηρο από τα συμπλέγματα DFP-σιδήρου στον εξωκυττάριο πλέον χώρο, δρώντας έτσι ως μία ασφαλής δεξαμενή για τον διαθέσιμο σίδηρο. *In vivo* η DFO μπορεί να αποβάλλει το σίδηρο από το σώμα.

Εξετάσαμε αρχικά αν ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων μπορεί να προσφέρει προστασία σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων που εκτέθηκαν σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η DFP οδήγησε σε, εξαρτώμενη από τη συγκέντρωσή της, μείωση των επιπέδων του ασταθούς σιδήρου και προστάτευσε έναντι της οξειδωτικής βλάβης του DNA. Αντιθέτως, η DFO δεν επηρέασε τα επίπεδα του ασταθούς σιδήρου, ούτε προσέφερε προστασία στο DNA, παρά μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις και παρατεταμένο χρόνο επώασης. Ωστόσο, όταν τα δύο φάρμακα χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό παρατηρήθηκε ενισχυμένη προστασία έναντι της βλάβης του DNA σε σύγκριση με την προστασία που έδειξε η DFP μεμονωμένα. Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, αποφασίστηκε η διενέργεια *in vivo* πειραμάτων σε κονίκλους και πρωτόκολλο μερικής ηπατικής ισχαιμίας και επαναιμάτωσης.

Σχεδιασμός αναισθησιολογικού πρωτοκόλλου και χειρουργικού μοντέλου ηπατικής I/R

Καθώς η ηπατική βλάβη επιδεινώνεται κατά την όψιμη φάση της βλάβης από I/R, λόγω της εξεσημασμένης παραγωγής ΔΜΟ και πρωτεασών (245), το *in vivo* πείραμα είχε ως βασικό στόχο

την μελέτη της όψιμης βλάβης από I/R και αυτή αποφασίστηκε να μελετηθεί στις 24 ώρες από την επαναιμάτωση. Για να μελετηθεί η όψιμη φάση της ηπατικής βλάβης έπρεπε να επιλεγεί ένα αναισθητικό μοντέλο που μπορούσε να εξασφαλίζει αιμοδυναμική σταθερότητα και να αποτρέπει την υποξία και οξέωση κατά τη διάρκεια της αναισθησίας. Επιπλέον, θα έπρεπε να επιτρέπει την ανάνηψη των ζώων και την παρακολούθησή τους για 24 ώρες.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η διαδικασία της αναισθησίας και η αναπνευστική υποστήριξη που χρησιμοποιούνται επηρεάζουν την οξυγόνωση και τον αερισμό των ζώων. Οι Heijnen και συνεργάτες εφάρμοσαν ενδοτραχειακή διασωλήνωση και μηχανικό αερισμό ή αυτόματη αναπνοή για να επιτύχουν αποτελεσματική ανταλλαγή αερίων ή αναπνευστική οξέωση, αντίστοιχα, σε επίμυες και έδειξαν πως η οξέωση και η υποξία μπορούν να επηρεάσουν την έκταση της ηπατικής βλάβης από I/R (246).

Ακόμη, η διενέργεια τραχειοστομίας, κρικοθυρεοειδοτομής ή ανάστροφης διασωλήνωσης απορρίφθηκαν, καθώς αποτελούν επεμβατικές παρεμβάσεις και αυξάνουν τον κίνδυνο τραυματικών κακώσεων της τραχείας, λοίμωξης και πρόκλησης σημαντικού μετεγχειρητικού στρες, το οποίο θα μπορούσε να επηρεάσει την ανάνηψη των ζώων και τα αποτελέσματα του πειράματος (247).

Η στοματοτραχειακή διασωλήνωση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε ποικίλα ερευνητικά πρωτόκολλα σε κονίκλους, σύμφωνα όμως με την αναζήτησή μας στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε πρωτόκολλο ηπατικής I/R με ανάνηψη των ζώων και παρακολούθηση για 24 ώρες (248–250). Οι Mongardon και συνεργάτες συνέκριναν τη βλάβη από I/R σε νορμο- και υπο-θερμικές συνθήκες με αποκλεισμό της αορτής (cross-clamping) σε διασωληνωμένους υπό μηχανικό αερισμό κονίκλους (251). Στη βιβλιογραφία έχουν περιγραφεί μοντέλα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης ήπατος, με διάφορους χρόνους ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, εφαρμόζοντας αερισμό διαμέσου τραχειοστομίας, προσωπικής μάσκας ή χωρίς καμία υποστήριξη του αερισμού (186,252–254). Οι Guo και συνεργάτες εφάρμοσαν αναισθησία με πεντοβαρβιτάλη, χωρίς υποστήριξη του αεραγωγού ή του αερισμού και προχώρησαν σε ανάνηψη των κονίκλων μετά την πρόκληση ισχαιμίας 60 λεπτών και επαναιμάτωσης για μέχρι και 48 ώρες (223,224). Οι Langdale και συνεργάτες εφάρμοσαν αναισθησία με κεταμίνη, ηπατική ισχαιμία για 45 λεπτά και ανάνηψη των κονίκλων για 24 ώρες (255). Ωστόσο, οι πληροφορίες που παρέχονται για τα παραπάνω αναισθησιολογικά πρωτόκολλα, οι διαφορετικοί χρόνοι ισχαιμίας και οι μετρούμενες παράμετροι για την εκτίμηση της ηπατικής βλάβης δεν επιτρέπουν τη σύγκριση με την παρούσα έρευνα. Η στοματοτραχειακή διασωλήνωση επιλέχθηκε ως πιο ασφαλής και ελάχιστα επεμβατική μέθοδος

διαχείρισης του αεραγωγού ήταν η γενική αναισθησία και ενδοτραχειακή διασωλήνωση με μηχανικό αερισμό.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πως το μοντέλο αναισθησίας επέτρεπε την στενή διεγχειρητική παρακολούθηση της αιμοδυναμικής κατάστασης, της οξυγόνωσης και του αερισμού των ζώων με στόχο να αποφευχθούν η υπόταση, υποξία και αναπνευστική οξέωση. Η ανάνηψη των ζώων ήταν ανεπίπλεκτη, ενώ η ισχαιμία του ηπατικού παρεγχύματος για 45 λεπτά οδήγησε σε σημαντική ηπατική βλάβη, χωρίς να συνοδεύεται από αυξημένη θνητότητα στη διάρκεια των 24 ωρών, επιτρέποντας έτσι τη μελέτη της όψιμης φάσης της βλάβης από I/R.

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές για επιπλοκές της στοματοτραχειακής διασωλήνωσης, όπως τραυματισμός από τον αεροθάλαμο (cuff), οίδημα, τραυματισμός μαλακών ιστών του στοματοφάρυγγα, της γλωττίδας και της τραχείας, διασωλήνωση βρόγχου και λαρυγγόσπασμος (247,248,256–258). Παράγοντες κινδύνου που αυξάνουν την επίπτωση των παραπάνω επιπλοκών περιλαμβάνουν το μη ικανοποιητικό επίπεδο αναισθησίας, επαναλαμβανόμενες προσπάθειες διασωλήνωσης, ακατάλληλο μέγεθος τραχειοσωλήνα και μετακίνηση του σωλήνα κατά την αλλαγή θέσης του ζώου ή κατά τη διάρκεια της επέμβασης (247,256,257,259,260).

Ο ίδιος ο μηχανικός αερισμός μπορεί επίσης να συνοδεύεται από επιπλοκές, όπως βαρότραυμα, αυξημένο λόγο αερισμού/αιμάτωσης και παγίδευση αέρα εξαιτίας ενδογενούς θετικής τελοεκπνευστικής πίεσης (Positive end-expiratory pressure- PEEP) (261). Στην παρούσα έρευνα, η πρόκληση βαροτραύματος αποφεύχθηκε με την επίτευξη επαρκούς βάθους αναισθησίας με τη χορήγηση θειοπεντάλης πριν την διασωλήνωση και με τη χορήγηση βουτορφανόλης αμέσως μετά από αυτή με στόχο την καταστολή της αυτόματης αναπνοής πριν τη σύνδεση με τον αναπνευστήρα. Η εκπαίδευση του προσωπικού και η προτυποποίηση της αναισθησιολογικής μεθόδου με την επιλογή των κατάλληλων αναισθητικών και αναλγητικών φαρμάκων, την χορήγηση των κατάλληλων δόσεων για ικανό βάθος καταστολής και τον κατάλληλο χειρισμό και θέση των ζώων ελαχιστοποιούν τις προσπάθειες και τον χρόνο που απαιτείται για τη διασωλήνωση. Όταν τα παραπάνω συνδυάζονται με τις κατάλληλες παραμέτρους αερισμού ελαχιστοποιούνται οι επιπλοκές και το στρες για τα ζώα (247,256,259).

Τα ζώα παρέμειναν αιμοδυναμικά και μεταβολικά σταθερά κατά τη διάρκεια της γενικής αναισθησίας παρά την πτώση της ΜΑΠ σε όλες τις ομάδες στη διάρκεια της γενικής αναισθησίας. Το εύρημα αυτό μπορεί να αποδοθεί στη δράση του πτητικού αναισθητικού και την έλλειψη επώδυνων ερεθισμάτων μετά την πρόκληση της ισχαιμίας. Για την ομάδα ελέγχου CONTROL η ενεργοποίηση του συμπαθητικού αυτόνομου συστήματος ως απάντηση στην βλάβη από

επαναιμάτωση μπορεί να ερμηνεύσει τις υψηλότερες τιμές ΜΑΠ, σε σύγκριση με την ομάδα εικονικής παρέμβασης.

Όσον αφορά το μοντέλο I/R του ήπατος, τα 45 λεπτά μερικής (70%) ηπατικής ισχαιμίας είχαν ως αποτέλεσμα σημαντική αύξηση της ALT στον ορό στις 2 και 24 ώρες από την επαναιμάτωση, υποδηλώνοντας σημαντική ηπατική βλάβη. Η διάρκεια της ισχαιμίας μειώθηκε στα 45 λεπτά μετά από τροποποίηση του αρχικού μοντέλου ηπατικής I/R, το οποίο προέβλεπε 70 λεπτά μερικής (70%) ισχαιμίας και συνοδεύτηκε από υψηλή θνητότητα πριν τις 24 ώρες. Τα 45 λεπτά μερικής (70%) ηπατικής ισχαιμίας επέτρεψαν την επιβίωση των ζώων μέχρι τις 24 ώρες για τη μελέτη της όψιμης φάσης της βλάβης από I/R.

Η προτυποποίηση των αναισθησιολογικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται στη μελέτη της ηπατικής βλάβης από I/R είναι σημαντική ώστε να είναι εφικτή τη σύγκριση μεταξύ των πρωτοκόλλων. Το συγκεκριμένο μοντέλο μπορεί να εφαρμοστεί με ασφάλεια για τη μελέτη θεραπευτικών στρατηγικών που στόχο έχουν τον περιορισμό των καταστροφικών επιπτώσεων της όψιμης φάσης της βλάβης επαναιμάτωσης του ήπατος.

Αποτελέσματα *in vivo* πειράματος

Παρατηρήσαμε ότι, σε συμφωνία με τα *in vitro* πειράματα, η χορήγηση του συνδυασμού των φαρμάκων πριν την πρόκληση της ηπατικής ισχαιμίας (45 λεπτά τμηματική ισχαιμία) μείωσε την ηπατική βλάβη από I-R. Συγκεκριμένα, η ιστολογική ανάλυση ανέδειξε σημαντική προστασία έναντι της ηπατοκυτταρικής βλάβης, ενώ οι βιοχημικοί δείκτες ηπατικής βλάβης (ALT και AST) στον ορό παρουσίασαν τάση μείωσης. Τοξικότητα των φαρμάκων, που αφορά κυρίως την μακροχρόνια χρήση των δύο χηλικών παραγόντων, μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στο παρόν πείραμα για την DFP και αποδοθεί στην αδύναμη σύνδεσή της με τον σίδηρο που έχει ως αποτέλεσμα την κυκλική εναλλαγή μεταξύ των δύο καταστάσεων του σιδήρου, της Fe^{+2} και της Fe^{+3} , και συνεπώς την παραγωγή ΔΜΟ (244,262). Σημειωτέον πως η DFO έχει επανειλημμένα δοκιμασθεί σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα και φάνηκε να προσφέρει αμελητέα αποτελέσματα (15–23). Σε περιβάλλον κυτταρικής καλλιέργειας έχει φανεί σε προηγούμενες μελέτες πως η DFO απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις και μεγάλο χρόνο προεπώασης για να δράσει προστατευτικά (11–14,263). Αυτή η σχετική ανικανότητα για κυτταρική προστασία σχετίζεται με την αδυναμία της DFO να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες και να αποκτήσει πρόσβαση στο εσωτερικό του κυττάρου (12). Πολύ πρόσφατα οι Yamada και συνεργάτες παρουσίασαν ισχυρές ενδείξεις για το ρόλο του σιδήρου ως παράγοντα κινδύνου για ηπατική βλάβη από I/R (138). Στην εν λόγω μελέτη, οι συγγραφείς ανέλυσαν αρχικά αναδρομικά κλινικά δεδομένα 202 παιδιατρικών ζώντων

ηπατικού μοσχεύματος και βρήκαν ότι υψηλά επίπεδα φερριτίνης στον ορό στους δότες (δείκτης υπερφόρτωσης με σίδηρο) αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για ηπατική βλάβη μετά τη μεταμόσχευση του οργάνου. Μελέτησαν επίσης το ρόλο της φερρόπτωσης (σιδηροεξαρτώμενος κυτταρικός θάνατος) σε μοντέλο ηπατικής I/R σε επίμυες και συμπέραναν πως το φαινόμενο της φερρόπτωσης συμβάλει στην ανάπτυξη ηπατικής βλάβης από I/R. Οι συγγραφείς προτείνουν πως ο έλεγχος της φερρόπτωσης είναι μία αποτελεσματική στρατηγική για τον περιορισμό των καταστροφικών επιδράσεων της ηπατικής βλάβης από I/R στις μεταμοσχεύσεις ήπατος.

Επιπρόσθετα, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η φερρόπτωση διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη βλάβης από I/R στις μεταμοσχεύσεις νεφρού, καρδιάς και λεπτού εντέρου (264–267). Θεραπευτικές στρατηγικές αναχαίτισης του φαινομένου της φερρόπτωσης θα μπορούσαν να έχουν κάποιο ρόλο στον περιορισμό της βλάβης από I/R σε διαφορετικές κλινικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της μεταμόσχευσης συμπαγών οργάνων.

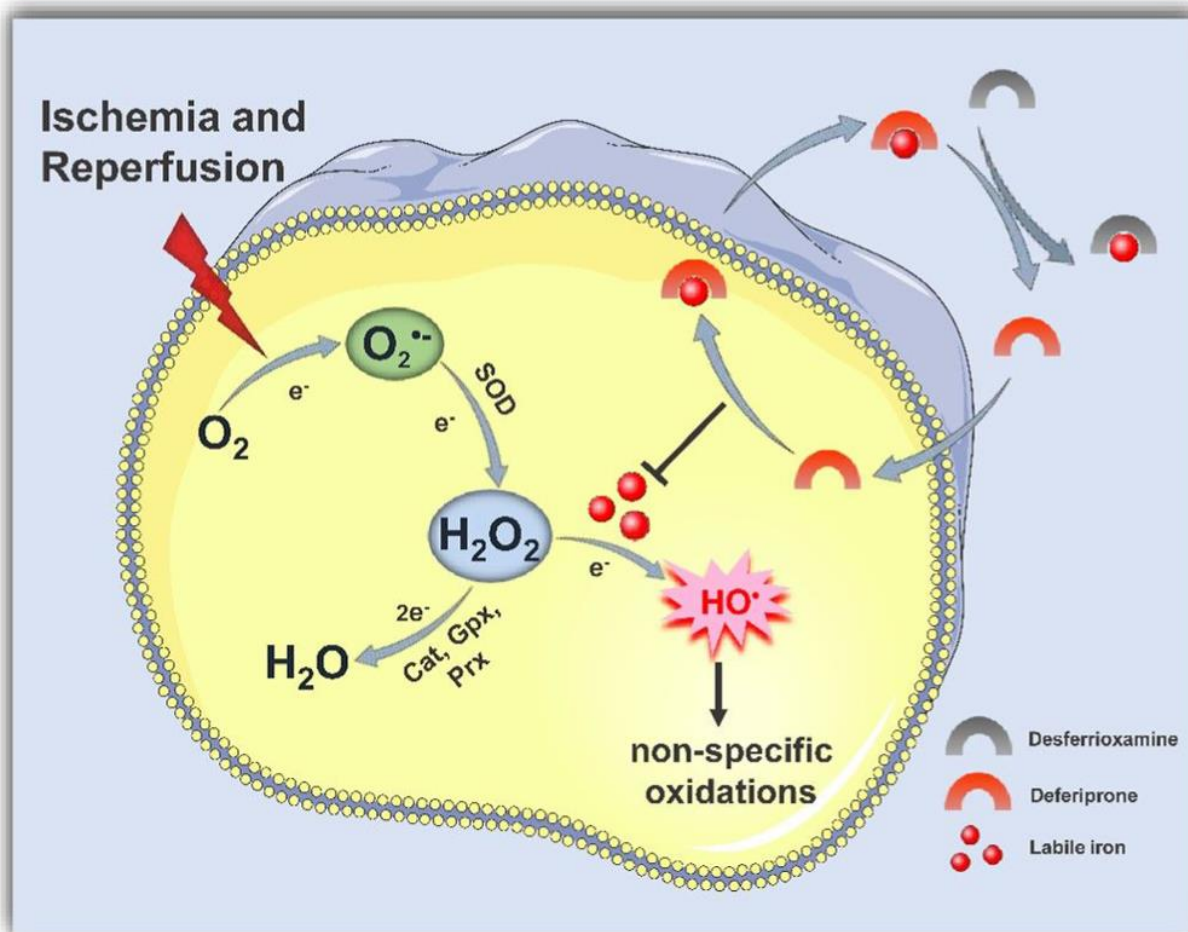
Αποτελέσματα *ex vivo* πειράματος

Σε αυτό το μέρος του πειράματος στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο στις τιμές του Fe στο διάλυμα UW της μηχανικής κυκλοφορίας με την ομάδα του συνδυασμού των σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων και την ομάδα της DFO να παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές. Τις χαμηλότερες τιμές ηπατοκυτταρικής βλάβης παρουσίασαν οι ομάδες του συνδυασμού και της προετοιμασίας με σίδηρο. Η ομάδα της DFO, παρόλο που παρουσιάζει τις χαμηλότερες τιμές σιδήρου στο διάλυμα UW μετά την ομάδα του συνδυασμού, δεν φαίνεται να προσφέρει προστασία. Η παρατήρηση αυτή σχετίζεται με την ικανότητα της DFO να δεσμεύει ισχυρά το Fe, αλλά παράλληλα και με την αδυναμία της να εισέρχεται στα κύτταρα και να προσφέρει προστασία. Παρατηρήσαμε ακόμη πως, σε αντίθεση με το *in vivo* πείραμα, η ομάδα της προετοιμασίας με σίδηρο παρουσιάζει τάση προστασίας έναντι της βλάβης από I/R, ακόμη και έναντι της ομάδας του συνδυασμού των δύο σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων. Το γεγονός αυτό μπορεί να ερμηνευθεί με την υπόθεση πως η χορήγηση σιδήρου κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας οδήγησε στην ενεργοποίηση αμυντικών μηχανισμών.

Συμπεράσματα

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη δείχνει ότι ο συνδυασμός ενός σιδηροδεσμευτικού παράγοντα με ικανότητα να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες (DFP) με έναν παράγοντα που δεν τις διαπερνά αλλά δεσμεύει ισχυρά τον σίδηρο (DFO), αυξάνει το βαθμό προστασίας τόσο σε

in vitro όσο και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα, δηλαδή σε σειρές ηπατικών κυττάρων που εκτέθηκαν σε συνθήκες οξειδωτικού στρες και σε μοντέλο ηπατικής I-R σε κόνικλους, αντίστοιχα. Όπως απεικονίζεται σχηματικά στην Εικόνα 5 η DFP η οποία μπορεί εύκολα να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες, δεσμεύει τον ενδοκυττάριο ασταθή σίδηρο, τον μεταφέρει έξω από το κύτταρο και τον παραδίδει στην DFO, η οποία αποτελεί ένα πολύ πιο ισχυρό χηλικό παράγοντα. Με αυτόν τον τρόπο η μείωση του ενδοκυττάριου ασταθούς σιδήρου μπορεί να αποτρέψει την παραγωγή ΔΜΟ και την επακόλουθη κυτταρική και ιστική βλάβη. Περαιτέρω έρευνες είναι απαραίτητες, ωστόσο η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι η συνδυασμένη χορήγηση σιδηροδεσμευτικών φαρμάκων με διαφορετική λιποφιλικότητα περιορίζει την ηπατική βλάβη από I/R σε μεγαλύτερο βαθμό σε σύγκριση με τα μεμονωμένα φάρμακα.



Εικόνα 5: Σχηματική απεικόνιση που περιγράφει τον τρόπο συνεργικής δράσης της DFO και DFP. Η υποβολή ενός ιστού σε ισχαιμία που ακολουθείται από επαναιμάτωση, πυροδοτεί την υπερπαραγωγή ενδοκυττάριων ΔΜΟ, που προκύπτει από την μερική αναγωγή του O_2 . Τα προϊόντα αυτά αναγωγής του οξυγόνου είναι το $O_2^{\bullet-}$, το H_2O_2 και η $^{\bullet}OH$. Υπό φυσιολογικές συνθήκες το $O_2^{\bullet-}$ και το H_2O_2

εξουδετερώνονται άμεσα από καλά συντονισμένο ενζυμικό δίκτυο αποτελούμενο από τα ένζυμα SOD, Cat, Gpx και Prx. Παρολαυτά, με την παρουσία ασταθούς σιδήρου και πιο συγκεκριμένα όταν τα επίπεδα του H_2O_2 είναι αυξημένα (όπως όταν αποκαθίσταται η κυκλοφορία σε έναν προηγουμένως ισχαιμικό ιστό), το H_2O_2 ανάγεται μη ενζυμικά σε $\cdot OH$. Αυτή η εξαιρετικά δραστική ελεύθερη ρίζα οξειδώνει αδιακρίτως οποιοδήποτε κυτταρικό συστατικό βρίσκεται στο περιβάλλον της, βάζοντας σε κίνδυνο της κυτταρική και ως συνέπεια την ιστική ομοιόσταση. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας δείχνουν πως ο συνδυασμός ενός λιπόφιλου σιδηροδεσμευτικού παράγοντα (DFP) με έναν ισχυρό υδρόφιλο παράγοντα (DFO), αυξάνει την κυτταρική προστασία τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειραματικά μοντέλα (ηπατοκύτταρα που εκτίθενται σε οξειδωτικό στρες και μοντέλο ηπατικής I/R σε κονίκλους). Ο προτεινόμενος μηχανισμός είναι πως η DFP διαχέεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, αποκτώντας πρόσβαση στον ενδοκυττάριο χώρο, όπου δεσμεύει σίδηρο και τον μεταφέρει εξωκυττάρια. Η DFP «δωρίζει» τον σίδηρο στην DFO έξω από τα κύτταρα. Έτσι, η συνδυασμένη χορήγηση της DFP και της DFO περιορίζει τη δεξαμενή ασταθούς σιδήρου και προσφέρει ισχυρότερη προστασία έναντι της βλάβης από I/R.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ως βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση (I/R injury) ορίζεται η επιδείνωση της κυτταρικής λειτουργίας και ο κυτταρικός θάνατος μετά από επανεγκατάσταση της αιματικής ροής σε έναν προηγουμένως ισχαιμικό ιστό. Παρόλο που η επαναιμάτωση/επανοξυγόνωση είναι απαραίτητη για τη διάσωση των ισχαιμικών ιστών, παραδόξως επιδεινώνει την ιστική βλάβη και η επιδείνωση αυτή εξαρτάται από τη διάρκεια και την έκταση της ισχαιμίας. Η περίοδος της επαναιμάτωσης χωρίζεται σε δύο φάσεις, την πρώιμη (<4 ώρες) και την όψιμη (4-48 ώρες). Ιστική βλάβη προκύπτει τόσο στην πρώιμη όσο και στην όψιμη φάση, αλλά είναι σοβαρότερη στην τελευταία. Η βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση συναντάται σε διάφορα όργανα και σε ένα ευρύ φάσμα διαταραχών, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, νόσοι των αγγείων του εγκεφάλου, η αιμορραγική καταπληξία, οι ηπατεκτομές, το τραύμα και οι μεταμοσχεύσεις οργάνων. Κύριο και κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της βλάβης από I/R παίζει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την αύξηση της παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου (ΔΜΟ) κατά την επαναιμάτωση. Η βλάβη προκύπτει από έκρηξη παραγωγής ΔΜΟ που πυροδοτείται από την επανείσοδο οξυγόνου στον προηγουμένως ισχαιμικό ιστό κατά τη διάρκεια των λίγων πρώτων λεπτών της επαναιμάτωσης. Οι ΔΜΟ περιλαμβάνουν ενώσεις τόσο μέτριας (όπως το $O_2^{\cdot-}$ και το H_2O_2) όσο και εξαιρετικά υψηλής (όπως η $HO^{\cdot}$) δραστηριότητας. Απαραίτητη προϋπόθεση για την παραγωγή αυτών των εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών είναι η παρουσία ασταθούς σιδήρου, ο οποίος δρα ως καταλύτης για την μετατροπή του H_2O_2 σε $HO^{\cdot}$. Η $HO^{\cdot}$ (ρίζα του υδροξυλίου) είναι ο πιο δραστικός οξειδωτικός παράγοντας που παράγεται *in vivo* και προκαλεί ανεξέλεγκτες οξειδώσεις σε όλα τα βασικά κυτταρικά συστατικά οδηγώντας σε ιστική βλάβη. Ο ρόλος αυτός του σιδήρου έχει συσχετισθεί και με ένα τύπο σιδηροεξαρτώμενου κυτταρικού θανάτου, την φερρόπτωση, που έχει περιγραφεί πρόσφατα και συνοδεύει κατά κανόνα την βλάβη από I/R.

Παίρνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω, φαρμακευτική παρέμβαση που στοχεύει στην μείωση των επιπέδων του ενδοκυττάριου ασταθούς σιδήρου κατά την επαναιμάτωση μπορεί να αποτελέσει εναλλακτική και αποτελεσματική στρατηγική προστασίας έναντι της επακόλουθης ιστικής βλάβης. Τα επίπεδα του ασταθούς ή οξειδοαναγωγικά ενεργού σιδήρου μπορούν να τροποποιηθούν σχετικά εύκολα φαρμακολογικά με την εξωγενή χορήγηση των κατάλληλων σιδηροδεσμευτικών παραγόντων. Η αποτελεσματικότητα αυτών των φαρμάκων εξαρτάται πρωτίστως από την ικανότητάς τους στον ενδοκυττάριο χώρο στον κατάλληλο χρόνο και την κατάλληλη συγκέντρωση. Τα σιδηροδεσμευτικά φάρμακα έχει περιγραφεί να είναι αποτελεσματικά στην προστασία κυτταρικών καλλιιεργειών έναντι βλάβης από οξειδωτικό στρες,

καθώς και έναντι βλάβης από I/R. Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, υποθέσαμε πως ο συνδυασμός δύο σιδηροδεσμευτικών παραγόντων με διαφορετική λιποφιλικότητα και ικανότητα σύνδεσης με τον σίδηρο είναι πιθανά πιο προστατευτικός σε σύγκριση με τον κάθε παράγοντα μεμονωμένα. Επιλέξαμε δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα σιδηροδεσμευτικά φάρμακα, τη δεσφερριοξαμίνη (DFO) και τη δεφεριπρόνη (DFP). Τα συμπλέγματα της DFO με τον σίδηρο (Fe) ευνοούνται κινητικά σε σύγκριση με τα συμπλέγματα DFP-Fe. Παράλληλα, η DFP διαθέτει υψηλή λιποφιλικότητα και χαμηλό μοριακό βάρος και έτσι είναι ικανή να διέρχεται διαμέσου κυτταρικών μεμβρανών και να δεσμεύει τον ασταθή ενδοκυττάριο σίδηρο. Η συμβολή της DFO σε αυτό το πλαίσιο έγκειται στην απόσπαση του Fe από τα συμπλέγματα DFP-Fe στον εξωκυττάριο χώρο, ενεργώντας έτσι τελικά ως μια ασφαλής δεξαμενή θωράκισης του διαθέσιμου σιδήρου.

Αρχικά, εξετάσαμε αν ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων μπορεί να προσφέρει ενισχυμένη προστασία σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων που θα εκτίθονταν σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η DFP οδηγούσε σε δοσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων του ασταθούς σιδήρου και προστάτευε έναντι της οξειδωτικής βλάβης του DNA. Αντιθέτως, η DFO δεν επηρέαζε σημαντικά τα επίπεδα του σιδήρου, ούτε προσέφερε προστασία στο DNA, εκτός και αν χορηγούνταν σε υψηλές συγκεντρώσεις και παρατεταμένο χρόνο επώασης. Τέλος, ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων έδειξε ενισχυμένη προστασία έναντι της βλάβης του DNA σε σύγκριση με την προστασία που προσέφερε η DFP μόνη της.

Βασιζόμενοι σε αυτά τα ευρήματα, προχωρήσαμε στη διενέργεια *in vivo* πειράματος σε κονίκλους που υποβλήθηκαν σε μερική ηπατική ισχαιμία ακολουθούμενη από επαναιμάτωση. Προκειμένου να διεξαχθεί το *in vivo* μέρος του πειράματος και η μελέτης της όψιμης φάσης της βλάβης από I/R προτυποποιήσαμε και περιγράψαμε στη βιβλιογραφία αναισθησιολογικό μοντέλο γενικής αναισθησίας με ενδοτραχειακή διασωλήνωση ακολουθούμενο από ανάνηψη των κονίκλων που εφαρμόστηκε για τη μελέτη της όψιμης φάσης της I/R του ήπατος με παρακολούθηση για 24 ώρες. Τα ζώα υποβλήθηκαν σε 45 λεπτά μερικής (70%) ηπατικής ισχαιμίας και 24 ώρες επαναιμάτωσης. Το μοντέλο αυτό αναισθησίας προσέφερε αιμοδυναμική και μεταβολική σταθερότητα, εύκολη ανάνηψη και επιβίωση των ζώων μέχρι τις 24 ώρες μετά την επαναιμάτωση.

Παρατηρήσαμε στο *in vivo* πείραμα πως, σε συμφωνία με το *in vitro* πείραμα, η χορήγηση του συνδυασμού των φαρμάκων πριν την πρόκληση της ισχαιμίας μείωνε την βλάβη από I/R. Πιο συγκεκριμένα, η ιστολογική ανάλυση αποκάλυψε σημαντική προστασία έναντι της ηπατοκυτταρικής βλάβης, ενώ οι βιοχημικοί δείκτες ηπατικής βλάβης (επίπεδα ALT και AST) στον ορό έδειξαν τάση μείωσης.

Επιπρόσθετα, η μελέτη περιλάμβανε πείραμα *ex vivo*, στο οποίο ηπατικά μοσχεύματα υποβλήθηκαν σε ψυχρή ισχαιμία και ακολούθως σε υπο-νορμοθερμική μηχανική κυκλοφορία με ή χωρίς τους δύο σιδηροδεσμευτικούς παράγοντες ή τον συνδυασμός τους. Παρόλο που ο συνδυασμός των δύο φαρμάκων έδειξε τάση προστασίας έναντι της ηπατικής βλάβης, τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά.

Τόσο το *in vivo* όσο και το *ex vivo* μέρος του πειράματος περιλάμβαναν μία επιπλέον ομάδα ζώων, η οποία είχε υποβληθεί σε προετοιμασία με χορήγηση σιδήρου ενδοπεριτοναϊκά μέρα παρ' ημέρα για 10 ημέρες. Τα αποτελέσματα ήταν αντικρουόμενα. Η προετοιμασία με σίδηρο δεν έδειξε προστατευτική ικανότητα έναντι της βλάβης από θερμή I/R *in vivo*, αλλά έδειξε τάση προστασίας έναντι της βλάβης από ψυχρή ισχαιμία και επανοξυγόνωση *ex vivo*.

SUMMARY

Ischemia and reperfusion (I/R) injury has been defined as the aggravation of cellular dysfunction and death following the reestablishment of blood flow to previously ischemic tissues. Although reperfusion is vital for salvaging ischemic tissues, paradoxically, it also exacerbates tissue injury, depending on the duration and extension of the ischemic event. The reperfusion phase can be divided into the early (<4 h) and the late (4–48 h) reperfusion phase. Tissue injury occurs in both the early and the late phases, but is more severe in the latter. The reperfusion-induced injury occurs in different organs and a wide range of disorders, including myocardial infarction, cerebrovascular disease, hemorrhagic shock, liver resections, trauma and transplantation. Oxidative stress caused by the elevated production of reactive oxygen species (ROS) during reperfusion, represents the critical cause for the development of I/R injury. During the first few minutes of reperfusion, a burst of ROS generation fueled by the reintroduction of oxygen to the previously ischemic tissue occurs, causing tissue injury. ROS include both moderately reactive oxidants (such as $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2) and extremely reactive ones (such as $HO^{\cdot}$). A necessary requirement for the generation of extremely reactive free radicals is the presence of available labile iron, which acts as a catalyst to convert H_2O_2 to $HO^{\cdot}$. This free radical is the most powerful oxidant generated *in vivo* and provokes uncontrolled oxidations to all basic cellular constituents causing apparent tissue injury. This potential role of iron has been associated with a recently appreciated specific type of iron-dependent cell death, named “ferroptosis”, which invariably accompanies I/R injury.

Considering the above, pharmacological interventions that diminish intracellular labile iron during reperfusion could be an alternative effective strategy to protect against the subsequent tissue injury.

Tissue labile iron level can be modulated relatively easy by pharmacological means, using exogenous administration of appropriate iron chelating agents. The effectiveness of such drugs depends primarily on their accessibility to the cell interior at the right time and the right concentration. Iron chelating agents have been shown to be very effective in protecting cultured cells against oxidative stress-induced damage and against I/R injury. Based on the above considerations, we hypothesized that the combination of iron-chelating agents of different lipophilicity and iron-binding capacity could increase the possibility to be protective compared to single agents alone. We selected two widely used iron chelating drugs, namely desferrioxamine (DFO) and deferiprone (DFP). The DFO-iron complexes are kinetically favored compared to DFP-iron ones. At the same time, DFP exhibits higher lipophilicity and lower molecular weight and is therefore more capable to penetrate through cell membranes and chelate intracellular labile iron. The contribution of DFO in this system is to abstract iron from DFP-iron complexes in the extracellular space, ultimately acting as a safe sink for available iron.

We initially examined whether the combination of the two drugs could offer enhanced protection in cultures of hepatic cells which were exposed to oxidative stress conditions. Our results showed that DFP induced a concentration-dependent decrease in labile iron levels and protected against oxidative stress-induced DNA damage. On the contrary, DFO did not affect iron levels, neither offered any protection to DNA, except when used in a high concentration and long incubation time. Finally, the two drugs in combination showed enhanced protection against DNA damage, compared to the protection offered by DFP alone.

Based on these findings, we further performed *in vivo* experiments in rabbits subjected to partial hepatic ischemia followed by reperfusion. In order to conduct the *in vivo* part of the experiment and study the late phase of I/R injury, we standardised and described an anaesthetic model of general anaesthesia with endotracheal intubation, followed by recovery of the rabbits, which was applied in the study of the late phase of liver I/R with 24-h follow-up. Animals were subjected to 45 minutes of partial (70%) hepatic ischemia and 24 hours of reperfusion. The above anesthetic model offered hemodynamical and metabolic stability, easy recovery and survival of the animals at 24 hours after reperfusion.

We observed in the *in vivo* part of the experiment that, in accordance with the *in vitro* experiments pre-treatment of the animals with the combination of the two drugs attenuated I/R-induced hepatic injury. In particular, histological analysis revealed significant protection against hepatocellular

injury, while key biochemical markers of hepatic injury (ALT and AST activity) in serum showed a trend to decrease.

In addition, the study included an *ex vivo* part, where liver grafts were subjected to cold ischemia and subsequently to subnormothermic mechanical perfusion with or without the two iron-chelating drugs or their combination. Although the combination of the two agents showed a tendency to liver injury protection, the results were not statistically significant.

Both the *in vivo* and *ex vivo* experiments included an extra group of animals that were subjected to preconditioning with iron administration intraperitoneally every other day for 10 days. The results were contradictory. Iron-preconditioning showed no protection against warm I/R injury in vivo, but a tendency to protect against cold ischemia and reoxygenation.

PUB-MED ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

- 1. Description of a Recovery Model in Rabbits for the Study of the Late Phase of Liver Ischemia-Reperfusion Injury.** Mantelou AG, Zacharioudaki A, Pappas-Gogos G, Papalois A, Papoudou-Bai A, Goussia A, Glantzounis GK. **In Vivo.** 2022 Jan-Feb;36(1):153-160. PMID: 34972710.
- 2. Combined administration of membrane-permeable and impermeable iron-chelating drugs attenuates ischemia/reperfusion-induced hepatic injury.** Mantelou AG, Barbouti A, Goussia A, Zacharioudaki A, Papoudou-Bai A, Vlachou C, Kokkoris S, Papalois A, Galaris D, Glantzounis GK. **Free Radic Biol Med.** 2022 Nov 20;193(Pt 1):227-237. PMID: 36243210.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- 1. Description of a recovery experimental general anaesthesia model in rabbits for the study of the late phase of liver ischemia-reperfusion injury.** A. Mantelou, M. Karamperi, K. Tsarea, E. Karampela, N. Psichalakis, A. Papalois, A. Papoudou-Bai, A. Goussia, C. Katsios, G. Glantzounis. 12th Biennial E-AHPBA Congress 2017, European-African Hepato-Pancreato-Biliary Association, 23-26 May 2017, Mainz, Germany
- 2. Protection against hepatic ischemia-reperfusion injury using iron-chelating agents with different lipophilicity. Experimental research.** A. Mantelou, A. Papalois, A. Papoudou-Bai, P. Gerogianni, D. Galaris, A. Goussia, G. Glantzounis. 13th Congress of the European-African Hepato-Pancreatobiliary Association (E-AHPBA), 2-5 June 2019, Amsterdam, The Netherlands.
- 3. Περιγραφή πειραματικού μοντέλου γενικής αναισθησίας με ανάνηψη σε κόνικλους για τη μελέτη της όψιμης φάσης της ηπατικής βλάβης από ισχαιμία-επαναιμάτωση.** Αθηνά Μαντέλου, Γεώργιος Παππάς-Γώγος, Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάη, Άννα Γούσια, Γεώργιος Γκλαντζούνης. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ήπατος, Παγκρέατος, Χοληφόρων, 19-21 Σεπτεμβρίου 2025, Ιωάννινα, Ελλάδα
- 4. Προστασία έναντι της ηπατικής βλάβης από ισχαιμία-επαναιμάτωση με τη χρήση σιδηροδεσμευτικών παραγόντων διαφορετικής λιποφιλικότητας.** Πειραματική μελέτη. Αθηνά Μαντέλου, Αλεξάνδρα Μπαρμπούτη, Άννα Γούσια, Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάη, Δημήτριος Γαλάρης, Γεώργιος Γκλαντζούνης. 5ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ήπατος, Παγκρέατος, Χοληφόρων, 19-21 Σεπτεμβρίου 2025, Ιωάννινα, Ελλάδα

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011 Nov 7;17(11):10.1038/nm.2507.
2. Li YV, Zhang JH, editors. *Metal ion in stroke*. New York: Springer; 2012. 820 p. (Springer series in translational stroke research).
3. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: A double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox Biol*. 2014 Jan 1;2:702–14.
4. Quesnelle KM, Bystrom PV, Toledo-Pereyra LH. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver. *Arch Toxicol*. 2015 May;89(5):651–7.
5. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Jul;21(7):363–83.
6. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015 Jan 2;4:180–3.
7. Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019 Dec;1866(12):118535.
8. Cannistrà M, Ruggiero M, Zullo A, Gallelli G, Serafini S, Maria M, et al. Hepatic ischemia reperfusion injury: A systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers. *Int J Surg*. 2016 Sep;33:S57–70.
9. Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. Oxidative Stress in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury: The Role of Antioxidants and Iron Chelating Compounds. *Curr Pharm Des*. 2006 Aug 1;12(23):2875–90.
10. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*. 2014 Nov;515(7527):431–5.
11. Barbouti A, Doulias PT, Zhu BZ, Frei B, Galaris D. Intracellular iron, but not copper, plays a critical role in hydrogen peroxide-induced DNA damage. *Free Radic Biol Med*. 2001 Aug 15;31(4):490–8.
12. Doulias PT, Christoforidis S, Brunk UT, Galaris D. Endosomal and lysosomal effects of desferrioxamine: protection of HeLa cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage and induction of cell-cycle arrest. *Free Radic Biol Med*. 2003 Oct 1;35(7):719–28.
13. Tenopoulou M, Doulias PT, Barbouti A, Brunk U, Galaris D. Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem J*. 2005 May 1;387(Pt 3):703–10.
14. Tenopoulou M, Kurz T, Doulias PT, Galaris D, Brunk UT. Does the calcein-AM method assay the total cellular ‘labile iron pool’ or only a fraction of it? *Biochem J*. 2007 Apr 15;403(2):261–6.

15. Kontoghiorghes GJ, Sheppard L, Hoffbrand AV, Charalambous J, Tikerpae J, Pippard MJ. Iron chelation studies using desferrioxamine and the potential oral chelator, 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one, in normal and iron loaded rats. *J Clin Pathol*. 1987 Apr 1;40(4):404–8.
16. Palmer C, Roberts RL, Bero C. Deferoxamine posttreatment reduces ischemic brain injury in neonatal rats. *Stroke*. 1994 May;25(5):1039–45.
17. Shadid M, Buonocore G, Groenendaal F, Moison R, Ferrali M, Berger HM, et al. Effect of deferoxamine and allopurinol on non-protein-bound iron concentrations in plasma and cortical brain tissue of newborn lambs following hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett*. 1998 May;248(1):5–8.
18. Paraskevaïdis IA, Iliodromitis EK, Vlahakos D, Tsiapras DP, Nikolaidis A, Marathias A, et al. Deferoxamine infusion during coronary artery bypass grafting ameliorates lipid peroxidation and protects the myocardium against reperfusion injury: immediate and long-term significance. *Eur Heart J*. 2005 Feb 1;26(3):263–70.
19. Vlahakos D, Arkadopoulos N, Kostopanagiotou G, Siasiakou S, Kaklamanis L, Degiannis D, et al. Deferoxamine Attenuates Lipid Peroxidation, Blocks Interleukin-6 Production, Ameliorates Sepsis Inflammatory Response Syndrome, and Confers Renoprotection After Acute Hepatic Ischemia in Pigs: DEFEROXAMINE IN PIGS WITH ACUTE HEPATIC ISCHEMIA. *Artif Organs*. 2012 Apr;36(4):400–8.
20. Chan W, Taylor AJ, Ellims AH, Lefkovits L, Wong C, Kingwell BA, et al. Effect of Iron Chelation on Myocardial Infarct Size and Oxidative Stress in ST-Elevation–Myocardial Infarction. *Circ Cardiovasc Interv*. 2012 Apr;5(2):270–8.
21. Arthur PG. Desferrioxamine in warm reperfusion media decreases liver injury aggravated by cold storage. *World J Gastroenterol*. 2013;19(5):673.
22. Trogadas G, Mastoraki A, Nastos C, Kondi-Pafiti A, Kostopanagiotou G, Smyrniotis V, et al. Comparative Effects of Ischemic Preconditioning and Iron Chelation in Hepatectomy. *J Invest Surg*. 2015 Sep 3;28(5):261–7.
23. Niu X, Huang WH, De Boer B, Delriviere L, Mou LJ, Jeffrey GP. Iron-induced oxidative rat liver injury after non-heart-beating warm ischemia is mediated by tumor necrosis factor α and prevented by deferoxamine: Deferoxamine Abates Non-Heart-Beating Liver Injury. *Liver Transpl*. 2014 Aug;20(8):904–11.
24. Mantelou AG, Barbouti A, Goussia A, Zacharioudaki A, Papoudou-Bai A, Vlachou C, et al. Combined administration of membrane-permeable and impermeable iron-chelating drugs attenuates ischemia/reperfusion-induced hepatic injury. *Free Radic Biol Med*. 2022 Oct 13;193(Pt 5):227–37.
25. Melidou M, Riganakos K, Galaris D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. *Free Radic Biol Med*. 2005 Dec 15;39(12):1591–600.
26. Kitsati N, Fokas D, Ouzouni MD, Mantzaris MD, Barbouti A, Galaris D. Lipophilic Caffeic Acid Derivatives Protect Cells against H₂O₂-Induced DNA Damage by Chelating Intracellular Labile Iron. *J Agric Food Chem*. 2012 Aug 15;60(32):7873–9.

27. Zhu H, Santo A, Trush M, Li YR. Oxygen and Oxygen Toxicity: The Birth of Concepts. React Oxyg Species [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2021 Dec 9];1(1). Available from: <http://rosj.org/index.php/ros/article/view/3>
28. Tasman W, Patz A, McNamara JA, Kaiser RS, Trese MT, Smith BT. Retinopathy of prematurity: the life of a lifetime disease. Am J Ophthalmol. 2006 Jan;141(1):167–74.
29. Ingalls TH, Purshottam N. Oxygenation and Retrolental Fibroplasia. N Engl J Med. 1954 Apr 15;250(15):621–9.
30. Sullivan JL. Iron, plasma antioxidants, and the ‘oxygen radical disease of prematurity’. Am J Dis Child 1960. 1988 Dec;142(12):1341–4.
31. Lyons TW, Reinhard CT, Planavsky NJ. The rise of oxygen in Earth’s early ocean and atmosphere. Nature. 2014 Feb;506(7488):307–15.
32. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine [Internet]. 5th ed. Oxford: Oxford University Press; 2015. 944 p. Available from: <https://oxford.universitypressscholarship.com/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001/acprof-9780198717478>
33. Martínez-González J de J, Guevara-Flores A, Del Arenal Mena IP. Evolutionary Adaptations of Parasitic Flatworms to Different Oxygen Tensions. Antioxid Basel Switz. 2022 Dec 31;11(6):1102.
34. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chem Biol Interact. 2014 Dec;224:164–75.
35. Galaris D. Free Radicals and Oxidative Stress [Internet]. Hellenic Academic Ebooks www.kallipos.gr; 2015. 184 p. Available from: <http://hdl.handle.net/11419/5113>
36. Gomberg M. AN INSTANCE OF TRIVALENT CARBON: TRIPHENYLMETHYL. J Am Chem Soc. 1900 Nov;22(11):757–71.
37. Renaud P, Mukund P. S. Radicals in organic synthesis. WILEY-VCH Verlag GmbH; 2001.
38. Γαλάρης Δ. Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Πανεπιστημιακές Εκδόσεις; 2015.
39. Ahmed M, Pickova J, Ahmad T, Liaquat M, Farid A, Jahangir M. Oxidation of Lipids in Foods. Sarhad J Agric. 2016 Aug 30;32(3):230–8.
40. Rao SD. Studies on the destruction of vitamin A in shark-liver oil; relation between vitamin A destruction and peroxide number. Indian J Med Res. 1945 May;33:63–7.
41. Moran T, Pace J, McDERMOTT EE. The lipids in flour; oxidative changes induced by storage and improver treatment. Nature. 1954 Sep 4;174(4427):449–52.
42. Rolinson GN, Lumb M. The oxidation of lard oil by *Penicillium chrysogenum*. J Gen Microbiol. 1953 Dec;9(3):385–93.

43. Addis PB. Occurrence of lipid oxidation products in foods. *Food Chem Toxicol.* 1986 Oct 1;24(10):1021–30.
44. Michaelis Leonor. Demonstration of the existence of a free radical. *J Chem Educ.* 1946 Jul 1;23(7):317.
45. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free Radicals in Biological Materials. *Nature.* 1954 Oct;174(4432):689–91.
46. Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO. Oxygen Poisoning and X-irradiation: A Mechanism in Common. *Science.* 1954 May 7;119(3097):623–6.
47. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969 Nov 25;244(22):6049–55.
48. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest.* 1973 Mar;52(3):741–4.
49. Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1980;492:153–68.
50. Del Maestro R, Thaw HH, Björk J, Planker M, Arfors KE. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1980;492:43–57.
51. Hogg N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998;16(4):241–8.
52. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):47–95.
53. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006 Mar 10;160(1):1–40.
54. Dormandy TL. Free-radical oxidation and antioxidants. *Lancet Lond Engl.* 1978 Mar 25;1(8065):647–50.
55. Demopoulos HB, Flamm ES, Seligman ML, Pietronigro DD, Tomasula J, DeCrescito V. Further studies on free-radical pathology in the major central nervous system disorders: effect of very high doses of methylprednisolone on the functional outcome, morphology, and chemistry of experimental spinal cord impact injury. *Can J Physiol Pharmacol.* 1982 Nov;60(11):1415–24.
56. Martínez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 1995 Jan 1;77(3):147–61.
57. Florence TM. The role of free radicals in disease. *Aust N Z J Ophthalmol.* 1995 Feb;23(1):3–7.
58. Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *J Gerontol.* 1956 Jul 1;11(3):298–300.

59. Deucher GP. Antioxidant therapy in the aging process. *EXS*. 1992;62:428–37.
60. Young VR. Diet as a modulator of aging and longevity. *Fed Proc*. 1979 Dec;38(6):1994–2000.
61. Harman D. Free radical theory of aging. *Mutat Res*. 1992 Sep 1;275(3):257–66.
62. Harman D. Free radical theory of aging: effect of the amount and degree of unsaturation of dietary fat on mortality rate. *J Gerontol*. 1971 Oct;26(4):451–7.
63. Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem*. 1981 Nov 10;256(21):10986–92.
64. Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, et al. Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Induces Apoptosis through Enhancing Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production *. *J Biol Chem*. 2003 Mar 7;278(10):8516–25.
65. Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 15;15(6):1583–606.
66. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. 1995 May 1;268(5):L699–722.
67. Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem*. 2014 Mar 28;289(13):8735–41.
68. Winterbourn CC. Chapter One - The Biological Chemistry of Hydrogen Peroxide. In: Cadenas E, Packer L, editors. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2013 [cited 2024 Mar 16]. p. 3–25. (Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, Part C; vol. 528). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012405881100001X>
69. Barbouti A, Briasoulis E, Galaris D. Chapter 120 - Protective Effects of Olive Oil Components Against Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage: The Potential Role of Iron Chelation. In: Preedy VR, Watson RR, editors. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2010 [cited 2024 Mar 28]. p. 1103–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123744203001200>
70. Perkins A, Nelson KJ, Parsonage D, Poole LB, Karplus PA. Peroxiredoxins: Guardians Against Oxidative Stress and Modulators of Peroxide Signaling. *Trends Biochem Sci*. 2015 Aug;40(8):435–45.
71. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012 Dec;24(5):981–90.
72. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol CB*. 2014 Dec 19;24(10):R453–462.

73. del Río LA, López-Huertas E. ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling. *Plant Cell Physiol.* 2016 Jul 1;57(7):1364–76.
74. Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJ. Transient adaptation of oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 1995 Apr 1;318(1):231–40.
75. Sies H. H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H (ed) *Oxidative stress*. Orlando, FL: Academic Press; 1985. p. 1–7.
76. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Res Int.* 2014;2014:761264.
77. Sies H, Jones D. Oxidative Stress*. In: Fink G, editor. *Encyclopedia of Stress* (Second Edition) [Internet]. New York: Academic Press; 2007 [cited 2024 Apr 8]. p. 45–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123739476002853>
78. Sies H. Oxidative Stress: Concept and Some Practical Aspects. *Antioxidants.* 2020 Sep 10;9(9):852.
79. Mello T, Zanieri F, Ceni E, Galli A. Oxidative Stress in the Healthy and Wounded Hepatocyte: A Cellular Organelles Perspective. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1–15.
80. Fenton HJH. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc Trans.* 1894 Jan 1;65(0):899–910.
81. Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, Kuča K, Musílek K. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Arch Toxicol.* 2016 Jan;90(1):1–37.
82. Paul T. Effect of a prolonged superoxide flux on transferrin and ferritin. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Oct 15;382(2):253–61.
83. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell.* 2010 Jul 9;142(1):24–38.
84. Park E, Chung SW. ROS-mediated autophagy increases intracellular iron levels and ferroptosis by ferritin and transferrin receptor regulation. *Cell Death Dis.* 2019 Oct 28;10(11):1–10.
85. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets.* 2018;19(1):38–54.
86. Uchiyama A, Kim JS, Kon K, Jaeschke H, Ikejima K, Watanabe S, et al. Translocation of iron from lysosomes into mitochondria is a key event during oxidative stress-induced hepatocellular injury. *Hepatology.* 2008 Nov;48(5):1644–54.
87. Zhang X, Lemasters JJ. Translocation of iron from lysosomes to mitochondria during ischemia predisposes to injury after reperfusion in rat hepatocytes. *Free Radic Biol Med.* 2013 Oct;63:243–53.

88. Bresgen N, Eckl P. Oxidative Stress and the Homeodynamics of Iron Metabolism. *Biomolecules*. 2015 May 11;5(2):808–47.
89. Ma Y, de Groot H, Liu Z, Hider RC, Petrat F. Chelation and determination of labile iron in primary hepatocytes by pyridinone fluorescent probes. *Biochem J*. 2006 Apr 1;395(1):49–55.
90. Petrat F, Rauen U, de Groot H. Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. *Hepatology*. 1999 Apr;29(4):1171–9.
91. Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, et al. The role of mitochondria in cellular iron–sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2012 Sep;1823(9):1491–508.
92. Pantopoulos K. Iron Metabolism and the IRE/IRP Regulatory System: An Update. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1012(1):1–13.
93. Tsoucalas G, Sgantzios M, Androutsos G. Hippocrates, Principles on Abdominal Surgery in Ancient Greece During the Fifth Century BC. *Surg Innov*. 2016 Apr;23(2):212–3.
94. Tsoucalas G, Kapsoritakis A, Potamianos S, Sgantzios M. Promethean and Tityean hepatic regeneration, unveiling hepar's myth. Post mortem observation, surgical ascertainment, or just fiction? *J Univers Surg [Internet]*. 2017 [cited 2022 Feb 27];05(02). Available from: <http://www.jusurgery.com/universalsurgery/promethean-and-tityean-hepatic-regeneration-unveiling-hepars-myth-post-mortem-observation-surgical-ascertainment-or-just-fiction.php?aid=18506>
95. Brunicaudi F et al. *Schwartz's Principles of Surgery*. 10th Edition. 10th Edition. New York: McGraw-Hill Education; 2014.
96. Torzilli G. Adjuncts to hepatic resection. :17.
97. BECK C. SURGERY OF THE LIVER. *J Am Med Assoc*. 1902 Dec 26;XXXVIII(17):1063–8.
98. Yan L. *Operative Techniques in Liver Resection*. Springer; 2015. 351 p.
99. Kokudo N, Takemura N, Ito K, Mihara F. The history of liver surgery: Achievements over the past 50 years. *Ann Gastroenterol Surg*. 2020 Mar;4(2):109–17.
100. Davakis S, Vailas M, Kozadinos A, Sakarellos P, Karampa A, Korkolis D, et al. Surgical Therapy of Hepatocellular Carcinoma: State of the Art Liver Resection [Internet]. *IntechOpen*; 2021 [cited 2022 Feb 28]. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/79097>
101. Gulik TM van. Couinaud's corrosion casts of the liver. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2022 Apr;11(2):17475–17175.
102. Vauthey JN, Zimmitti G, Shindoh J. From Couinaud to molecular biology: the seven virtues of hepato-pancreato-biliary surgery. *HPB*. 2012 Aug;14(8):493–9.

103. Pringle JH. NOTES ON THE ARREST OF HEPATIC HEMORRHAGE DUE TO TRAUMA: *Ann Surg.* 1908 Oct;48(4):541–9.
104. Teoh NC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection—the good, bad and deadly. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26(s1):180–7.
105. Tennant R, Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol-Leg Content.* 1935;112(2):351–61.
106. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960 Jul;70:68–78.
107. Hearse DJ, Humphrey SM, Nayler WG, Slade A, Border D. Ultrastructural damage associated with reoxygenation of the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1975 May 1;7(5):315–24.
108. Glantzounis GK, Seifalian AM, Davidson BR, Mikhailidis DP. Editorial [Pharmacological Modulation of Liver Ischemia - Reperfusion Injury Executive Editors: G.K. Glantzounis, D.P. Mikhailidis, A.M. Seifalian and B.R. Davidson] [Internet]. 2006 [cited 2019 Feb 28]. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/contentone/ben/cpd/2006/00000012/00000023/art00001>
109. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2013 Jan;123(1):92–100.
110. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015 Oct 8;6:524–51.
111. Sheth H, Hafez T, Glantzounis GK, Seifalian AM, Fuller B, Davidson BR. Glycine maintains mitochondrial activity and bile composition following warm liver ischemia-reperfusion injury. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Jan;26(1):194–200.
112. Galaris D, Kitsati N, Pelidou SH, Barbouti A. Implication of Oxidative Stress and “Labile Iron” in the Molecular Mechanisms of Ischemic Stroke. In: Li YV, Zhang JH, editors. *Metal Ion in Stroke* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2012. p. 255–71. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9663-3_12
113. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am J Surg.* 1975 Dec;129(5):513–7.
114. Peralta C, Jiménez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: Effects on the liver sinusoidal milieu. *J Hepatol.* 2013 Nov;59(5):1094–106.
115. Kaltenmeier C, Yazdani HO, Handu S, Popp B, Geller D, Tohme S. The Role of Neutrophils as a Driver in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Cancer Growth. *Front Immunol.* 2022 Jul 1;13:887565.
116. Pan Y, Wang X, Liu X, Shen L, Chen Q, Shu Q. Targeting Ferroptosis as a Promising Therapeutic Strategy for Ischemia-Reperfusion Injury. *Antioxidants.* 2022 Nov 6;11(11):2196.

117. Harada H, Hines IN, Flores S, Gao B, McCord J, Scheerens H, et al. Role of NADPH oxidase-derived superoxide in reduced size liver ischemia and reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys*. 2004 Mar 1;423(1):103–8.
118. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol*. 2006 Sep;91(5):807–19.
119. Boucher F, Pucheu S, Coudray C, Favier A, de Leiris J. Evidence of cytosolic iron release during post-ischaemic reperfusion of isolated rat hearts Influence on spin-trapping experiments with DMPO. *FEBS Lett*. 1992;302(3):261–4.
120. Ozaki M, Fuchinoue S, Teraoka S, Ota K. Mobilization of low-molecular-weight iron and peroxidative damage during ischemia and reoxygenation of the rat liver. *Transplant Proc*. 1994 Apr;26(2):918–21.
121. Berenshtein E, Mayer B, Goldberg C, Kitrossky N, Chevion M. Patterns of Mobilization of Copper and Iron Following Myocardial Ischemia: Possible Predictive Criteria for Tissue Injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1997 Nov 1;29(11):3025–34.
122. Colletti LM, Remick DG, Campbell DA. Desferal attenuates TNF release following hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res*. 1994 Oct;57(4):447–53.
123. Ishizaki N, Zhu Y, Zhang S, Nemoto A, Kobayashi Y, Subbotin VM, et al. Comparison of Various Lazaroid Compounds for Protection Against Ischemic Liver Injury. *Transplantation*. 1997 Jan 27;63(2):202–8.
124. Omar R, Nomikos I, Piccorelli G, Savino J, Agarwal N. Prevention of postischaemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut*. 1989 Apr 1;30(4):510–4.
125. Amersi F, Dulkanchainun T, Nelson SK, Farmer DG, Kato H, Zaky J, et al. A novel iron chelator in combination with a P-selectin antagonist prevents ischemia/reperfusion injury in a rat liver model. *Transplantation*. 2001 Jan 15;71(1):112–8.
126. Tokyol C, Yilmaz S, Kahraman A, Cakar H, Polat C. The effects of desferrioxamine and quercetin on liver injury induced by hepatic ischaemia-reperfusion in rats. *Acta Chir Belg*. 2006;106(1):68–72.
127. Kalimeris K, Nastos C, Papoutsidakis N, Xanthopoulou MN, Defterevos G, Tympha A, et al. Iron chelation prevents lung injury after major hepatectomy: Desferrioxamine for post-hepatectomy lung injury. *Hepatology*. 2010 Jul 23;40(8):841–50.
128. Arkadopoulos N, Nastos C, Kalimeris K, Economou E, Theodoraki K, Kouskouni E, et al. Iron Chelation for Amelioration of Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Hemoglobin*. 2010 Jun;34(3):265–77.
129. Ollinger K, Brunk UT. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radic Biol Med*. 1995 Nov;19(5):565–74.
130. Persson HL, Yu Z, Tirosh O, Eaton JW, Brunk UT. Prevention of oxidant-induced cell death by lysosomotropic iron chelators. *Free Radic Biol Med*. 2003 May;34(10):1295–305.

131. Yu Z, Persson HL, Eaton JW, Brunk UT. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic Biol Med.* 2003 May 15;34(10):1243–52.
132. Zhang L, Wang H, Zhou X, Mao L, Ding K, Hu Z. Role of mitochondrial calcium uniporter-mediated Ca^{2+} and iron accumulation in traumatic brain injury. *J Cell Mol Med.* 2019 Apr;23(4):2995–3009.
133. Chen ACH, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, et al. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PloS One.* 2011;6(7):e22453.
134. Endo H, Nito C, Kamada H, Yu F, Chan PH. Akt/GSK3 β Survival Signaling Is Involved in Acute Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Stroke.* 2006 Aug;37(8):2140–6.
135. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005 Jun 1;38(11):1433–44.
136. Stone JR, Yang S. Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Mar 1;8(3–4):243–70.
137. Veal EA, Day AM, Morgan BA. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. *Mol Cell.* 2007 Apr;26(1):1–14.
138. Yamada N, Karasawa T, Wakiya T, Sadatomo A, Ito H, Kamata R, et al. Iron overload as a risk factor for hepatic ischemia-reperfusion injury in liver transplantation: Potential role of ferroptosis. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* 2020 Jun;20(6):1606–18.
139. Kim KM, Cho SS, Ki SH. Emerging roles of ferroptosis in liver pathophysiology. *Arch Pharm Res.* 2020 Oct 1;43(10):985–96.
140. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, et al. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell.* 2012 May;149(5):1060–72.
141. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of Ferroptotic Cancer Cell Death by GPX4. *Cell.* 2014 Jan 16;156(0):317–31.
142. Hatcher HC, Singh RN, Torti FM, Torti SV. Synthetic and natural iron chelators: therapeutic potential and clinical use. *Future Med Chem.* 2009 Dec;1(9):10.4155/fmc.09.121.
143. Ετυμολογικό Λεξικό Χημικών Όρων [Internet]. ΕΚΠΑ - Τμήμα Χημείας. [cited 2022 Apr 17]. Available from: <http://www.chem.uoa.gr/?p=6979&lang=el>
144. Mobarra N, Shanaki M, Ehteram H, Nasiri H, Sahmani M, Saeidi M, et al. A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *Int J Hematol-Oncol Stem Cell Res.* 2016 Oct 1;10(4):239–47.

145. Méthy D, Bertrand N, Prigent-Tessier A, Mossiat C, Stanimirovic D, Beley A, et al. Beneficial effect of dipyrityl, a liposoluble iron chelator against focal cerebral ischemia: In vivo and in vitro evidence of protection of cerebral endothelial cells. *Brain Res.* 2008 Feb 8;1193:136–42.
146. Demougeot C, Hoecke M, Bertrand N, Mossiat C, Beley A, Marie C. Cytoprotective Efficacy and Mechanisms of the Liposoluble Iron Chelator 2,2'-Dipyridyl in the Rat Photothrombotic Ischemic Stroke Model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Jan 1;311:1080–7.
147. Prass K, Ruscher K, Karsch M, Isaev N, Megow D, Priller J, et al. Desferrioxamine Induces Delayed Tolerance against Cerebral Ischemia in Vivo and in Vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 May 1;22(5):520–5.
148. Soloniuk DS, Perkins E, Wilson JR. Use of allopurinol and deferoxamine in cellular protection during ischemia. *Surg Neurol.* 1992 Aug 1;38(2):110–3.
149. Defraigne JO, Pincemail J, Detry O, Franssen C, Meurisse M, Limet R. Preservation of cortical microcirculation after kidney ischemia-reperfusion: value of an iron chelator. *Ann Vasc Surg.* 1994 Sep;8(5):457–67.
150. Wu S, Qian H, Zou X, Liu R. Combination of Deferoxamine With Cyclosporine Synergistically Blunt Renal Cold Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Transplantation Model. *Transplant Proc.* 2024 Oct;56(8):1732–9.
151. Jr RJB. Method for synthesis of desferrioxamine B, analogs and homologs thereof [Internet]. US5254724A, 1993 [cited 2022 Dec 31]. Available from: <https://patents.google.com/patent/US5254724A/en>
152. Crisponi G, Nurchi VM, Crespo-Alonso M, Sanna G, Zoroddu MA, Alberti G, et al. A Speciation Study on the Perturbing Effects of Iron Chelators on the Homeostasis of Essential Metal Ions. Kim J, editor. *PLOS ONE.* 2015 Jul 20;10(7):e0133050.
153. Porter J b., Rafique R, Srichairatanakool S, Davis BA, Shah FT, Hair T, et al. Recent Insights into Interactions of Deferoxamine with Cellular and Plasma Iron Pools: Implications for Clinical Use. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054(1):155–68.
154. Porter JB, Gyparaki M, Burke LC, Huehns ER, Sarpong P, Saez V, et al. Iron mobilization from hepatocyte monolayer cultures by chelators: the importance of membrane permeability and the iron-binding constant. *Blood.* 1988 Nov;72(5):1497–503.
155. Hider RC, Singh S, Porter JB, Huehns ER. The development of hydroxypyridin-4-ones as orally active iron chelators. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;612:327–38.
156. Kwiatkowski JL, Hamdy M, El-Beshlawy A, Ebeid FSE, Badr M, Alshehri A, et al. Deferiprone vs deferoxamine for transfusional iron overload in SCD and other anemias: a randomized, open-label noninferiority study. *Blood Adv.* 2022 Feb 22;6(4):1243–54.
157. ferriprox-epar-product-information_en.pdf [Internet]. [cited 2023 Jan 10]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ferriprox-epar-product-information_en.pdf

158. Hider RC, Zhou T. The Design of Orally Active Iron Chelators. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054(1):141–54.
159. Link G, Konijn AM, Breuer W, Cabantchik ZI, Hershko C. Exploring the ‘iron shuttle’ hypothesis in chelation therapy: effects of combined deferoxamine and deferiprone treatment in hypertransfused rats with labeled iron stores and in iron-loaded rat heart cells in culture. *J Lab Clin Med.* 2001 Aug;138(2):130–8.
160. Evans P, Kayyali R, Hider RC, Eccleston J, Porter JB. Mechanisms for the shuttling of plasma non-transferrin-bound iron (NTBI) onto deferoxamine by deferiprone. *Transl Res.* 2010 Aug;156(2):55–67.
161. Eid R, Arab NTT, Greenwood MT. Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and a re-examination of existing paradigms. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2017 Feb;1864(2):399–430.
162. Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes1 This article is part of a series of reviews on “Iron and Cellular Redox Status.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. *Free Radic Biol Med.* 2002 Oct 15;33(8):1037–46.
163. Kitsati N, Mantzaris MD, Galaris D. Hydroxytyrosol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptotic signaling via labile iron chelation. *Redox Biol.* 2016 Dec;10:233–42.
164. Codd R, Richardson-Sanchez T, Telfer TJ, Gotsbacher MP. Advances in the Chemical Biology of Desferrioxamine B. *ACS Chem Biol.* 2018 Jan 19;13(1):11–25.
165. Jamuar SS, Lai AHM. Safety and efficacy of iron chelation therapy with deferiprone in patients with transfusion-dependent thalassemia. *Ther Adv Hematol.* 2012 Oct 1;3(5):299–307.
166. Bellotti D, Remelli M. Deferoxamine B: A Natural, Excellent and Versatile Metal Chelator. *Molecules.* 2021 May 28;26(11):3255.
167. Βλάχου Χ. Διερεύνηση του ρόλου του οξειδωτικού στρες και της ομοιοστασίας του σιδήρου σε παθολογικές καταστάσεις. [Διδακτορική διατριβή]. Ιωάννινα: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων; 2011 [Internet]. [cited 2023 Dec 18]. Available from: <https://olympias.lib.uoi.gr/jspui/bitstream/123456789/741/5/%CE%94.%CE%94.%20%CE%92%CE%9B%CE%91%CE%A7%CE%9F%CE%A5%20%CE%A7%CE%91%CE%A1%CE%99%CE%9A%CE%9B%CE%95%CE%99%CE%91%202011.pdf>
168. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 30;123(1):291–8.
169. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988 Mar;175(1):184–91.
170. Panayiotidis M, Tsolas O, Galaris D. GLUCOSE OXIDASE-PRODUCED H₂O₂ INDUCES Ca²⁺-DEPENDENT DNA DAMAGE IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES. :9.

171. Kontoghiorghes G, Pattichis K, Neocleous K, Kolnagou A. The Design and Development of Deferiprone (L1) and Other Iron Chelators for Clinical Use: Targeting Methods and Application Prospects. *Curr Med Chem*. 2004 Aug 1;11(16):2161–83.
172. Ακριβιάδης Ε. Κλινική ηπατολογία. University Studio Press; 2011. 678 p.
173. Nakatake R, Schulz M, Kalvelage C, Benstoem C, Tolba RH. Effects of iNOS in Hepatic Warm Ischaemia and Reperfusion Models in Mice and Rats: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 2022 Oct 7;23(19):11916.
174. Jiménez-Castro MB, Cornide-Petronio ME, Gracia-Sancho J, Peralta C. Inflammasome-Mediated Inflammation in Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells*. 2019 Sep 23;8(10):1131.
175. Ushitora M, Sakurai F, Yamaguchi T, Nakamura S ichiro, Kondoh M, Yagi K, et al. Prevention of hepatic ischemia–reperfusion injury by pre-administration of catalase-expressing adenovirus vectors. *J Controlled Release*. 2010;
176. Eleftheriou D, Benetou V, Trichopoulou A, La Vecchia C, Bamia C. Mediterranean diet and its components in relation to all-cause mortality: meta-analysis. *Br J Nutr*. 2018 Nov;120(10):1081–97.
177. Shen J, Wilmot KA, Ghasemzadeh N, Molloy DL, Burkman G, Mekonnen G, et al. Mediterranean Dietary Patterns and Cardiovascular Health. *Annu Rev Nutr*. 2015;35:425–49.
178. Antoniadis C, Tousoulis D, Tentolouris C, Toutouzas P, Stefanadis C. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice. *Herz*. 2003 Nov;28(7):628–38.
179. Warnholtz A, Münzel T. Why do antioxidants fail to provide clinical benefit? *Curr Control Trials Cardiovasc Med*. 2000;1(1):38–40.
180. Steinhubl SR. Why have antioxidants failed in clinical trials? *Am J Cardiol*. 2008 Dec 22;101(10A):14D–19D.
181. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996 Dec 2;334(18):1145–9.
182. Koufaki M, Theodorou E, Galaris D, Nouis L, Katsanou ES, Alexis MN. Chroman/Catechol Hybrids: Synthesis and Evaluation of Their Activity against Oxidative Stress Induced Cellular Damage. *J Med Chem*. 2006 Jan 1;49(1):300–6.
183. Nouis L, Doulias PT, Aligiannis N, Bazios D, Agalias A, Galaris D, et al. DNA protecting and genotoxic effects of olive oil related components in cells exposed to hydrogen peroxide. *Free Radic Res*. 2005 Jul;39(7):787–95.
184. Doulias PT, Nouis L, Zhu BZ, Frei B, Galaris D. Protection by tropolones against H₂O₂-induced DNA damage and apoptosis in cultured Jurkat cells. *Free Radic Res*. 2005 Feb 1;39(2):125–35.

185. Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, Mikhailidis DP, Seifalian AM, Davidson BR. Continuous infusion of N-acetylcysteine reduces liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 2004 Oct;91(10):1330–9.
186. Fusai G, Glantzounis GK, Hafez T, Yang W, Quaglia A, Sheth H, et al. N-Acetylcysteine ameliorates the late phase of liver ischaemia/reperfusion injury in the rabbit with hepatic steatosis. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2005 Nov;109(5):465–73.
187. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, et al. Glutathione Protects the Rat Liver Against Reperfusion Injury After Prolonged Warm Ischemia. *Ann Surg*. 2004 Feb;239(2):220–31.
188. Amersi F, Nelson SK, Shen XD, Kato H, Melinek J, Kupiec-Weglinski JW, et al. Bucillamine, a thiol antioxidant, prevents transplantation-associated reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 25;99(13):8915–20.
189. Horwitz LD. Bucillamine: a potent thiol donor with multiple clinical applications. *Cardiovasc Drug Rev*. 2003;21(2):77–90.
190. Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kaçmaz A, Arbak S, Ersoy Y, et al. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci*. 2003 Dec 2;72(24):2707–18.
191. Ozaki M, Deshpande SS, Angkeow P, Bellan J, Lowenstein CJ, Dinanier MC, et al. Inhibition of the Rac1 GTPase protects against nonlethal ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in vivo. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2000 Feb;14(2):418–29.
192. Lehnert M, Arteel GE, Smutney OM, Conzelmann LO, Zhong Z, Thurman RG, et al. Dependence of liver injury after hemorrhage/resuscitation in mice on NADPH oxidase-derived superoxide. *Shock Augusta Ga*. 2003 Apr;19(4):345–51.
193. Gennaro R, Zanetti M, Benincasa M, Podda E, Miani M. Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action. *Curr Pharm Des*. 2002;8(9):763–78.
194. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124–36.
195. Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. Oxidative Stress in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury: The Role of Antioxidants and Iron Chelating Compounds. *Curr Pharm Des*. 2006 Aug 1;12(23):2875–90.
196. Bystrom P, Foley N, Toledo-Pereyra L, Quesnelle K. Ischemic preconditioning modulates ROS to confer protection in liver ischemia and reperfusion. *EXCLI J*. 2017 Apr 7;16:483–96.
197. Zhang H, Zhang T, Zhong F, Xia X. Effects of remote ischemic preconditioning on liver injury following hepatectomy: a systematic review and meta-analysis of randomized control trials. *Surg Today*. 2021 Aug 1;51(8):1251–60.

198. Wu J, Yu C, Zeng X, Sun C. The hepatoprotective effect from ischemia-reperfusion injury of remote ischemic preconditioning in the liver related surgery: a meta-analysis. *ANZ J Surg.* 2022;92(6):1332–7.
199. Galleano M, Tapia G, Puntarulo S, Varela P, Videla LA, Fernández V. Liver preconditioning induced by iron in a rat model of ischemia/reperfusion. *Life Sci.* 2011 Aug 15;89(7–8):221–8.
200. Fernández V, Castillo I, Tapia G, Romanque P, Uribe-Echevarría S, Uribe M, et al. Thyroid hormone preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology* Baltim Md. 2007 Jan;45(1):170–7.
201. Ito K, Ozasa H, Sanada K, Horikawa S. Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* Baltim Md. 2000 Feb;31(2):416–9.
202. Yu SY, Chiu JH, Yang SD, Yu HY, Hsieh CC, Chen PJ, et al. Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res.* 2005 Sep;128(1):28–36.
203. Alchera E, Imarisio C, Mandili G, Merlin S, Chandrashekar BR, Novelli F, et al. Pharmacological Preconditioning by Adenosine A2a Receptor Stimulation: Features of the Protected Liver Cell Phenotype. *BioMed Res Int.* 2015;2015:286746.
204. Pacher P, Haskó G. Endocannabinoids and cannabinoid receptors in ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol.* 2008 Jan;153(2):252–62.
205. Younis NN, Shaheen MA, Mahmoud MF. Silymarin preconditioning protected insulin resistant rats from liver ischemia-reperfusion injury: role of endogenous H₂S. *J Surg Res.* 2016 Aug;204(2):398–409.
206. Zhang Q, Fu H, Zhang H, Xu F, Zou Z, Liu M, et al. Hydrogen sulfide preconditioning protects rat liver against ischemia/reperfusion injury by activating Akt-GSK-3 β signaling and inhibiting mitochondrial permeability transition. *PloS One.* 2013;8(9):e74422.
207. Lai IR, Chang KJ, Tsai HW, Chen CF. Pharmacological Preconditioning With Simvastatin Protects Liver From Ischemia-Reperfusion Injury by Heme Oxygenase-1 Induction. *Transplantation.* 2008 Mar 15;85(5):732–8.
208. Kyriazi MariaA, Theodoraki K, Thedosopoulos T, Tsiantoula P, Fragulidis G, Kostopanagiotou G, et al. Evaluation of Ischemia-Reperfusion Liver Injury by Near-Infrared Spectroscopy in an Experimental Swine Model: The Effect of Desferoxamine. *J Invest Surg.* 2011 Jun 16;24(4):164–70.
209. G Paradellis D, D Panousopoulos GS, G Mathioulaki A, E Papalois A, N Nomikos T, Theocharis S, et al. Antioxidant preconditioning attenuates liver ischemia/reperfusion injury after hepatectomy in swine. *J BUON Off J Balk Union Oncol.* 2021;26(3):1159–64.
210. Eggenhofer E, Proneth B. Ferroptosis Inhibition: A Key Opportunity for the Treatment of Ischemia/Reperfusion Injury in Liver Transplantation. *Transplantation.* 2025 May;109(5):e228.

211. Braughler JM, Pregenzer JF, Chase RL, Duncan LA, Jacobsen EJ, McCall JM. Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem.* 1987 Aug 5;262(22):10438–40.
212. Cosenza CA, Cramer DV, Cunneen SA, Tusio PJ, Wang HK, Makowka L. Protective effect of the lazaroid U74006F in cold ischemia-reperfusion injury of the liver. *Hepatology.* 1994;19(2):418–25.
213. Iwanami K, Takeyoshi I, Ohwada S, Kobayashi J, Kawashima Y, Aiba M, et al. The effect of Lazaroid U-74389G on extended liver resection with ischemia in dogs. *Surgery.* 1999 Nov 1;126(5):908–17.
214. Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, et al. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2003 Sep;17(12):1724–6.
215. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacol Pharmacother.* 2010;1(2):87–93.
216. Mantelou AG, Zacharioudaki A, Pappas-Gogos G, Papalois A, Papoudou-Bai A, Goussia A, et al. Description of a Recovery Model in Rabbits for the Study of the Late Phase of Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Vivo Athens Greece.* 2022;36(1):153–60.
217. Lewis DI. Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs. *Emerg Top Life Sci.* 2019 Nov 27;3(6):675–9.
218. Imber CJ, St. Peter SD, Lopez de Cenarruzabeitia I, Pigott D, James T, Taylor R, et al. Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation. *Transplantation.* 2002 Mar 15;73(5):701–9.
219. Reddy SP, Bhattacharjya S, Maniakin N, Greenwood J, Guerreiro D, Hughes D, et al. PRESERVATION OF PORCINE NON-HEART-BEATING DONOR LIVERS BY SEQUENTIAL COLD STORAGE AND WARM PERFUSION. *Transplantation.* 2004 May 15;77(9):1328–32.
220. Hafez TS, Glantzounis GK, Fusai G, Taanman JW, Wignarajah P, Parkes H, et al. Intracellular oxygenation and cytochrome oxidase C activity in ischemic preconditioning of steatotic rabbit liver. *Am J Surg.* 2010 Oct;200(4):507–18.
221. Glantzounis GK, Rocks SA, Sheth H, Knight I, Salacinski HJ, Davidson BR, et al. Formation and role of plasma S-nitrosothiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 2007 Mar 15;42(6):882–92.
222. Glantzounis GK, Sheth H, Thompson C, Hafez TS, Kanoria S, Pamecha V, et al. Acute limb ischemia caused by femoral arterial line induces remote liver injury in a rabbit model of liver ischemia/reperfusion injury. *Angiology.* 2009;60(5):554–61.
223. Guo CW, Shen SD, Zhang Y, Liang CH, Yi XL, Luo W. Determination of Apparent Diffusion Coefficient to Quantitatively Study Partial Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in a Rabbit Model. *Transplant Proc.* 2011 Jun;43(5):1474–9.

224. Guo C wei, Shen S di, Zhang Y, Yi X lin, Liang C, Luo W. Perfusion Computed Tomography Evaluation of Partial Hepatic Ischemia Reperfusion in a Rabbit Model. *Acad Radiol*. 2011 Oct;18(10):1311–7.
225. Gasbarrini A, Addolorato G, Campi CD, Simoncini M, Montemagno S, Castagneto M, et al. Gender Affects Reperfusion Injury in Rat Liver. *Dig Dis Sci*. 2001;46(6).
226. Lü P. Gender differences in hepatic ischemic reperfusion injury in rats are associated with endothelial cell nitric oxide synthase-derived nitric oxide. *World J Gastroenterol*. 2005;11(22):3441.
227. Burkhardt M, Slotta JE, Garcia P, Seekamp A, Menger MD, Pohlemann T. The effect of estrogen on hepatic microcirculation after ischemia/reperfusion. *Int J Colorectal Dis*. 2007 Nov 15;23(1):113–9.
228. Shen SQ, Zhang Y, Xiong CL. The Protective Effects of 17 β -Estradiol on Hepatic Ischemia–Reperfusion Injury in Rat Model, Associated with Regulation of Heat-Shock Protein Expression. *J Surg Res*. 2007 Jun;140(1):67–76.
229. Soric S, Belanger MP, Askin N, Wittnich C. Impact of Female Sex Hormones on Liver Tissue Lactic Acidosis During Ischemia. *Transplantation*. 2007 Sep 27;84(6):763–70.
230. Wiwanitkit V. Quantum chemical analysis of the deferiprone–iron binding reaction. *Int J Nanomedicine*. 2006 Mar;1(1):111–3.
231. Jing L, Yao L, Zhao M, Peng L ping, Liu M. Organ preservation: from the past to the future. *Acta Pharmacol Sin*. 2018 May;39(5):845–57.
232. Bellini MI, Nozdrin M, Yiu J, Papalois V. Machine Perfusion for Abdominal Organ Preservation: A Systematic Review of Kidney and Liver Human Grafts. *J Clin Med*. 2019 Aug 15;8(8):1221.
233. Wyllie S, Seu P, Gao FQ, Goss JA. Deregulation of iron homeostasis and cold-preservation injury to rat liver stored in University of Wisconsin solution. *Liver Transpl*. 2003 Apr;9(4):401–10.
234. Huang H, He Z, Roberts LJ, Salahudeen AK. Deferoxamine Reduces Cold-Ischemic Renal Injury in a Syngeneic Kidney Transplant Model. *Am J Transplant*. 2003 Dec;3(12):1531–7.
235. Banker A, Bhatt N, Rao PS, Agrawal P, Shah M, Nayak M, et al. A Review of Machine Perfusion Strategies in Liver Transplantation. *J Clin Exp Hepatol*. 2023 Mar 1;13(2):335–49.
236. Bruinsma BG, Yeh H, Ozer S, Martins PN, Farmer A, Wu W, et al. Subnormothermic machine perfusion for ex vivo preservation and recovery of the human liver for transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2014 Jun;14(6):1400–9.
237. Kerkweg U, Li T, De Groot H, Rauen U. Cold-induced apoptosis of rat liver cells in University of Wisconsin solution: The central role of chelatable iron. *Hepatology*. 2002 Mar;35(3):560–7.

238. Rauen U, Petrat F, Li T, De Groot H. Hypothermia injury/cold-induced apoptosis--evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂-/H₂O₂ formation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2000 Oct;14(13):1953–64.
239. Williams RE, Zweier JL, Flaherty JT. Treatment with deferoxamine during ischemia improves functional and metabolic recovery and reduces reperfusion-induced oxygen radical generation in rabbit hearts. *Circulation.* 1991 Mar;83(3):1006–14.
240. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Mar;84(5):1404–7.
241. Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C, et al. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab.* 2016 Feb 9;23(2):254–63.
242. Martin JL, Costa ASH, Gruszczuk AV, Beach TE, Allen FM, Prag HA, et al. Succinate accumulation drives ischaemia-reperfusion injury during organ transplantation. *Nat Metab.* 2019 Oct;1(10):966–74.
243. Merkofer M, Kissner R, Hider RC, Brunk UT, Koppenol WH. Fenton chemistry and iron chelation under physiologically relevant conditions: Electrochemistry and kinetics. *Chem Res Toxicol.* 2006 Oct;19(10):1263–9.
244. Zhou T, Ma Y, Kong X, Hider RC. Design of iron chelators with therapeutic application. *Dalton Trans.* 2012 May 8;41(21):6371–89.
245. Wang H, Xi Z, Deng L, Pan Y, He K, Xia Q. Macrophage Polarization and Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *Int J Med Sci.* 2021 Jan 1;18(5):1104–13.
246. Heijnen BHM, Elkhouloufi Y, Straatsburg IH, Van Gulik TM. Influence of acidosis and hypoxia on liver ischemia and reperfusion injury in an in vivo rat model. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2002 Jul;93(1):319–23.
247. Falcão SC, Pereira Junior JR, Coelho AR de B. Technique of blind tracheal intubation in rabbits (*Oryctolagus cuniculi*) supported by previous maneuver of esophageal cannulization. *Acta Cir Bras.* 2011 Oct;26(5):352–6.
248. Balbinotto RP, Trindade MRM, Meyer FS, Muller ALL, Rosa Jr A da, Nunes AG, et al. Anesthetic protocol for videolaparoscopic surgery in rabbits. *Acta Cir Bras.* 2010 Feb;25(1):121–5.
249. Weinstein CH, Fujimoto JL, Wishner RE, Newton PO. Anesthesia of six-week-old New Zealand White rabbits for thoracotomy. *Contemp Top Lab Anim Sci.* 2000 May;39(3):19–22.
250. Yershov AL, Jordan BS, Fudge JM, Dubick MA. Influence of the mode of ventilation on ketamine/xylazine requirements in rabbits. *Vet Anaesth Analg.* 2007 May;34(3):157–63.
251. Mongardon N, Kohlhauer M, Lidouren F, Hauet T, Giraud S, Hutin A, et al. A Brief Period of Hypothermia Induced by Total Liquid Ventilation Decreases End-Organ Damage and

Multiorgan Failure Induced by Aortic Cross-Clamping: *Anesth Analg*. 2016 Sep;123(3):659–69.

252. Kanoria S, Glantzounis G, Quaglia A, Dinesh S, Fusai G, Davidson BR, et al. Remote preconditioning improves hepatic oxygenation after ischaemia reperfusion injury: Remote IPC the liver. *Transpl Int*. 2012 Jul;25(7):783–91.
253. Chen H, Ma Y, Ying L. Effects of Ginseng Polysaccharides on Hepatocellular Energy Metabolism in Hepatic Ischemia Reperfusion Injury in Rabbits. *J Liver [Internet]*. 2012 [cited 2019 Jul 14];01(02). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/effects-of-ginseng-polysaccharides-on-hepatocellular-energy-metabolism-in-hepatic-ischemia-reperfusion-injury-in-rabbits-2167-0889-1-107.php?aid=6411>
254. Matsumoto T, Yamaguchi M, Kikuchi H, Nakano H, Midorikawa T, Kumada K, et al. Heparin reduces serum levels of endothelin-1 and hepatic ischemia reperfusion injury in rabbits. *Surg Today*. 2000 Jun;30(6):523–5.
255. Langdale LA, Kajikawa O, Frevert C, Liggitt HD. Sustained Tolerance to Lipopolysaccharide After Liver Ischemia-Reperfusion Injury: *Shock*. 2003 Jun;19(6):553–8.
256. Morgan TJ, Glowaski MM. Teaching a new method of rabbit intubation. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2007;46(3):32–6.
257. Phaneuf LR, Barker S, Groleau MA, Turner PV. Tracheal injury after endotracheal intubation and anesthesia in rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2006;45(6):67–72.
258. Stephens DeValle JM. Successful management of rabbit anesthesia through the use of nasotracheal intubation. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009;48(2):166–70.
259. Imai A, Eisele PH, Steffey EP. A new airway device for small laboratory animals. *Lab Anim*. 2005;39(1):111–5.
260. Grint NJ, Sayers IR, Cecchi R, Harley R, Day MJ. Postanaesthetic tracheal strictures in three rabbits. *Lab Anim*. 2006;40(3):301–8.
261. Gografe SI, Wilson JS, Johnson BL, Rushing G, Bowser A, Parker JL, et al. Successful management of long-term general anesthesia in rabbits used as an animal model of human disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2003;42(2):16–9.
262. Kontoghiorghes CN, Kontoghiorghes GJ. Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drug Des Devel Ther*. 2016 Jan 29;10:465–81.
263. Barbouti A, Amorgianiotis C, Kolettas E, Kanavaros P, Galaris D. Hydrogen peroxide inhibits caspase-dependent apoptosis by inactivating procaspase-9 in an iron-dependent manner. *Free Radic Biol Med*. 2007 Nov 15;43(10):1377–87.

264. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol.* 2014 Dec;16(12):1180–91.
265. Li Y, Feng D, Wang Z, Zhao Y, Sun R, Tian D, et al. Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion. *Cell Death Differ.* 2019 Nov;26(11):2284–99.
266. Li W, Feng G, Gauthier JM, Lokshina I, Higashikubo R, Evans S, et al. Ferroptotic cell death and TLR4/Trif signaling initiate neutrophil recruitment after heart transplantation. *J Clin Invest.* 2019 Feb 26;129(6):2293–304.
267. Fang X, Wang H, Han D, Xie E, Yang X, Wei J, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci.* 2019 Feb 12;116(7):2672–80.
- .