



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Επίδραση δεφεριπρόνης
σε in vivo μοντέλο αυτόλογης νεφρικής μεταμόσχευσης
(Πειραματική μελέτη σε χοίρους)**

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Ι. ΤΑΤΣΗΣ
Χειρουργός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**Επίδραση δεφεριπρόνης
σε in vivo μοντέλο αυτόλογης νεφρικής μεταμόσχευσης
(Πειραματική μελέτη σε χοίρους)**

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ Ι. ΤΑΤΣΗΣ

Χειρουργός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

«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 του κ. Τάτση Βασιλείου: 20-5-2010

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 693^α/21-9-2010

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Μήτσης Μιχαήλ, Επίκουρος Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Φατούρος Μιχαήλ, Καθηγητής Χειρουργικής και Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Χαρίσης Χαράλαμπος, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 29-3-2011

«Επίδραση δεφεριπρόνης σε in vivo μοντέλο αυτόλογης νεφρικής μεταμόσχευσης (Πειραματική μελέτη σε χοίρους)»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 798^α/6-6-2017

Φατούρος Μιχαήλ	Ομότιμος Καθηγητής Χειρουργικής, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Κάτσιος Χρήστος	Καθηγητής Χειρουργικής, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Μήτσης Μιχαήλ	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Νάστος Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Χαρίσης Χαράλαμπος	Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Γαλάνη Βασιλική	Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας- Ιστολογίας-Εμβρυολογίας, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
Ντουνούση Ευαγγελία	Επίκουρη Καθηγήτρια Νεφρολογίας με έμφαση στις Μεταμοσχεύσεις, του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 7-12-2017

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μηνάς Πασχόπουλος

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Στους γονείς μου Γιάννη και Νόνη,
για την αγάπη, την παιδεία και την υποστήριξη που μου προσέφεραν.

Στο μέντορα, δάσκαλο, φίλο και «πατέρα» μου στην Ιατρική
Μιχάλη Μήτση, Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων,
για την εμπιστοσύνη, τη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου έδωσε.

Στη Μαρία,

για την υπομονή, τη συμπαράσταση και την αγάπη της.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πραγματοποίηση της Διδακτορικής Διατριβής αποτέλεσε για μένα ένα κοπιαστικό, αλλά και παράλληλα ένα μαγευτικό ταξίδι. Η χαρά και η ικανοποίησή μου για την ολοκλήρωσή της είναι απεριόριστη. Ωστόσο, στο ταξίδι αυτό δεν ήμουν μόνος. Στην πορεία αυτή είχα μαζί μου αξιόλογους συνοδοιπόρους και συνεργάτες, που με την ενεργό συμμετοχή τους με βοήθησαν να ξεπεράσω σημαντικά εμπόδια. Για τον λόγο αυτό θα ήταν μεγάλη παράλειψή μου να μην τους ευχαριστήσω.

Πρώτα από όλα, ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς τον μέντορα, δάσκαλό, φίλο και «πατέρα» μου στην Ιατρική, τον επιβλέποντα της Διδακτορικής Διατριβής μου κ. Μιχάλη Μήτση, Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων Π.Ι., για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αναθέτοντας μου το θέμα αυτό και τη δυνατότητα για τη διεκπεραίωση του δύσκολου αυτού έργου. Τον ευχαριστώ επίσης, γιατί στάθηκε αρωγός σε όλα τα στάδια της προσπάθειας αυτής, επιλύοντας όλα τα προβλήματα που κατά καιρούς εμφανίζονταν και βοηθώντας με έμπρακτα μέχρι το τελευταίο στάδιο της μελέτης. Και με την ευκαιρία, θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω, για ό,τι έχει κάνει για εμένα σε σχέση με την ιατρική και χειρουργική μου εκπαίδευσή και την επαγγελματική μου πορεία. Για πράξεις βαθιά αλτρουιστικές, που μπορούν να παρομοιαστούν μόνο με πράξεις γονέων προς τα παιδιά τους.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, κ.κ. Μιχάλη Φατούρο, Ομότιμο Καθηγητή Χειρουργικής Π.Ι. και Χαράλαμπο Χαρίση, Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων Π.Ι., για την υποστήριξή τους στην εκπόνηση της παρούσης Διδακτορικής Διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά την κα. Ελένη Μπαϊρακτάρη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας Π.Ι., για τη δυνατότητα χρησιμοποίησης του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Π.Γ.Ν.Ιωαννίνων, για την αποθήκευση, συντήρηση και φυγοκέντρηση των δειγμάτων αίματος μέχρι την ανάλυσή τους, αλλά και τη δυνατότητα συνεργασίας μου με τον κ. Χρήστο Τζάλλα, Βιολόγο, τον οποίο επίσης θερμά ευχαριστώ, για τη βοήθειά του στην ανάλυση των δειγμάτων.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον κ. Ιωάννη Σαΐνη, Βιολόγο-ΕΔΙΠ Π.Ι. και την κα. Δήμητρα Κουμάση, Βιολόγο, συνεργάτες του ΚΕ.ΒΙ.ΚΑ.ΠΙ, για την βοήθειά τους στην πραγματοποίηση μεθόδων ανάλυσης δειγμάτων αίματος (ELISA), προς υπολογισμό της συγκέντρωσης των 8-ισοπροστανίων.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης, στις κες Βασιλική Γαλάνη, Επίκουρη Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας Π.Ι. και Ευαγγελή Λάμπρη-Καλογερά, Ιατρό Παθολογοανατόμο, για την ιστολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη των νεφρικών μοσχευμάτων.

Ευχαριστώ επίσης, τον κ. Δημήτρη Αθανασούλα, Νοσηλευτή Ανασθησιολογικού του Π.Γ.Ν.Ι., για την βοήθειά του στην αναισθησία και διεγχειρητική παρακολούθηση των πειραματόζωων.

Εγκάρδια ευχαριστώ τους κ.κ. Οδυσσέα Ανδρούτσο και Αντώνη Μακρή, Νοσηλευτές-Χειριστές της μηχανής εξωσωματικής κυκλοφορίας του χειρουργείου του Π.Γ.Ν.Ι. για την ανιδιοτελή βοήθειά τους με τη σύνδεση των νεφρικών μοσχευμάτων στη μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας στα πειράματα.

Ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την κα. Παπαδοπούλου Χρυσάνθη, Καθηγήτρια Μικροβιολογίας Π.Ι. για την υποστήριξή της στο πειραματικό πρωτόκολλο.

Ακόμα, να ευχαριστήσω τον κ. Σιαμόπουλο Κωνσταντίνο, Ομότιμο Καθηγητή Παθολογίας/Νεφρολογίας Π.Ι. για την ευγενική χορηγία των διαλυμάτων έκπλυσης.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου Γιάννη και Νόνη, για την πολύπλευρη υποστήριξη και βοήθειά τους, χωρίς την οποία η ολοκλήρωση της Διδακτορικής αυτής Διατριβής θα ήταν αδύνατη.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι μεταμοσχεύσεις οργάνων αποτελούν μια από τις πλέον αξιοσημείωτες εξελίξεις στην ιστορία της Ιατρικής. Παρότι, τα αμιγώς τεχνικά-χειρουργικά ζητήματα είχαν ξεπεραστεί από τις αρχές ήδη του 20^{ου} αιώνα, το μεγάλο εμπόδιο της ανοσιακής απόρριψης εξακολουθούσε να αποτελεί σημαντικό φραγμό στην εξέλιξή τους. Δεν είναι τυχαίο, πως η πρώτη επιτυχής μεταμόσχευση νεφρού πραγματοποιήθηκε το 1954 μεταξύ ομοζυγωτικών διδύμων. Από τότε και καθόλη τη διάρκεια του δευτέρου μισού του περασμένου αιώνα, η εντατική έρευνα των σχετικών ανοσολογικών μηχανισμών, αλλά και η ανακάλυψη και χρησιμοποίηση πανίσχυρων ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων, είχαν ως αποτέλεσμα την ραγδαία πρόοδο των μεταμοσχεύσεων, ώστε σήμερα να αποτελούν καθημερινή θεραπευτική πρακτική παγκοσμίως. Έτσι, δεν θα ήταν υπερβολή να ισχυριστεί κάποιος, πως σήμερα η προσπάθεια βελτίωσης των αποτελεσμάτων των μεταμοσχεύσεων, έχει μετατοπιστεί από το πεδίο της ανοσοβιολογίας, σε αυτό της επιστήμης της συντήρησης των μεταμοσχευόμενων συμπαγών οργάνων.

Έχει ειπωθεί, πως η μεταμόσχευση νεφρού έχει πέσει θύμα της επιτυχίας της. Με τα ιδιαίτερα ικανοποιητικά αποτελέσματα των τελευταίων δύο δεκαετιών, ολοένα και περισσότεροι ασθενείς εγγράφονται στις αντίστοιχες λίστες αναμονής, με αποτέλεσμα η προσφορά να υπολείπεται καταφανέστατα της ζήτησης. Αυτό με τη σειρά του έχει οδηγήσει στην ανάγκη χρησιμοποίησης ακόμη και μη βέλτιστων μοσχευμάτων, ενώ παράλληλα οι πολύπλοκες προεγχειρητικές διευθετήσεις επιλογής και προετοιμασίας του καταλληλότερου λήπτη, έχουν επαναφέρει στο προσκήνιο την προσπάθεια περιορισμού της ιστικής βλάβης του μοσχεύματος κατά τη φάση της συντήρησής του. Παρότι, η απλή στατική υποθερμική (ψυχρή) συντήρηση στον πάγο (4-6°C) είναι η συνηθέστερη μέθοδος, όλο και συχνότερη γίνεται η χρησιμοποίηση τεχνικών μηχανικής έκπλυσης-συντήρησης, που φαίνεται να βελτιώνουν τα αποτελέσματα, ειδικά όταν χρησιμοποιούνται «οριακά» μοσχεύματα. Επιπλέον, διεθνώς καταβάλλεται σημαντική ερευνητική προσπάθεια στην κατεύθυνση μείωσης της περαιτέρω ιστικής βλάβης, που προκαλείται κατά την επαναιμάτωση λόγω του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και του επακόλουθου οξειδωτικού stress.

Σκοπό της μελέτης αυτής αποτέλεσε η μελέτη της πιθανής προστατευτικής επίδρασης του σιδηροδεσμευτικού παράγοντα δεφεριπρόνη (L1), σε πειραματικό μοντέλο

αυτομεταμόσχευσης νεφρού σε χοίρους. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες, που δείχνουν σχετική ευεργετική επίδραση του κλασικού σιδηροδεσμευτικού παράγοντα δεσφεροξαμίνη σε αντίστοιχα μοντέλα. Όμως, η χρησιμοποίηση της L1 έχει πραγματοποιηθεί μόνο σε πειραματικές και κλινικές μελέτες σε ασθενείς με υπερφόρτωση σιδήρου, δείχνοντας μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τη δεσφεροξαμίνη, αλλά ποτέ σε μοντέλα μεταμόσχευσης. Η αρχική σύλληψη της ιδέας χρησιμοποίησης της L1 σε πειραματική διάταξη αυτομεταμόσχευσης νεφρού βασίστηκε στη γενική αποδοχή της ταχύτερης εισόδου της (διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών) εντός του κυτταροπλάσματος, σε σχέση με τη δεσφεροξαμίνη. Ως εκ τούτου, είναι λογικό να αναμένεται ισχυρότερη σιδηροδεσμευτική δράση έναντι του ελεύθερου εντός του κυτταροπλάσματος σιδήρου. Λαμβανομένου υπόψη, πως ο σίδηρος ως μέταλλο μετάπτωσης κατέχει κεντρικό ρόλο στις διαδικασίες του οξειδωτικού stress, η ανάγκη ελέγχου της πιθανής προστατευτικής δράσης της L1 κατέστη στη συλλογιστική μας απαραίτητη.

Στο Γενικό Μέρος της Διδακτορικής Διατριβής αρχικά παρουσιάζεται μια συνοπτική περιγραφή της ιστορίας των μεταμοσχεύσεων και αναφέρονται ειδικότερα τα αποτελέσματα της μεταμόσχευσης νεφρού. Εν συνεχεία, αναλύονται οι μέθοδοι συντήρησης των νεφρικών μοσχευμάτων και τα αντίστοιχα ειδικά διαλύματα. Εκτενής αναφορά γίνεται στους μηχανισμούς του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και στον κεντρικό ρόλο του σιδήρου σε αυτό. Περιγράφεται ο μηχανισμός δημιουργίας των δραστικών μορφών οξυγόνου και οι επιβλαβείς κυτταρικές συνέπειές τους. Το Γενικό Μέρος ολοκληρώνεται με την ανάλυση των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών χαρακτηριστικών της δεφεριπρόνης, την αποτελεσματικότητά της στη σιδηροδέσμευση, καθώς και τις παρενέργειές της.

Στο Ειδικό Μέρος περιγράφονται αναλυτικά όλες οι δυνατές θέσεις αυτομεταμόσχευσης νεφρού σε χοίρους που έχουν μέχρι σήμερα εφαρμοστεί (υπονεφρική αορτή και κάτω κοίλη φλέβα, έξω λαγόνια αρτηρία και φλέβα και νεφρικά αγγεία) και σχολιάζονται τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της κάθε μεθόδου. Η απόρριψη των μοντέλων αυτών μας οδήγησε στην εφαρμογή μιας νέας, μη περιγραφείσης μέχρι σήμερα χειρουργικής μεθόδου, η μεθοδολογία της οποίας αναλύεται διεξοδικά. Ακολουθεί η περιγραφή της μεθοδολογίας καθορισμού των ομάδων μελέτης και ελέγχου, της χρησιμοποίησης της L1, της συλλογής των δειγμάτων και της ανάλυσής τους. Στη συνέχεια, αναλύονται και συγκρίνονται τα αποτελέσματα των δύο ομάδων και ακολουθεί η συζήτηση σε σχέση με τη διεθνή βιβλιογραφία και η παράθεση των συμπερασμάτων.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες.....	1
Πρόλογος.....	3
Περιεχόμενα.....	5
Γενικό Μέρος	
Κεφάλαιο 1 – Σύντομη ιστορική αναδρομή των Μεταμοσχεύσεων.....	11
Κεφάλαιο 2 – Αποτελέσματα μεταμόσχευσης νεφρού	17
Κεφάλαιο 3 – Τρόποι συντήρησης νεφρικού μοσχεύματος.....	21
3.1 Παθοφυσιολογία ιστικής βλάβης νεφρικού μοσχεύματος κατά τη συντήρηση	21
3.2 Τα κύρια διαλύματα συντήρηση νεφρικού μοσχεύματος.....	24
3.3 Υποθερμική απλή συντήρηση.....	27
3.4 Υποθερμική μηχανική έκπλυση.....	28
3.5 Μελλοντικές προοπτικές.....	30
Κεφάλαιο 4 – Σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στη μεταμόσχευση νεφρού	33
4.1 Υπερφόρτωση ασβεστίου	33
4.2 Οξειδωτικό stress	34
4.3 Το stress του ενδοπλασματικού δικτύου.....	35
4.4 Δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων.....	36
4.5 Ενεργοποίηση απόπτωσης	37
4.6 Ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης.....	38
4.7 Φλεγμονή και σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης	38
4.8 Κλινικές συνέπειες του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στο νεφρικό μόσχευμα	39
Κεφάλαιο 5 – Σίδηρος και σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης.....	41
5.1 Συνοπτική φυσιολογία του μεταβολισμού του σιδήρου	41
5.2 Δεξαμενή ασταθούς σιδήρου (labile iron pool, LIP)	42
5.3 Ο ρόλος της LIP στο σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης.....	44

Κεφάλαιο 6 – Οξειδωτικό stress	47
6.1 Ορισμός οξειδωτικού stress	47
6.2 Χημική δομή οξυγόνου.....	47
6.3 Παραγωγή ROS	48
6.4 Το νιτρικό οξύ (NO) και η συμμετοχή του στο οξειδωτικό stress	50
6.5 Μονοπάτια που περιλαμβάνουν τη δημιουργία ROS	51
6.5.1 Υποδοχείς κυτοκινών.....	51
6.5.2 Υποδοχείς πρωτεϊνικής κινάσης	51
6.5.3 Κινάση σερίνης/θρεονίνης.....	52
6.5.4 Υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνη.....	52
6.5.5 Υποδοχείς διαύλων ιόντων	52
6.6 Μιτοχόνδρια και παραγωγή ROS-NO	52
6.7 Δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου.....	55
6.8 Συνέπειες του οξειδωτικού stress	55
6.8.1 Επίδραση του οξειδωτικού stress στις πρωτεΐνες	55
6.8.2 Επίδραση του οξειδωτικού stress στα λιπίδια.....	56
6.8.3 Επίδραση του οξειδωτικού stress στο DNA.....	56
6.8.4 Επίδραση του οξειδωτικού stress στη μεταγωγή σήματος.....	56
6.9 Γλουταθειόνη και οξειδωτικό stress	58
Κεφάλαιο 7 – Δεφεριπρόνη	61
7.1 Φαρμακοκινητική	61
7.2 Φαρμακοδυναμική	63
7.3 Ενδοκυττάρια διείσδυση της δεφεριπρόνης.....	63
7.4 Αποτελεσματικότητα της δεφεριπρόνης.....	64
7.5 Βέλτιστη δόση της δεφεριπρόνης	64
7.6 Παρενέργειες της δεφεριπρόνης	65
Ειδικό Μέρος	
Κεφάλαιο 8 – Σκοπός της πειραματικής μελέτης	69
Κεφάλαιο 9 – Υλικό και μέθοδος	71
9.1 Υλικό (πειραματόζωα).....	71
9.2 Μέθοδος.....	72

9.2.1 Σχεδιασμός πειραματικού πρωτοκόλλου	72
9.2.2 Χορήγηση δεφεριπρόνης	74
9.2.3 Αναισθησιολογικό πρωτόκολλο	75
9.2.4 Τοποθέτηση κεντρικής φλεβικής γραμμής και χειρουργική τεχνική αριστερής νεφρεκτομής δότη	75
9.2.5 Σύνδεση νεφρικού αυτομοσχεύματος στη μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας και συντήρησή του	78
9.2.6 Χειρουργική τεχνική αυτομεταμόσχευσης νεφρού σε χοίρο.....	79
9.2.7 Μετεγχειρητική φροντίδα.....	89
9.2.8 Δειγματοληψία-ευθανασία.....	90
9.3 Βιοχημική ανάλυση δειγμάτων και μέτρηση βάρους νεφρικών αυτομοσχευμάτων	90
9.4 Μέτρηση των 8-ισοπροστανίων.....	91
9.5 Ιστολογική εξέταση	92
9.6 Ανοσοϊστοχημική εξέταση.....	93
9.7 Στατιστική ανάλυση.....	96
Κεφάλαιο 10 – Αποτελέσματα	97
10.1 CK/LDH διαλύματος συντήρησης και βάρος νεφρικού αυτομοσχεύματος	98
10.2 Ουρία και κρεατινίνη	100
10.3 8-ισοπροστάνια	104
10.4 Ιστοπαθολογικός δείκτης	105
10.5 Διακυττάριο μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1)	108
10.6 Μόριο προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων-1 (VCAM-1).....	110
Κεφάλαιο 11 – Συζήτηση	119
Κεφάλαιο 12 – Συμπεράσματα.....	125
Περίληψη	127
Summary.....	129
Βιβλιογραφία	131

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΣΥΝΤΟΜΗ ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ



Εικόνα 1.1: Οι Shiva, Parvati και Ganesha¹



Εικόνα 1.2: Νόμισμα της Σικυώνας με απεικόνιση χίμαιρας, 4^{ος} αιώνας π.Χ.²

Αναφορές σχετικές με τις μεταμοσχεύσεις ιστών και οργάνων υπάρχουν σε μυθολογικά και θρησκευτικά κείμενα πολλών λαών, όπως επίσης και σε αντικείμενα τέχνης καθόλη τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας. Σε Ινδουιστικό κείμενο του 2.500 με 3.000 π.Χ. αναφέρεται η μεταμόσχευση δέρματος από το γλουτό ή το πιγούνι ασθενούς, για την αναδόμηση της μύτης του, η οποία είχε ακρωτηριαστεί ως τιμωρία για εγκλήματα που είχε διαπράξει. Σε έναν μύθο του 12^{ου} αιώνα π.Χ., ο άρχοντας Ganesha, γιος των Parvati και Shiva, αποκεφαλίστηκε από τον πατέρα του, ενώ προστάτευε τη μητέρα του κατά τη διάρκεια του μπάγιου της. Ο Ganesha επέστρεψε στη ζωή, αφού του μεταμοσχεύτηκε ένα κεφάλι ελέφαντα (εικόνα 1.1). Στην Ιλιάδα, ο Όμηρος αναφέρεται σε ένα τέρας που πετούσε φωτιά με την αναπνοή του, είχε κεφάλι λιονταριού, σώμα αίγας, ουρά φιδιού και ονομάζονταν Χίμαιρα (εικόνα 1.2). Σε έναν κινέζικο μύθο, ο ιατρός Pien Chiao, ο οποίος απεβίωσε το 310 π.Χ., αντάλλαξε τις καρδιές μεταξύ ενός άνδρα με δυνατό πνεύμα και αδύναμη θέληση, με έναν άνδρα με αδύναμο πνεύμα και δυνατή θέληση, έτσι ώστε να επιτευχθεί ισορροπία. Στη Βίβλο υπάρχουν αρκετές αναφορές, που θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ως μεταμόσχευση. Στο Χριστιανισμό από τον 3^ο αιώνα μ.Χ., περιγράφεται το «θαύμα του μαύρου ποδιού»



Εικόνα 1.3: Μεταμόσχευση κάτω άκρου από τους Αγίους Κοσμά και Δαμιανό βοηθούμενοι από αγγέλους, 16^{ος} αιώνας μ.Χ.¹

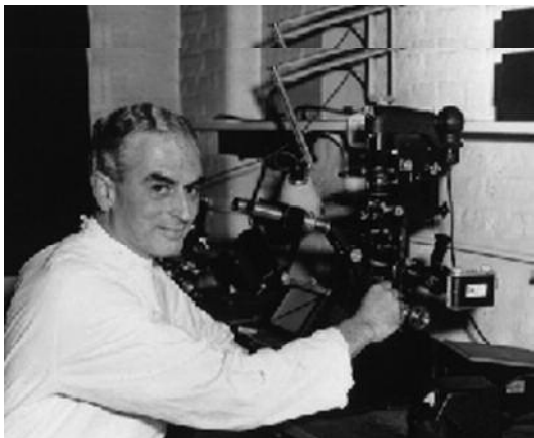


Εικόνα 1.4: Alexis Carrel³

στο Jacopo da Varagine's *Legenda Aurea* (348 μ.Χ.), στο οποίο οι προστάτες Άγιοι των χειρουργών, Κοσμάς και Δαμιανός, αντικατέστησαν το γαγγραινώδες πόδι ενός ασθενούς, με το πόδι ενός πρόσφατα αποβιώσαντος Αιθίοπα στρατιώτη (εικόνα 1.3).^{1,3,4,5}

Ο Ελβετός χειρουργός Theodor Kocher (1841-1917, Βραβείο Nobel 1909), ο οποίος κατέστησε τη θυρεοειδεκτομή μία ασφαλή επέμβαση, το 1883 μεταμόσχευσε θυρεοειδικό ιστό σε ασθενή που εμφάνισε υποθυρεοειδισμό μετά από ριζική θυρεοειδεκτομή.¹ Στη Γαλλία, ο Alexis Carrel (1873-1944, Βραβείο Nobel 1912, εικόνα 1.4), πραγματοποίησε αυτομεταμόσχευση νεφρού ενός σκύλου στο λαιμό του και τελειοποίησε την τεχνική των αγγειακών αναστομώνσεων, με τη μέθοδο της τριγωνοποίησης.^{1,4-6} Ωστόσο, η πρώτη τεχνικά επιτυχημένη μεταμόσχευση νεφρού σε πειραματόζωα, επιτεύχθηκε από τον Emerich Ullmann, ο οποίος το 1902 πραγματοποίησε αυτομεταμόσχευση νεφρού σε σκύλο και ξενομεταμόσχευση νεφρού από σκύλο σε αίγα.^{3,5} Κατά τον 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο, υπήρξε μεγάλη ανάγκη θεραπείας των σοβαρών εγκαυμάτων και ο Peter Medawar (1915-1987, Βραβείο Nobel 1960 - εικόνα 1.5) ερεύννησε τον μηχανισμό απόρριψης δερματικών αλλομοσχευμάτων, θέτοντας τις βάσεις της σύγχρονης ανοσολογίας της απόρριψης.^{1,4,5,7}

Παράλληλα με την πρόοδο των γνώσεων σε σχέση με τους ανοσολογικούς μηχανισμούς απόρριψης των μοσχευμάτων, επήλθε και ανάλογη πρόοδος σε σχέση με την ανάπτυξη ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων. Η συνεργασία των Gertrude Elion (1918-1999) και George Hitchings (1905-1998) απέδωσε τη δημιουργία νέων



Εικόνα 1.5: Peter Medawar¹



Εικόνα 1.5: Ο Joseph Murray (πίσω αριστερά) που πραγματοποίησε την πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση νεφρού στους διδύμους Richard και Ron Herrick το 1954¹

χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, όπως η αζαθειοπρίνη, που προήλθε από την επεξεργασία της 6-μερκαπτοπουρίνης. Η αζαθειοπρίνη ήταν για πολλά χρόνια το μόνο διαθέσιμο φάρμακο για την αποτροπή της απόρριψης.¹

Το 1933, ο Σοβιετικός χειρουργός Yu Yu Voronoy πραγματοποίησε την πρώτη μεταμόσχευση νεφρού από άνθρωπο σε άνθρωπο, αλλά η καθυστερημένη λήψη του νεφρικού μοσχεύματος, που πραγματοποιήθηκε 6 ώρες μετά το θάνατο του δότη και η ασυμβατότητα των ομάδων αίματος δότη και λήπτη είχαν ως συνέπεια την άμεση αποτυχία της μεταμόσχευσης.³⁻⁶ Η πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση νεφρού σε κλινικό επίπεδο έγινε την 23 Δεκεμβρίου 1954 από τον Joseph Murray (1919-2012, Βραβείο Nobel 1990) στο Νοσοκομείο Peter Bent Brigham της Βοστώνης, μεταξύ δύο ομοζυγωτικών διδύμων (εικόνα 1.6). Ο λήπτης έζησε 8 χρόνια χωρίς απόρριψη του μοσχεύματος.^{1, 4, 5, 6} Στις αρχές της δεκαετίας του 1960, ο Thomas Starzl (1926-2017) απέδειξε ότι οι υψηλές δόσεις πρεδνιζόνης, σε συνδυασμό με αζαθειοπρίνη, μπορούν να αποτρέψουν την απόρριψη του νεφρικού μοσχεύματος.¹ Ακόμα, το 1967, πραγματοποίησε την πρώτη επιτυχημένη μεταμόσχευση ήπατος σε άνθρωπο.^{1, 4, 7, 8} Το 1968, ο Sir Roy Calne,

ίδρυσε το δεύτερο κέντρο μεταμόσχευσης ήπατος στο Cambridge της Αγγλίας (εικόνα 1.6).^{1,4}

Το 1963, ο James Hardy (1918-2003) πραγματοποίησε την πρώτη μεταμόσχευση πνεύμονα σε ένα φυλακισμένο, ο οποίος υπέφερε από χρόνια λοίμωξη των πνευμόνων. Ο λήπτης επέζησε για 18 ημέρες.^{1, 8} Το 1966, ο C. Walton Lillehei (1918-1999)

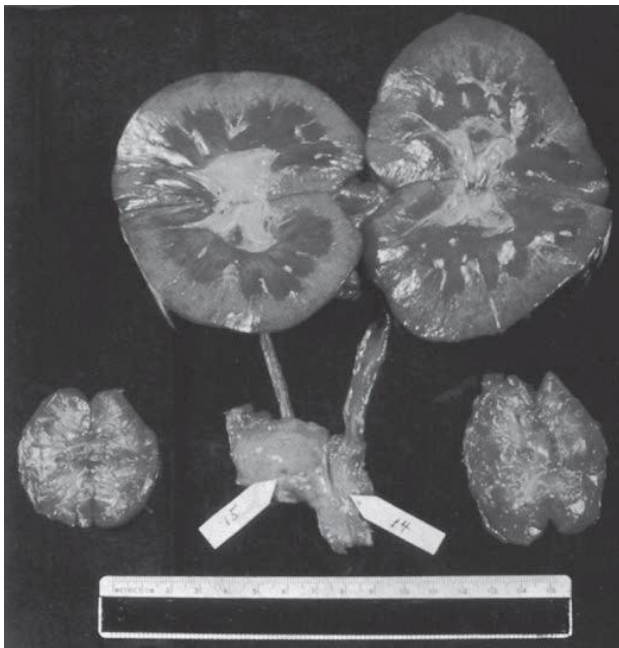


Εικόνα 1.5: Οι Thomas Starzl (αριστερά) και Sir Roy Calne (δεξιά)¹

πραγματοποίησε την πρώτη μεταμόσχευση παγκρέατος στο Πανεπιστήμιο της Μινεσότα.^{1, 8} Η πρώτη μεταμόσχευση καρδιάς σε άνθρωπο πραγματοποιήθηκε από τον Dr. Christiaan Barnard (1922-2001), το 1967 στο Capetown της Νότιας Αφρικής. Ο ασθενής επέζησε για 18 ημέρες.^{1, 7, 8}

Η έννοια του εγκεφαλικού θανάτου εισήχθη το 1968, από ad hoc επιτροπή της Ιατρικής Σχολής του Harvard, δίνοντας τεράστια ώθηση στην εξέλιξη των μεταμοσχεύσεων.^{1, 9} Άλλη μεγάλη εξέλιξη αποτέλεσε η ανακάλυψη των ανοσοτροποποιητικών ιδιοτήτων της κυκλοσπορίνης, από τον Jean Borel το 1977.^{1, 5, 7, 10, 11} Η κυκλοσπορίνη εφαρμόστηκε κλινικά το 1978 και έλαβε έγκριση από το FDA των ΗΠΑ το 1983.¹ Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, το Tacrolimus (FK 506) ερευνήθηκε κλινικά από την ομάδα του Starzl, στο Πανεπιστήμιο του Pittsburgh, σε λήπτες ηπατικού μοσχεύματος, οι οποίοι εμφάνιζαν ανθεκτική στην κυκλοσπορίνη απόρριψη του μοσχεύματος.^{1, 12} Η εισαγωγή των αναστολέων καλσινευρίνης (Κυκλοσπορίνη και Tacrolimus) βελτίωσε δραματικά την επιβίωση, τόσο των ασθενών, όσο και των μοσχευμάτων.¹

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η προσπάθεια ξενομεταμοσχεύσεων. Το 1906, ο Jaboulay πραγματοποίησε τις δύο πρώτες ξενομεταμοσχεύσεις νεφρού σε άνθρωπο, μία από χοίρο και μία από αίγα.^{3, 4} Ο Ernst Unger, το 1909, ήταν ο δεύτερος που πραγματοποίησε ξενομεταμόσχευση νεφρού σε άνθρωπο, χρησιμοποιώντας νεφρούς πιθήκου. Κανένα από αυτά τα ξενομοσχεύματα δε λειτούργησε για παραπάνω από λίγες μέρες και όλοι οι λήπτες απεβίωσαν.³ Επιπλέον, τη δεκαετία του 1960 ξενομεταμόσχευση νεφρού σε άνθρωπο επιχείρησαν ο Tom Starzl (χρησιμοποιώντας μπαμπούνους για δότες) και ο Keith Reemtsma (χρησιμοποιώντας χιμπατζήδες για δότες). Όλοι οι ασθενείς κατέληξαν λίγες εβδομάδες αργότερα. Μόνο ένας ασθενής του Reemtsma επιβίωσε για 9 μήνες, αλλά απεβίωσε αιφνιδίως λόγω ηλεκτρολυτικών διαταραχών, εξαιτίας της μεγάλης διούρησης που προκαλείται από νεφρούς τέτοιων πρωτευόντων ζώων (εικόνα 1.6).^{3, 13, 14}



Εικόνα 1.6: Φυσιολογική μακροσκοπική απεικόνιση νεφρών χιμπαντζή που ξενομεταμοσχεύτηκαν σε 23-χρονη λήπτρια και λειτούργησαν για 9 μήνες¹³

Από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα είχε γίνει αντιληπτό, πως το ανοσοποιητικό σύστημα ήταν υπεύθυνο για την απόρριψη των μοσχευμάτων. Πρώτος ο Dempster χρησιμοποίησε την ολική ακτινοβολία, ως προσπάθεια μείωσης της ανοσιακής απάντησης. Αρκετοί άλλοι ακολούθησαν την τεχνική αυτή, αλλά το αποτέλεσμα ήταν τραγικό, μιας και η πλειοψηφία των ληπτών απεβίωσε.^{3, 5} Οι Hamburger και Küss χρησιμοποίησαν στεροειδή αντί της ακτινοβολίας. Ωστόσο, μέχρι τότε δεν υπήρχε καμία συστηματική έρευνα στην φαρμακευτική ανοσοκαταστολή αντί της ακτινοβολίας.³

Στις αρχές του 1905, ο Charles Guthrie had, υποστήριξε πως η ψύξη των οργάνων προς μεταμόσχευση προσφέρει σημαντική προστασία. Ο Starzl χρησιμοποίησε την υποθερμία ολόκληρου του σώματος, για να προστατέψει τα όργανα του δότη και το 1960 αντικατέστησε την τεχνική αυτή με έγχυση κρύου υγρού στην πυλαία φλέβα, για προστασία του ηπατικού μοσχεύματος. Από το 1963, η έκπλυση του νεφρικού μοσχεύματος με κρύο διάλυμα μέσω της νεφρικής αρτηρίας αποτέλεσε την μέθοδος εκλογής. Κατά την πολυοργανική λήψη καθιερώθηκε η *in situ* ψύξη των κοιλιακών οργάνων, με έγχυση κρύου διαλύματος μέσω της αορτής.³ Σε αναφορά του Belzer το 1967, περιγράφεται η *ex vivo* μηχανική έκπλυση νεφρών, η οποία παρέτεινε τη διατήρηση των νεφρών για 2-3 ημέρες. Ωστόσο, η δημοτικότητα της μεθόδου αυτής μειώθηκε μετά το 1987, όταν ο Belzer παρασκεύασε το διάλυμα University of Wisconsin (WU), που έμελε να αποτελέσει το gold standard της συντήρησης οργάνων, μέχρι και σήμερα.^{3-5, 10, 12}

Από παλιά, πολλοί ερευνητές είχαν τονίσει τη σημασία της ιστοσυμβατότητας λήπτη και δότη, αλλά οι σχετικοί μηχανισμοί άρχισαν να γίνονται περισσότερο κατανοητοί, όταν ο

Jean Dausset το 1958 ανακάλυψε το πρώτο αντιγόνο ανθρώπινου λευκοκυττάρου (Human Leukocyte Antigen, HLA) και τη συσχέτισή του με την ανοσοβιολογία της απόρριψης. Ο έλεγχος για αντισώματα έναντι των HLAs ήταν δύσκολος μέχρι και το 1964, όταν ο Paul Terasaki ανέπτυξε μία μικροκυτταροτοξική διαδικασία, στην οποία αναμιγνύονταν ορός του λήπτη και λεμφοκύτταρα του δότη. Σύντομα έγινε η μέθοδος εκλογής για τον έλεγχο ιστοσυμβατότητας μεταξύ δότη και λήπτη.^{3,12}

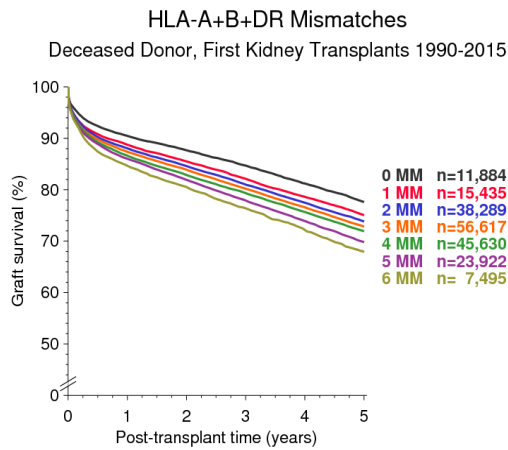
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗΣ ΝΕΦΡΟΥ

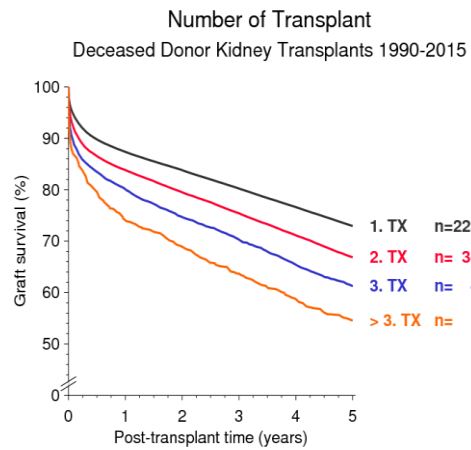
Είναι γνωστό, πως η χρόνια νεφρική νόσος τελικού σταδίου αυξάνει τη θνητότητα.¹⁵ Συνεπώς, το κρίσιμο ερώτημα που προκύπτει, είναι αν αποκαθιστώντας τη νεφρική λειτουργία μέσω της μεταμόσχευσης νεφρού θα μπορούσε να υπάρξει μείωση της θνητότητας των ασθενών αυτών. Μελέτες έχουν αποδείξει, ότι οι μεταμοσχευθέντες ασθενείς εμφανίζουν αύξηση της επιβίωσης, σε σχέση με τους ασθενείς που παραμένουν στην αιμοκάθαρση.¹⁶⁻²¹ Επιπλέον, από μελέτες προκύπτει, πως η μεταμόσχευση νεφρού είναι οικονομικότερη μέθοδος, σε σχέση με την αιμοκάθαρση.²²

Η επιβίωση του νεφρικού μοσχεύματος από αποβιώσαντα δότη ανέρχεται στο 93,2% στον 1^ο χρόνο και στο 74,3% στον 5^ο χρόνο, ενώ από ζώντα δότη είναι 97,5% και 85,5%, αντίστοιχα. Η επιβίωση του λήπτη νεφρικού μοσχεύματος από αποβιώσαντα δότη ανέρχεται στο 96,2% στον 1^ο χρόνο και στο 83% στον 5^ο χρόνο, ενώ από ζώντα δότη στο 98,8% και 91,9%, αντίστοιχα.²³ Η κύρια αιτία καθυστερημένης απώλειας του μοσχεύματος είναι ο θάνατος του λήπτη με λειτουργικό μόσχευμα.²⁴ Διαβητικοί λήπτες νεφρικού μοσχεύματος από αποβιώσαντες δότες εμφανίζουν υψηλότερο ποσοστό θνητότητας με λειτουργικό μόσχευμα, σε σχέση με μη διαβητικούς.²⁵ Η επιβίωση του νεφρικού μοσχεύματος εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η μεγάλη ηλικία του δότη, ο βαθμός ιστοσυμβατότητας για τα HLA αντιγόνα και η επαναμεταμόσχευση επηρεάζουν τα ποσοστά επιβίωσης του νεφρικού μοσχεύματος (εικόνα 2.1).^{26, 27} Η μείωση του χρόνου ψυχρής ισχαιμίας αυξάνει το ποσοστό επιβίωσης, τόσο του μοσχεύματος, όσο και του λήπτη.²⁸ Καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με τη χρήση του διαλύματος UW, έναντι άλλων, όπως του διαλύματος ιστιδίνης-τριπτοφάνης-κετογλουταρικού (HTK).²⁹ Επίσης, η παχυσαρκία αποτελεί παράγοντα κινδύνου, που αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης καθυστερημένης λειτουργίας του μοσχεύματος, οξείας απόρριψης και λοίμωξης και σχετίζεται με χειρότερα ποσοστά επιβίωσης.³⁰⁻³²

Μια από τις σοβαρές μακροχρόνιες επιπλοκές την μεταμόσχευσης νεφρού αποτελούν και οι κακοήθειες. Έχει αποδειχθεί αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης κακοήθειας μετά από μεταμόσχευση νεφρού, με τη μεγαλύτερη αύξηση για τις κακοήθειες που σχετίζονται με ιούς.³⁴ Ο μεγαλύτερος κίνδυνος αφορά στον μη μελανωτικό καρκίνο του δέρματος και στα



A



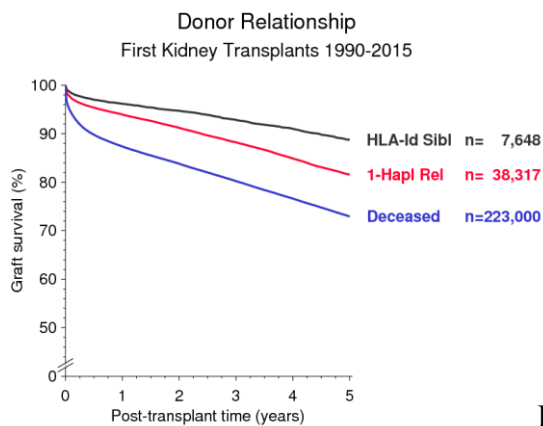
B

CTS Collaborative Transplant Study

K-21101-0217

CTS Collaborative Transplant Study

K-11101-0217



Γ

CTS Collaborative Transplant Study

K-15101-0217

Εικόνα 2.1: Α. Αναντιστοιχία HLA-A, HLA-B, HLA-DR και πρώτη μεταμόσχευση νεφρού από αποβιώσαντα δότη, Β. Αριθμός μεταμοσχεύσεων νεφρού από αποβιώσαντα δότη και επιβίωση μοσχεύματος, Γ. Συγγένεια δότη και λήπτη πρώτου νεφρικού μοσχεύματος και επιβίωση μοσχεύματος²⁷

λεμφοϋπερπλαστικά νοσήματα. Άλλες συχνές κακοήθειες είναι του ουροποιογεννητικού και γαστρεντερικού συστήματος, του ήπατος, του μαστού και το σάρκωμα Kaposi.³⁵ Στους ανοσοκατασταλαμένους λήπτες η διαδικασία της ογκογένεσης επιταχύνεται. Ο μέσος χρόνος εμφάνισης λεμφώματος, σαρκώματος Kaposi και κακοήθειας των ενδοκρινών αδένων είναι περίπου 6 χρόνια μετά τη μεταμόσχευση, για αυτή του αναπνευστικού συστήματος 8 χρόνια, για του μαστού, του ουροποιογεννητικού συστήματος και λεμφικού ιστού 9 χρόνια και για καρκίνο της γαστρεντερικής οδού τα 10 χρόνια.³⁶

Από την άλλη μεριά, η μεταμόσχευση νεφρού αναστρέφει την σχετιζόμενη με τη χρόνια νεφρική νόσο υπογονιμότητα και επιτρέπει την αναπαραγωγή.³⁷ Η καλή νεφρική λειτουργία αποτελεί σημαντικότατο παράγοντα καλής έκβασης της εγκυμοσύνης λήπτρια νεφρικού μοσχεύματος.^{38, 39} Τέλος, η μεταμόσχευση νεφρού βελτιώνει σημαντικά την ποιότητα ζωής των ασθενών, σε σχέση με παραμέτρους όπως η φυσική δραστηριότητα, το χρόνιο άλγος, η κοινωνική δραστηριότητα και η εν γένει σωματική και ψυχική ευεξία. Οι εργαζόμενοι λήπτες, σε σχέση με τους άνεργους και τους συνταξιούχους ασθενείς παρουσιάζουν σημαντική βελτίωση της ποιότητας ζωής βάσει των ανωτέρων παραμέτρων.⁴⁰

Οι ασθενείς δε, που δεν λαμβάνουν στεροειδή έχουν καλύτερη κοινωνική δραστηριότητα, λιγότερα ψυχιατρικά συμπτώματα και χαμηλότερα επίπεδα θλίψης.⁴¹ Σε μία Ολλανδική μελέτη που εξέταζε τη σεξουαλική δυσλειτουργία, μεταξύ ληπτών νεφρικού μοσχεύματος, νεφροπαθών ασθενών σε αιμοκάθαρση και ομάδας ελέγχου γενικού πληθυσμού, έδειξε λιγότερες σεξουαλικές δυσλειτουργίες στους μεταμοσχευμένους με νεφρό σε σχέση με τους ασθενείς υπό αιμοκάθαρση ή περιτοναϊκή κάθαρση, αλλά περισσότερες δυσκολίες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.^{42, 43}

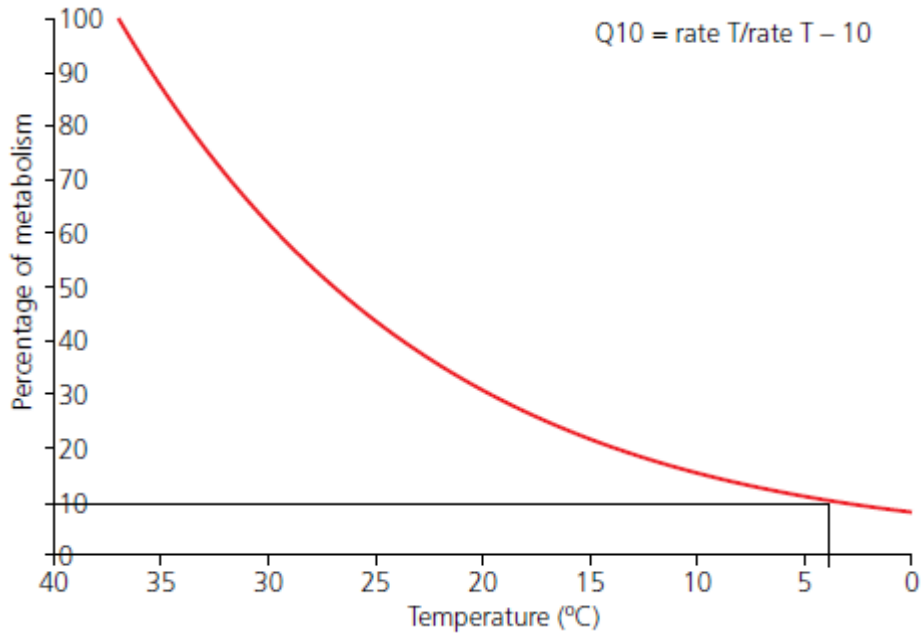
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΤΡΟΠΟΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΝΕΦΡΙΚΟΥ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ

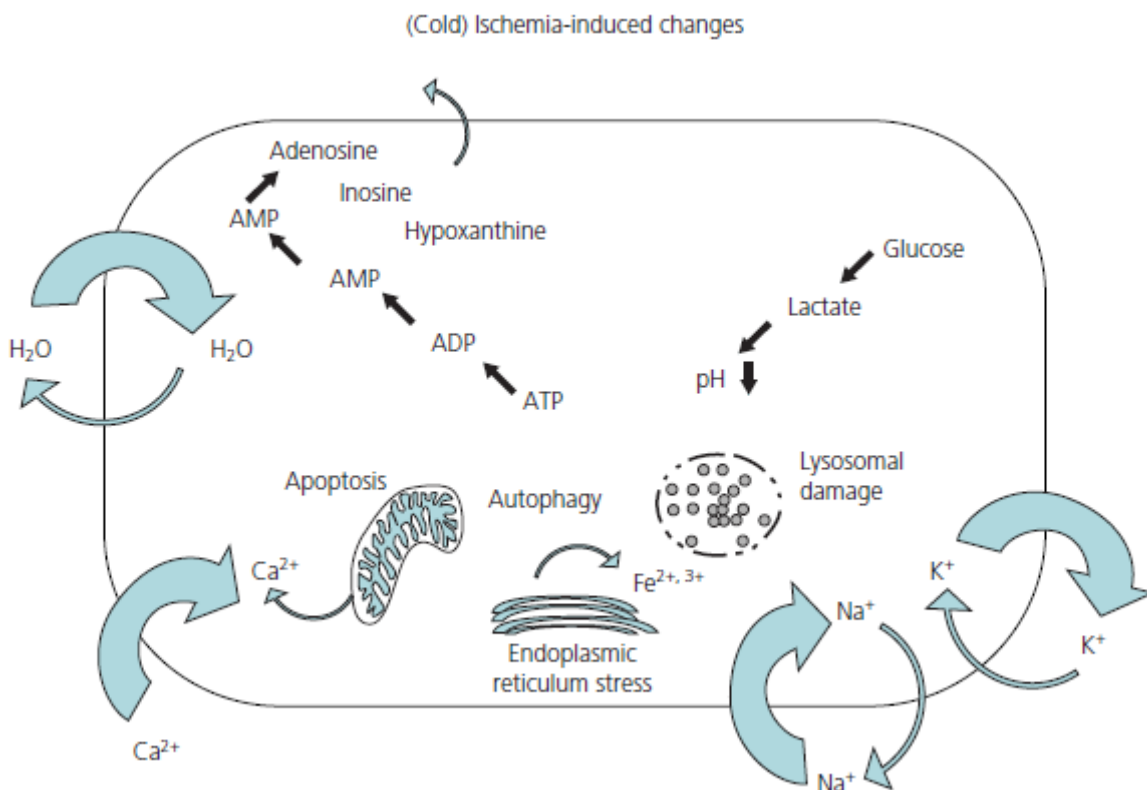
Οι δεξαμενές λήψης νεφρικών μοσχευμάτων είναι οι ζώντες και οι αποβιώσαντες δότες με ή χωρίς πάλλουσα καρδιά. Πρακτικά, στους ζώντες δότες δεν υπάρχει χρόνος θερμής ισχαιμίας και σοβαρή ιστική βλάβη του μοσχεύματος, λόγω μη ανάγκης συντήρησης του μοσχεύματος. Αντίθετα, στους αποβιώσαντες δότες υπάρχει κατ' ανάγκη και χρόνος θερμής ισχαιμίας, αλλά και βλάβη συντήρησης των μοσχευμάτων. Στο κεφάλαιο αυτό θα αναλυθούν η παθοφυσιολογία της ιστικής βλάβης συντήρησης, τα υπάρχοντα διαλύματα και οι τρόποι συντήρησης, καθώς και οι μελλοντικές προοπτικές συντήρησης των νεφρικών μοσχευμάτων.

3.1 Παθοφυσιολογία ιστικής βλάβης νεφρικού μοσχεύματος κατά τη συντήρηση

Η απομάκρυνση των νεφρών από το κυκλοφορικό σύστημα έχει σαν συνέπεια τη διακοπή της αιματικής κυκλοφορίας. Η απουσία του οξυγόνου από τα κύτταρα οδηγεί σε μείζονες μεταβολικές διαταραχές. Γι' αυτόν το λόγο, η καταστολή του μεταβολισμού είναι ουσιώδους σημασίας για την παράταση του χρόνου συντήρησης, που μπορεί να ανεχθεί ο νεφρός. Η μείωση του μεταβολικού ρυθμού και των χημικών αντιδράσεων στα βιολογικά συστήματα εξαρτώνται από τη μείωση της θερμοκρασίας. Ο συντελεστής θερμοκρασίας Q10 αποτελεί μέτρο του ρυθμού αλλαγής του βιολογικού ή χημικού συστήματος, ως συνέπεια της μείωσης της θερμοκρασίας κατά 10°C (εικόνα 3.1).⁴⁴ Συνεπώς, ελαττώνοντας τη θερμοκρασία των νεφρών κάτω από 4°C, μειώνεται ο μεταβολισμός των κυττάρων στο 5-8%, με ανάλογη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας.⁴⁵ Οι Calne και συν. διατήρησαν νεφρούς για 12 ώρες με απλή ψύξη σε παγωμένο νερό (η επίδραση της θερμοκρασίας).⁴⁶ Με τη χρήση διαλύματος συντήρησης, οι Belzer και συν. διατήρησαν ηπατικά μοσχεύματα σκύλου για πάνω από 24 ώρες,⁴⁷ όπως και οι Murphy και συν. διατήρησαν νεφρικά μοσχεύματα για έξι ημέρες (η επίδραση του διαλύματος) (εικόνα 3.2).⁴⁸



Εικόνα 3.1: Σχέση μεταξύ θερμοκρασίας και μεταβολικής δραστηριότητας⁴⁹



Εικόνα 3.2: Αρνητική επίδραση της ψυχρής ισχαιμίας: αποδόμηση ATP, οξέωση, απελευθέρωση λυσοσωμικών ενζύμων, stress του ενδοπλασματικού δικτύου, ενδοκυττάρια αύξηση Na⁺ και Ca²⁺ και κυτταρικό οίδημα⁴⁹

Η αρχική αλλαγή που παρατηρείται στη δομή του κυττάρου είναι η ανάπτυξη οίδηματος.⁴⁷ Ο μηχανισμός που το προκαλεί είναι η δυσλειτουργία της Na^+/K^+ -ΑΤΡασης, με αποτέλεσμα το νάτριο να μην απεκκρίνεται και παθητικά να εισέρχεται στο κύτταρο, λόγω των αρνητικά φορτισμένων κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Η συνέπεια είναι να δημιουργείται ένα υπερωσμωτικό ενδοκυττάριο περιβάλλον και συνεπώς να διευκολύνεται και η είσοδος ύδατος. Για να αποκατασταθεί η διαταραγμένη εξίσωση του Donnan στην κυτταρική μεμβράνη και να αποφευχθεί το κυτταρικό οίδημα, μη διαπερατές ουσίες (σακχαρίτες και ανιόντα μη-σακχαρίτες) και κολλοειδή προστίθενται στα διαλύματα συντήρησης.⁵⁰⁻⁵² Η ανοξία οδηγεί σε γρήγορη και δραματική μείωση του ενδοκυττάρου ATP. Ακόμα και σε θερμοκρασία 0-4°C, όπου ο κυτταρικός μεταβολισμός έχει μειωθεί, το κυτταρικό ATP έχει ελαττωθεί στο 5% μέσα σε 4 ώρες. Κατά τη διάρκεια της ψυχρής συντήρησης, ο αναερόβιος μεταβολισμός 1 mol γλυκόζης αποδίδει 2 ATP, έναντι 38 της αερόβιας γλυκόλυσης. Επιπλέον, δύο μόρια γαλακτικού οξέος σχηματίζονται προκαλώντας κυτταρική οξέωση.⁵³ Η συνεισφορά της οξέωσης στη βλάβη της ισχαιμίας είναι εξαρτώμενη από το pH. Η έντονη οξέωση ενεργοποιεί τις φωσφολιπάσες και τις πρωτεάσες προκαλώντας βλάβη των λυσοσωμάτων και τελικά κυτταρικό θάνατο.⁵⁴

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) δημιουργούνται από αρκετές διαδικασίες κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση των οργάνων. Ένας βασικός δημιουργός ROS είναι η οξειδάση της ξανθίνης, η οποία παράγει υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Η οξειδάση της ξανθίνης απελευθερώνεται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας από την πρωτεόλυση της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης, που πυροδοτείται από το ασβέστιο.⁵⁵⁻⁵⁷ Οι ROS αντιδρούν γρήγορα με άλλα μόρια και προκαλούν σοβαρές βλάβες στα λιπίδια, το νουκλεϊκό οξύ και στις πρωτεΐνες κατά τη φάση της επαναιμάτωσης.^{58, 59} Τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των ROS.⁶⁰

Σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει μεγάλη διαφορά στη συγκέντρωση του ελεύθερου ασβεστίου μεταξύ ενδοκυττάρου και εξωκυττάρου χώρου. Αυτή η διαφορά διατηρείται από την ενεργή μεταφορά Ca^{2+} μέσω πολλών διαδικασιών εξαρτώμενων από ATP.⁶¹ Κατά τη διάρκεια της ψυχρής συντήρησης, η συγκέντρωση του ενδοκυττάρου ATP ελαττώνεται, οδηγώντας σε αύξηση του ενδοκυττάρου Ca^{2+} . Επιπλέον, λόγω της μείωσης του pH, το κύτταρο προσπαθεί να αποκαταστήσει το pH βγάζοντας από αυτό ιόντα H^+ για ιόντα Na^+ μέσω της αντλίας Na^+/H^+ . Τα ιόντα Na^+ ανταλλάσσονται με Ca^{2+} μέσω της αντλίας $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.⁶² Αυτή η αύξηση του Ca^{2+} οδηγεί σε ενεργοποίηση της καλπαΐνης, η οποία με τη

σειρά της οδηγεί στην απώλεια της κυτταρικής δομής. Αύξηση της δραστηριότητας της καλπαΐνης έχει αποδειχθεί κατά τη ψυχρή συντήρηση των ηπατοκυττάρων και περαιτέρω ενεργοποίηση κατά την επαναθέρμανση.⁶³

Οι ενδοκυττάρια πρωτεάσες σχετίζονται με την αποδόμηση των πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της συντήρησης λόγω κυρίως της έλλειψης οξυγόνου. Επίσης, οι ενδοκυττάρια μεταλλοπρωτεϊνάσες μπορεί να ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της συντήρησης οδηγώντας σε αποσύνδεση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τα παρακείμενα κύτταρα.^{64, 65} Ακόμα έχει παρατηρηθεί ενεργοποίηση των κασπασών κατά τη ψυχρή συντήρηση, ένζυμα που σχετίζονται με την απόπτωση.⁶⁶

3.2 Τα κύρια διαλύματα συντήρησης νεφρικού μοσχεύματος

Σήμερα τα κυριότερα χρησιμοποιούμενα διαλύματα συντήρησης νεφρικού μοσχεύματος είναι του Πανεπιστημίου του Wisconsin (University of Wisconsin, UW), της ιστιδίνης-τριπτοφάνης-κετογλουταρικού (HTK), το Celsion, του Ινστιτούτου George-Lopez (IGL-1), το Polysol, το EuroCollins (EC) και το διάλυμα Marshall (HOC) (πίνακας 3.1).^{67, 68} Τα διαλύματα χωρίζονται σε ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού τύπου, ανάλογα με τη σύνθεσή τους σε ηλεκτρολύτες. Τα διαλύματα ενδοκυτταρικού τύπου χαρακτηρίζονται από υψηλές συγκεντρώσεις καλίου και χαμηλές συγκεντρώσεις νατρίου, που είναι αναγκαίες για την αποτροπή του κυτταρικού οιδήματος. Όπως προαναφέρθηκε, η Na^+/K^+ -ΑΤΡασης είναι ανενεργή κατά τη ψυχρή συντήρηση, συνεπώς ένα διάλυμα στον εξωκυττάριο χώρο με συγκεντρώσεις Na^+ και K^+ ίσες με αυτές στον ενδοκυττάριο χώρο, διατηρεί ίση την εξίσωση του Donnan και έτσι αποτρέπεται η είσοδος του Na^+ και του Cl^- στο κύτταρο. Τα ενδοκυτταρικού τύπου διαλύματα, όπως το UW, θεωρούνται σημαντικά για τη διατήρηση της βιωσιμότητας του κυττάρου.^{69, 70} Τα διαλύματα εξωκυτταρικού τύπου, όπως το HTK, έχουν χαμηλή συγκέντρωση K^+ και υψηλή συγκέντρωση Na^+ . Αυτή η αναλογία στη συγκέντρωση των ηλεκτρολυτών θεωρείται καλύτερη από του ενδοκυτταρικού τύπου, γιατί το K^+ μπορεί να επάγει αγγειοσύσπαση.^{67, 71, 72}

Το **διάλυμα UW** θεωρείται το διάλυμα εκλογής για τη συντήρηση οργάνων. Συνδυάζει μεταβολικά αδρανή υποστρώματα, όπως το λακτοβιονικό και η ραφινόζη, με υδροξυαιθυλικό άμυλο (hydroxyethyl starch, HES), που δρα ως κολλοειδές, πρόδρομα μόρια του ATP (αδενοσίνη) και μόρια εξουδετέρωσης ROS (γλουταθειόνη και αλλοπουρινόλη). Τα

μειονεκτήματά του είναι το μεγάλο ιζώδες, που βλάπτει τη μικροκυκλοφορία και η υψηλή συγκέντρωση καλίου, που επάγει αγγειοσύσπαση.^{68, 73}

Component	UW	HTK	IGL-1	Cebior	Polysol	EC	HOC
Collides (g/L)							
HES (g/L)	50	—	—	—	—	—	—
PEG-35 (mmol/L)	—	—	0.03	—	20	—	—
Impermeants (mmol/L)							
Glucose	—	—	—	—	—	195	—
Citrate	—	—	—	—	—	—	80
Mannitol	—	38	—	60	—	—	185
Trehalose	—	—	—	—	5.3	—	—
Lactobionate	100	—	100	80	—	—	—
Sucrose	—	—	—	—	—	—	—
Raffinose	30	—	30	—	3.2	—	—
Buffers (mmol/L)							
K ₂ HPO ₄	—	—	—	—	—	15	—
KH ₂ PO ₄	25	—	25	—	—	42.5	—
NaHCO ₃	—	—	—	—	—	10	—
NaH ₂ P0 ₄	—	—	—	—	—	—	—
Na ₂ HP0 ₄	—	—	—	—	—	—	—
Histidine	—	180	—	30	6.3	—	—
Electrolytes (mmol/L)							
Sodium	25	15	120	100	120	10	84
Potassium	120	9	25	15	15	115	79
Chloride	20	32	—	42	—	15	—
Calcium	—	0.0015	0.5	0.25	—	—	—
Magnesium	—	4	—	13	—	—	—
Magnesium sulphate (MgSO ₄)	5	—	5	—	—	—	40
ROS scavengers (mmol/L)							
Glutathione	3	—	3	3	5.6	—	—
Allopurinol	1	—	1	—	—	—	—
Tryptophan	—	2	—	—	—	—	—
Additives (mmol/L)							
Adenosine	5	—	5	—	5	—	—
Ketoglutarate	—	1	—	—	—	—	—
Aminoglutarinic acid (mmol/L)	—	—	—	20	—	—	—
OH (mmol/L)	—	310	—	242-368	—	—	—
Osmolarity (mOsm/kg)	320	310	320	320	—	—	—
pH	7.2-7.4	7.02-7.2	7.2-7.4	7.3	—	—	7.1

Πίνακας 3.1: Σύνθεση των κύριων διαλυμάτων συντήρησης (τροποποιημένος)⁷⁴

Το **διάλυμα HTK** χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως καρδιοπληγικό. Αυτό περιέχει ιστιδίνη και τρυπτοφάνη, ως σταθεροποιητές μεμβράνης, κετογλουταρικό για τον αερόβιο μεταβολισμό και αντιοξειδωτικά. Λόγω του χαμηλού του ιζώδους μπορεί να βελτιώνει την έκπλυση στη μικροκυκλοφορία. Συστήνεται η χρήση του στην υποθερμική μηχανική έκπλυση σε χαμηλές πιέσεις και υψηλούς όγκους έκπλυσης. Σε μία πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη, προοπτική μελέτη που σύγκριναν τη ψυχρή συντήρηση νεφρού με διάλυμα UW έναντι HTK, έδειξαν ίδια αποτελέσματα όσον αφορά την καθυστερημένη λειτουργία του μοσχεύματος (33% vs 33%).^{68, 73, 75}

Το **διάλυμα Celsior** είναι ένα κολλοειδές που χρησιμοποιήθηκε αρχικά στην μεταμόσχευση καρδιάς, πριν επεκταθεί η χρήση του και σε άλλα όργανα. Το συγκεκριμένο διάλυμα συνδυάζει την ωσμωτική δράση του διαλύματος UW και τη ρυθμιστική ικανότητα του HTK (ιστιδίνη). Τα κολλοειδή διαλύματα περιέχουν πρόσθετα μακρομόρια, τα οποία δε διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και έτσι αποτρέπει το κυτταρικό οίδημα.⁶⁸

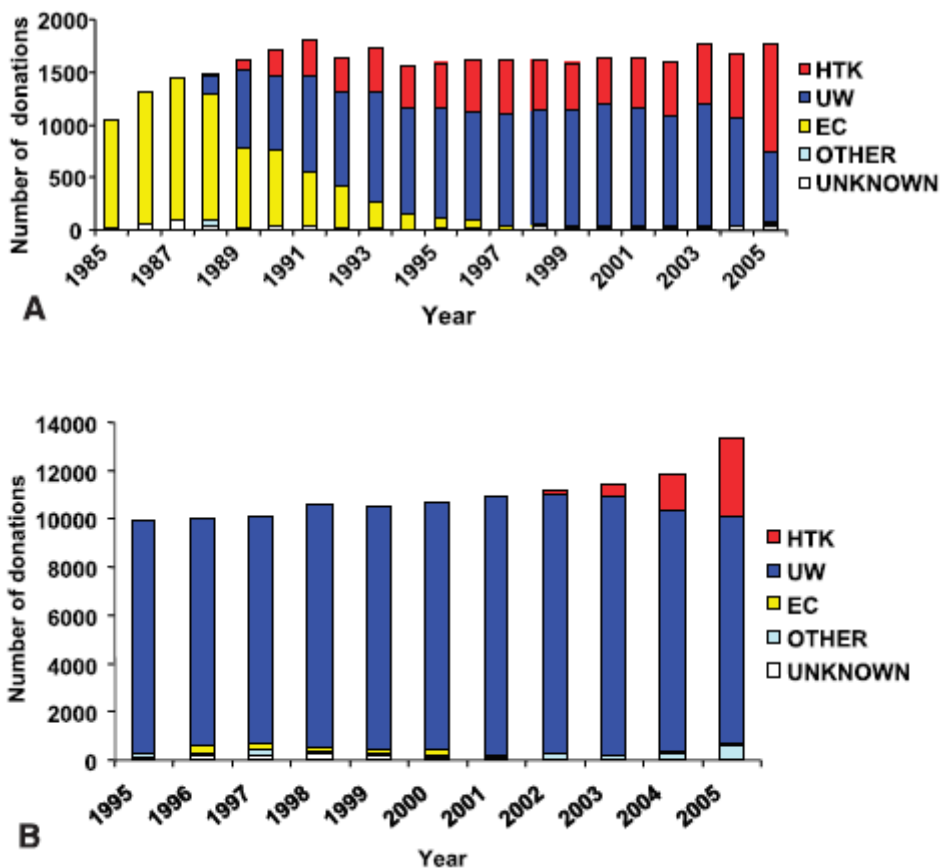
Το **διάλυμα IGL-1** συνδυάζει τα πλεονεκτήματα των διαλυμάτων UW και Celsion. Η πολυαιθυλική γλυκόλη συνδέεται στα κύτταρα και στις επιφάνειες των ιστών σταθεροποιώντας αυτές από ανεπιθύμητες αντιδράσεις. Μελέτες έχουν δείξει, ότι αυτό το χαρακτηριστικό τροποποιεί την εγγενή ανοσογονικότητα στους ιστούς του δότη, ως συνέπεια της βλάβης από την ισχαιμία-επαναιμάτωση. Μια πολυκεντρική μελέτη δεν έδειξε σημαντική διαφορά μεταξύ των διαλυμάτων UW και IGL-1, όσον αφορά την καθυστερημένη λειτουργία του μοσχεύματος.^{68, 76, 77}

Το **διάλυμα Polysol** δημιουργήθηκε με σκοπό να διευκολύνει τη μεταμόσχευση οργάνων που έχουν υποστεί βλάβη λόγω της ισχαιμίας. Γι' αυτόν το λόγο έχουν προστεθεί σε αυτό το διάλυμα αμινοξέα, βιταμίνες, ρυθμιστές και αντιοξειδωτικά για να υποστηρίξουν τον μεταβολισμό σε συνθήκες υποθερμίας. Επί του παρόντος το Polysol χρησιμοποιείται μόνο σε πειραματικές μελέτες με υποσχόμενα καλά αποτελέσματα.^{68, 78, 79}

Το **διάλυμα EuroCollins** είναι ένα απλό και φθινό, ενδοκυτταρικού τύπου διάλυμα. Ο φώσφορος χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση του pH και η γλυκόζη ως ωσμωτικός παράγοντας. Σε μία τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη είχε αποδειχθεί ότι η καθυστερημένη λειτουργία του μοσχεύματος ήταν μικρότερη μετά από ψυχρή συντήρηση με διάλυμα UW, συγκριτικά με το διάλυμα EuroCollins (23% vs. 33%). Επιπλέον, μελέτες είχαν δείξει σημαντικά υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης του μοσχεύματος μετά από ψυχρή συντήρηση με διάλυμα UW. Έτσι, το διάλυμα EuroCollins σταμάτησε να χρησιμοποιείται για συντήρηση κοιλιακών οργάνων στην Ευρώπη.^{73, 80}

Το **διάλυμα Marshall**, ένα ενδοκυτταρικού τύπου διάλυμα, χρησιμοποιεί μαννιτόλη για να αποφευχθεί το κυτταρικό οίδημα και κιτρικό ως ρυθμιστικό, για να βοηθήσει την έξοδο του ασβεστίου από το κύτταρο διατηρώντας φυσιολογικό pH. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει καλύτερη αποτελεσματικότητα σε νεφρούς από σκύλους για περίοδο συντήρησης μέχρι 72 ώρες.⁸¹⁻⁸³

Στην εικόνα 3.3 φαίνεται η χρήση των διαλυμάτων συντήρησης στην Ευρώπη (τα πιο κοινά διαλύματα: UW και HTK) και στις ΗΠΑ (συχνότερο: UW).



Εικόνα 3.3: Σύγκριση μεταξύ διάφορων διαλυμάτων συντήρησης στην Ευρώπη (A) και στις ΗΠΑ (B)⁸⁰

3.3 Υποθερμική απλή συντήρηση

Η υποθερμική απλή συντήρηση των νεφρών έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα αποτελώντας μια εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδο συντήρησης μοσχευμάτων. Μετά την αφαίρεση των οργάνων από το δότη, τα νεφρικά μοσχεύματα ξεπλένονται με αποστειρωμένο ψυχρό διάλυμα συντήρησης, χρησιμοποιώντας την υδροστατική πίεση και τη βαρύτητα, προκαλώντας γρήγορα υποθερμία. Στη συνέχεια το μόσχευμα διατηρείται σε ψυχρό διάλυμα συντήρησης σε αποστειρωμένες, ισχυρές, πλαστικές σακούλες, οι οποίες καλύπτονται από πάγο, έτσι ώστε να διατηρηθεί η θερμοκρασία μεταξύ 0-4°C. Τα βασικά πλεονεκτήματα της

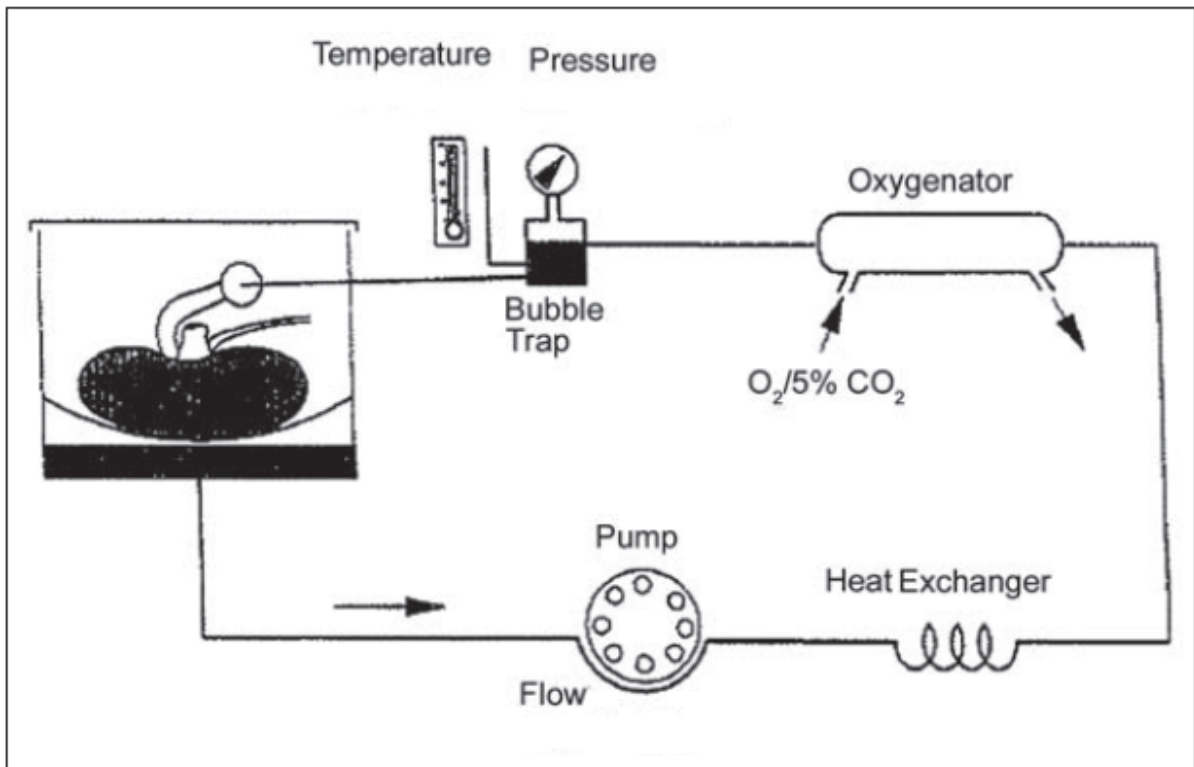
μεθόδου είναι η απλότητα και το χαμηλό της κόστος, επιτρέποντας την παράταση της συντήρησης μέχρι και 35 ώρες. Σαν αποτέλεσμα, η υποθερμική συντήρηση μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε νοσοκομείο, από κάθε χειρουργό μεταμοσχεύσεων χωρίς επιπλοκές ή μακροχρόνια εκπαίδευση, χωρίς ιδιαίτερα και ακριβά υλικά. Το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η αδυναμία εφαρμογής μίας σταθερής παραμέτρου αξιολόγησης της κατάστασης του οργάνου και μέτρησης της ισχαιμικής βλάβης, έτσι ώστε να προβλεφτεί η βιωσιμότητα του μοσχεύματος.⁷⁴

3.4 Υποθερμική μηχανική έκπλυση

Η άλλη εναλλακτική μέθοδος συντήρησης του νεφρικού μοσχεύματος είναι η συνεχής υποθερμική έκπλυση. Δύο τύποι συστημάτων έκπλυσης έχουν χρησιμοποιηθεί, υποθερμική παλμική έκπλυση και υποθερμική μη-παλμική έκπλυση. Μετά τη λήψη των οργάνων, ο νεφρός τοποθετείται στο μηχάνημα, εισάγοντας αεροστεγώς έναν σωλήνα στη νεφρική αρτηρία. Η κυκλοφορία του διαλύματος επιτυγχάνεται μέσω μίας συσκευής, που παράγει συνεχή ή παλμική ροή μέσω αντλίας. Το φλεβικό έκπλυμα συλλέγεται και ψύχεται σε έναν εναλλάκτη θερμότητας, διατηρώντας θερμοκρασία μεταξύ 0-4°C, σε μερικές δε περιπτώσεις μπορεί και να οξυγονωθεί πριν επιστρέψει στη νεφρική αρτηρία. Μέσω πιεσόμετρου και θερμομέτρου μπορούν να ελέγχονται η αρτηριακή πίεση και η θερμοκρασία του διαλύματος, αντίστοιχα (εικόνα 3.4).⁷⁴

Υπάρχουν δύο κύριες μηχανές συνεχόμενης υποθερμικής έκπλυσης. Στην Ευρώπη το LifePort (Organ Recovery System, from Chicago and Brussel) και στις ΗΠΑ η RM3 Waters Medical (from Rochester, Minn, USA) (εικόνα 3.5). Το LifePort είναι φορητό και μπορεί να εκπλένει ένα νεφρικό μόσχευμα, χωρίς επίβλεψη. Χρησιμοποιεί το διάλυμα συντήρησης KPS-1, ένα διάλυμα που μοιάζει με το UW. Η RM3 δεν είναι φορητή και μπορεί να εκπλένει ταυτόχρονα 2 νεφρικά μοσχεύματα, υπό επίβλεψη.⁷⁴

Τα πλεονεκτήματα της υποθερμικής μηχανικής έκπλυσης που έχουν δημοσιευτεί στη βιβλιογραφία είναι πολυάριθμα. Με αυτήν τη μέθοδο μειώνεται η αγγειοσύσπαση και επίσης μπορούν να ελεγχθούν διάφορες παράμετροι, όπως η ροή, η αντίσταση, η θερμοκρασία και η πίεση, που επιτρέπουν την εκτίμηση της ισχαιμικής βλάβης και τη βιωσιμότητας του νεφρού. Επιπλέον, με την υποθερμική μηχανική έκπλυση διατηρείται το αιμοδυναμικό ερέθισμα του



Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση της υποθερμικής μηχανικής έκπλυσης (τροποποιημένη)⁸⁴

αγγειακού συστήματος, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο. Ωστόσο, όλα αυτά τα πλεονεκτήματα της υποθερμικής μηχανικής έκπλυσης δεν είναι πλήρως κατανοητά.^{68, 85-88}

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για την υποθερμική μηχανική έκπλυση έχει αυξηθεί λόγω της λήψης οργάνων από οριακούς δότες, τα οποία έχουν προδιάθεση για πρωτοπαθή μη-λειτουργία του μοσχεύματος και για καθυστερημένη λειτουργία του μοσχεύματος.^{85, 86, 89} Μελέτες έχουν δείξει καλύτερα αποτελέσματα, όταν αυτά τα όργανα εκπλένονται με υποθερμική μηχανική έκπλυση.⁹⁰⁻⁹² Μια πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη



A



B

Εικόνα 3.5: Α. Μηχανή έκπλυσης νεφρικού μοσχεύματος LifePort, Β. Μηχανή έκπλυσης νεφρικού μοσχεύματος RM3⁸⁴

μελέτη που συνέκρινε την υποθερμική μηχανική έκπλυση με την υποθερμική συντήρηση, έδειξε ανωτερότητα της πρώτης, σε σχέση με την πιθανότητα εμφάνισης καθυστερημένης λειτουργίας του μοσχεύματος και την επιβίωσή του στον 1^ο χρόνο.⁸⁶ Ωστόσο, υπάρχουν δύο βασικά μειονεκτήματα της συγκεκριμένης μεθόδου, το υψηλό κόστος και η υψηλού επιπέδου εκπαίδευση που απαιτείται από το προσωπικό.⁷⁴

3.5 Μελλοντικές προοπτικές

Μία νέα, αρκετά υποσχόμενη, μέθοδος συντήρησης αποτελεί η νορμοθερμική μηχανική έκπλυση. Αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα αποφυγής της βλάβης, λόγω υποθερμίας και συμπληρωματικά της παροχής μεταβολικής υποστήριξης. Θεωρητικά, η νορμοθερμική μηχανική έκπλυση επιτρέπει στο νεφρό να διατηρήσει το φυσιολογικό μεταβολισμό του και έτσι να μειωθεί η συσσώρευση των τοξικών παραγόντων και η δημιουργία των δραστικών ριζών οξυγόνου. Με τη νορμοθερμική μηχανική έκπλυση, εκτός των γνωστών διαλυμάτων συντήρησης, έχουν χρησιμοποιηθεί στην κλινική πράξη και έκπλυση με αίμα ή πλάσμα με θετικά αποτελέσματα.^{74, 80, 93, 94}

Η οξυγόνωση κατά τη διάρκεια της μηχανικής έκπλυσης έχει δείξει ωφέλιμη δράση. Επίσης, η χορήγηση μονοξειδίου του άνθρακα (CO) σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο δότη, σε πειραματικό μοντέλο εντερικής μεταμόσχευσης σε επίμυ, μείωσε τις προφλεγμονώδεις ιντερλευκίνες και βελτίωσε την επιβίωση στο 100% έναντι 58% στην ομάδα που έλαβε αέρα. Παρομοίως, σε πειραματικό μοντέλο μεταμόσχευσης ήπατος σε επίμυ, οι λήπτες έλαβαν CO και παρατηρήθηκε καταστολή της επαγωγής του παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (tumor necrosis factor-α), της διέγερσης της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου και του διακυττάριου μορίου προσκόλλησης-1. Τα ηπατικά μοσχεύματα έδειξαν βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας και μικρότερη διήθηση ουδετερόφιλων μετά από έκθεση στο CO. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO), η δραστική μορφή του αζώτου που παράγεται από την L-αργινίνη με τη βοήθεια του ενζύμου συνθάση του NO, είναι ένας βασικός επαγωγέας αγγειοδιαστολής που αναστέλλει τη συσσώρευση και τη σύνδεση των αιμοπεταλίων και των ουδετερόφιλων. Πειραματικές μελέτες αυτομεταμόσχευσης λεπτού εντέρου σε επίμυ και χοίρο έδειξαν βελτίωση της βιωσιμότητας του λεπτού εντέρου, όταν προστέθηκε NO στην υποθερμική συντήρηση.^{80, 84}

Η προετοιμασία του δότη με φαρμακολογικούς παράγοντες, όπως ορμονική θεραπεία υποκατάστασης, χορήγηση αναστολέα της απαμινάσης της αδενοσίνης, N-ακετυλοκυστεΐνης, αναλόγων προστακυκλίνης και τρόποι ενίσχυσης της οξυγενάσης της αίμης-1 (heme-oxygenase-1) είναι όλες ρεαλιστικές θεραπείες. Προετοιμασία με μεταφορά γονιδίων ή με διαλείπουσα ισχαιμία αποτελούν μελλοντικές ελπιδοφόρες προοπτικές.⁸⁴

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ-ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΝΕΦΡΟΥ

Το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης είναι μία πολύπλοκη παθολογική διαδικασία, που περιλαμβάνει ενδοκυτταρικά και εξωκυτταρικά μονοπάτια, τα οποία έχουν σαν αποτέλεσμα μεταβολικές και φλεγμονώδεις αλλαγές στους ιστούς. Ένα παράδοξο στοιχείο στη βλάβη της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης είναι η αύξηση της βλάβης κατά την επαναιμάτωση, παρά την αποκατάσταση της αιματικής κυκλοφορίας που προσφέρει οξυγόνο και θρεπτικά στοιχεία υποστήριξης του αερόβιου μεταβολισμού, την παραγωγή ATP και την ομαλοποίηση του pH με την απομάκρυνση των συσσωρευμένων ιόντων H^+ .

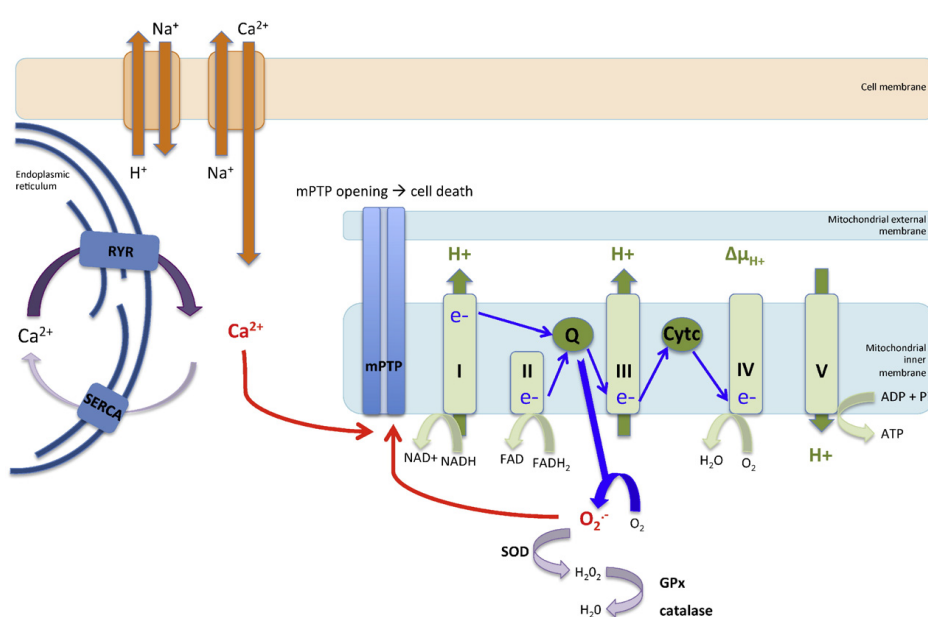
4.1 Υπερφόρτωση ασβεστίου

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, το Ca^{2+} αυξάνεται ενδοκυττάρια κατά την ισχαιμία. Αυτή επιτείνεται κατά την επαναιμάτωση, επειδή η έκπλυση των εξωκυττάρων συσσωρευμένων ιόντων H^+ αυξάνει περαιτέρω τη διαφορά των πρωτονίων εκατέρωθεν της μεμβράνης, αυξάνοντας έτσι τη λειτουργία της αντλίας Na^+/H^+ .⁹⁵ Επιπλέον, επηρεάζεται η μεταφορά του Ca^{2+} διαμέσου του ενδοπλασματικού δικτύου. Η επαναρρόφηση του Ca^{2+} στο ενδοπλασματικό δίκτυο από την Ca^{2+} ATPase του ενδοπλασματικού δικτύου (SERCA) είναι μειωμένη, ενώ η απελευθέρωση του Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω του υποδοχέα ρυανοδίνης (RYR) είναι ενισχυμένη (εικόνα 4.1).⁹⁶⁻⁹⁹ Η υπερφόρτωση ασβεστίου ενεργοποιεί ποικίλα συστήματα, τα οποία συμβάλλουν στη βλάβη του κυττάρου μετά από ισχαιμία-επαναιμάτωση. Η περίσσεια του ασβεστίου εισέρχεται στα μιτοχόνδρια, μέσω μίας πύλης Ca^{2+} μονής εισόδου, η οποία χρησιμοποιεί το αρνητικό διαμεμβρανικό δυναμικό για να εισάγει το θετικά φορτισμένο ιόν ασβεστίου μέσα στο μιτοχόνδριο. Όταν τα επίπεδα του Ca^{2+} στο μιτοχόνδριο είναι υψηλά, τότε το Ca^{2+} συνδέεται και ενεργοποιεί το μεταβατικό πόρο της μιτοχονδριακής διαπερατότητας (mitochondrial permeability transition pore, mPTP), ανοίγοντας τον mPTP και προκαλώντας κυτταρικό θάνατο (εικόνα 4.1).¹⁰⁰ Όπως προαναφέρθηκε, οι καλπαΐνες είναι ένας άλλος στόχος της υπερφόρτωσης ασβεστίου,. Αυτή η οικογένεια των πρωτεασών κυστεΐνης ενεργοποιείται από τα αυξημένα επίπεδα Ca^{2+} και

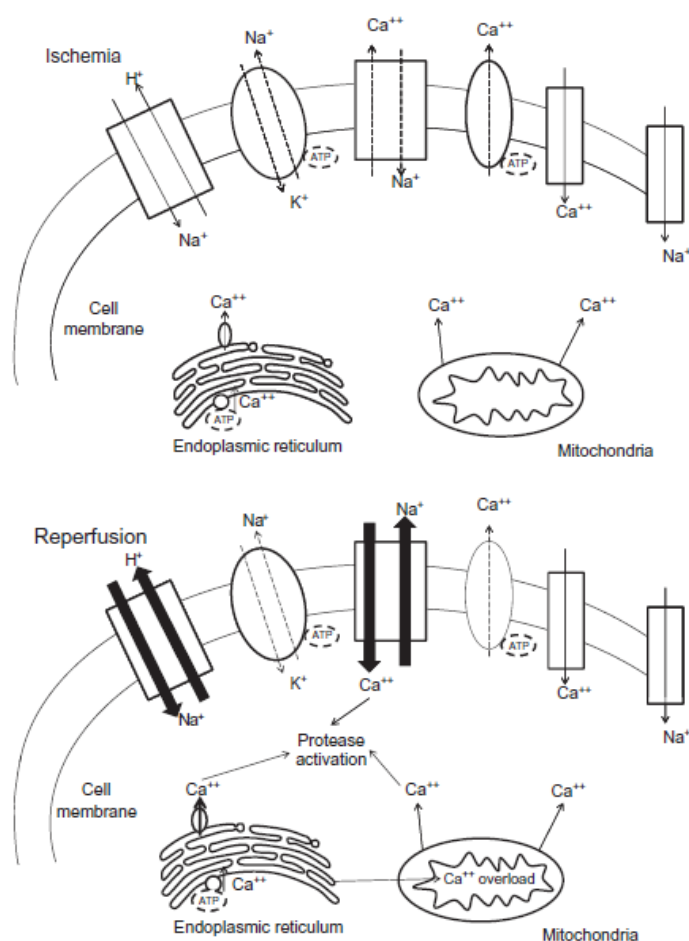
αποδομεί ενδοκυττάρια πρωτεΐνες, όπως ο κυτταροσκελετός, το ενδοπλασματικό δίκτυο και οι μιτοχονδριακές πρωτεΐνες. Από την άλλη, η ενδογενής αναστολή των καλπαϊνών, η καλπαστατίνη, αποδομείται συχνά κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και με αυτόν τον τρόπο ενισχύεται περισσότερο η διαθεσιμότητα των καλπαϊνών και η βλάβη. Τελικά, η υπερφόρτωση ασβεστίου οδηγεί στη δημιουργία συμπλόκων πυροφωσφορικού ασβεστίου και ουρικού οξέος, τα οποία αυξάνουν την έκφραση των κυτοκινών και των χυμοκινών που συνεισφέρουν στη βλάβη του συνδρόμου (εικόνα 4.2).¹⁰¹

4.2 Οξειδωτικό stress

Η πρώτη ROS που παράγεται κατά την επαναιμάτωση είναι το ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) από τη μονοσθενή μείωση του μορίου του οξυγόνου, ως τμήμα της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το ανιόν του σουπεροξειδίου αποτελεί πρόδρομο μόριο των άλλων ROS. Γενικά δε θεωρείται τοξικό, επειδή μετατρέπεται στο λιγότερο κυτταροτοξικό υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), μία μετατροπή που επιταχύνεται 10^4 φορές από τη δράση του ενζύμου δισμουτάση του σουπεροξειδίου (superoxide dismutase, SOD). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μετατρέπεται σε νερό, είτε από την καταλάση, είτε από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η οποία χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα τη γλουταθειόνη (GSH). Το αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης απαιτεί επαρκή επίπεδα γλουταθειόνης, τα οποία δημιουργούνται από τη αναγωγή της γλουταθειόνης (glutathione reductase, GR) (εικόνα 4.1).^{97, 103}



Εικόνα 4.1: Σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης: ρόλος του οξειδωτικού stress, της υπερφόρτωσης ασβεστίου και του mPTP¹⁰²



Εικόνα 4.2: Σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και υπερφόρτωση ασβεστίου¹⁰¹

4.3 Το stress του ενδοπλασματικού δικτύου

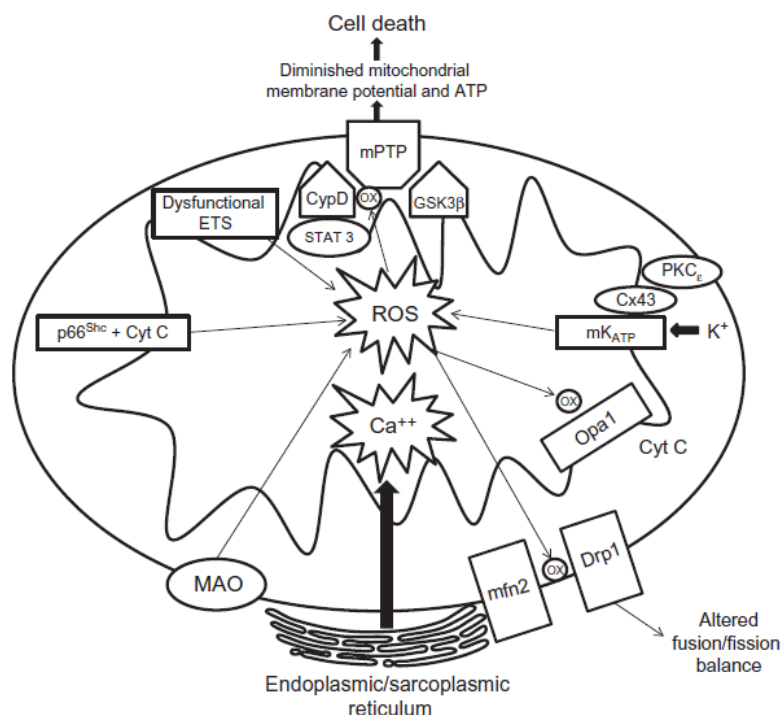
Το ενδοπλασματικό δίκτυο είναι ένα περίπλοκο δίκτυο μεμβρανών, που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα όλων των κυττάρων και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του ασβεστίου, στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και στη βιοσύνθεση των λιπών. Ποικίλοι στρεσογόνοι παράγοντες, όπως το οξειδωτικό stress και η ισχαιμία, εμποδίζουν τη λειτουργία του ενδοπλασματικού δικτύου, που οδηγεί σε μη φυσιολογικά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Η συσσώρευση τέτοιων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μία κατάσταση που ορίζεται ως stress του ενδοπλασματικού δικτύου, προκαλεί την αντίδραση τους μέσω ποικίλων μηχανισμών, όπως η έκφραση της σαπερόνης και η αποδόμηση των πρωτεϊνών που μπορεί να οδηγήσει στην κυτταρική απόπτωση. Υπερβολικό stress, σαν μέρος του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, μπορεί να επιτείνει φαινόμενα κυτταρικού θανάτου.¹⁰⁴

4.4 Δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια είναι η σημαντικότερη πηγή παραγωγής ενέργειας για το κύτταρο, μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από τα λιγότερο στα περισσότερο ηλεκτροαρνητικά μόρια, καταλήγοντας στο οξυγόνο, το πλέον ηλεκτροαρνητικό μόριο της αλυσίδας αυτής. Η όλη διαδικασία ονομάζεται οξειδωτική φωσφορυλίωση, μιας και το ADP φωσφορυλιώνεται σε ATP, χρησιμοποιώντας την ενέργεια της οξείδωσης του υδρογόνου. Τα μιτοχόνδρια παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της βλάβης του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, με την παραγωγή ROS, το άνοιγμα της mPTP και τη μιτοχονδριακή σχάση. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ανιόν του σουπεροξειδίου παράγεται από τα αναπνευστικά σύμπλοκα I και II. Λόγω έλλειψης του οξυγόνου, η ροή των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα αναστέλλεται. Σαν συνέπεια, η συνθάση του ATP δε μπορεί να φωσφορυλιώσει ADP και να δημιουργήσει ATP.¹⁰¹ Επιπλέον, προσπαθώντας τα μιτοχόνδρια να διατηρήσουν το διαμεμβρανικό δυναμικό τους, η ATP-συνθάση δρα αντίστροφα, υδρολύοντας ATP και οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό αδενοσίνης. Η αδενοσίνη μετατρέπεται σε ινοσίνη και αυτή τελικά σε ξανθίνη. Κατά την επαναιμάτωση, το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης ενεργοποιείται λόγω της διαθεσιμότητας του οξυγόνου. Σαν αποτέλεσμα, το οξυγόνο οξειδώνεται δημιουργώντας δραστικά μόρια, όπως το ανιόν του σουπεροξειδίου και ρίζες υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$). Η αποκατάσταση του οξυγόνου κατά την επαναιμάτωση είναι απαραίτητη για την παραγωγή του αναγκαίου ATP, αλλά παραδόξως επάγεται δυσλειτουργία στο κύτταρο με υπέρμετρη παραγωγή ROS (παράδοξο του οξυγόνου).¹⁰⁵

Το άνοιγμα των mPTP κατά την επαναιμάτωση πιστεύεται ότι είναι το τελικό μονοπάτι, που οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο.^{106, 107} Οι mPTP είναι κλειστοί κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, γιατί αναστέλλονται από το χαμηλό pH. Ωστόσο, κατά την επαναιμάτωση τα υψηλά ενδοκυττάρια επίπεδα ασβεστίου και η μεγάλη παραγωγή ROS επάγουν το άνοιγμά τους. Τότε, ιόντα K^+ εισέρχονται στη μήτρα των μιτοχονδρίων, εξουδετερώνοντας το διαμεμβρανικό δυναμικό τους και αναστέλλοντας τη σύνθεση ATP.¹⁰⁰ Επιπλέον, νερό εισέρχεται στα μιτοχόνδρια λόγω ωσμωτικής διαβάθμισης, προκαλώντας οίδημα και ρήξη των μιτοχονδρίων.¹⁰¹ Κατά την επαναιμάτωση, αναστέλλεται η αποδόμηση των λιπαρών οξέων, οδηγώντας σε συσσώρευση τοξικών οξέων μέσα στο κύτταρο και στην παραγωγή φλεγμονωδών μεταβολιτών μέσω του αραχιδονικού οξέος.¹⁰⁸ Τα μιτοχόνδρια είναι δυναμικά οργανίδια, που μπορούν να υποβληθούν σε σχάση και σύντηξη. Αλλαγές στη μορφολογία των μιτοχονδρίων και κατά συνέπεια στη λειτουργία τους, προκαλούνται όταν

αυτές οι δύο διαδικασίες βγαίνουν εκτός ισορροπίας. Χαμηλά επίπεδα ATP και αυξημένη μιτοχονδριακή παραγωγή ROS, λόγω της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, οδηγούν στη σχάση του μιτοχονδρίου και κατά συνέπεια στην απόπτωση (εικόνα 4.3).¹⁰²



Εικόνα 4.3: Ο ρόλος των μιτοχondρίων στην κυτταρική βλάβη που προκαλείται από τα σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης¹⁰¹

4.5 Ενεργοποίηση απόπτωσης

Το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση. Η ενεργοποίηση των προαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl2, όπως οι Bax, Bak, Bip και PUMA, η μετάθεση και η ενσωμάτωσή τους στην μιτοχονδριακή μεμβράνη έχουν αναφερθεί ως γεγονότα που σχετίζονται με το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Αυτές οι πρωτεΐνες διαπερνούν την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και έτσι ενεργοποιούν τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες, όπως το κυτόχρωμα C, Smac/DIABLO και την ενδονουκλεάση G. Το κυτόχρωμα C συνδέεται με την πρωτεΐνη apaf1 και αυτό το σύμπλοκο ενεργοποιεί τις πρωτεάσες κασπάση 9 και 3. Η Smac/DIABLO ενεργοποιεί τις κασπάσες απενεργοποιώντας τις ανασταλτικές πρωτεΐνες των κασπασών. Η ενδονουκλεάση G μεσολαβεί στον κατακερματισμό του DNA. Ωστόσο, η ισχαιμία μόνο δεν είναι επαρκής για την ενεργοποίηση της προαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2, αλλά απαιτείται και η επαναιμάτωση.

Δεδομένου του γεγονότος ότι πολλές προαποπτωτικές πρωτεΐνες Bcl2 είναι οξειδοαναγωγικά ευαίσθητες (εικόνα 4.3).¹⁰¹

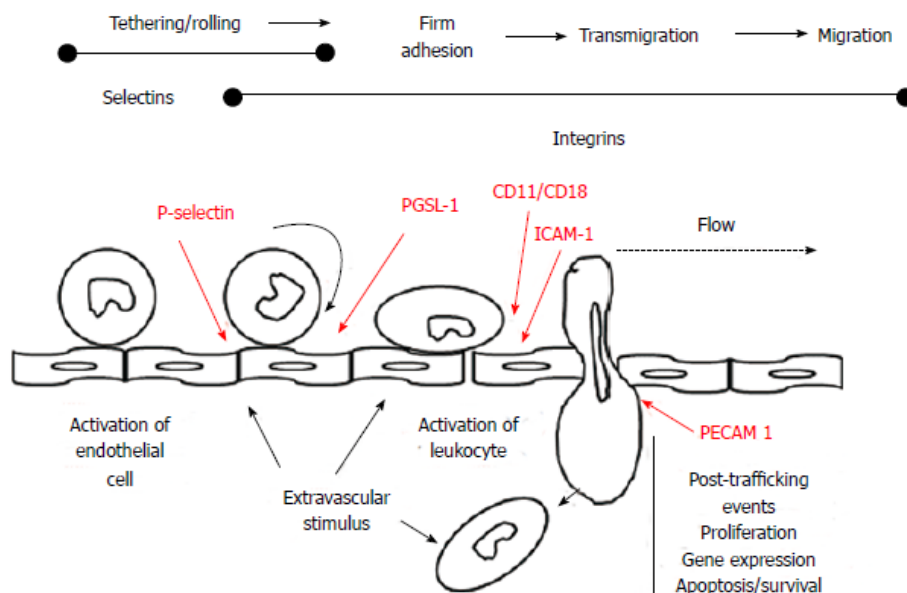
4.6 Ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης

Η ενεργοποίηση του ενδοκυττάριου μονοπατιού μεταγωγής σήματος παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Οι πρωτεϊνικές κινάσες, που θεωρούνται οι μεσολαβητές της βλάβης του συνδρόμου, είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνο (c-Jun, p38 MAPK), η πρωτεϊνική κινάση Cδ, η πρωτεϊνική κινάση εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη (CaMK) και τον υποδοχέα αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνικών κινασών (RIP kinases). Αυτές οι κινάσες-επαγωγείς θανάτου έχουν πολυάριθμους στόχους, που μπορούν να συνεισφέρουν στη βλάβη του συνδρόμου. Οι JNK και p38 οδηγούν σε ενεργοποίηση της παραγωγής των φλεγμονωδών κυτοκινών, όπως ο TNF-α και IL1, οι JNK, p38 και η πρωτεϊνική κινάση Cδ στην ενεργοποίηση των μονοπατιών θανάτου εξαρτωμένων από τα μιτοχόνδρια ή στην ενεργοποίηση διάφορων πρωτεϊνών Bcl2 που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο.¹⁰¹ Η CaMK στην υπερφόρτωση ασβεστίου μέσω της ενεργοποίησης των καναλιών Na^+ και Ca^{2+} και απελευθερώνοντας Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο και η RIP κινάση στην παραγωγή ROS.¹⁰⁹

4.7 Φλεγμονή και σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης χαρακτηρίζεται από ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων, χημειοταξία, σύνδεση λευκοκυττάρων-ενδοθηλίου, μετανάστευση λευκοκυττάρων, με αποτέλεσμα τη επαγωγή στείρας φλεγμονώδους αντίδρασης. Αυτή η φλεγμονή χαρακτηρίζεται από τη στρατολόγηση ουδετερόφιλων και την παραγωγή κυτοκινών και χυμοκινών. Η στρατολόγηση των κυττάρων της φυσικής ανοσίας πραγματοποιείται κυρίως κατά την επαναιμάτωση. Έτσι, πραγματοποιείται ο σχηματισμός των ROS από την οξειδάση της ξανθίνης ή την NADPH οξειδάση, που βρίσκονται στα κύτταρα της φυσικής ανοσίας. Τα ουδετερόφιλα αλληλεπιδρούν με το αγγειακό ενδοθήλιο σε διάφορα στάδια. Πρώτα, έχουμε το κύλισμα (rolling) των ουδετερόφιλων πάνω στο ενδοθήλιο, μετά την ισχυρή σύνδεση των ουδετερόφιλων με το ενδοθήλιο μέσω των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, κ.α.) και τελικά τη μετανάστευση των ουδετερόφιλων (εικόνα 4.4). Η μετανάστευση-διήθηση των

ουδετερόφιλων είναι αποτέλεσμα της φλεγμονώδους αντίδρασης στα νεκρά κύτταρα και στο σχηματισμό των μεσολαβητών, μερικοί εκ των οποίων εξαρτώνται από τη δημιουργία ROS.^{110, 111}



Εικόνα 4.4: Κύλιση, σύνδεση και μετανάστευση των ουδετερόφιλων¹¹¹

4.8 Κλινικές συνέπειες του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης στο νεφρικό μόσχευμα

Οι κλινικές συνέπειες του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης είναι η καθυστερημένη λειτουργία (DGF), η χρόνια δυσλειτουργία και η απόρριψη του μοσχεύματος. Η καθυστερημένη λειτουργία είναι αποτέλεσμα της οξείας βλάβης, λόγω του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, χωρίς ο μηχανισμός να είναι επαρκώς διευκρινισμένος. Ωστόσο, ο χρόνος ψυχρής ισχαιμίας, η κρεατινίνη του δότη, ο δείκτης μάζας σώματος του λήπτη, η λήψη οργάνων μετά από καρδιακό θάνατο και η ηλικία του δότη είναι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με αυτή.¹¹² Το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης έχει σαν αποτέλεσμα και την προοδευτική διάμεση ίνωση του νεφρικού μοσχεύματος σε πειραματικά μοντέλα. Στον άνθρωπο, η ανάπτυξη διάμεσης ίνωσης και σωληναριακής ατροφίας είναι τα ιστολογικά γνωρίσματα της χρόνιας δυσλειτουργίας του μοσχεύματος.¹¹² Η φλεγμονώδης αντίδραση σχετίζεται και με την αύξηση της ανοσογονικότητας του μοσχεύματος. Με την αύξηση του χρόνου ψυχρής ισχαιμίας αυξάνεται ο κίνδυνος για καθυστερημένη λειτουργία του μοσχεύματος, περίπου 23% για κάθε 6 ώρες επιπλέον ψυχρής ισχαιμίας. Συνεπώς, έχει αποδειχθεί ότι η καθυστερημένη λειτουργία του μοσχεύματος σχετίζεται με την οξεία απόρριψη.¹¹²

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΙΔΗΡΟΣ ΚΑΙ ΣΥΝΔΡΟΜΟ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ-ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ

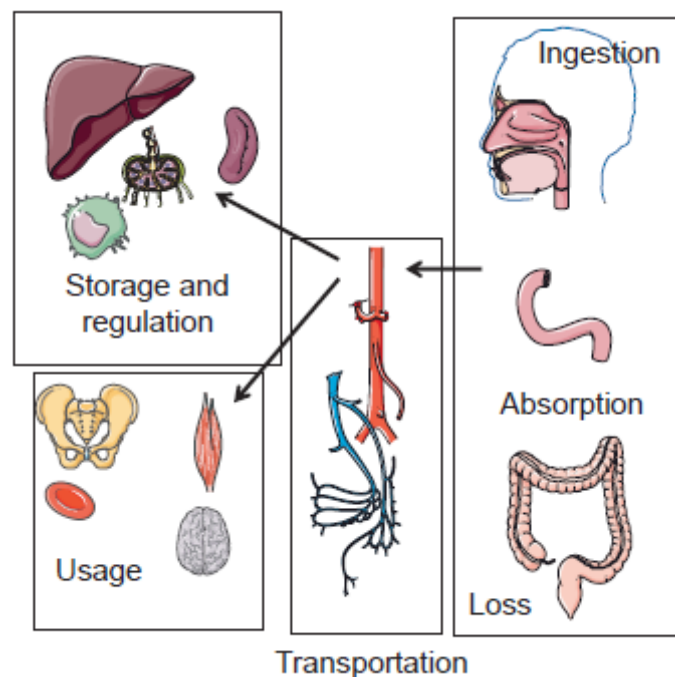
5.1 Συνοπτική φυσιολογία του μεταβολισμού του σιδήρου

Πολλές πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του σιδήρου. Η φερριτίνη (FT) και η τρανσφερρίνη (TF) είναι οι κύριες πρωτεΐνες αποθήκευσης και μεταφοράς του. Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες, επσιδίνη (hepcidin, HP) και ματριπτάση (matriptase, Mt2) είναι καθοριστικές για τη ρύθμιση του σιδήρου σε διάφορα επίπεδα. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες μεταφορέας δισθενούς μετάλλου-1 (DMT-1), φερροπορτίνη (FPN1) και ο υποδοχέας της τρανσφερρίνης (TFR), σε συνδυασμό με της φερροξιδάσες, όπως το δωδεκαδακτυλικό κυτόχρωμα B (DCYTB), η σερουλοπλασμίνη (CP) και η πρωτεΐνη φορέας της αίμης (HCP1), σχετίζονται με τη διαμεμβρανική μεταφορά του σιδήρου στο κύτταρο. Άλλες πρωτεΐνες, όπως η μυοσφαιρίνη και η αιμοσφαιρίνη, όπως και ένζυμα είναι τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού του σιδήρου.^{113, 114} Ο σίδηρος είναι παρών σε διάφορους τύπους κυττάρων. Κύτταρα εξαγωγής σιδήρου είναι τα εντεροκύτταρα, τα οποία απορροφούν σίδηρο από την πέψη των τροφών, τα μακροφάγα και τα ηπατοκύτταρα, τα οποία ανακυκλώνουν το σίδηρο ανάλογα με τις ανάγκες. Η ομοιοστασία του σιδήρου διατηρείται από τις πρωτεΐνες ρύθμισης (IRP1 και IRP2). Αυτές συνδέονται στις περιοχές του DNA που είναι υπεύθυνες για το σίδηρο (iron-response element, IRE) και κωδικοποιούν πρωτεΐνες υπεύθυνες για την πρόσληψη, αποθήκευση, χρησιμοποίηση και εξαγωγή του σιδήρου. Το σύστημα IRP/IRE είναι υπεύθυνο για την σύνθεση και την καταστολή πολλών πρωτεϊνών που συμπεριλαμβάνονται στην ομοιοστασία του σιδήρου.¹¹⁵

Οι άνδρες έχουν 4.000mg σιδήρου, από τα οποία τα 2.500mg είναι στα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα 1.000mg αποθηκευμένα στα μακροφάγα του σπληνός και του ήπατος και ο υπόλοιπος κατανέμεται σε διάφορες πρωτεΐνες, όπως η μυοσφαιρίνη, το κυτόχρωμα και άλλες. Μόνο 3mg σιδήρου είναι στο πλάσμα συνδεδεμένα με τρανσφερρίνη και αποτελούν τον κινητό σίδηρο, που προμηθεύει τις διάφορες ενδοκυττάρια αποθήκες. Στις γυναίκες η κατάσταση είναι διαφορετική, αφού χαμηλότερες τιμές αιμοσφαιρίνης και φερριτίνης θεωρούνται φυσιολογικές. Ακόμα πιο περίπλοκη είναι η κατάσταση στις εγκυμονούσες, στα νήπια και στα παιδιά, όπου οι απαιτήσεις για σίδηρο αυξάνονται. Περίπου 1-2mg σιδήρου χάνονται κάθε μέρα μέσω απολέπισης του δέρματος, απόπτωσης εντεροκυττάρων και

ελασσόνων απωλειών αίματος. Αυτές οι απώλειες εξισώνονται μέσω της εντερικής απορρόφησης σιδήρου (εικόνα 5.1).^{114, 116-118}

Μόνο ο τρισθενής σίδηρος (Fe^{3+}) μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα ή στα μιτοχόνδρια μέσω της τρανσφερρίνης. Μετά την αποδέσμευση του Fe^{3+} από την τρανσφερρίνη στην κυτταρική μεμβράνη, αυτός μειώνεται σε δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) από τη σιδηρορεδοκτάση και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένος με το μεταφορέα δισθενούς μετάλλου-1 (DMT1). Επιπλέον, λόγω της τοξικότητάς του, ο σίδηρος είναι συνδεδεμένος στο κυτταρόπλασμα με πρωτεΐνες (όπως η poly r(C)-binding protein), που λειτουργούν ως μεταφορείς σιδήρου και τον παραδίδουν στη φερριτίνη. Στο μόριο της φερριτίνης, αποθηκεύεται σε τρισθενή μορφή, συνδεδεμένος με ιόντα υδροξειδίου και φωσφόρου. Η φερριτίνη έχει επίσης και ενζυματικές ιδιότητες, μετατρέποντας τον τρισθενή σίδηρο σε δισθενή, καθώς αυτός εισέρχεται στον πυρήνα της φερριτίνης.^{114, 119}



Εικόνα 5.1: Μεταβολισμός σιδήρου¹¹⁴

5.2 Δεξαμενή ασταθούς σιδήρου (labile iron pool, LIP)

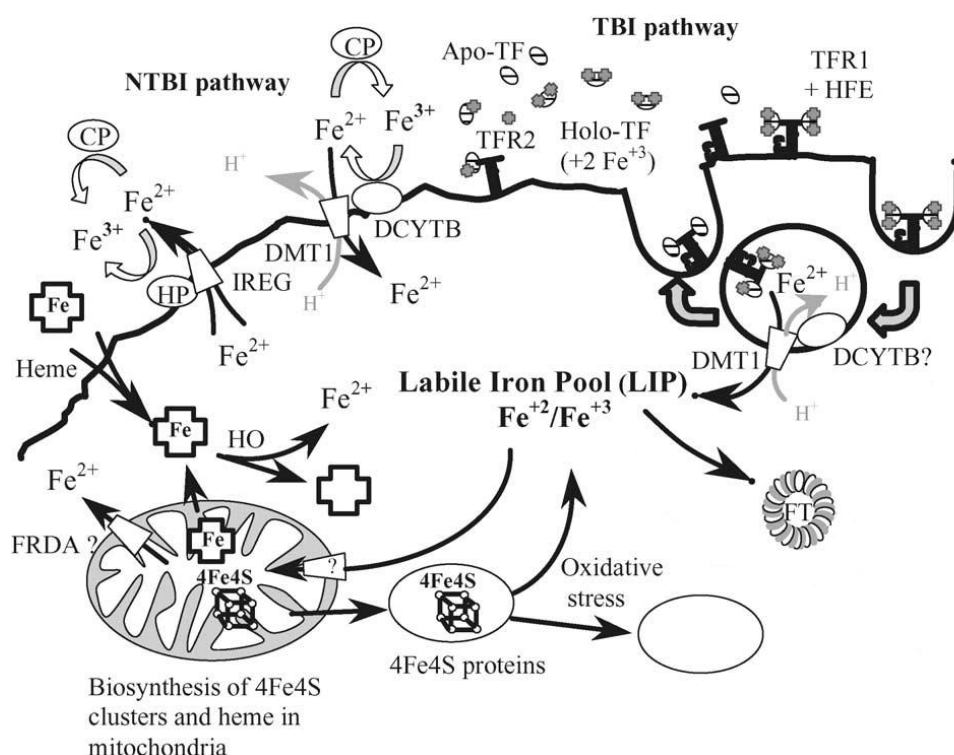
Από τη στιγμή που διάφορες πρωτεΐνες συμμετέχουν στην πρόσληψη, μεταφορά και αποθήκευση, υπάρχει μία δεξαμενή ιόντων σιδήρου που είναι προσβάσιμη σε αυτές τις διαδικασίες και ονομάζεται δεξαμενή ασταθούς σιδήρου (LIP). Αυτή αποτελεί το

σταυροδρόμι των μεταβολικών μονοπατιών του σιδήρου και των συμπλόκων του. Επιπλέον, έχει προταθεί ο όρος «σίδηρος που μπορεί να δεσμευτεί» (chelatable iron), ένας μεθοδολογικά σωστότερος όρος, ώστε να περιγραφεί η δεξαμενή ιόντων σιδήρου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους χηλικούς παράγοντες μετάλλων.¹²⁰⁻¹²²

Η LIP ορίζεται ως μία χαμηλού μοριακού βάρους δεξαμενή ιόντων σιδήρου, αποτελούμενη από δισθενή και τρισθενή ιόντα (Fe^{2+} και Fe^{3+}). Αποτελεί ένα μικρό ποσοστό του ολικού κυτταρικού σιδήρου (3-5%).^{121, 122} Ο λόγος ύπαρξης της LIP δεν έχει εξακριβωθεί, αλλά η προέλευση της έχει επακριβώς καθοριστεί. Το κύτταρο επιτρέπει συνέχεια την είσοδο εξωκυττάριου σιδήρου στο κυτταρόπλασμα του, για να καλύψει τις ανάγκες του (σύνθεση πρωτεϊνών). Έτσι, η πρόσληψη σιδήρου είναι η κύρια πηγή της LIP. Θεωρητικά, ο ημερήσιος προσλαμβανόμενος μέσω δίαιτας σίδηρος (1-2mg) θα περάσει από τη LIP, πριν δεσμευτεί από μία πρωτεΐνη. Στους περισσότερους θηλαστικούς οργανισμούς, ο σίδηρος προσλαμβάνεται με δύο οδούς, μέσω του μονοπατιού σύνδεσης με την τρανσφερρίνη (transferrin bound iron pathway, TBI pathway) και του μονοπατιού μη-σύνδεσης με την τρανσφερρίνη (non-transferrin bound iron pathway, NTBI pathway) (εικόνα 5.2).¹²³ Η τρανσφερρίνη που μεταφέρει σίδηρο, συνδέεται με τον υποδοχέα της στην κυτταρική μεμβράνη και με ενδοκύττωση τον παραδίδει στον DMT1. Θεωρείται, ότι η τρανσφερρίνη (TBI pathway) και ο DMT1 είναι σημαντικές πηγές σιδήρου για τη LIP. Στο NTBI μονοπάτι, ο σίδηρος που είναι συνδεδεμένος εισέρχεται στο κύτταρο με μία διαδικασία που μεσολαβεί ο DMT1 και πιστεύεται, ότι και αυτή είναι μία σημαντική πηγή σιδήρου για τη LIP.^{124, 125}

Επιπρόσθετα με την εξωκυττάρια πρόσληψη σιδήρου, μία ακόμη σημαντική πηγή για τη LIP είναι ο ενδοκυττάρια συνδεδεμένος σίδηρος με πρωτεΐνες. Η πιο γνωστή πρωτεΐνη είναι η φερριτίνη, μία πρωτεΐνη αποθήκευσης σιδήρου, που μπορεί να αποθηκεύσει 4.500 Fe^{3+} σε κάθε μόριό της. Η φερριτίνη δεσμεύοντας το σίδηρο προστατεύει το κύτταρο από την τοξικότητά του. Υπερέκφρασή της μειώνει τα επίπεδα της LIP και τη βλάβη που επάγεται στο DNA από το H_2O_2 .^{126, 127} Η αίμη αποτελεί μία άλλη σημαντική πηγή σιδήρου για τη LIP. Αυτή εισέρχεται στα κύτταρα με τη βοήθεια ενός υποδοχέα μεταφέροντας σίδηρο, ο οποίος οδηγείται σε οξειδοαναγωγική αντίδραση, δημιουργώντας υψηλής τοξικότητας οξειδωμένα προϊόντα.¹²⁸ Το κύτταρο για να προστατευτεί από την τοξική δράση του σιδήρου της αίμης, κάτω από συνθήκες οξειδωτικού stress, στρατολογεί την οξυγενάση της αίμης (heme oxygenase, OH).¹²⁹ Η OH οξειδώνει την αίμη σε CO, μπιλιβερντίνη και Fe^{2+} . Ακολούθως, η μπιλιβερντίνη μετατρέπεται σε χολερυθρίνη, ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό παράγοντα.¹³⁰

Έτσι, η ΟΗ αποτρέπει την τοξικότητα της αίμης, αλλά το ιόν σιδήρου που απελευθερώνεται εισέρχεται στη LIP και θέτει το κύτταρο σε κίνδυνο.¹³¹ Τέλος, στο σχηματισμό της LIP σημαντικό ρόλο παίζουν οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν σίδηρο, αλλά δεν ανήκουν στην αίμη. Μεταξύ αυτών, οι πρωτεΐνες συμπλέγματος σιδήρου-θείου (Fe-S) έχουν μεγάλη σημασία. Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από ένα ή περισσότερα ιόντα σιδήρου συνδεδεμένα στο ανόργανο θείο, σχηματίζοντας επίπεδα ή κυβικά συμπλέγματα σιδήρου-θείου. Ο βασικός ρόλος τους είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων.¹³² Η δράση πολλών τέτοιων πρωτεϊνών, ιδιαίτερα του συμπλέγματος 4Fe-4S, είναι ευαίσθητες στο οξειδωτικό stress.¹³³



Εικόνα 5.2: Πηγές και κατάληξη της LIP (τροποποιημένη)¹³⁴

5.3 Ο ρόλος της LIP στο σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Ο σίδηρος παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ενέργειας, της μεταφοράς οξυγόνου και της σύνθεσης του DNA. Η εξάρτηση της ζωής από το μέταλλο αυτό οφείλεται στο ότι ο σίδηρος δρα ως συμπράγοντας μέσα σε δραστικά σημεία ενζύμων, που συμμετέχουν στα βιοχημικά μονοπάτια. Η καταλυτική του ικανότητα βρίσκεται στην οξειδοαναγωγική αντίδρασή του,

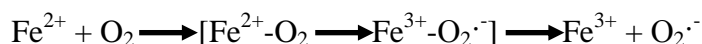
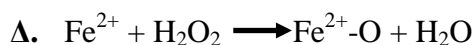
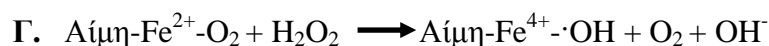
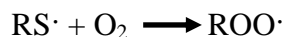
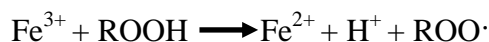
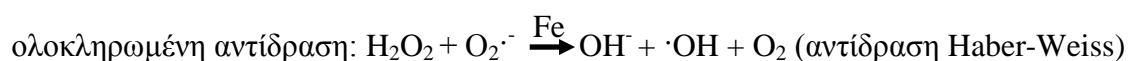
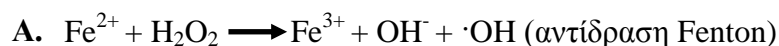
μιας και μπορεί να εναλλάσσεται μεταξύ δύο μορφών, του τρισθενή και του δισθενή σιδήρου, να δρα δηλαδή ως δότης, αλλά και δέκτης ηλεκτρονίων.¹³⁵ Ωστόσο, η ιδιότητα αυτή τον μετατρέπει και σε κίνδυνο, μιας και μπορεί να καταλύσει τη δημιουργία επιβλαβών ριζών. Η τοξικότητα του σιδήρου βασίζεται στις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss (εικόνα 5.3, A), μέσω των οποίων είναι ικανός να παράγει ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$) από ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^-$) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), γνωστά ως δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Οι ROS είναι υποπροϊόντα του αερόβιου μεταβολισμού και προκύπτουν από την ατελή μείωση του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια. Μπορούν ακόμα να δημιουργηθούν κατά τη διάρκεια αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα σε διάφορα διαμερίσματα του κυττάρου, όπως τα υπεροξειδισώματα, το ενδοπλασματικό δίκτυο και το κυτταρόπλασμα.¹³⁶

Οι ROS παράγονται και από τη NADPH οξειδάση, ένα ένζυμο που εκφράζεται κυρίως στα ουδετερόφιλα και στα μακροφάγα. Η NADPH οξειδάση είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την αντιμικροβιακή άμυνα του οργανισμού, η οποία ενεργοποιείται στη λοίμωξη και παράγει ανιόν του σουπεροξειδίου σε μία «αναπνευστική έκρηξη». Στη συνέχεια αυτό μετατρέπεται σε υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα προϊόντα της αντίδρασης δημιουργούν πολύ οξειδωτικές ενώσεις, όπως το περοξυνιτρώδες (ONOO^-) και το υποχλωριώδες (OCl^-), που ενισχύουν τη βακτηριοκτόνο ικανότητα των φαγοκυττάρων. Το περοξυνιτρώδες δημιουργείται αυθόρμητα με την αντίδραση με το NO, ενώ το υποχλωριώδες σχηματίζεται από το υπεροξειδίου του υδρογόνου με ιόντα χλωρίου, σε μία αντίδραση που καταλύεται από την μυελοπεροξειδάση.¹³⁷

Η οξειδοαναγωγική δράση του σιδήρου δε καταλύει μόνο τη δημιουργία ριζών υδροξυλίου, αλλά επίσης και οργανικές δραστικές μορφές, όπως θειλικές (RS), υπεροξειδίου ($\text{ROO}\cdot$) και αλκοξειδίου ($\text{RO}\cdot$) ρίζες (εικόνα 5.3, B). Ακόμα, ο σίδηρος που περιέχεται στην αίμη μπορεί να καταλύσει το σχηματισμό ριζών (π.χ. oxoferryl) (εικόνα 5.3, Γ). Ο Fe^{2+} μπορεί να δράσει σαν αντιδραστήριο για τη δημιουργία ελευθέρων ριζών, αντιδρώντας απευθείας με το οξυγόνο ($\text{Fe}^{2+}-\text{O}$, $\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2$) (εικόνα 5.3, Δ). Έχει δειχθεί, ότι όταν $[\text{O}_2]/[\text{H}_2\text{O}_2] > 100$ η αντίδραση αυτή αντιπροσωπεύει μία σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών *in vivo*.^{138, 139}

Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά μόρια και προάγουν την οξείδωση των πρωτεϊνών, των μεμβρανικών λιπιδίων και τη διαμόρφωση των νουκλεϊκών οξέων. Ομοίως, οι δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), όπως το περοξυνιτρώδες

(ONOO⁻), μπορούν να οδηγήσουν στην καταστροφή των πρωτεϊνών. Η αύξηση των επιπέδων των ROS και RNS πάνω από την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού καλείται οξειδωτικό stress, το οποίο εμφανίζεται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, η φλεγμονή και οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις. Περίσσεια σιδήρου με οξειδοαναγωγική δράση επιδεινώνει το οξειδωτικό stress και οδηγεί σε επιταχυνόμενη βλάβη των ιστών.^{137, 140}



Εικόνα 5.3: **A.** Δημιουργία ρίζας υδροξυλίου καταλυόμενης από σίδηρο μέσω της αντίδρασης Fenton. Το ανιόν του σουπεροξειδίου θα μπορούσε να αναγάγει εκ νέου το Fe^{3+} , ούτως ώστε αυτό να δρα καταλυτικά. Το άθροισμα αυτών των δύο αντιδράσεων μπορεί να θεωρηθεί σαν μία μεταλλοκαταλυόμενη αντίδραση Haber-Weiss.

B. Δημιουργία οργανικών ριζών που καταλύεται από το σίδηρο.

Γ. Δημιουργία ριζών οξυγόνου που καταλύονται από αίμη μέσω ενδιάμεσων oxoferryl.

Δ. Άμεση αλληλεπίδραση σιδήρου με οξυγόνο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

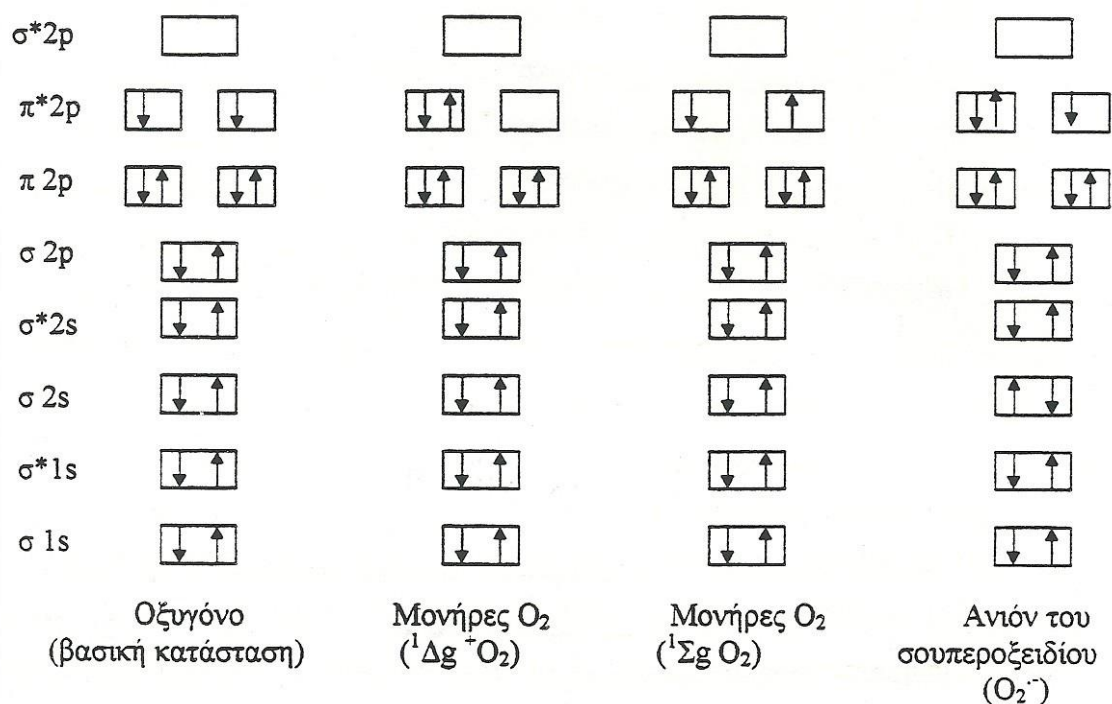
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ STRESS

6.1 Ορισμός οξειδωτικού stress

Το οξειδωτικό stress αρχικά ορίστηκε από τον Sies (1985), ως κατάργηση της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων, που οδηγεί σε κυτταρική βλάβη. Μπορεί να πρόκειται για απλό ορισμό, όμως προκύπτουν τρία ζητήματα από αυτόν: 1) η διαδικασία παραγωγής ROS, 2) ο λόγος της υψηλής τους τοξικότητας και 3) η ύπαρξη ενός συστήματος αποτοξίνωσης. Για την ομαλή λειτουργία του κυττάρου υπάρχει ισορροπία μεταξύ των φυσιολογικών λειτουργιών των ROS και της μείωσης των επιβλαβών συνεπειών τους, μέσω του αντιοξειδωτικού μηχανισμού.¹⁴¹

6.2 Χημική δομή οξυγόνου

Το μόριο του οξυγόνου έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με την ίδια στροφορμή (spin) στις εξωτερικές τους στοιβάδες. Το γεγονός ότι τα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια του μοριακού οξυγόνου (triplet O₂) έχουν παράλληλη στροφορμή μπορεί να εξηγήσει το φαινόμενο της μικρής σχετικά οξειδωτικής ικανότητάς του. Τα ηλεκτρόνια αυτά δεν είναι δυνατόν να αντιδράσουν με ζεύγη ηλεκτρονίων άλλων ενώσεων (αντιπαράλληλη στροφορμή), λόγω της αρχής του Pauli. Αντίθετα, στο διεγερμένο μοριακό οξυγόνο (μονήρες O₂ ή singlet O₂) τα δύο ηλεκτρόνια αποκτούν αρχικά αντιπαράλληλη στροφορμή, σε διαφορετικά τροχιακά (Σ μορφή) και αυτομάτως συνενώνονται στην ίδια στοιβάδα (Δ μορφή), οπότε πλέον δεν αποτελούν ελεύθερη ρίζα. Το μονήρες οξυγόνο όμως είναι εξαιρετικά δραστικό οξειδωτικό μέσο, διότι έχει αρθεί η παρεμπόδιση σύμφωνα με την αρχή του Pauli. Οι ονομασίες triplet O₂ και singlet O₂ για το O₂ και το μονήρες οξυγόνο αντίστοιχα, εκφράζουν τις καταστάσεις των ασύζευκτων ηλεκτρονίων. Η τιμή της γωνιώδους ροπής M (multiplicity) δίνεται από τον τύπο $M=2S+1$ (όπου S είναι το αλγεβρικό άθροισμα των στροφορμών), δηλαδή το O₂ με $S = 2 \times \frac{1}{2} = 1$, έχει $M = 3$ (triplet), ενώ το μονήρες O₂ έχει $S = -\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 0$ και συνεπώς $M = 1$ (singlet) (εικόνα 6.1).¹⁴²



Εικόνα 6.1: Απεικόνιση των δεσμών και της ηλεκτρονιακής στροφορμής, στις διάφορες μορφές του διατομικού μορίου του οξυγόνου¹⁴²

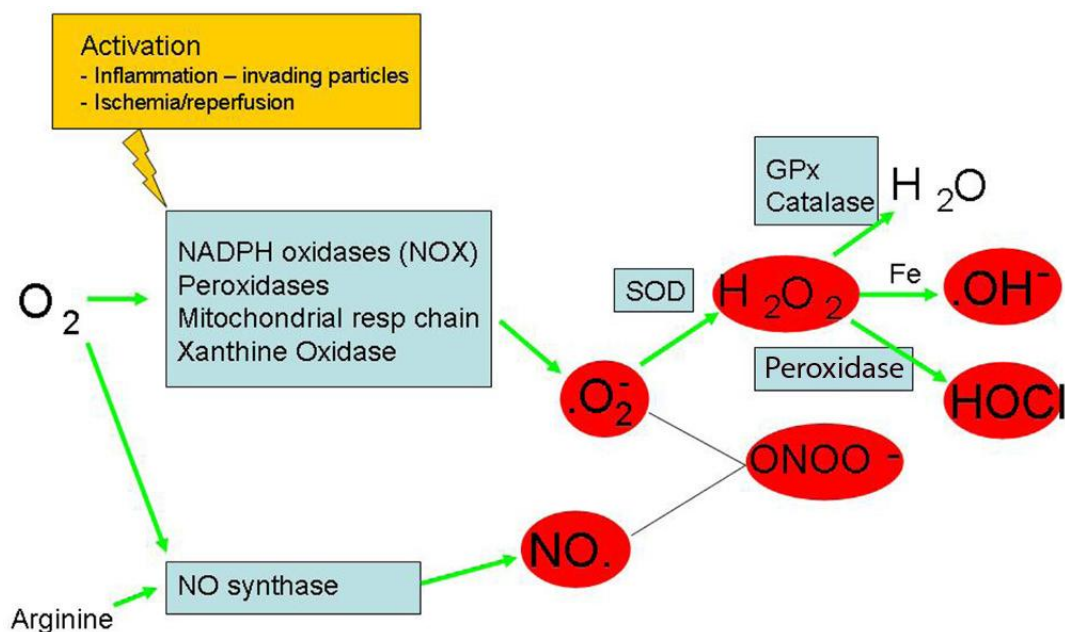
6.3 Παραγωγή ROS

Οι ROS αποτελούν ενεργείς μορφές οξυγόνου (πίνακας 6.1), που χρειάζονται σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου και σε απάντηση πολλών ερεθισμάτων. Το μόριο του οξυγόνου δεν αντιδρά αυθόρμητα με άλλα μόρια, καθώς περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Η αντίδρασή του με άλλα οργανικά μόρια γίνεται με δύο τρόπους: 1) το οργανικό μόριο πρέπει να περιέχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα, αφαιρώντας το ένα από τα δύο συζευγμένα ηλεκτρόνια (οξειδωση) και 2) το οξυγόνο να μπορεί να μετατραπεί σε ρίζα με την προσθήκη ενός επιπλέον ηλεκτρονίου (μείωση). Αυτές οι διαδικασίες απαιτούν ενέργεια, που προσφέρεται από συμπλέγματα μετάλλων ή ένζυμα, όπως η οξυγενάση και η οξειδάση, που μετατρέπουν οργανικά μόρια και το οξυγόνο σε ελεύθερες ρίζες, αντίστοιχα. Η οξυγενάση καταλύει την εξαγωγή $H\cdot$ (ένα άτομο υδρογόνου με το ηλεκτρόνιό του) από ένα μόριο. Η οξειδάση μεταφέρει ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο δότη στο οξυγόνο, δημιουργώντας έτσι ένα ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$). Από ταυτο σχηματίζεται υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) αυθόρμητα ή με τη βοήθεια ενζύμου (δισμουτάση του σουπεροξειδίου, SOD). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι σχετικά σταθερό και μπορεί να διαχυθεί μακριά από το σημείο παραγωγής του. Ακολουθώντας,

υπάρχουν τα εξής πιθανά βήματα: 1) αποτοξίνωση με τη δημιουργία νερού (H_2O), με τη βοήθεια του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) ή καταλάσης από τα σύμπλοκα της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας, 2) δημιουργία ρίζας υδροξυλίου ($\cdot OH$) με την παρουσία δισθενούς σιδήρου και 3) μετατροπή σε υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) από την υπεροξειδάση (εικόνα 6.2).^{141, 143-145}

Ελεύθερες ρίζες		Μη-ελεύθερες ρίζες	
$O_2^{\cdot -}$	Ανιόν του σουπεροξειδίου	H_2O_2	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
$\cdot OH$	Ρίζα υδροξυλίου	1O_2	Μονήρες οξυγόνο
$RO\cdot$	Ρίζα αλκοξειδίου	$HOCl$	Υποχλωριώδες οξύ
$ROO\cdot$	Ρίζα υπεροξειδίου	O_3	Όζων
$ONOO^-$	Περοξυνιτρώδες	$NO\cdot$	Ρίζα μονοξειδίου του αζώτου

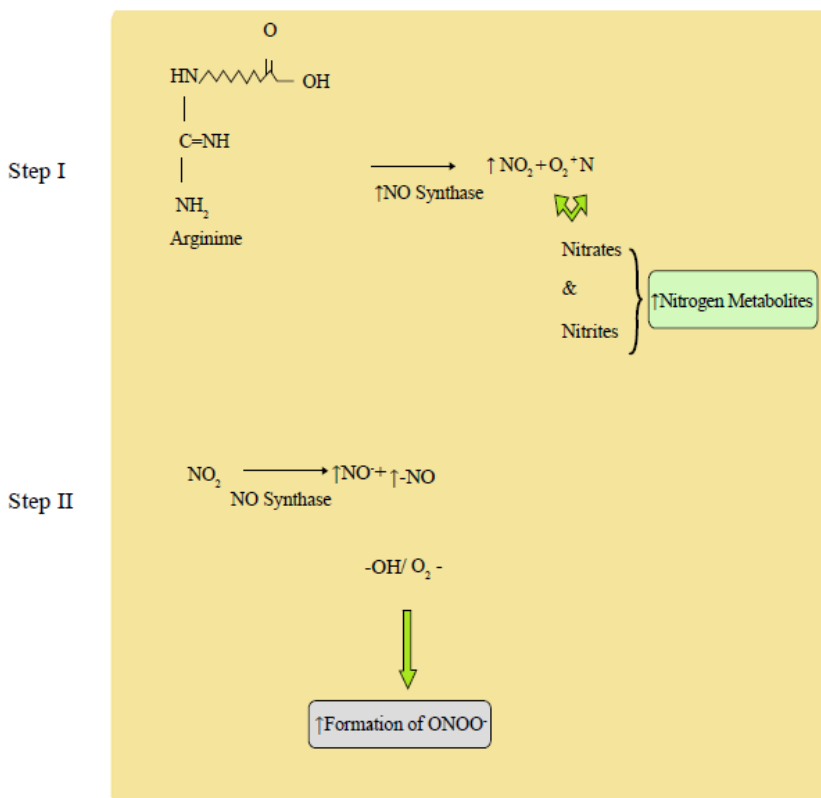
Πίνακας 6.1: Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)



Εικόνα 6.2: Σχηματική αναπαράσταση των μηχανισμών παραγωγής ROS¹⁴¹

6.4 Το νιτρικό οξύ (NO) και η συμμετοχή του στο οξειδωτικό stress

Το NO είναι ένα μόριο που συμμετέχει σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες και κυρίως ρυθμίζει τον τόνο των αγγείων και την αιματική ροή τοπικά. Το υπόστρωμα για τη σύνθεσή του είναι η L-αργινίνη. Με την παρουσία οξυγόνου, ένα άζωτο της L-αργινίνης οξειδώνεται με αποτέλεσμα τη δημιουργία NO. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τη συνθάση του NO (NOS). Υπάρχουν διάφορες ισομορφές NOS, ανάλογες με τη λειτουργία τους και το κύτταρο στο οποίο παράγονται. Υψηλές συγκεντρώσεις NO αποβαίνουν καταστροφικές για το κύτταρο, κυρίως σε περιοχές φλεγμονής. Πρόκειται για το αποτέλεσμα της παραγωγής ενός δραστικού ενδιάμεσου μορίου, του περοξυνιτρώδους (ONOO⁻), το οποίο αποδομείται σε άλλα δραστικά ενδιάμεσα (ελεύθερες ρίζες αζώτου). Το NO και τα δραστικά του ενδιάμεσα ζουν λίγο και γι' αυτό μπορούν να διαχυθούν μόνο σε μικρές αποστάσεις πριν αποδομηθούν. Το NO απενεργοποιείται από την αίμη, όποτε έρχεται σε επαφή με το αίμα. Αυτό και τα δραστικά ενδιάμεσά του αντιδρούν με πρωτεΐνες για να σχηματίσουν S-νιτροσοθειόλες, οι οποίες έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής και δρουν σαν δεξαμενή βιοδιαθεσιμότητας του NO (εικόνα 6.3).^{143, 144, 147}



Εικόνα 6.3:
Σύνθεση νιτρικού οξέος
από αργινίνη¹⁴³

6.5 Μονοπάτια που περιλαμβάνουν τη δημιουργία ROS

Οι ROS δημιουργούνται μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως του εξαρτώμενου από ασβέστιο, της πρωτεϊνικής κινάσης της τυροσίνης, της πρωτεϊνικής φωσφατάσης της τυροσίνης, της κινάσης σερίνης/θρεονίνης, της φωσφολιπάσης, των πρωτεϊνικών κινασών που ενεργοποιούνται από μιτογόνα, του NFκB, των υποδοχέων κυτοκινών, των υποδοχέων που συνδέονται με G-πρωτεΐνη, του υποδοχέα διαύλων ιόντων και του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα.¹⁴³

6.5.1 Υποδοχείς κυτοκινών

Σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα, οι υποδοχείς των κυτοκινών IL-1, TNF-α και NF-κB είναι από τους πρώτους που δημιουργούν ROS. Ο TNF-α και οι οξειδωτικοί παράγοντες μπορούν συνεργικά να ενεργοποιήσουν τον NF-κB, με μηχανισμούς εξαρτώμενους από ROS. Ο TNF-α ευθύνεται για την παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια, που εμπλέκονται στην κυτταρική απόπτωση. Επίσης, ενεργοποιεί την IL-8 και την παραγωγή χυμοκινών, που επάγουν υπερτροφία των καρδιακών μυοκυττάρων, μέσω μηχανισμού που εξαρτάται από τις ROS. Τρία διαφορετικά κυτταρικά μονοπάτια του NF-κB έχουν ταυτοποιηθεί πως ενεργοποιούνται από την IL-1β και οδηγούν στη παραγωγή ROS: από την 5-LOX στα λεμφοκύτταρα, από μονοπάτια ανεξάρτητα από την 5-LOX στα επιθηλιακά κύτταρα και από την NADPH-οξειδάση στα μονοκύτταρα.¹⁴³

6.5.2 Υποδοχείς πρωτεϊνικής κινάσης

Ένας σημαντικός αριθμός αυξητικών παραγόντων συνδέεται με τον υποδοχέα της πρωτεϊνικής κινάσης, για την παραγωγή ROS. Έχει βρεθεί ότι ο αιμοπεταλιακός αυξητικός παράγοντας (PDGF) ενεργοποιεί το ενδοκυττάριο H₂O₂, που απαιτείται για τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης, τη σύνθεση του DNA και τη χημειοταξία και ενεργοποίηση της MAPK. Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) επάγει τη δημιουργία H₂O₂, αναστέλλοντας την δραστηριότητα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης της τυροσίνης. Έχει βρεθεί, ότι ο EGF ενεργοποιεί το ενδοκυττάριο O₂ μέσω του μονοπατιού LOX. Η σύνδεση της ηπαρίνης στον EGF ενεργοποιεί τις ROS στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Η επαγόμενη από τον EGF παραγωγή υπεροξειδίων ενισχύει την ογκογένεση και τη μεταστατική ικανότητα. Ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών-2 (FGF-2) ενεργοποιεί το ενδοκυττάριο H₂O₂ μέσω επαγωγής του c-Fos στα χονδοκύτταρα, χρησιμοποιώντας φλαβοπρωτεϊνική οξειδάση.¹⁴³

6.5.3 Κινάση σερίνης/θρεονίνης

Αυτοί οι υποδοχείς ανήκουν στην υπεροικογένεια TGF-β1. Σε οστεοβλάστες ποντικού έχει αποδειχθεί αναστολή της ανάπτυξης με την προσθήκη H₂O₂. Σε πνευμονικά κύτταρα ο TGF-β1 αναστέλλει την έκφραση της δισμουτάσης του σουπεροξειδίου και μειώνει τα ενδοκυττάρια επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH). Το προ-οξειδωτικό αποτέλεσμα του TGF-β1 είναι η ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη, η απόπτωση, η αυτοενεργοποίηση του TGF-β1, η ενεργοποίηση του TGF-β, ο κυτταρικός μετασχηματισμός, η σύνθεση του κολλαγόνου, η διαφοροποίηση των μυοβλαστών και άλλα.¹⁴³

6.5.4 Υποδοχείς που συνδέονται με G-πρωτεΐνη

Διάφοροι συνδέτες, όπως η αγγειοτενσίνη II, η σεροτονίνη, η 5-υδροξυτρυπταμίνη, η βραδικινίνη, η θρομβίνη και η ενδοθηλίνη δημιουργούν ROS. Η αγγειοτενσίνη II διεγείρει την παραγωγή τους στα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων. Έχει βρεθεί, ότι η φωσφορυλίωση της τυροσίνης από την GTPάση, επάγεται από την ενδοκυττάρια 5-υδροξυτρυπταμίνη, η οποία δημιουργεί ανιόν του σουπεροξειδίου χρησιμοποιώντας τα μονοπάτια του μιτογόνου μέσω της NADPH-οξειδάσης. Η βραδικινίνη έχει αγγειοδιασταλτική δράση και επάγεται από το NO. Η δημιουργία ROS στα ενδοθηλιακά κύτταρα γίνεται κυρίως μέσω του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, χρησιμοποιώντας το μονοπάτι της κυκλοοξυγενάσης. Η θρομβίνη δημιουργεί ROS στα λεία μυϊκά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, χρησιμοποιώντας τη δραστηριότητα της NADPH οξειδάσης για μιτογένεση.¹⁴³

6.5.5 Υποδοχείς διαύλων ιόντων

Νευροδιαβιβαστές, όπως η 5-υδροξυτρυπταμίνη, η ακετυλοχολίνη, η γλουταμίνη, η γλυκίνη, το γ-αμινοβουτυρικό οξύ, επάγονται μέσω σηματοδότησης μεταξύ ηλεκτρικά διεγερτικών κυττάρων χρησιμοποιώντας διαύλους ιόντων.¹⁴³

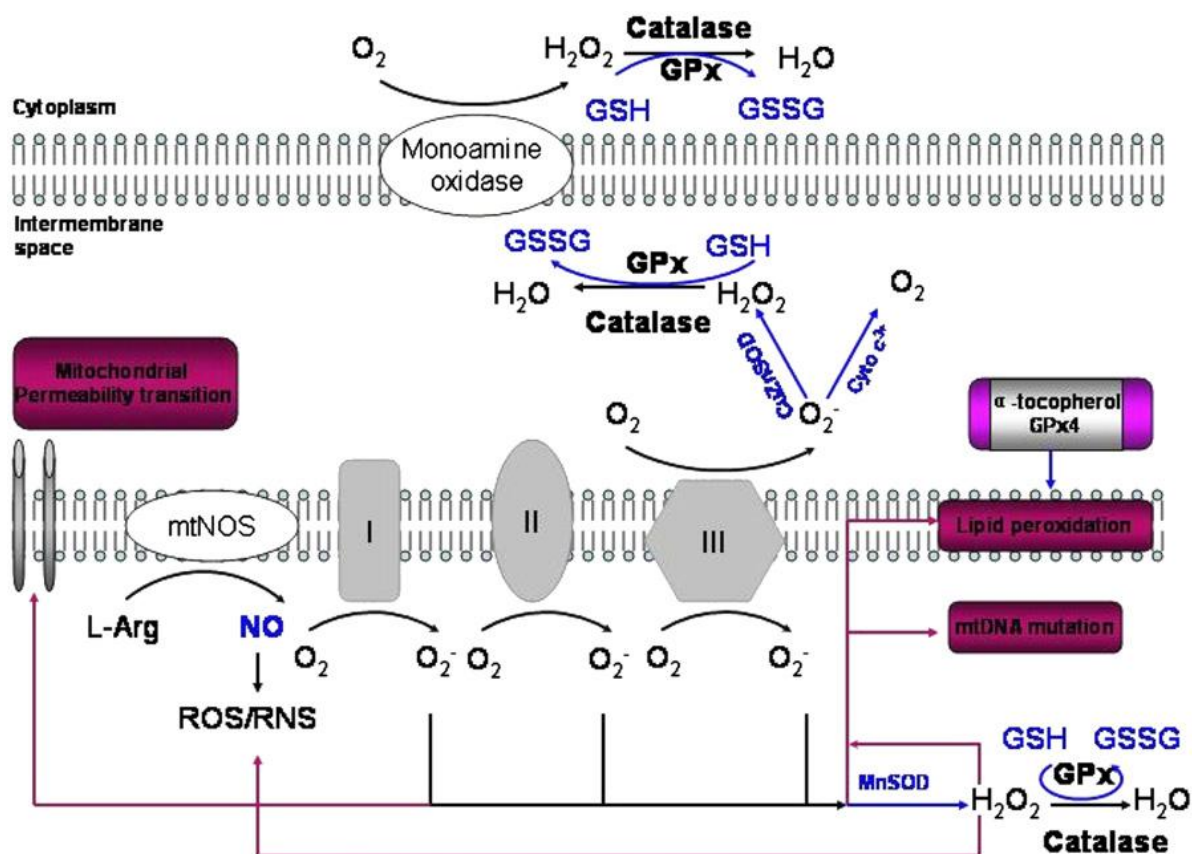
6.6 Μιτοχόνδρια και παραγωγή ROS-NO

Τα μιτοχόνδρια μπορούν να λειτουργήσουν σαν πρωταρχική πηγή ROS στα περισσότερα κύτταρα. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 0,2-2% του καταναλωμένου O₂ μετατρέπεται σε ανιόν του σουπεροξειδίου στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Σε υγιή κύτταρα με υψηλό αναπνευστικό ρυθμό, όπως τα καρδιακά μυϊκά κύτταρα η δημιουργία ROS προέρχεται, κατά το 90% περίπου, από τα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες

έχουν δείξει ότι η NADPH-οξειδάση είναι η πρωταρχική πηγή ROS στα αγγειακά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων. Η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων δημιουργεί ανιόν του σουπεροξειδίου ως αναπόφευκτο υποπροϊόν στο σύμπλοκο I και III. Παραδόξως, η δημιουργία του ανιόντος του σουπεροξειδίου ενισχύεται στο σύμπλοκο III κατά τη διάρκεια υποξίας, μέσω της αυτοοξειδωσης της ουβικινόνης και στις δύο πλευρές της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το ανιόν του σουπεροξειδίου, είτε παραμένει στο διαμεμβρανικό χώρο, είτε απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, σχηματίζοντας υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη σταθεροποίηση του παράγοντα επαγόμενου από υποξία-1α (HIF-1α). Ο HIF-1α μπορεί να πυροδοτήσει ποικίλες λειτουργικές ανταποκρίσεις, όπως αγγειοσυστολή και διέγερση της γονιδιακής έκφρασης του VEGF, ενισχύοντας την αγγειογένεση, η οποία μπορεί να αυξήσει την αντοχή του κυττάρου στην υποξία. Ο μηχανισμός δημιουργίας του ανιόντος του σουπεροξειδίου λόγω υποξίας, που προέρχεται από το σύμπλεγμα III, δεν είναι πλήρως κατανοητός. Αλλά, έχει προταθεί ότι η ημίσεια ζωή της ουμπισεμικινόνης παρατείνεται από τις δομικές αλλαγές του συμπλέγματος III ως απόκριση στην υποξία. Αυτή η δομική αλλαγή αυξάνει την προσβασιμότητα του O₂ σε μονά ηλεκτρόνια. Επιπλέον, περισσότερο ανιόν του σουπεροξειδίου κατευθύνεται στον διαμεμβρανικό χώρο παρά στη μήτρα του μιτοχονδρίου.¹⁴⁶

Μέχρι στιγμής δεν υπάρχει ομοφωνία για την παραγωγή ROS στο σύμπλεγμα I. Το ανιόν του σουπεροξειδίου μπορεί να δημιουργείται από την αντίστροφη μεταφορά ηλεκτρονίων σε απουσία NAD⁺-συνδεόμενου υποστρώματος στην οξείδωση της σουκινάτης στο σύμπλεγμα I [δεϋδρογονάση της σουκινάτης (succinate dehydrogenase, SDH)] ή σε χαμηλότερες ποσότητες στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NAD⁺-συνδεόμενο υπόστρωμα. Το παραγόμενο στο σύμπλεγμα I ανιόν του σουπεροξειδίου μπορεί να απελευθερωθεί μόνο στην μιτοχονδριακή μήτρα και όχι στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, επτά ακόμα μιτοχονδριακές θέσεις έχουν προταθεί για τη δημιουργία του. Η ρεδουκτάση του κυτοχρώματος b5, η οξειδάση της μονοαμίνης, η διυδροοροϊκή δεϋδρογονάση, η δεϋδρογονάση του α-γλυκεροφωσφορικού, η SDH, η ακονιτάση και το σύμπλεγμα της δεϋδρογονάσης του α-κετογλουταρικού (εικόνα 6.4).¹⁴⁶

Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την παραγωγή NO στα μιτοχόνδρια, από τη μιτοχονδριακή συνθάση του νιτρικού οξέος (mtNOS). Αυτό υποδεικνύει πως το μιτοχόνδριο είναι πηγή του NO (εικόνα 6.4). Επίσης, αυτό σημαίνει πως η αναπνευστική αλυσίδα μπορεί να ρυθμιστεί από την τοπική παραγωγή NO. Οι συνέπειες της δραστηριότητας της NOS, όσον



Εικόνα 6.4: Παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια και αντιοξειδωτικό δίκτυο¹⁴⁶

αφορά τη λειτουργία των μιτοχονδρίων, εξαρτώνται από την ποσότητα του παραγόμενου NO. Χαμηλά επίπεδα NO αναστέλλουν μερικώς την αναπνευστική αλυσίδα. Η μερική αυτή αναστολή της αναπνευστικής αλυσίδας αυξάνει τη μιτοχονδριακή παραγωγή ROS, για σύντομο χρονικό διάστημα, που οδηγεί σε περαιτέρω εκπόλωση του μιτοχονδρίου. Αυτό σχετίζεται με σημαντική μείωση του ασβεστίου στο μιτοχόνδριο, η οποία αυξάνει την κυτταρική αντίσταση στη βλάβη. Επιπλέον, η μεγάλη παραγωγή NO μπορεί να προκαλέσει ιστική βλάβη. Υψηλές συγκεντρώσεις του σε σχετικά χαμηλή ιστική τάση O_2 προκαλεί πλήρη αναστολή του αναπνευστικού μεταβολισμού. Στην περίπτωση αυτή, ακόμα και αν οι ιστοί εφοδιάζονται επαρκώς με O_2 , δεν μπορούν να το χρησιμοποιήσουν. Στο μεταξύ δημιουργείται περισσότερο ανιόν του σουπεροξειδίου, που αντιδρά με NO και σχηματίζει περοξυνιτρώδες ($ONOO^-$), μία εξαιρετικά δραστική ρίζα, η οποία βλάπτει περαιτέρω τη λειτουργία του μιτοχονδρίου. Ως αποτέλεσμα, ανοίγει ο μεταβατικός πόρος της μιτοχονδριακής διαπερατότητας και το κύτταρο οδηγείται σε θάνατο.¹⁴⁶

6.7 Δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου

Δυσλειτουργία του μιτοχονδρίου είναι παρούσα σε όλες τις κλινικές καταστάσεις που σχετίζονται με ελαττωματικό μεταβολισμό και κυρίως με διαταραχή της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αυτή μπορεί να προκληθεί από γενική δυσλειτουργία της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων ή να σχετίζεται με βλάβες σε κάποιο από τα πέντε συμπλέγματα. Μία άλλη αιτία δυσλειτουργίας του μιτοχονδρίου είναι η διαρροή ηλεκτρονίων, από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Αυτή η διαρροή ηλεκτρονίων αλληλεπιδρά με το O₂ για να παραχθεί ανιόν του σουπεροξειδίου. Η εγγύτητα του μιτοχονδριακού DNA στο ανιόν του σουπεροξειδίου και η έλλειψη προστατευτικών και επιδιορθωτικών μηχανισμών οδηγεί σε μετάλλαξη και διαγραφή του μιτοχονδριακού DNA μέσω ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, το μιτοχονδριακό σύστημα οξειδωτικής φωσφορυλίωσης από μόνο του παράγει ελεύθερες ρίζες και η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι ευάλωτη σε αυτές. Έτσι, η βλάβη που επάγεται από τις ελεύθερες ρίζες μπορεί να αποτελεί αιτία ή και συνέπεια της δυσλειτουργίας του μιτοχονδρίου.¹⁴⁷

6.8 Συνέπειες του οξειδωτικού stress

Το οξειδωτικό stress έχει συνδεθεί με τον παθογενετικό μηχανισμό πολλών ασθενειών, όπως το άσθμα, η αθηροσκλήρωση, η απόρριψη του νεφρικού μοσχεύματος και άλλα. Όλες αυτές οι καταστάσεις χαρακτηρίζονται από μία φλεγμονώδη αντίδραση (για την οποία τα φαγοκύτταρα αποτελούν την κύρια πηγή παραγωγής ROS) και από βλάβη και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Επίσης, στο οξειδωτικό stress διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ παραγωγής ROS και αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Ο λόγος μεταξύ αναχθείσης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG) θεωρείται ένας από τους πλέον σημαντικούς δείκτες οξειδωτικού stress. Υψηλότερη παραγωγή ROS μπορεί να προκαλέσει τροποποιήσεις στις πρωτεΐνες και τα λιπίδια, αλλαγές στη δομή του DNA, ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και παραγωγή προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτοκινών.^{143, 148}

6.8.1 Επίδραση του οξειδωτικού stress στις πρωτεΐνες

Οι ROS μπορούν να προκαλέσουν κατακερματισμό της πεπτιδικής αλυσίδας, αλλαγές στο ηλεκτρικό φορτίο, διασταυρούμενη σύνδεση των πρωτεϊνών και οξείδωση συγκεκριμένων αμινοξέων, με αποτέλεσμα την πρωτεόλυση από διάφορες πρωτεάσες. Η

κυστεΐνη και η μεθειονίνη είναι τα πιο ευαίσθητα αμινοξέα στην οξειδωση. Η οξειδωση των σουλφυδρυλικών ομάδων και των καταλοίπων μεθειονίνης των πρωτεϊνών προκαλούν αλλαγές στη διαμόρφωση, ξεδίπλωμα και αποδόμησή τους. Ένζυμα που περιέχουν μέταλλα στα δραστικά τους κέντρα είναι πιο ευαίσθητα στην οξειδωση. Οι τροποποιήσεις στα ένζυμα, λόγω οξειδωσης, αναστέλλουν τη δραστηκότητά τους.^{143-145, 148}

6.8.2 Επίδραση του οξειδωτικού stress στα λιπίδια

Οι ROS μπορούν να προκαλέσουν λιπιδιακή υπεροξειδωση και διάσπαση της λιπιδιακής μεμβράνης. Έτσι, απενεργοποιούνται οι υποδοχείς και τα ένζυμα που είναι συνδεδεμένα στη μεμβράνη και αυξάνεται η διαπερατότητα της. Τα προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης, όπως η μαλονδιαλδεΰδη (MDA) και οι ακόρεστες αλδεΰδες, μπορούν να απενεργοποιήσουν πολλές κυτταρικές πρωτεΐνες, σχηματίζοντας διασταυρούμενες συνδέσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Η 4-υδροξυ-2-νονενάλη προκαλεί μείωση της GSH και δημιουργία υπεροξειδίων, ενεργοποιεί τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και προάγει την παραγωγή ινωδονεκτίνης. Τα προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης, όπως τα ισοπροστάνια και οι δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος, έχουν χρησιμοποιηθεί ως έμμεσοι βιοδείκτες του οξειδωτικού stress. Αυξημένα επίπεδά τους έχουν βρεθεί στον εκπνεόμενο αέρα και στο βρογχοκυβελιδικό έκπλυμα ασθενών με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια και σε καπνιστές.^{143-145, 148}

6.8.3 Επίδραση του οξειδωτικού stress στο DNA

Οι ROS διασπών τις αλυσίδες του DNA και σχηματίζουν προϊόντα προσθήκης στο DNA, που χαρακτηρίζονται από διαγραφή, μετάλλαξη, προκαλώντας γενετικές αλλοιώσεις. Τα σάκχαρα και τμήματα βάσεων του DNA αποδομούνται από τις ROS. Η 8-υδροξυγουανίνη, η υδροξυαιθυλουρία, η ουρία, η θειαμίνη και κορεσμένα προϊόντα είναι οι οξειδωμένες βάσεις. Η σύνθεση της πολυ-αδενοσίνης διφωσφορικής ριβόζης στον πυρήνα, η οποία είναι το οξειδωτικό προϊόν του DNA, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του κυτταρικού NADH. Τα πρόσθετα MDA στο DNA είναι το πιο χαρακτηριστικά γνωρίσματα της οξειδωσης του νουκλεϊκού οξέος. Ο δείκτης οξέωσης του DNA είναι η 4-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη.^{143-145, 148}

6.8.4 Επίδραση του οξειδωτικού stress στη μεταγωγή σήματος

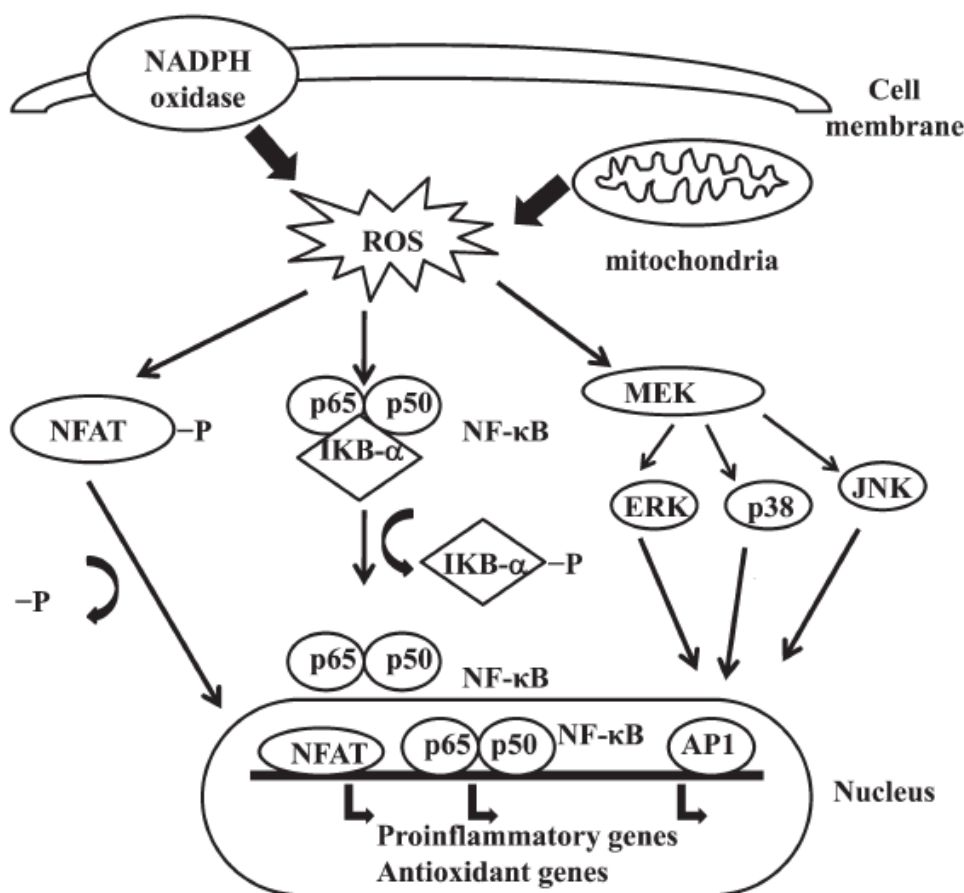
Οι ROS επάγουν την έκφραση διάφορων γονιδίων, που συμπεριλαμβάνονται στη μεταγωγή σήματος. Ο υψηλός λόγος GSH/GSSG είναι σημαντικός για την προστασία του

κυττάρου από το οξειδωτικό stress. Διαταραχή του λόγου αυτού προκαλεί ενεργοποίηση των ευαίσθητων στο οξειδωτικό stress μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο NF-κB, ο AP-1, ο πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων και ο παράγοντας 1 που επάγεται από την υποξία (HIF-1), οι οποίοι εμπλέκονται στη φλεγμονώδη αντίδραση. Η ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων μέσω των ROS, επιτυγχάνεται μέσω του καταρράκτη μεταγωγής σήματος, που μεταφέρει την πληροφορία από το εξωτερικό στο εσωτερικό του κυττάρου. Οι υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης, οι περισσότεροι υποδοχείς αυξητικών παραγόντων (του EGF, του VEGF και άλλοι) και ο υποδοχέας του PDGF, η πρωτεϊνική φωσφατάση της τυροσίνης και οι κινάσες της σερίνης/θρεονίνης, αποτελούν στόχους των ROS. Άλλες κινάσες, όπως οι JNK και p38, που μπορούν να ρυθμιστούν από οξειδωτικούς παράγοντες, συμμετέχουν σε πολλές διαδικασίες του κυττάρου, όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση.^{143-145, 148}

Υπό συνθήκες οξειδωτικού stress, τα κατάλοιπα κυστεΐνης στα σημεία σύνδεσης του c-Jun στο DNA, μερικές υπομονάδες του AP-1 και η ανασταλτική κινάση k-B, υποβάλλονται σε αναστρέψιμη S-γλουταθειοποίηση. Η γλουταρεδοξίνη και το TRX παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των ευαίσθητων στην οξειδοαναγωγή σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως του NF-κB, της AP-1, του p38 και του JNK.^{143-145, 148}

Ο NF-κB μπορεί να ενεργοποιηθεί σε αντίδραση στο οξειδωτικό stress. Η φωσφορυλίωση του IκB απελευθερώνει τον NF-κB και επιτρέπει την είσοδό του στον πυρήνα για την ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων. Διάφορες κινάσες φωσφορυλιώνουν τον IκB και αποτελούν στόχο οξειδωτικών σημάτων για την ενεργοποίηση του NF-κB. Αναγωγικοί παράγοντες ενισχύουν τη σύνδεση του NF-κB στο DNA, ενώ οξειδωτικοί παράγοντες την αναστέλλουν. Ο TRX μπορεί να ασκεί και τις δύο αντίθετες δράσεις στη ρύθμιση του NF-κB: στο κυτταρόπλασμα μπλοκάρει την αποδόμηση του IκB και αναστέλλει τη δραστηριότητα του NF-κB, ενώ στο DNA ενισχύει τη σύνδεση του NF-κB. Η ενεργοποίηση του NF-κB μέσω της αποδόμησης του IκB από οξειδωτικούς παράγοντες, έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων, που σχετίζονται με αντιοξειδωτικά μέσα. Ο NF-κB ρυθμίζει την έκφραση αρκετών γονιδίων, που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση, όπως της IL-1b, της IL-6, του TNF-α, της IL-8 και πολλών μορίων προσκόλλησης.^{143-145, 148, 149}

Ο AP-1 ρυθμίζεται επίσης σε καταστάσεις οξειδοαναγωγής. Παρουσία H_2O_2 μερικά ιόντα μετάλλων μπορούν να ενεργοποιήσουν τον AP-1. Η αύξηση του λόγου GSH/GSSG ενισχύει τη σύνδεση του AP-1, ενώ η GSSG αναστέλλει τη σύνδεσή του στο DNA. Η σύνδεση στο DNA του ετεροδιμερούς Fos/Jun αυξάνεται με την αναγωγή μίας κυστεΐνης των πρωτεϊνών στην περιοχή σύνδεσης με το DNA, ενώ η σύνδεση του AP-1 στο DNA αναστέλλεται από την GSSG, ώστε ο σχηματισμός δισουλφιδικού δεσμού από κατάλοιπα κυστεΐνης αναστέλλει τη σύνδεση του AP-1 στο DNA (εικόνα 6.5).^{143-145, 148}

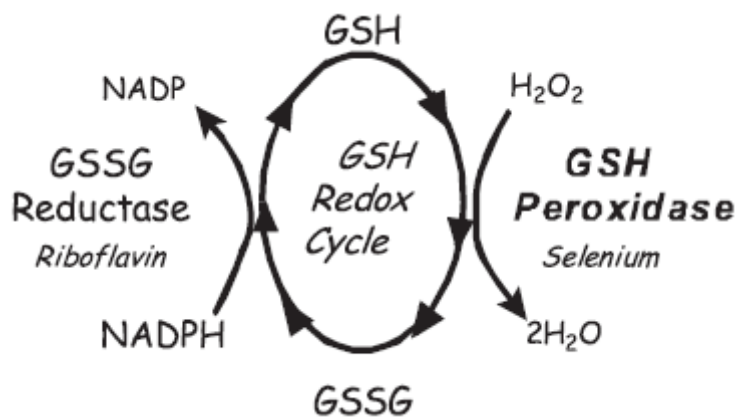


Εικόνα 6.5: Επίδραση του οξειδωτικού stress στη μεταγωγή σήματος στο κύτταρο¹⁴⁸

6.9 Γλουταθειόνη και οξειδωτικό stress

Η γλουταθειόνη αποτελεί το κύριο κυτταρικό αντιοξειδωτικό παράγοντα και η μέτρησή της αποτελεί μέτρο εκτίμησης του οξειδωτικού stress. Η έλλειψη ισορροπίας μεταξύ αντιοξειδωτικών και προοξειδωτικών παραγόντων μπορεί να ποσοτικοποιηθεί στο πλάσμα, ως η κατάσταση οξειδοαναγωγής της αναγόμενης γλουταθειόνης (GSH) προς την

οξειδωμένη (GSSG), ή αλλιώς GSH/GSSG. Η υψηλή αποδοτικότητα της ρεδοκτάσης του GSSG μπορεί συχνά να διατηρήσει την κυτταρική δεξαμενή της GSH σε μία αναγωγική κατάσταση (ενδοκυττάρια GSH/GSSG > 98%). Αυτή η μείωση του GSSG σε σχέση με τη GSH συμβαίνει μόνο με την παρουσία της NADPH. Με την παροχή των απαιτούμενων επιπέδων για αυτήν την κυτταρική αντίδραση, τα αποθηκευμένα επίπεδα NADPH μπορούν να μειωθούν. Το NADPH είναι σημαντικό για την απομάκρυνση των τοξικών ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα. Επομένως, η διαθεσιμότητα του NADPH μπορεί να είναι η αιτία της μειωμένης δημιουργίας της GSH. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο, που παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της οξειδοαναγωγής στο κύτταρο, μετατρέποντας το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό (εικόνα 6.6).¹⁴⁷

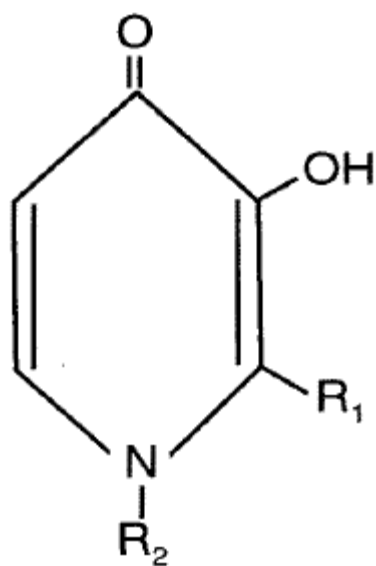


Εικόνα 6.6: Η αντίδραση του κύκλου οξειδοαναγωγής της γλουταθειόνης δείχνει τη μείωση των ισοδυνάμων και τους ενζυμικούς συμπαράγοντες¹⁴⁷

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΔΕΦΕΡΙΠΡΟΝΗ

Η δεφεριπρόνη (L1) είναι ένας από του στόματος χορηγούμενος δεσμευτής σιδήρου, που χρησιμοποιείται ως θεραπεία της υπερφόρτωσης σιδήρου στη θαλασσαιμία. Ανήκει στην κατηγορία των δεσμευτών σιδήρου της 3-υδροξυπυριδίνη-4-ένα (εικόνα 7.1) και έχει μεγάλη δεσμευτική ικανότητα έναντι του Fe^{3+} , με σταθερά δέσμευσης έξι φορές μεγαλύτερη από αυτή της δεσφεροξαμίνης. Δεν είναι φορτισμένη, είτε ως ελεύθερο μόριο, είτε ως δεσμευμένη με σίδηρο. Έχει υψηλή συγγένεια για το Fe^{3+} , συνδέεται με το αλουμίνιο και σε μικρότερο βαθμό με το ψευδάργυρο. Μπορεί να αφαιρέσει το σίδηρο απευθείας από τη φερριτίνη, με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από τη δεσφεροξαμίνη, πιθανώς λόγω του μικρότερου μεγέθους των υδροξυπυριδονών, που της επιτρέπουν να εισέρχεται μέσα στην πρωτεΐνη από τους πόρους της και να αφαιρεί το σίδηρο από τον πυρήνα της.¹⁵⁰



Εικόνα 7.1: Η δομή της χημικής ένωσης των 3-υδροξυπυριδίνη-4-ένα. Οι θέσεις O και OH συμμετέχουν στη δέσμευση σιδήρου, ενώ μόνο η θέση OH εμπλέκεται στη μετατροπή σε γλυκουρονίδιο. Για τη L1, οι θέσεις R1 και R2 αντιστοιχούν σε CH_3 ¹⁵⁰

7.1 Φαρμακοκινητική

Μετά από χορήγηση από του στόματος, η μέγιστη συγκέντρωση δεφεριπρόνης στο πλάσμα (C_{\max}) επιτυγχάνεται σε 1 ώρα περίπου. Η πρόσληψη τροφής μειώνει τον ρυθμό, αλλά όχι την ποσότητα απορρόφησης του φαρμάκου. Η χορήγηση της δεφεριπρόνης σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία σε δόση 75mg/kg ανά 12 ώρες, δημιουργεί C_{\max} που ανέρχεται

στα 34,6mg/L και AUC στα 37,5mg/L. Ωστόσο, έχει βρεθεί, ότι δόση 75mg/kg/ημέρα για μία εβδομάδα απεκκρίνει την ποσότητα σιδήρου αντίστοιχη με αυτή που επιτυγχάνεται με χορήγηση 40mg/kg δεσφεροξαμίνης υποδορίως για 5 ημέρες/εβδομάδα. Σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία, ο όγκος κατανομής της δεφεριπρόνης, μετά από χορήγηση 75mg/kg/ημέρα, είναι 1,55-1,73 L/kg.¹⁵⁰⁻¹⁵³

Η δεφεριπρόνη μεταβολίζεται κυρίως σε γλυκουρονίδιο (>85%), το οποίο δεν έχει δεσμευτικές ικανότητες. Η δεφεριπρόνη, ο μεταβολίτης της και το σύμπλοκο δεφεριπρόνης-σιδήρου αποβάλλονται κυρίως από τους νεφρούς και περίπου το 80% της δόσης εντοπίζεται στα ούρα. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της ($T_{1/2}$) είναι 1-2,5 ώρες, σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία. Ο $T_{1/2}$ του γλυκουρονιδίου σχετίζεται άμεσα με την κάθαρση της κρεατινίνης και συνεπώς αυτό συσσωρεύεται σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο. Παρότι η δεφεριπρόνη μεταβολίζεται στο ήπαρ, η επίδραση της ηπατικής ανεπάρκειας στη φαρμακοκινητική της δεν έχει καθοριστεί πλήρως (πίνακας 7.1).¹⁵⁰⁻¹⁵³

	Δεσφεροξαμίνη	Δεφεριπρόνη
Μοριακό βάρος	560	139
Σύμπλοκο δεσμευτή: σιδήρου	1:1	3:1
Χρόνος ημίσειας ζωής ($T_{1/2}$) (λεπτά)	20	60-150
Απορρόφηση από του στόματος	Αμελητέα	Μέγιστη συγκέντρωση σε 1 ώρα
Αποβολή σιδήρου	Ούρα και κόπρανα	Ούρα
Θεραπευτική ημερήσια δόση (mg/kg)	40	75
Οδός χορήγησης	Παρεντερική	Από του στόματος
Παρενέργειες	Ωτοτοξικότητα, οφθαλμολογικές, ανάπτυξης, αρθροπάθεια	Ακοκκιοκυτταραιμία, αρθροπάθεια, γαστρεντερικές, τρανσαμινασαιμία, ανεπάρκεια ψευδαργύρου

Πίνακας 7.1: Φαρμακοκινητική και κλινικά χαρακτηριστικά της δεσφεροξαμίνης και της δεφεριπρόνης

7.2 Φαρμακοδυναμική

Η δεφεριπρόνη είναι ένας δεσμευτής σιδήρου σε αναλογία 3L1:1Fe³⁺. Μπορεί να δεσμεύει και άλλα μέταλλα, όπως το αλουμίνιο, το γάλλιο, ο χαλκός και ο ψευδάργυρος, αλλά όχι το ασβέστιο και το μαγνήσιο.¹⁵¹ Από μελέτες έχει αποδειχθεί, πως η δεφεριπρόνη μειώνει τα επίπεδα του σιδήρου σε πειραματόζωα και ανθρώπους με αιμοσιδήρωση. Η απέκκριση του σιδήρου σχετίζεται με τη δοσολογία του φαρμάκου και το βαθμό υπερφόρτωσης σιδήρου. Η δεφεριπρόνη κινητοποιεί το σίδηρο από το δικτυοενδοθηλιακό σύστημα, τα ηπατοκύτταρα, την τρανσφερίνη, τη φερριτίνη, την αίμη και από παθολογικές εναποθέσεις ερυθρών αιμοσφαιρίων σε ασθενείς με β-θαλασσαιμία ή δρεπανοκυτταρική αναιμία.¹⁵¹

In vitro, έχει αναφερθεί, ότι μικρές συγκεντρώσεις δεφεριπρόνης προάγουν τη βλάβη του οξειδωτικού stress, ενώ σε μεγαλύτερες ασκούν κυτταρική προστασία. Επίσης, όπως και η δεσφεροξαμίνη, φαίνεται πως αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό πολλών κυτταρικών σειρών και πως επάγει την απόπτωση. Η δεφεριπρόνη έχει δείξει μυελοκατασταλτική επίδραση σε πειραματόζωα και ανθρώπους. Ωστόσο, in vitro μελέτες έχουν δείξει ότι είναι σημαντικά λιγότερο τοξική, από τη δεσφεροξαμίνη, στα αρχέγονα κύτταρα του μυελού των οστών.¹⁵¹

7.3 Ενδοκυττάρια διείσδυση της δεφεριπρόνης

Τα μέγιστα επίπεδα στο πλάσμα της δεφεριπρόνης, μετά από του στόματος χορήγησής της, είναι 5-10 φορές υψηλότερα από αυτά της δεσφεροξαμίνης και αυτό τη βοηθάει να εισέρχεται ευκολότερα στα κύτταρα. Ως μικρό ουδέτερο μόριο, διαπερνά εύκολα τις κυτταρικές μεμβράνες, όπως φαίνεται σε κυτταρικές σειρές μετά από in vitro επώαση. Το σύμπλοκο που προκύπτει μετά τη δέσμευση του σιδήρου είναι υδρόφιλο. Σε μια μελέτη, μετά από επώαση δεφεριπρόνης με ερυθρά αιμοσφαίρια 15 ασθενών με ενδιάμεση θαλασσαιμία και 6 ασθενών με δρεπανοκυτταρική αναιμία, βρέθηκε ότι ήταν ικανή να αφαιρέσει το σίδηρο από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, σε ποσότητα εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση του φαρμάκου και τη διάρκεια της επώασης. Στο ίδιο in vitro μοντέλο, η δεσφεροξαμίνη αποδείχθηκε ανεπαρκής. In vivo, η δεφεριπρόνη σε χαμηλές δόσεις των 25mg/kg/ημέρα, για 2 εβδομάδες, είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση του σιδήρου στα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά 50%, ενώ σε δόσεις των 50mg/kg/ημέρα και 75mg/kg/ημέρα έδειξε μείωση 67% και 79%,

αντίστοιχα. Η παραγωγή μαλονδιαλδεΐδης σε απόκριση του υπεροξειδίου μειώθηκε επίσης, τόσο in vitro όσο και in vivo. Σε άλλη in vivo μελέτη, επιβεβαιώθηκε πως η δεφεριπρόνη αφαιρεί το σίδηρο από τα ερυθρά αιμοσφαίρια.¹⁵²

Άμεση απόδειξη της διείσδυσης της L1 στα ερυθρά αιμοσφαίρια έχει γίνει σε μελέτες με ραδιενεργά επισημασμένα L1. Η ραδιενεργά επισημασμένη L1 συγκεντρωνόταν στα ερυθρά αιμοσφαίρια ασθενών με θαλασσαιμία τρεις φορές περισσότερο σε σχέση με τα εξωκυττάρια επίπεδα, ενώ δεν παρατηρήθηκε τέτοια συγκέντρωση στα φυσιολογικά ή στα δρεπανοκυτταρικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Αυτό συμβαίνει πιθανώς λόγω της απουσίας περίσσειας σιδήρου στα κύτταρα, δεν υπάρχει σχηματισμός υψηλού μοριακού βάρους συμπλόκου $3L1:1Fe^{3+}$, έτσι ώστε η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου να εξισορροπείται κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης. Η απελευθέρωση της L1 από τα θαλασσαιμικά ερυθρά αιμοσφαίρια ήταν σχετικά αργή, μόνο το 17% του ενδοκυττάριου φαρμάκου εξέρχονταν στο εξωκυττάριο υγρό σε 4 ώρες.¹⁵²

7.4 Αποτελεσματικότητα της δεφεριπρόνης

Η αποτελεσματικότητα της δεφεριπρόνης καθορίζεται από την ποσότητα απέκκρισης σιδήρου στα ούρα 24ώρου και από τις μεταβολές των συγκεντρώσεων σιδήρου στους ιστούς, που εκτιμώνται από τα επίπεδα της φερριτίνης ορού και του σιδήρου στο ήπαρ. Σε διάφορες μελέτες σε θαλασσαιμικούς ασθενείς, τα επίπεδα φερριτίνης ορού κυμαίνονταν από 2.000-2.500mg/l και μειώθηκαν σε όσους έλαβαν σιδηροδεσμευτικούς παράγοντες. Σε άλλη μελέτη 11 ασθενών, στους οποίους η χορήγηση δεσφεροξαμίνης δεν ήταν αποτελεσματική και οι οποίοι στη συνέχεια έλαβαν δεφεριπρόνη, η συγκέντρωση του σιδήρου στο ήπαρ μειώθηκε από $125,3 \pm 11,5$ σε $60,3 \pm 9,6 \mu\text{mol/gr}$ ξηρού βάρους, με τους 8 από τους 11 ασθενείς να εμφανίζουν επίπεδα $< 80 \mu\text{mol/gr}$, τα οποία θεωρούνται απόλυτα ασφαλή. Ωστόσο, σε άλλες μελέτες τα αποτελέσματα ήταν αντικρουόμενα.¹⁵⁰⁻¹⁵⁶

7.5 Βέλτιστη δοσολογία της δεφεριπρόνης

Στις περισσότερες μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί η δόση των 75mg/kg/ημέρα. Με αυτή, οι περισσότεροι ασθενείς που μεταγγίζονταν έδειξαν ικανοποιητική δέσμευση του σιδήρου, όπως αξιολογήθηκε με μαγνητική τομογραφία καρδιάς, με τα επίπεδα σιδήρου στο ήπαρ και

τα επίπεδα φερριτίνης ορού. Η δόση των 75mg/kg/ημέρα χρησιμοποιήθηκε επειδή διατηρούσε την πλειονότητα των ασθενών σε ισορροπία ασφαλές φορτίο σιδήρου. Σε ακόμη υψηλότερη δόση (π.χ. 100mg/kg/ημέρα) οι παρενέργειες είναι πιθανά συχνότερες. Άλλες μελέτες προτείνουν, πως οι υψηλότερες δόσεις αποτελούν μια σοφή επιλογή, για ασθενείς στους οποίους η δόση των 75mg/kg/ημέρα δεν είναι επαρκής.^{151, 152}

7.6 Παρενέργειες της δεφεριπρόνης

Οι πιο κοινές παρενέργειες της δεφεριπρόνης είναι η αρθροπάθεια, η μυοσκελετική δυσκαμψία και άλγος και οι γαστρεντερικές διαταραχές (ανορεξία, ναυτία, έμετος). Η αρθροπάθεια εμφανίζεται έως και στο 39% των ασθενών και υποχωρεί γενικά με μείωση της δόσης ή με διακοπή του φαρμάκου. Οι σοβαρότερες παρενέργειες είναι η ουδετεροπενία και η ακοκκιοκυτταραιμία, που εμφανίζονται στο 2% περίπου των ασθενών, αλλά ευτυχώς είναι αναστρέψιμες.^{150-153, 155, 157, 158} Έχουν ακόμη παρατηρηθεί αύξηση της ALT και ανοσολογικές διαταραχές, όπως ανάπτυξη αντιπυρηνικών αντισωμάτων και αντισωμάτων αντι-ιστόνης. Επίσης, η δεφεριπρόνη μπορεί να προκαλέσει αύξηση της αποβολής ψευδαργύρου στα ούρα, ιδιαίτερα σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Αυτό σπανίως οδηγεί σε κλινική ανάλογη κλινική συμπτωματολογία ανεπάρκειας, που εύκολα ανταποκρίνεται σε χορήγηση συμπληρωμάτων ψευδαργύρου.^{150-153, 155, 157} Σε ασθενείς με ηπατική ίνωση έχει αναφερθεί πρόοδος της, αλλά αυτό έχει ταυτόχρονα αμφισβητηθεί, μιας και πολλοί από τους ασθενείς αυτούς ήταν ήδη θετικοί στην ηπατίτιδα C, κατάσταση που μπορεί να επάγει την πρόοδο της ηπατικής ίνωσης.^{150-153, 155, 157} Καμιά άλλη παρενέργεια της δεφεριπρόνης δεν έχει έως τώρα αναφερθεί. Αντίθετα, με τη χορήγησή της έχουν αναφερθεί βελτίωση του βλαισού γόνατος, της επούλωσης του οστού στην περιφέρεια των μεταφύσεων του γόνατος και της βελτίωσης της ανάπτυξης. Επίσης, σε αντίθεση με τη δεσφεροξαμίνη, η δεφεριπρόνη δεν αυξάνει τη μολυσματικότητα της *Yersinia enterocolitica* και η λοίμωξη αυτή δεν έχει περιγραφεί ως επιπλοκή της θεραπείας με δεφεριπρόνη.^{150-153, 155, 157}

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σε μελέτες έχει αποδειχθεί η ευεργετική δράση των σιδηροδεσμευτικών παραγόντων, κυρίως της δεσφεροξαμίνης, στη μεταμόσχευση νεφρού.¹⁵⁹⁻¹⁶⁴ Επιπλέον, σε άλλες μελέτες έχει αποδειχθεί η ισότητα της δεφεριπρόνης με τη δεσφεροξαμίνη, στη μείωση της φερριτίνης ορού, της συγκέντρωσης σιδήρου στο ήπαρ και στην ίση αποβολή σιδήρου στα ούρα, που σημαίνει αποτελεσματική αποβολή σιδήρου σε θαλασσαιμικούς ασθενείς με υπερφόρτωση σιδήρου.¹⁶⁵⁻¹⁶⁹ Ακόμα, έχει αποδειχθεί η αποτελεσματικότερη δράση της δεφεριπρόνης έναντι της δεσφεροξαμίνης, στη μείωση του σιδήρου από την καρδιά και στην αύξηση του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας σε ανάλογες ομάδες ασθενών.¹⁶⁸⁻

172

Σκοπό της παρούσης μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης της δεφεριπρόνης στη μεταμόσχευση νεφρού. Με τη χρησιμοποίηση του μοντέλου αυτομεταμόσχευσης σε χοίρους, κατέστη δυνατή η αποφυγή επηρεασμού των αποτελεσμάτων, λόγω ανοσοβιολογικών επιδράσεων και μελετήθηκαν φαινόμενα, που σχετίζονται με την ιστική βλάβη που προκύπτει από την ψυχρή συντήρηση, το οξειδωτικό stress που αναπτύσσεται κατά τη φάση της επαναιμάτωσης (σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης), την έκφραση μορίων προσκόλλησης του νεφρικού μοσχεύματος και τέλος και κύρια η επίδραση της δεφεριπρόνης στη μετεγχειρητική του λειτουργία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

9.1 Υλικό (πειραματόζωα)

Για την πραγματοποίηση της παρούσας πειραματικής έρευνας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 22 χοίροι, αρσενικοί και θηλυκοί, ηλικίας 4-6 μηνών και βάρους 65-75kg. Όλα τα πειραματόζωα προήλθαν από ένα συγκεκριμένο χοιροστάσιο. Οι χοίροι διέμεναν σε κλουβιά κατάλληλα για μεγάλα πειραματόζωα (ένας χοίρος σε κάθε κλουβί) και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό ύδρευσης. Η τροφή ήταν τυποποιημένη και βιομηχανοποιημένη. Οι συνθήκες διαβίωσης ήταν ελεγχόμενες με σταθερή θερμοκρασία 20-22°C, υγρασία 50-60%, αερισμό και φωτοπερίοδο στις 12 ώρες.

Το πειραματικό πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις πειραματισμού του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με αριθμό καταχώρησης EL20BIO04 (εικόνα 9.1), αφού πρώτα έλαβε έγκριση από το Τμήμα Κτηνιατρικής της Περιφέρειας Ηπείρου με Αριθμό Αδείας 13899/27-12-2012.



Εικόνα 9.1: Α. Εγκαταστάσεις πειραματισμού του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, Β. Χειρουργική αίθουσα που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα.

9.2 Μέθοδος

9.2.1 Σχεδιασμός πειραματικού πρωτοκόλλου

Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με το αν θα λάμβαναν πριν την αυτομεταμόσχευση L1 ή όχι.

1. Ομάδα ελέγχου (control): 7 πειραματόζωα αυτής της ομάδας δεν έλαβαν προεγχειρητικά L1.
2. Ομάδα μελέτης (L1): 7 πειραματόζωα σε αυτήν την ομάδα έλαβαν L1 (ApoPharma, Καναδάς), δύο δόσεις ημερησίως για 3 ημέρες και μία δόση την ημέρα πριν την αυτομεταμόσχευση σε δοσολογία 50mg/kg.

Τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε αριστερή νεφρεκτομή υπό γενική αναισθησία, 2 ημέρες μετά την είσοδό τους στο κλουβί. Μετά την αφαίρεση του αριστερού νεφρού, αυτός ξεπλένονταν με 500ml διάλυμα Custodiol[®] (διάλυμα HTK) και εν συνεχεία συνδέονταν για 4 ώρες σε μηχανή συνεχούς υποθερμικής έκπλυσης (τροποποιημένη μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας). Μετά την πάροδο των 4 ωρών, ο νεφρός συντηρούνταν σε 500ml διαλύματος Custodiol[®], στους 4°C, για ακόμη 13 ώρες περίπου. Ο μέσος χρόνος ψυχρής ισχαιμίας των μοσχευμάτων υπολογίστηκε στις 17 ώρες. Προ της εμφύτευσης του αριστερού νεφρού, τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε δεξιά νεφρεκτομή και οι αγγειακές αναστομώσεις του μοσχεύματος γίνονταν στα κολοβώματα των δεξιών νεφρικών αγγείων. Ακολουθούσε τελικοτελική αναστόμωση του ουρητήρα του νεφρικού μοσχεύματος με το γηγενή δεξιό ουρητήρα.

Σε όλα τα πειραματόζωα εμφυτεύονταν κεντρικός φλεβικός καθετήρας στην αριστερή έσω σφαγίτιδα, από τον οποίο πραγματοποιούνταν όλες οι αιμοληψίες, για την παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας (Urea, Creat). Επίσης, μέσω αιμοληψίας από τη νεφρική φλέβα μετρήθηκε η συγκέντρωση των 8-ισοπροστανίων στα 30 λεπτά μετά την επαναιμάτωση του νεφρικού αυτομοσχεύματος. Βιοψίες του νεφρικού αυτομοσχεύματος ελήφθησαν στα 30 λεπτά μετά την επαναιμάτωση και τη 14^η μετεγχειρητική ημέρα και μελετήθηκαν, μέσω βαθμονομημένου συστήματος ιστοπαθολογικής εκτίμησης, οι ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις της ιστικής βλάβης (απώλεια ψηκτροειδής παρυφής, διαστολή σωληναρίων, σωληναριακά κατακρημνίσματα, έμβολα αγγείων, διάμεσο οίδημα, συρρίκνωση των σπειραμάτων και ο ιστοπαθολογικός δείκτης, που είναι το σύνολο της

έκφρασης των προαναφερθέντων ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων) και μέσω ανοσοϊστοχημείας η έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1.

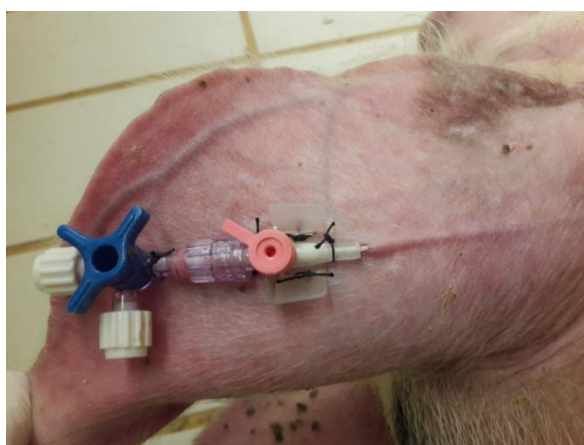
Χρονική στιγμή	Παράμετρος				
	CK, LDH διαλύματος	Βάρος AP νεφρού	Urea, Creat ορού	8-ισοπροστάνια	Βιοψία νεφρού
0 ημέρα			+		
13h ψυχρής συντήρησης	+				
17h ψυχρής ισχαιμίας		+			
30min από επαναιμάτωση				+	AP μεταμοσχ. νεφρού
1 ^η μτχ ημέρα			+		
2 ^η μτχ ημέρα			+		
3 ^η μτχ ημέρα			+		
4 ^η μτχ ημέρα			+		
5 ^η μτχ ημέρα			+		
6 ^η μτχ ημέρα			+		
7 ^η μτχ ημέρα			+		
8 ^η μτχ ημέρα			+		
9 ^η μτχ ημέρα			+		
10 ^η μτχ ημέρα			+		
11 ^η μτχ ημέρα			+		
12 ^η μτχ ημέρα			+		
13 ^η μτχ ημέρα			+		
14 ^η μτχ ημέρα			+		AP μεταμοσχ. νεφρού

Πίνακας 9.1: Παράμετροι που μελετήθηκαν και χρονικές στιγμές δειγματοληψίας.

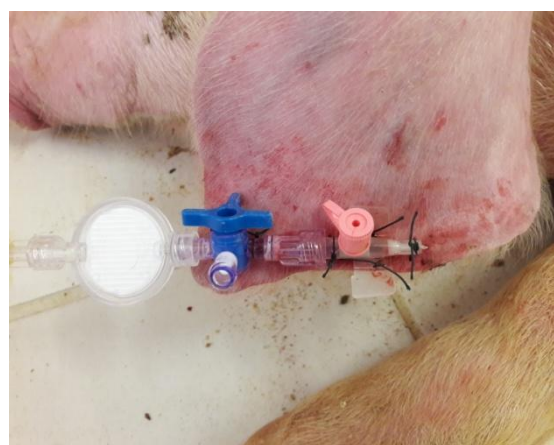
Επιπλέον, λαμβάνονταν δείγμα του διαλύματος συντήρησης Custodiol® μετά από 13 ώρες ψυχρής συντήρησης του νεφρικού μοσχεύματος, για τη μέτρηση των ενζύμων κυτταρικής βλάβης κρεατινική κινάση (CK) και γαλακτική αφυδρογονάση (LDH). Επίσης, προ της μεταμόσχευσης, το μόσχευμα ζυγίζονταν σε ζυγαριά ακριβείας. Στον πίνακα 9.1 φαίνονται οι ημέρες των δειγματοληψιών και στις δύο ομάδες, για κάθε παράμετρο που μελετήθηκε.

9.2.2 Χορήγηση δεφεριπρόνης

Τα πειραματόζωα της ομάδας L1 καταστέλλονταν με ενδομυϊκή χορήγηση αζαπερόμης (Stresnil®), σε δόση 4mg/kg. Μετά από 20 λεπτά τοποθετούταν φλεβοκαθετήρας 20G σε ωτική φλέβα, χορηγούταν αμέσως ενδοφλέβια προποφόλη, σε δόση 5ml ανά 75kg Σ.Β. και στερεωνόταν ο φλεβοκαθετήρας με ραφές μετάξι Νο2-0 στο ωτικό πτερύγιο (εικόνα 9.2). Μέχρι την πλήρη χορήγηση της δόσης της L1, ο χοίρος παρέμενε σε καταστολή με επαναληπτικές ενδοφλέβιες δόσεις προποφόλης. Η L1 είναι λευκή, μη αποστειρωμένη σκόνη και χορηγούταν σε διάλυμα N/S 0,9% με περιεκτικότητα 0,01mg/ml. Η ομάδα L1 έλαβε δύο δόσεις ανά ημέρα, για 3 ημέρες πριν και μία επιπλέον δόση την ημέρα της μεταμόσχευσης, σε δοσολογία 50mg/kg. Η L1 χορηγούταν κάθε φορά μέσω ενός αντιβακτηριακού φίλτρου 0,2μm (εικόνα 9.3). Κατά την έκπλυση του αριστερού νεφρού μετά τη νεφρεκτομή, την τοποθέτηση του στη μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας και κατά τη διάρκεια της ψυχρής απλής συντήρησης προστέθηκε στο διάλυμα KPS-1® και στο διάλυμα Custodiol® 0,1gr L1, αντίστοιχα.



Εικόνα 9.2: Στερεωμένος φλεβοκαθετήρας σε ωτική φλέβα



Εικόνα 9.3: Χορήγηση L1 μέσω αντιβακτηριακού φίλτρου 0,2μm

9.2.3 Αναισθησιολογικό πρωτόκολλο

Το πρωτόκολλο αναισθησίας ήταν ίδιο και για τις δύο ομάδες, για τις επεμβάσεις της αριστερής νεφρεκτομής και της αυτομεταμόσχευσης. Τα πειραματόζωα καταστέλλονταν με ενδομυϊκή χορήγηση αζαπερόμης (Stresnil®) 4mg/kg. Μετά από 20 λεπτά, η εισαγωγή στην αναισθησία πραγματοποιούνταν με ενδοφλέβια προποφόλη 2mg/kg, σιζατρακούριο 2mg, φαιντανύλη 5mg/kg. Μετά την ενδοτραχειακή διασωλήνωση (ενδοτραχειακός σωλήνας Νο6,5 ή 7) η αναισθησία διατηρούνταν με σεβοφλουράνιο 3% και οξυγόνο στα 4l/min. Όλα τα πειραματόζωα παρακολουθούνταν διεγχειρητικά με παλμικό οξύμετρο, που τοποθετούνταν στο αυτί τους (εικόνα 9.4) και κατά την μεταμόσχευση γίνονταν προσπάθεια διατήρησης της κεντρικής φλεβικής πίεσης στα 13-15mmHg. Κατά την αφύπνιση χορηγούταν ½amp νεοστιγμίνης 2,5mg/1ml και ½amp θειϊκής ατροπίνης 1mg.



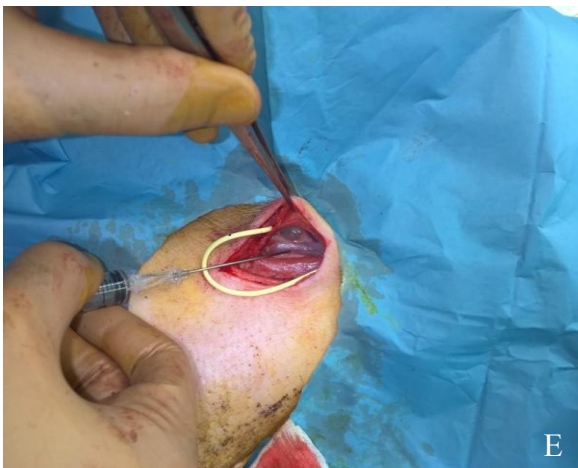
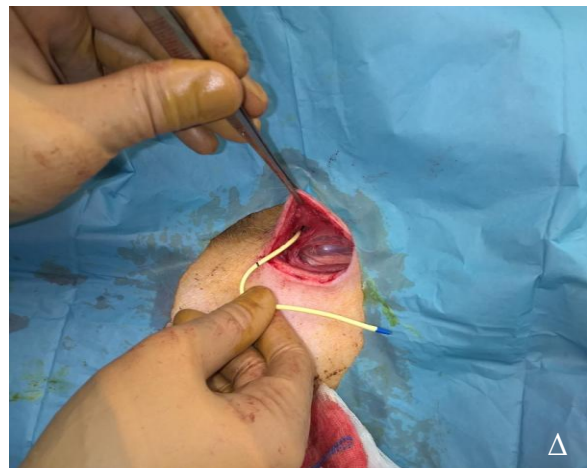
Εικόνα 9.4: Παρακολούθηση ζωτικών σημείων με παλμικό οξύμετρο.

9.2.4 Τοποθέτηση κεντρικής φλεβικής γραμμής και χειρουργική τεχνική αριστερής νεφρεκτομής

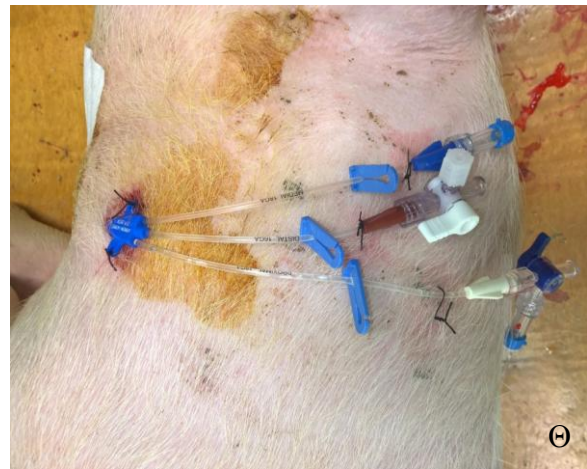
Πριν την αριστερή νεφρεκτομή τοποθετούνταν κεντρική φλεβική γραμμή τριπλού αυλού στην αριστερή έσω σφαγίτιδα φλέβα. Η φλέβα προσπελάζονταν μέσω κάθετης αριστερής παρατραχειακής τομής, αφού πρώτα γίνονταν τοπική αντισηψία με betadine (εικόνα 9.5 Α).

Μετά την ανεύρεση της αριστερής έσω σφαγίτιδας φλέβας (εικόνα 9.5 Β) ακολουθούσε η δημιουργία υποδόριου τούνελ, με έξοδο πίσω από το αριστερό αυτί (εικόνα 9.5 Γ). Στη συνέχεια γίνονταν εισαγωγή του κεντρικού φλεβικού καθετήρα, με τεχνική Seldinger (παρακέντηση-εισαγωγή οδηγού-σύρματος-εισαγωγή καθετήρα (εικόνες 9.5 Δ έως 9.5 Ζ_{1, 2}). Το τραχηλικό τραύμα συγκλείνονταν με συνεχόμενη ραφή (εικόνα 9.5 Η) και ο κεντρικός φλεβικός καθετήρας καθιλώνονταν στο δέρμα (εικόνα 9.5 Θ). Η κεντρική

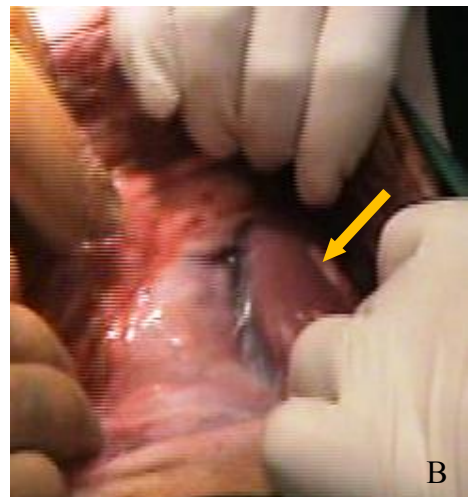
φλεβική γραμμή χρησιμοποιούταν για χορήγηση υγρών, φαρμάκων και πραγματοποίηση αιμοληψιών.



Εικόνα 9.5: Τοποθέτηση κεντρικής φλεβικής γραμμής στην αριστερή έσω σφαγίτιδα φλέβα για χορήγηση υγρών, φαρμάκων και πραγματοποίηση αιμοληψιών



Εικόνα 9.5 (συνέχεια): Τοποθέτηση κεντρικής φλεβικής γραμμής στην αριστερή έσω σφαγίτιδα φλέβα για χορήγηση υγρών, φαρμάκων και πραγματοποίηση αιμοληψιών



Εικόνα 9.6: Α. Αριστερή υποπλεύρια τομή με εξωπεριτοναϊκή προσπέλαση για την πραγματοποίηση της αριστερής νεφρεκτομής δότη, Β. Παρασκευή αριστερού νεφρού (βέλος) μέσω εξωπεριτοναϊκής προσπέλασης

Τα πειραματόζωα τοποθετούνταν σε δεξιά πλάγια θέση και μετά από ευπρεπισμό της αριστερής υποπλευρίας χώρας ακολουθούσε αντισηψία με betadine. Μέσω αριστερής υποπλευρίας τομής, διατέμονταν οι πλάγιοι κοιλιακοί μύες, με αποτέλεσμα την είσοδο στον εξωπεριτοναϊκό χώρο και την ανεύρεση του αριστερού νεφρού (εικόνα 9.6). Ακολουθούσε παρασκευή των νεφρικών αγγείων μέχρι την έκφυσή τους και του ουρητήρα (με διατήρηση επαρκούς περιουρητηρικού ιστού) σε μήκος 20cm περίπου. Μετά ηπαρινισμό του πειραματόζωου διατέμονταν στη σειρά, ο ουρητήρας, η νεφρική αρτηρία και η νεφρική φλέβα. Τα κολοβώματα των νεφρικών αγγείων απολινώνονταν με ραφή πολυπροπυλενίου Νο3-0 και του ουρητήρα με απολίνωση πολυγλυκολικού οξέος Νο2-0. Αμέσως μετά την αφαίρεση του μοςχεύματος, αυτό εκπλένονταν με 500ml διαλύματος Custodiol®. Στις περιπτώσεις των μοςχευμάτων των πειραματόζωων που εντάχθηκαν στην ομάδα μελέτης, εντός του διαλύματος έκπλυσης προστίθονταν 0,1gr δεφεριπρόνης. Το κοιλιακό τοίχωμα συγκλεινόταν με συνεχή ραφή πολυδιοξανόνης Νο1 και το δέρμα με αυτόματο συρραπτικό μηχάνημα. Κατά τη διάρκεια της νεφρεκτομής χορηγούταν ενδοφλεβίως ομεπραζόλη 40mg, κεφουροξίμη 1,5gr, παρακεταμόλη 1gr και 2lit N/S 0,9%.

9.2.5 Σύνδεση νεφρικού αυτομοσχεύματος στη μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας και συντήρησή του

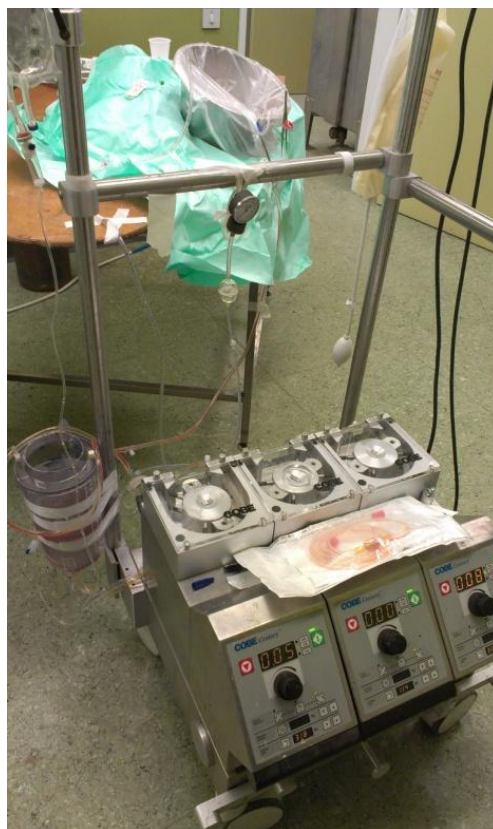
Στη νεφρική αρτηρία εισάγονταν κατάλληλου εύρους προσαρμογέας και στερεώνονταν με απολίνωση πολυγλυκολικού οξέος Νο4-0 (εικόνα 9.7). Στον προσαρμογέα συνδεόταν ο σωλήνας της αντλία χορήγησης του διαλύματος έκπλυσης (KPS-1®, Organ Recovery Systems, Βρυξέλλες) της μηχανής εξωσωματικής κυκλοφορίας. Στη διαδρομή του σωλήνα χορήγησης και πριν αυτός καταλήξει στον προσαρμογέα και στο νεφρικό μόσχευμα παρεμβάλλονταν μανόμετρο για τον συνεχή έλεγχο της πίεσης με την οποία χορηγούνται το διάλυμα. Εντός της αποστειρωμένης ισχυρής πλαστικής σακούλας, στην οποία τοποθετούνταν το μόσχευμα, τοποθετούνταν επίσης και ο σωλήνας απορροής της μηχανής, ώστε το διάλυμα που εξέρχονταν από τη νεφρική φλέβα να επιστρέφει στο δοχείο περισυλλογής (εικόνα 9.8). Το νεφρικό μόσχευμα βρισκόταν μέσα σε αποστειρωμένη ισχυρή πλαστική σακούλα, η οποία είχε απλωθεί σε λεκάνη που περιείχε πάγο. Επιπλέον, ο ουρητήρας καθετηριάζονταν με φλεβοκαθετήρα 18G ή 20G, ώστε να διευκολύνεται η απορροή του υπερδιηθήματος (εικόνα 9.9). Το διάλυμα KPS-1® διατηρούνταν σε θερμοκρασία 4°C και χορηγούνταν με την υψηλότερη δυνατόν ροή, ώστε η πίεση να μην υπερβαίνει τα 35-40mmHg. Οι ροές που παρατηρήθηκαν να πληρούν αυτό τον όρο ήταν της τάξης των 50-100ml/min. Στο διάλυμα KPS-1® προστίθονταν 1.000IU ηπαρίνης και 1gr

μαννιτόλης και στις δύο ομάδες, ενώ επιπλέον στην ομάδα μελέτης (L1) και 0,1gr δεφεριπρόνης. Τα νεφρικά μοσχεύματα παρέμεναν στη μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας για 4 ώρες.

Μετά την παρέλευση του διαστήματος των 4 ωρών τα νεφρικά μοσχεύματα συντηρούνταν εμβαπτισμένα σε 500ml διαλύματος Custodiol® εντός αποστειρωμένης πλαστικής σακούλας και μέσα σε κυτίο από μονωτικό υλικό που περιείχε θρυμματισμένο πάγο στους 4°C. Στην ομάδα μελέτης και εντός του διαλύματος αυτού προστίθονταν 0,1gr δεφεριπρόνης. Η μέση διάρκεια της επιπρόσθετης αυτής στατικής ψυχρής ισχαιμίας και μέχρι την επαναιμάτωση των μοσχευμάτων ήταν 13ώρες, ώστε η μέση συνολική ψυχρή συντήρησή τους ανήλθε στις 17 ώρες.



Εικόνα 9.7: Νεφρικό αυτομόσχευμα συνδεδεμένο με προσαρμογέα στη νεφρική αρτηρία

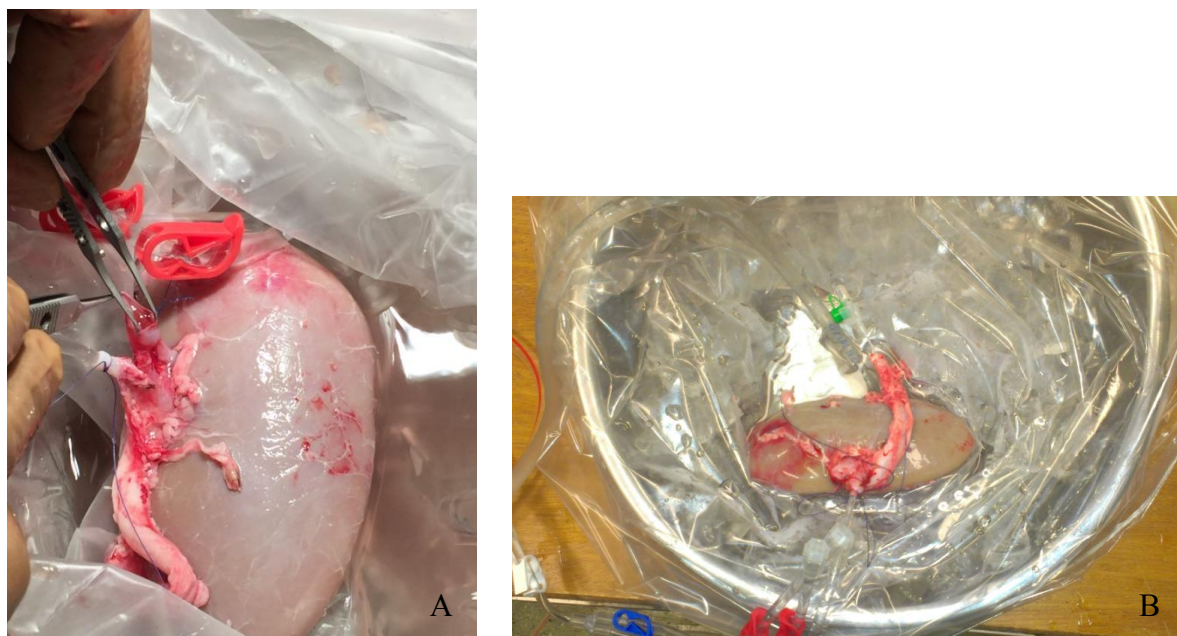


Εικόνα 9.8:
Μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας

9.2.6 Χειρουργική τεχνική αυτομεταμόσχευσης νεφρού σε χοίρο

- Τεχνικές που λόγω εγγενών μειονεκτημάτων απορρίφθηκαν

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν τρεις θέσεις αυτομεταμόσχευσης νεφρού σε χοίρο, στην υπονεφρική αορτή και κάτω κοίλη φλέβα,^{173, 174} στα έξω λαγόνια αγγεία¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ και στα νεφρικά αγγεία,^{174, 178, 179} τις οποίες αρχικά, πιλοτικά, προσπαθήσαμε και εμείς να

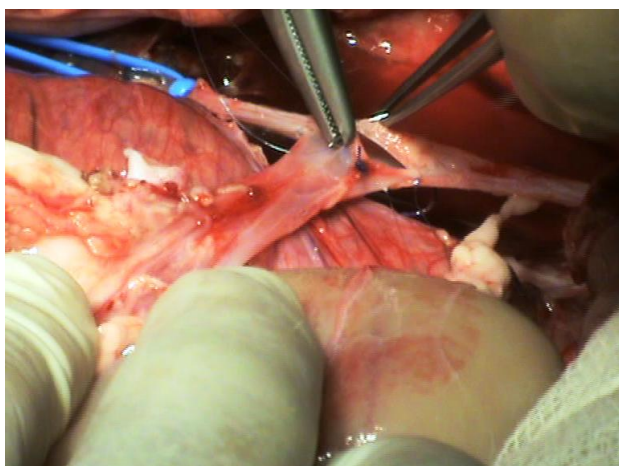


Εικόνα 9.9: Α. Νεφρικό αυτομόσχευμα συνδεδεμένο στη μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας, όπου φαίνεται η έξοδος του διαλύματος KPS-1[®] από τη νεφρική φλέβα, Β. Λεκάνη με πάγο με το νεφρικό μόσχευμα συνδεδεμένο στη μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας, φαίνεται ο σωλήνας που είναι συνδεδεμένος στη νεφρική αρτηρία, ο σωλήνας που επιστρέφει το διάλυμα KPS-1[®] πίσω στο δοχείο περισυλλογής και ο φλεβοκαθετήρας στον ουρητήρα.

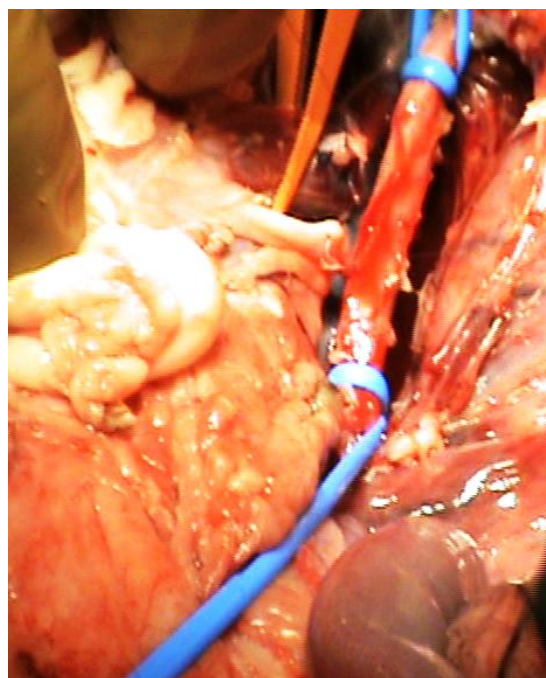
εφαρμόσουμε, ώστε να οριστικοποιήσουμε τις όποιες εγχειρητικές λεπτομέρειες στο πρωτόκολλό μας.

Α. Για την αυτομεταμόσχευση νεφρού στην υπονεφρική αορτή και κάτω κοίλη φλέβα, με βάση την τεχνική που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία, απαιτούνταν διπλή λαπαροτομία μέσω μέσης υπερ-υπομφάλιας τομής. Κατά την πρώτη διενεργούνταν αριστερή νεφρεκτομή. Κατά τη δεύτερη, απαιτούνταν απόθεση του λεπτού εντέρου και διάνοιξη του οπίσθιου περιτοναίου για την αποκάλυψη και παρασκευή της υπονεφρικής αορτής και κάτω κοίλης φλέβας, σε μήκος 3-4cm και 4-5cm, αντίστοιχα, με απαραίτητη συνοδό απολίνωση των αντίστοιχων οσφυϊκών κλάδων τους. Ακολουθούσε περιβροχισμός των αγγείων με ελαστικό vessel loop. 5 λεπτά πριν τον αγγειακό αποκλεισμό τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε συστηματικό ηπαρινισμό με 5.000IU ηπαρίνης. Ακολουθούσε η δημιουργία των τελικο-πλάγιων αναστομών με ράμμα πολυπροπυλενίου Νο6-0 (εικόνα 9.10-9.12). Εν συνεχεία, πραγματοποιούνταν δεξιά νεφρεκτομή, αναστομώνονταν ο ουρητήρας του μοσχεύματος με το δεξιό γηγενή ουρητήρα με τοποθέτηση pigtail, με συνεχόμενη ραφή πολυδιοξανόνης Νο5-0 (εικόνα 9.13) και κατασκευαζόταν διαδερμική

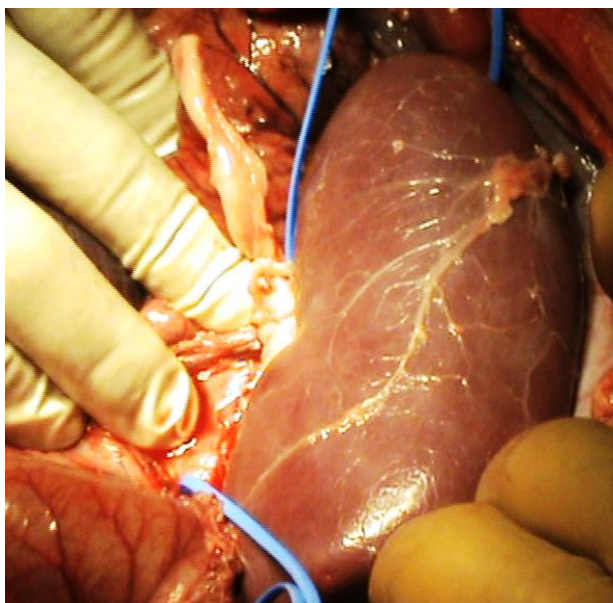
κυστεοστομία (εικόνα 9.14), με τη χρήση δύο επάλληλων και δίκην καπνοσακούλας ραφών πολυγλυκολικού οξέος No2-0, ενώ ουροκαθετήρας (22F) εξέρχονταν μέσω οπής στο κοιλιακό τοίχωμα και καθηλώνονταν στο δέρμα της περιοχής. Τέλος, συγκλείονταν το κοιλιακό τοίχωμα με συνεχή ραφή πολυδιοξανόνης loop No1 και το δέρμα με αυτόματο συρραπτικό μηχάνημα.



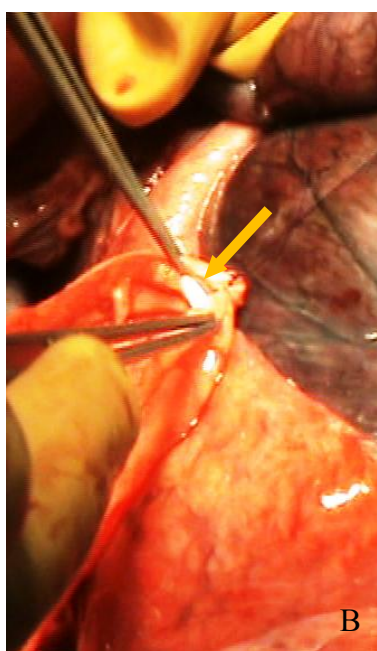
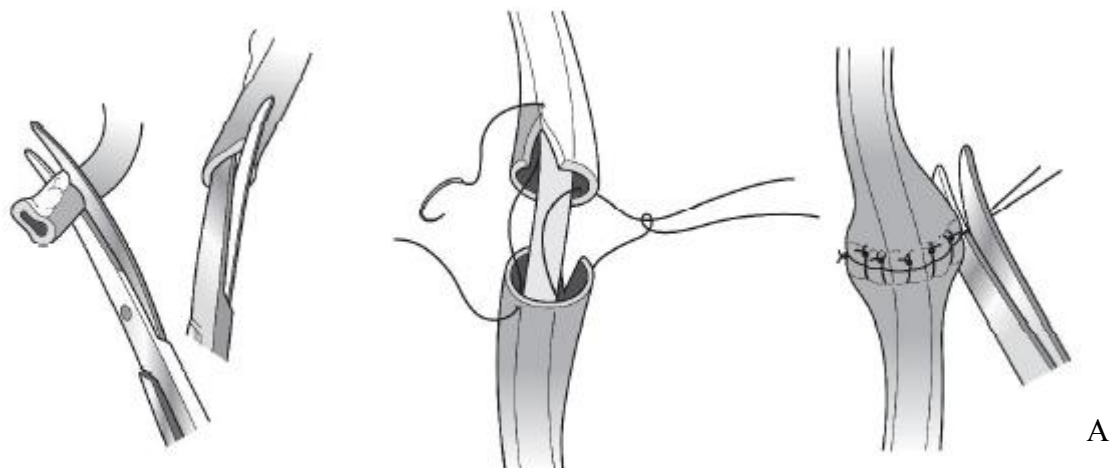
Εικόνα 9.10: Τελικοπλάγια αναστόμωση της νεφρικής φλέβας του αυτομοσχεύματος με την υπονεφρική κάτω κοίλη φλέβα



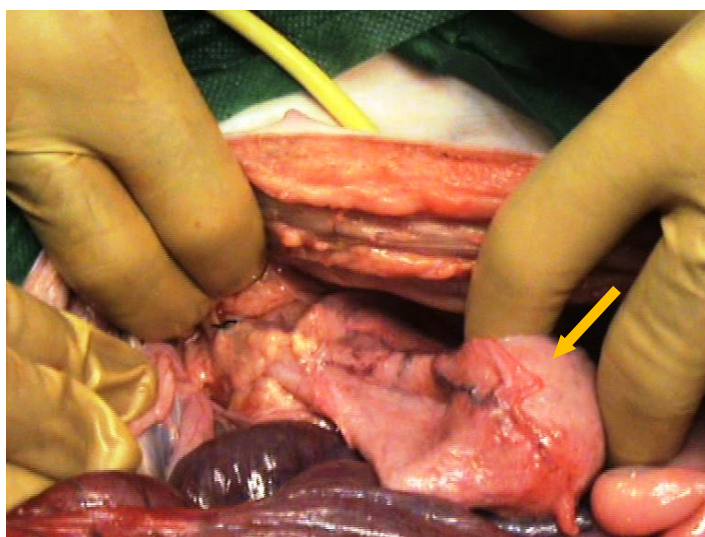
Εικόνα 9.11: Τελικοπλάγια αναστόμωση της νεφρικής αρτηρίας του αυτομοσχεύματος με την υπονεφρική αορτή



Εικόνα 9.12: Επαναιμάτωση του αυτομοσχεύματος από την υπονεφρική αορτή



Εικόνα 9.13: Α. Σχηματική αναπαράσταση της τελικοτελικής αναστόμωσης των ουρητήρων (τροποποιημένη),¹⁸⁰ Β. Τελικοτελική αναστόμωση του ουρητήρα του αυτομοσχεύματος με το γηγενή δεξιό ουρητήρα (διαφαίνεται το rigtail στον αυλό των ουρητήρων, βέλος)



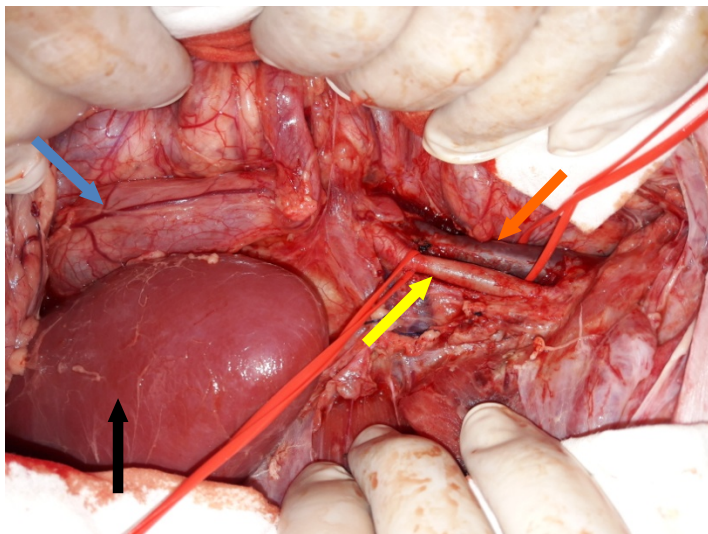
Εικόνα 9.14:
 Διαδερμική κυστεοστομία
 (διαφαίνεται φουσκωμένο το
 μπαλονάκι μέσα στην ουροδόχο
 κύστη, βέλος)

Την τεχνική αυτή εφαρμόσαμε σε 5 πειραματόζωα, όμως καταγράψαμε σοβαρά μειονεκτήματα, που μας οδήγησαν στην απόρριψή της. Περιληπτικά αυτά αφορούσαν: α) στις δυσχέρειες απομάκρυνσης του λεπτού εντέρου, από το χειρουργικό πεδίο, ώστε τελικά αυτό να εμφανίζει έστω και πρόσκαιρα διεγχειρητικά σημεία υποάρδευσης (διαταραχή χρώματος), β) στους λεπτούς χειρισμούς και το σημαντικό χρόνο που απαιτούνταν για την παρασκευή της αορτής, της κάτω κοίλης φλέβας και την απολίνωση των οσφυϊκών κλάδων τους, γ) στη σοβαρή πιθανότητα τρώσης λεμφαγγειακών στελεχών, που πορεύονται παράλληλα της αορτής, δ) στον σημαντικό χρόνο αγγειακού αποκλεισμού, τόσο της αορτής, όσο και της κάτω κοίλης φλέβας, ε) στον παρατεταμένο μετεγχειρητικό παραλυτικό ειλεό, ως αποτέλεσμα της διπλής λαπαροτομίας και τέλος το σημαντικότερο ε) στην υψηλή πιθανότητα θρόμβωσης και μη λειτουργίας του μοσχεύματος κατά την πρώιμη μετεγχειρητική περίοδο, ως αποτέλεσμα των κινήσεων του πειραματόζωου και της όρθιας θέσης του και της εξ' αυτών ταλάντωσης του μοσχεύματος, λόγω μη δυνατότητας καθήλωσής του και γωνίωσης των αγγείων του. Θεωρήσαμε λοιπόν, πως υπό αυτές τις συνθήκες οποιαδήποτε προσπάθεια εκτίμησης κλινικοεργαστηριακών παραμέτρων, αφ' ενός μεν της έντασης του αναπτυσσόμενου οξειδωτικού stress και αφ' ετέρου της μετεγχειρητικής λειτουργίας του νεφρικού μοσχεύματος, καθίστατο σίγουρα προβληματική, αν όχι απαγορευτική.

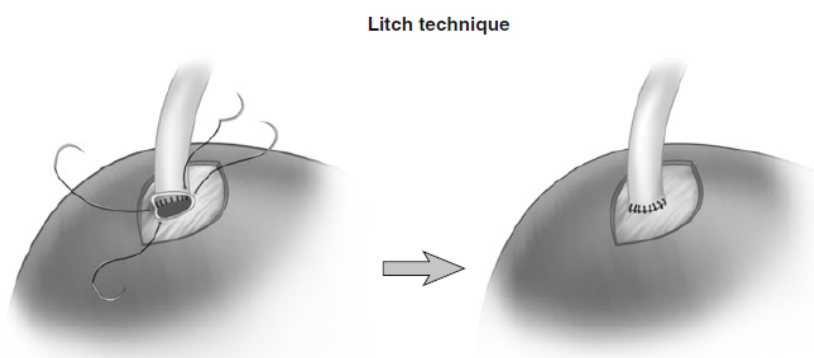
B. Ο δεύτερος τρόπος αυτομεταμόσχευσης νεφρού αφορά στην αναστόμωση των νεφρικών αγγείων στα δεξιά έξω λαγόνια αγγεία. Όπως έχει περιγραφεί στη βιβλιογραφία, η λήψη του μοσχεύματος έγινε μέσω λαπαροτομίας και η εμφύτευσή του μέσω παρασκευής των έξω λαγονίων αγγείων με εξωπεριτοναϊκή προσπέλαση (εικόνα 9.15). Οι αγγειακές αναστομώσεις γίνονταν τελικο-πλάγια και ο ουρητήρας εμφυτεύονταν στην ουροδόχο κύστη με την τεχνική της νεοκυστεο-ουρητηροστομίας (εικόνα 9.16). Η επέμβαση ολοκληρωνόταν με τη διενέργεια δεξιάς νεφρεκτομής, μετά από επέκταση κεφαλικάς της τομής της αυτομεταμόσχευσης.

Η τεχνική αυτή πραγματοποιήθηκε σε 2 πειραματόζωα, αλλά επίσης απορρίφθηκε. Ως βασικότερο μειονέκτημά, που την καθιστά μη ικανοποιητική, ήταν ο ανεπαρκής χώρος τοποθέτησης του μοσχεύματος στο δεξιό λαγόνιο βόθρο (εικόνα 9.17), που οδηγεί σε ανάπτυξη σοβαρών πιεστικών φαινομένων επί του μοσχεύματος (σύνδρομο αυξημένης πίεσης). Επιπλέον, κρίθηκε πως η τεχνική αυτή εμφανίζει επίσης μειονεκτήματα, που

σχετίζονται με τη διπλή λαπαροτομία και τους αγγειακούς αποκλεισμούς, που όπως και στην προηγούμενη τεχνική δεν είναι δυνατόν να περιορισθούν με χρήση αγγείων Satinsky, λόγω του μικρού εύρους των αγγείων.



Εικόνα 9.15: Παρασκευή και περιβροχισμός δεξιών έξω λαγόνιων αγγείων (κίτρινο βέλος δεξιά έξω λαγόνια αρτηρία, πορτοκαλί βέλος δεξιά έξω λαγόνια φλέβα, μαύρο βέλος δεξιός νεφρός, μπλε βέλος δεξιός ουρητήρας)



Εικόνα 9.16: Κυστεοουρητηρική αναστόμωση με τη τεχνική Litch¹⁸¹



Εικόνα 9.17: Επιτυχής αυτομεταμόσχευση του αριστερού νεφρού στα δεξιά έξω λαγόνια αγγεία. Φαίνεται η έντονη προβολή του νεφρικού αυτομοσχεύματος έξω από το κοιλιακό τοίχωμα, που υποδηλώνει την ανεπάρκεια χώρου στο δεξιό λαγόνιο βόθρο

Γ. Βάσει της βιβλιογραφίας, για την αυτομεταμόσχευση νεφρού στα δεξιά νεφρικά αγγεία, απαιτήθηκε επίσης διπλή λαπαροτομία, για τη λήψη του μοσχεύματος (αριστερός νεφρός) και την εμφύτευσή του την επόμενη ημέρα. Για την εμφύτευση στα δεξιά νεφρικά αγγεία πραγματοποιούνταν προσεκτικός διαχωρισμός του πλάγιου περιτοναίου, δεξιά νεφρεκτομή και αναστόμωση των αγγείων του μοσχεύματος στα κολοβώματα των δεξιών νεφρικών αγγείων (τελικο-τελικές αναστομώσεις). Στη συνέχεια γίνονταν προσπάθεια καθήλωσης του μοσχεύματος, με συρραφή του διανοιχθέντος πλάγιου περιτοναίου με το κοιλιακό τοίχωμα. Και στη τεχνική αυτή διαπιστώθηκε συνδυασμός μειονεκτημάτων, που αναφέρθηκαν στις προηγούμενες δύο και παρότι χρησιμοποιήθηκε αρχικά σε 1 πειραματόζωο, τελικά εγκαταλείφθηκε.

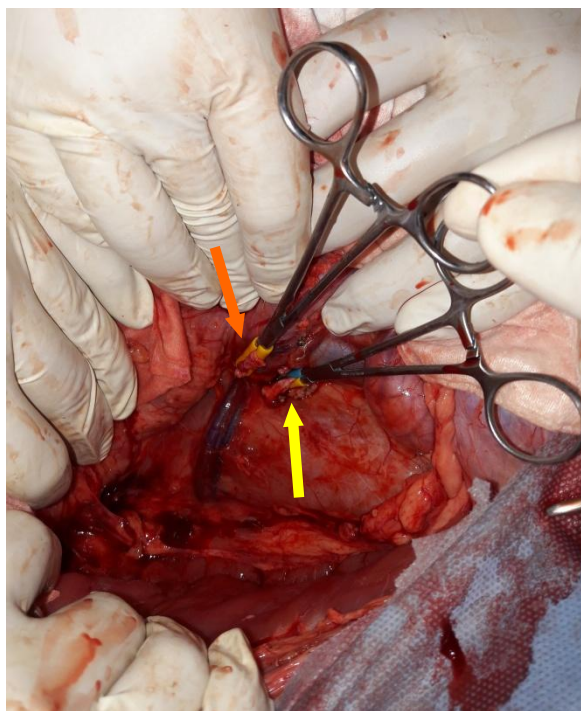
➤ Περιγραφή ίδιου μοντέλου που τελικά χρησιμοποιήθηκε στο πρωτόκολλό μας

Λόγω των πολλαπλών μειονεκτημάτων που διαπιστώσαμε κατά την εφαρμογή των παραπάνω, ήδη γνωστών, τεχνικών, αναπτύξαμε ένα νέο –ίδιο- μοντέλο αυτομεταμόσχευσης νεφρού, ώστε να αποφεύγονται όλα τα παραπάνω προβλήματα και η εκτίμηση των αποτελεσμάτων πρωτοκόλλων παρέμβασης στη μεταμόσχευση να είναι αντικειμενική και αξιόπιστη. Οι κρίσιμες λεπτομέρειες της τεχνικής που αναπτύξαμε και που για πρώτη φορά εμφανίζεται στην βιβλιογραφία περιγράφονται παρακάτω.

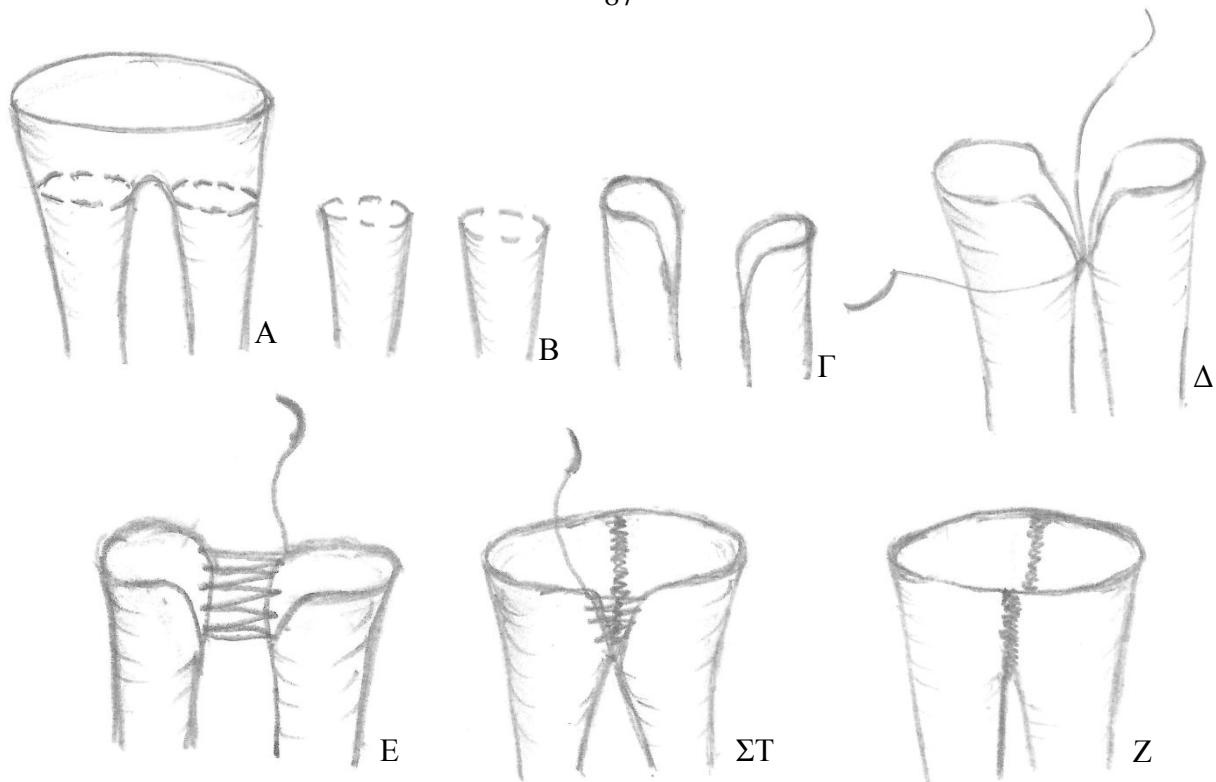
- Η λήψη του νεφρικού μοσχεύματος γίνονταν με αριστερή εξωπεριτοναϊκή προσπέλαση.
- Η εμφύτευσή του γίνονταν μέσω δεύτερης εξωπεριτοναϊκής προσπέλασης στα δεξιά νεφρικά αγγεία, μετά από αντίστοιχη νεφρεκτομή και διατήρηση μήκους αγγείων κατάλληλου για ασφαλή αναστόμωση, όχι όμως ιδιαίτερα μεγάλου, ώστε να αποφεύγεται η γωνίωσή τους (εικόνα 9.18-9.22).
- Στις περιπτώσεις που το κοινό στέλεχος της φλέβας του μοσχεύματος κρίνονταν ιδιαίτερα βραχύ, πραγματοποιούνταν ανακατασκευή του, για την ευχερέστερη και ασφαλέστερη αναστόμωσή του με τα κολοβώματα των δεξιών νεφρικών αγγείων (εικόνα 9.19).
- Το κοινό στέλεχος της δεξιάς νεφρικής αρτηρίας διατέμονταν προ του διχασμού του και η αρτηρία του μοσχεύματος ανακατασκευάζονταν σε σχήμα «κεφαλής κόμπρας» (εικόνα 9.20).

- Ο ουρητήρας του μοσχεύματος αναστομώνονταν τελικο-τελικά με τον γηγενή δεξιό ουρητήρα, μετά από εισαγωγή pig tail.
- Μετά την απομάκρυνση του διαστολέα που διατηρούσε προσπελάσιμο τον δεξιό εξωπεριτοναϊκό χώρο, το άθικτο περιτόναιο καθλώνονταν στο δεξιό πλάγιο κοιλιακό τοίχωμα, ώστε υπήρχε πλήρης καθήλωση του μοσχεύματος στην ανατομική θέση του δεξιού νεφρού (εικόνα 9.22).
- Τέλος, δημιουργούταν διαδερμική κυστεοστομία, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

Τα πειραματόζωα ελάμβαναν διεγχειρητικά ομεπραζόλη 40mg, κεφουροξίμη 1,5gr, ενώ ενυδατώνονταν με 3lit N/S 0,9% συνολικά. Μετά την επαναϊμάτωση του νεφρικού μοσχεύματος χορηγούνταν 10gr μαννιτόλης, 40mg φουροσεμίδης και 100ml HCO_3^- 4%. Επιπλέον, στις περιπτώσεις που υπήρχε έντονη αγγειοσύσπαση της νεφρικής αρτηρίας μετά την αναστόμωση, την περιβρέχαμε με παπαβερίνη. Όπως αναφέρθηκε αρχικά, η ομάδα μελέτης έλαβε πριν την μεταμόσχευση δεφεριπρόνη 50mg/kg, που διαλύθηκε στην αντίστοιχη ποσότητα N/S 0,9%, όπως ήδη έχει περιγραφεί.

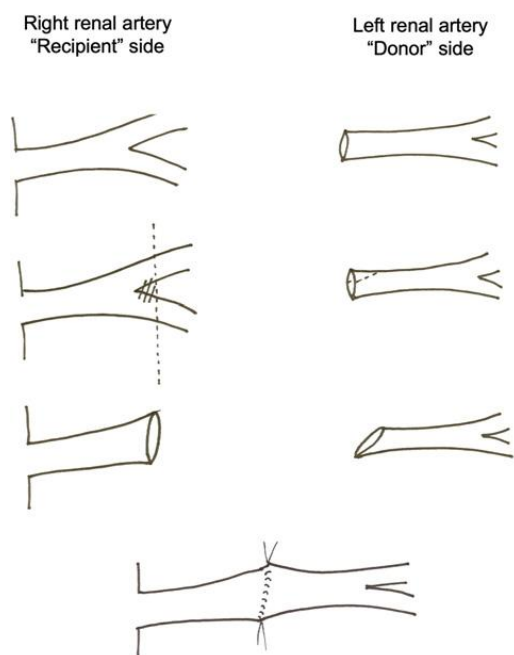


Εικόνα 9.18: Αποκλεισμός των δεξιών νεφρικών αγγείων με υπενδεδυμένες αιμοστατικές λαβίδες με πλαστικά καλύμματα για την πραγματοποίηση της αυτομεταμόσχευσης νεφρού (πορτοκαλί βέλος δεξιά νεφρική φλέβα, κίτρινο βέλος δεξιά νεφρική αρτηρία)

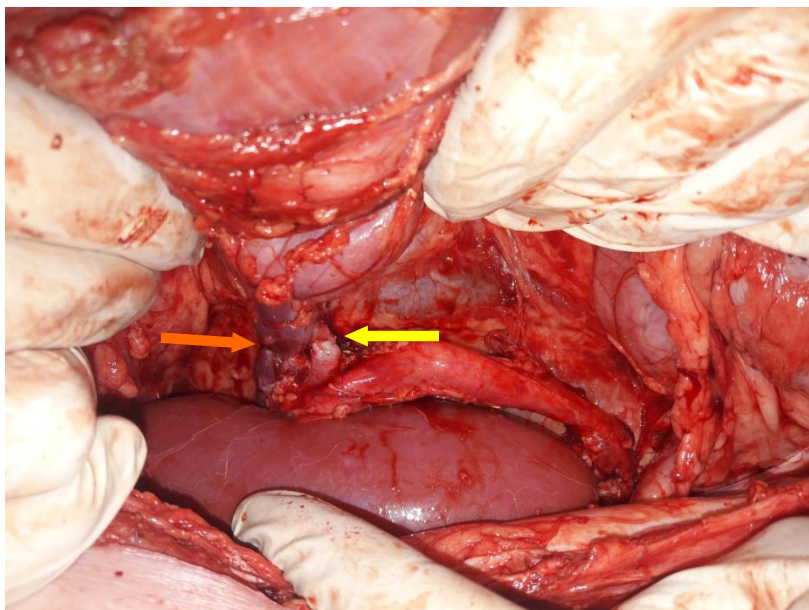


Εικόνα 9.19: Ανακατασκευή της νεφρικής φλέβας του αυτομοσχεύματος λόγω μικρού μήκους του κοινού στελέχους της. Α. Νεφρική φλέβα αυτομοσχεύματος με κοντό κοινό στέλεχος. Β. Οι δύο κλάδοι της νεφρικής φλέβας του αυτομοσχεύματος μετά τη διατομή του κοντού κοινού στελέχους. Γ. Επιμήκη διατομή των δύο φλεβικών κλάδων στην εσωτερική τους πλευρά. Δ-ΣΤ. Συρραφή των εγγύς ελεύθερων άκρων των φλεβικών κλάδων σχηματίζοντας ένα μακρύτερο κοινό αυλό με δύο συνεχόμενες ραφές. ΣΤ. Ολοκλήρωση του μακρύτερου κοινού αυλού, έτοιμο για την πραγματοποίηση της τελικοτελικής αναστόμωσης των νεφρικών φλεβών. (Σχέδιο: Ιωάννης Β. Τάτσης)

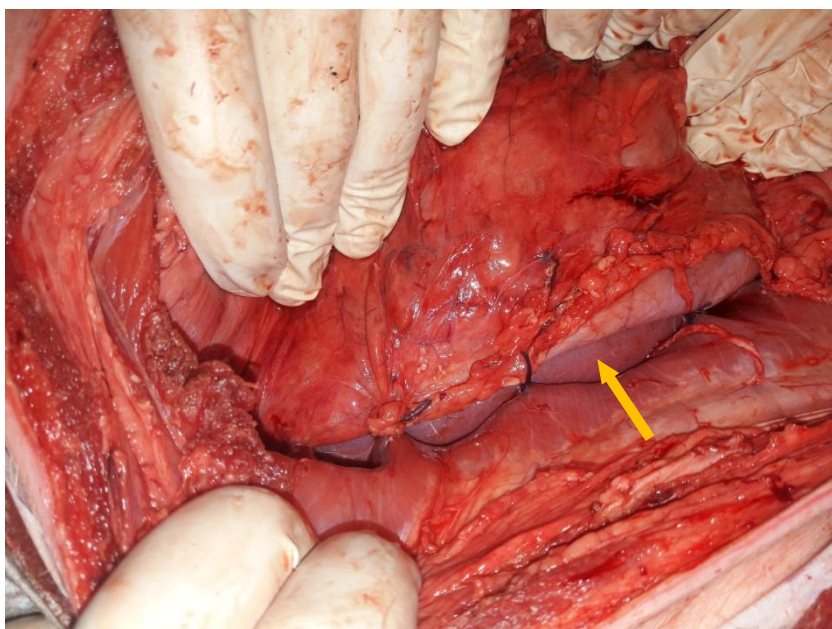
ARTERIAL ANASTOMOSIS



Εικόνα 9.20: Πραγματοποίηση της τελικοτελικής αρτηριακής αναστόμωσης. Φαίνεται η εκτομή της έσω καμπύλης του διχασμού της δεξιάς νεφρικής αρτηρίας και η διατομή της νεφρικής αρτηρίας του αυτομοσχεύματος σε σχήμα «κεφαλής κόμπρας». Τελικό αποτέλεσμα είναι η αποφυγή της στένωσης της αρτηριακής αναστόμωσης¹⁷⁹



Εικόνα 9.21: Αυτομεταμόσχευση του αριστερού νεφρού στα δεξιά νεφρικά αγγεία (κίτρινο βέλος αρτηριακή αναστόμωση, πορτοκαλί βέλος φλεβική αναστόμωση)



Εικόνα 9.22: Συρραφή του τοιχωματικού περιτοναίου στο κοιλιακό τοίχωμα για να περιορισθεί ο αυτομεταμοσχευμένος νεφρός σε έναν ελεγχόμενο χώρο και να αποφευχθεί η διάταση των νεφρικών αγγείων και η θρόμβωσή τους (βέλος αυτομεταμοσχευμένος αριστερός νεφρός)

9.2.7 Μετεγχειρητική φροντίδα

Μετεγχειρητικά, τα πειραματόζωα ελάμβαναν ενδοφλεβίως: 40mg ομεπραζόλης μία φορά την ημέρα, 1gr παρακεταμόλης τέσσερις φορές ημερησίως, 1,5gr κεφουροξίμης δύο φορές την ημέρα και ενυδατώνονταν με 2lit N/S 0,9% την ημέρα για τις τρεις πρώτες μετεγχειρητικές ημέρες (μετά από και κάθε λίτρο φυσιολογικού ορού χορηγούνταν 20mg φουροσεμίδης) (εικόνα 9.23). Τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό ύδρευσης από την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα (εικόνα 9.24).



Εικόνα 9.23: Πειραματόζωο μετεγχειρητικά μετά την αυτοματεμόσχευση νεφρού στο οποίο χορηγείται φυσιολογικός όρος από την κεντρική φλεβική γραμμή. Φαίνεται η διαδερμική κυστεοστομία με τον ουροσυλλέκτη γεμάτο ούρα



Εικόνα 9.24: Τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό ύδρευσης τη μετεγχειρητική περίοδο

9.2.8 Δειγματοληψία-ευθανασία

Οι αιμοληψίες για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων της ουρίας και της κρεατινίνης έγιναν από την κεντρική φλεβική γραμμή, ενώ για τα 8-ισοπροστάνια (στα 30mins από την επαναιμάτωση) από τη νεφρική φλέβα με σύριγγα με βελόνα 27G. Η κεντρική φλεβική γραμμή μετά από κάθε αιμοληψία ξεπλενόταν με ηπαρινισμένο διάλυμα φυσιολογικού ορού. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρούνταν άμεσα, ο ορός των δειγμάτων αρχειοθετούνταν και διατηρούνταν στους -60°C μέχρι την ανάλυσή τους. Ομοίως, γινόταν για το διάλυμα Custodiol[®] μετά από 13h ψυχρής συντήρησης για τη μέτρηση των CK και LDH. Την 14^η μετεγχειρητική ημέρα, τα πειραματόζωα καταστέλλονταν με 25-35ml προποφόλη, υποβάλλονταν σε δεξιά υποπλεύρια τομή, ανευρισκόταν το νεφρικό μόσχευμα και λαμβανόταν επαρκές βιοπτικό υλικό, από την ίδια θέση σε κάθε πειραματόζωο, αλλά σε διαφορετική από τη βιοψία που είχε γίνει στα 30mins μετά την επαναιμάτωση του (εικόνα 9.25). Τα παρασκευάσματα διατηρήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% και αρχειοθετήθηκαν μέχρι την ιστολογική και ανοσοϊστοχημική τους εξέταση. Μετά τη λήψη της βιοψίας τα πειραματόζωα θανατώνονταν με χορήγηση 5-8amp K^+ ενδοφλεβίως και οδηγούνταν σε κατάλληλο αποτεφρωτήρα καύσης.



Εικόνα 9.25: Τη 14^η μετεγχειρητική ημέρα μέσω μίας δεξιάς υποπλεύριας τομής, με τα πειραματόζωα σε καταστολή, ανευρίσκοντας ο αυτομεταμοσχευμένος νεφρός και λαμβανόταν βιοψία για ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική εξέταση

9.3 Βιοχημική ανάλυση δειγμάτων και μέτρηση βάρους νεφρικών αυτομοσχευμάτων

Η βιοχημική ανάλυση των δειγμάτων για μέτρηση των συγκεντρώσεων της ουρίας και της κρεατινίνης ορού, καθώς και των συγκεντρώσεων CK και LDH του διαλύματος

συντήρησης πραγματοποιήθηκαν στο Βιοχημικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, με μεθοδολογία αντίστοιχη της κλινικά εφαρμοζόμενης, σε αναλυτή Beckman Coulter AU5800. Τα νεφρικά μοσχεύματα ζυγίζονταν σε ηλεκτρονική ζυγαριά με κλίμακα μέτρησης τα 0,1 gr.

9.4 Μέτρηση των 8-ισοπροστανίων

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων των 8-ισοπροστανίων στον ορό πραγματοποιήθηκε με το kit 8-Isoprostane ELISA Kit της Cayman CHEMICAL. Πρόκειται για μέθοδο που στηρίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των 8-ισοπροστανίων, του υπό μέτρηση δείγματος, με ένα υπόστρωμα που περιέχει 8-ισοπροστανία-ακετυλοχολινεστεράσης για περιορισμένο αριθμό ειδικών θέσεων πρόσδεσης.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

1. Προετοιμασία διαλυμάτων και αντιδραστηρίων

- i. ELISA Buffer: Σε 90ml Ultrapure water αραιώνουμε το περιεχόμενο ενός vial ELISA Buffer, συγκέντρωσης 10X.
- ii. Wash Buffer: Αραίωση ενός vial Wash Buffer (400X) σε 2 lt Ultrapure water και προσθήκη 2,5 ml Polysorbate 20.
- iii. Bulk Standard: 100μl του 8-Isoprostane ELISA Standard αραιώνονται σε 900 μl Ultrapure Water. Η τελική του συγκέντρωση είναι 5ng/ml.
- iv. 8-Isoprostane ELISA Standards: Μεταφορά 100μl του Bulk Standard σε 900μl ELISA Buffer (Standard 1). Από αυτό μεταφέρονται 500μl σε 750μl ELISA Buffer (Standard 2). Επανάληψη της διαδικασίας 6 φορές (Standard 3-8).
- v. 8-Isoprostane AChe Tracer: Προσθήκη 6ml ELISA Buffer σε 1 vial που περιέχει 100dtn 8-Isoprostane AChe Tracer. Σε αυτό προστίθενται επιπλέον 60μl Tracer Dye (ροζ χρώμα).
- vi. 8-Isoprostane ELISA Antiserum: Προσθήκη 6ml ELISA Buffer σε 1 vial που περιέχει 100dtn 8-Isoprostane ELISA Antiserum. Σε αυτό προστίθενται επιπλέον 60μl Antiserum Dye (μπλε χρώμα).

2. Διεξαγωγή της μεθόδου

- i. Στο ELISA Plate φορτώνονται:
 - 2 Blank wells (Blk).

- 2 Non Specific Binding wells (NSB), τα οποία περιέχουν 100μl ELISA Buffer.
 - 2 Maximum Binding wells (B_0), τα οποία περιέχουν 50μl ELISA Buffer.
 - 1 Total Activity well (TA).
 - 50 μl από τα standard 1-8 και 50μl από τα δείγματα, το καθένα από δύο φορές.
- ii. Προσθήκη 50μl 8-Isoprostane AChE Tracer σε όλα τα wells, εκτός των Blk και TA.
 - iii. Προσθήκη 50μl 8-Isoprostane ELISA Antiserum σε όλα τα wells, εκτός των Blk, NSN και TA.
 - iv. Το plate καλύπτεται και επωάζεται για 18h/4 °C.
 - v. Μετά την επώαση το plate ξεπλένεται 5 φορές με Wash Buffer.
 - vi. Προσθήκη 200μl Ellman's Reagent σε όλα τα wells, το οποίο παρασκευάζεται με την προσθήκη 20ml Ultrapure water σε 1 vial 100dtn Ellman's Reagent.
 - vii. Προσθήκη 5μl Tracer στο TA well.
 - viii. Επώαση του plate 120min/RT στο σκοτάδι υπό ανάδευση.
3. Μέτρηση της απορρόφησης στα 405nm

9.5 Ιστολογική εξέταση

Μετά τη λήψη των ιστών, αρχικά μονιμοποιήθηκαν και διατηρήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10%. Αφού τοποθετούνταν σε ειδική κασέτα έγκλεισης, έμπαιναν στην ιστοκινέτα, όπου ακολουθούνταν ένα πρόγραμμα 16 ωρών, που περιελάμβανε αφυδάτωση σε διαβαθμισμένες συγκεντρώσεις αιθανόλης (80%, 96%, 100%, 100%, 100%), εμβύθιση σε ξυλόλη (x2) και τελικά σε παραφίνη.

Το επόμενο βήμα περιελάμβανε την τοποθέτηση του ιστού σε κατάλληλα μεταλλικά καλούπια (μήτρες), πάνω από τα οποία προστίθονταν η κασέτα έγκλεισης και καλύπτονταν από καθαρή παραφίνη, από το σταθμό παραφίνης που λειτουργεί στους 70°C. Ακολουθούσε τοποθέτηση των μητρών σε ψυχομένη πλάκα στους -15°C και αφαίρεση των κασετών έγκλεισης πάνω στις οποίες έχει σταθεροποιηθεί ο ιστός με την παραφίνη. Στον μικροτόμο παίρνονταν τομές των 3μm από τους κύβους παραφίνης και οι οποίες παρέμεναν για μικρό χρονικό διάστημα στο υδατόλουτρο στους 65°C, ώστε να αποφευχθούν αναδιπλώσεις.

Επιλέγονταν μία και μοναδική τομή, την οποία φροντίζαμε να συλλέξουμε στο κάτω μέρος της αντικειμενοφόρου πλάκας.

Για την ιστοπαθολογική εκτίμηση και αξιολόγηση των αλλοιώσεων οι ιστοί ακολούθησαν τη διαδικασία χρώσης με αιματοξυλίνη και ηωσίνη. Ένα σύστημα ανάλυσης εικόνων, που αποτελείται από το οπτικό μικροσκόπιο Olympus BX43, τη ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Olympus Cam-SC30 και τη μαλακή ανάλυση (analySISH), χρησιμοποιήθηκαν στις μελετούμενες τομές (στις χρωσμένες με αντισώματα και τις αντίστοιχες με αιματοξυλίνη).

Η βαρύτητα των ιστολογικών αλλοιώσεων βαθμονομήθηκε ως εξής:¹⁸²

- 0 = καμία αλλοίωση,
- 1 = ήπιες αλλοιώσεις,
- 2 = μέτριες αλλοιώσεις και
- 3 = έντονες αλλοιώσεις.

Από το άθροισμα της βαθμολογίας των επιμέρους αλλοιώσεων προέκυπτε ο ιστοπαθολογικός δείκτης.

9.6 Ανοσοϊστοχημική εξέταση

Χρησιμοποιήθηκε η κλασσική μέθοδος της στρεπταβιδίνης-αβιδίνης-βιοτίνης (LSAB, Labeled StreptAbidin Biotin) με το kit Lab Vision Corporation, UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use). Σε όλες τις ανοσοϊστοχημικές χρώσεις συμπεριλήφθηκαν θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες (παράλειψη της προσθήκης του πρωτογενούς αντισώματος).

Αντίσωμα	Εταιρεία	Κλώνος	Χρόνος επώασης	Αραίωση
ICAM-1	Biorbyt	mouse monoclonal, 4C5D2	60min	1:50
VCAM-1	Santa Cruz	rat monoclonal, sc-18864	60min	1:250

Πίνακας 9.2: Ανοσοϊστοχημικοί δείκτες ICAM-1 και VCAM-1 που χρησιμοποιήθηκαν

Οι ανοσοϊστοχημικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι (πίνακας 9.2):

- ICAM-1 (mouse monoclonal), εταιρεία Biorbyt (orb382141) και
- VCAM-1 (rat monoclonal), εταιρεία Santa Cruz (sc-18864).

Περιγραφή της ανοσοϊστοχημικής μεθόδου:

1. Αποπαραφίνωση-ενυδάτωση: Τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε κλίβανο θερμοκρασίας 60°C, για 18 ώρες. Ακολούθησε προθέρμανση διαλύματος ξυλόλης για 30 λεπτά σε κλίβανο, σε θερμοκρασία 60°C. Στη συνέχεια, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα ξυλόλης και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο σε θερμοκρασία 60°C, για 20 λεπτά. Κατόπιν μεταφέρθηκαν σε διάλυμα ξυλόλης θερμοκρασίας δωματίου, για 10 λεπτά. Ακολούθησε η διαδικασία ενυδάτωσης των ιστολογικών τομών με εμβάπτισή τους για 30 δευτερόλεπτα x2, διαδοχικά σε κατιούσα σειρά οινόπνευμάτων (100%, 96%) και τέλος σε αποσταγμένο νερό.

2. Αποκάλυψη του αντιγόνου: Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων με νερό βρύσης x3. Ακολούθησε προθέρμανση διαλύματος κιτρικού οξέος 10% (630 ml απεσταγμένο νερό και 70 ml κιτρικό οξύ, Buffer for Antigen Retrieval) σε φούρνο μικροκυμάτων για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο παραπάνω διάλυμα, ώστε να αναδειχθεί η αντιγονικότητα του ιστού. Εφαρμόστηκαν 2 κύκλοι θέρμανσης εντός του φούρνου μικροκυμάτων σε ισχύ 300Watt επί 15 λεπτά για κάθε κύκλο. Το διάλυμα με τα πλακίδια αφέθηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 λεπτά, και ακολούθησε έκπλυση σε αποσταγμένο νερό x3.

3. Εξουδετέρωση ενδογενούς υπεροξειδάσης: Στη συνέχεια προετοιμάστηκε το διάλυμα εξουδετέρωσης της ενδογενούς υπεροξειδάσης μετά από ανάμειξη 500 ml H₂O₂ (30%) με 50 ml μεθανόλη. Τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα για 30 λεπτά και τοποθετήθηκαν σε αναδευτήρα (εναλλακτικά, ενστάλαξη 2-3 σταγόνων από το Hydrogen Peroxide Block που παρέχεται έτοιμο στο Kit, και επώαση για 15 λεπτά).

4. Προεπώαση: Ακολούθησε έκπλυση με αποσταγμένο νερό x3 και με διάλυμα TBS για 5 λεπτά (TBS: Tris Buffer Solution, 20 g NaCl, 1.5 g Tris σε 2.5 lt dH₂O και pH 7.6). Στη συνέχεια γίνονταν ενστάλαξη 2-3 σταγόνων Ultra V Block από το Kit και τα πλακίδια επώαστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αποφευχθεί η μη ειδική χρώση (δέσμευση μη ειδικών αντιγονικών επιτόπων του ιστού).

5. Επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα: Μετά από έκπλυση των πλακιδίων σε TBS για 5 λεπτά, ακολούθησε ενστάλαξη του πρωτογενούς αντισώματος σε αραιώση που έχει προσδιοριστεί μετά από χρώσεις. Το χρονικό διάστημα επώασης καθορίστηκε από το πρωτόκολλο κάθε αντισώματος και τις δοκιμές που προηγήθηκαν και κυμάνθηκε από ώρες μέχρι ολονύκτια επώαση.

6. Επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα: Πραγματοποιήθηκε έκπλυση των πλακιδίων με διάλυμα TBS για 10 λεπτά και στη συνέχεια επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι βιοτινισμένο (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Envision Kit, έτοιμο προς χρήση) για 30 λεπτά. Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε TBS για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκε το ABC Complex/HRP (στρεπταβιδίνης συνδεδεμένη με το σύμπλοκο αβιδίνη-βιοτίνη-υπεροξειδάση) το οποίο επώαστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε έκπλυση σε TBS για 5 λεπτά x2

7. Προσθήκη χρωμογόνων: Για την προετοιμασία του χρωμογόνου αναμίχθηκαν 20 μl DAB (χρωμογόνο, 3,3 τετραχλωρική διαμινοβενζιδίνη) σε 1ml από το αντίστοιχο Buffer. Τοποθετήθηκε διάλυμα χρωμογόνου (DAB 0.1% W/V) στις τομές για 3 λεπτά. Ακολούθησε έκπλυση των πλακιδίων σε αποσταγμένο νερό για 10 λεπτά και επίχρωσή τους με αιματοξυλίνη 10% (προσθήκη 10 ml αιματοξυλίνης 100% σε 90 ml αποσταγμένου νερού) για 2 λεπτά. Τέλος, οι ιστολογικές τομές ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης για 1 λεπτό.

8. Αφυδάτωση των ιστών: Τέλος τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε ανιούσα σειρά οινόπνευμάτων (96%, 96%, 100%, 100%) και ξυλόλη και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με επικάλυψη των ιστολογικών τομών με καλυπτρίδες.

Η ανοσοϊστοχημική εκτίμηση της έκφρασης των αντισωμάτων είναι ημιποσοτική και αφορά την ένταση-έκταση της χρώσης και βαθμονομείται ως εξής:

0 = καμία έκφραση,

1 = ήπια έκφραση,

2 = μέτρια έκφραση και

3 = έντονη έκφραση.

Η ιστολογική και η ανοσοϊστοχημική εξέταση πραγματοποιήθηκαν από δύο Παθολογοανατόμους. Στις περιπτώσεις διαφωνίας της εκτίμησης του αποτελέσματος, η διαφωνία επιλύονταν με συνεργασία και επανεκτίμηση, ώστε να υπάρξει μια κοινή τελική διάγνωση.

9.7 Στατιστική ανάλυση

Η περιγραφή των μετρήσεων που καταγράφηκαν έγινε με χρήση συχνοτήτων και ποσοστών για τις κατηγορικές μεταβλητές, ενώ για τις συνεχείς με τη διάμεσο τιμή και το εύρος κυρίως λόγω των μη παραμετρικών ελέγχων που ακολούθησαν λόγω του μεγέθους του δείγματος, όπως αυτό διαμορφώθηκε βάσει του ερευνητικού πρωτοκόλλου, αλλά και μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις για τις μετρήσεις της ουρίας και της κρεατινίνης. Για τις συσχετίσεις μεταξύ των κατηγορικών δεδομένων έγινε χρήση του έλεγχου χ τετράγωνο και σε περιπτώσεις μη πληρότητας των προϋποθέσεων, του ελέγχου Fisher's exact test. Για την ανίχνευση διαφορών μεταξύ των δύο ομάδων και των συνεχών μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Mann Whitney, ενώ τις συγκρίσεις μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών για κάθε ομάδα χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Wilcoxon signed ranks test. Για τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της ουρίας και της κρεατινίνης χρησιμοποιήθηκαν μοντέλα επαναλαμβανόμενων μετρήσεων και στη συνέχεια πολλαπλές συγκρίσεις με το κριτήριο Bonferroni. Για τις ανάγκες της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v21 και το STATISTICA v10. Σε όλες τις περιπτώσεις το επίπεδο σημαντικότητας (p -value) ορίστηκε μικρότερο του 0,05 ($p < 0,005$).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Φάση 1^η

Στην πρώτη φάση της πειραματικής διαδικασίας πρωτοτυποποίησης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 8 χοίροι.

Σε 5 χοίρους η μεταμόσχευση πραγματοποιήθηκε στην υπονεφρική αορτή και κάτω κοίλη φλέβα. Παρότι διεγχειρητικά, το αποτέλεσμα της μεταμόσχευσης κρίθηκε επιτυχές, ωστόσο τα πειραματόζωα εμφάνισαν μετεγχειρητικά σταθερά ανουρία και σοβαρές κλινικοεργαστηριακές επιπλοκές (αδυναμία, ανορεξία, σύγχυση). Παρά τις προσπάθειες ενυδάτωσης και διούρησης η ανουρία συνέχιζε να υφίσταται, με παράλληλη επιδείνωση των κλινικών και εργαστηριακών τιμών και έτσι, αποφασίστηκε η ευθανασία τους. Σε 4 από αυτά διαπιστώθηκε θρόμβωση των αγγείων του μοσχεύματος, λόγω γωνίωσής τους και στο 1 μεγάλο αιμάτωμα, πιθανά από αιμορραγία από τους οσφυϊκούς κλάδους της αορτής και κάτω κοίλης φλέβας, ή και των αναστομώνσεων

Ακολούθησε προσπάθεια μεταμόσχευσης σε 2 χοίρους στα δεξιά έξω λαγόνια αγγεία, αλλά και πάλι το αποτέλεσμα ήταν απογοητευτικό, ανάλογα με τα προηγούμενα. Στην ευθανασία διαπιστώθηκε και πάλι θρόμβωση των νεφρικών αγγείων και μάλιστα στο ένα και εκρηκτική ρήξη του νεφρικού μοσχεύματος με συνοδό αιμορραγία.

Μεταμόσχευση στα δεξιά νεφρικά αγγεία με διαπεριτοναϊκή προσπέλαση, με την τρίτη μέθοδο που έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία και η οποία αναλύθηκε παραπάνω (διπλή λαπαροτομία) πραγματοποιήθηκε σε 1 πειραματόζωο. Δυστυχώς και αυτό απεβίωσε κατά την αφύπνιση, πιθανά για αναισθησιολογικούς λόγους.

Φάση 2^η

Στα υπόλοιπα 14 πειραματόζωα, τα οποία και τελικά εντάχθηκαν στη μελέτη μας, η μεταμόσχευση έγινε με βάση το ίδιο μοντέλο, που ήδη περιγράψαμε. Τα 14 πειραματόζωα εντάχθηκαν στις δύο ομάδες (μελέτης και ελέγχου) τυχαιοποιούμενα 1 προς 1. Και τα 14 πειραματόζωα επιβίωσαν, μέχρι το προκαθορισμένο χρονικό σημείο ολοκλήρωσης της μελέτης (14^η μτχ ημέρα).

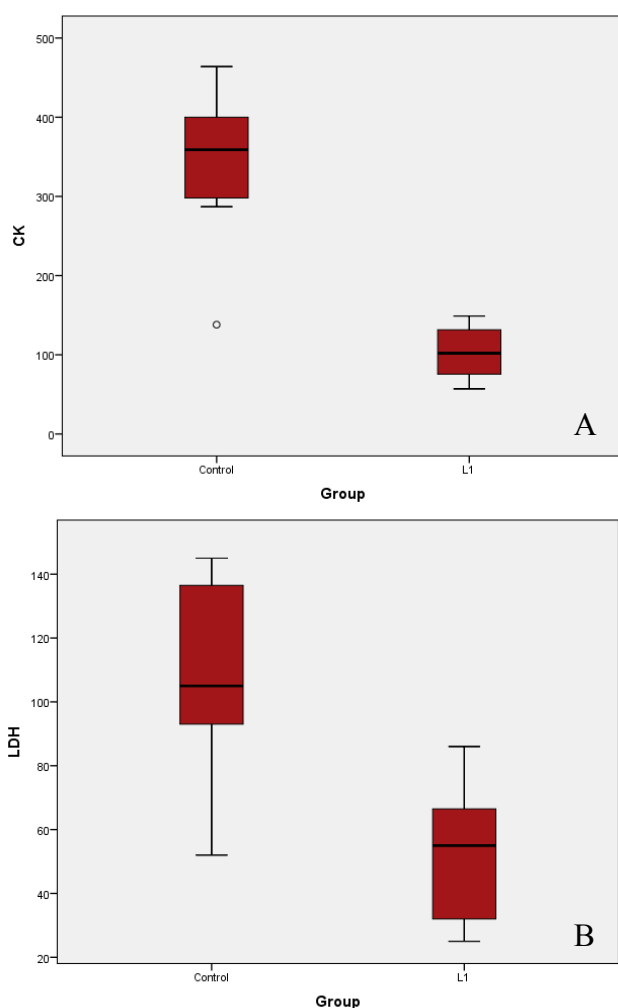
10.1 CK/LDH διαλύματος συντήρησης και βάρος νεφρικού αυτομοσχεύματος

Στον πίνακα 10.1 και στην εικόνα 10.1 παρουσιάζονται οι διάμεσες τιμές και τα εύρη των συγκεντρώσεων CK και LDH του διαλύματος συντήρησης, κατά τη χρονική στιγμή ολοκλήρωσης της συνδυασμένης περιόδου συντήρησης (4h HMP + 13h SCS, σύνολο 17 h).

Στον πίνακα 10.1 και στην εικόνα 10.1 παρατηρούμε ότι το διάλυμα συντήρησης της ομάδας μελέτης περιείχε σημαντικά λιγότερη ποσότητα των ενζύμων κυτταρικής καταστροφής (CK και LDH), σε σχέση με αυτό της ομάδας ελέγχου.

	Ομάδα Control	Ομάδα L1	Control vs L1
CK	359(326)	102(92)	p=0,001
LDH	105(93)	55(61)	p=0,007

Πίνακας 10.1: Σύγκριση διάμεσων τιμών (εύρος) των συγκεντρώσεων CK και LDH στο διάλυμα συντήρησης για τις δύο ομάδες

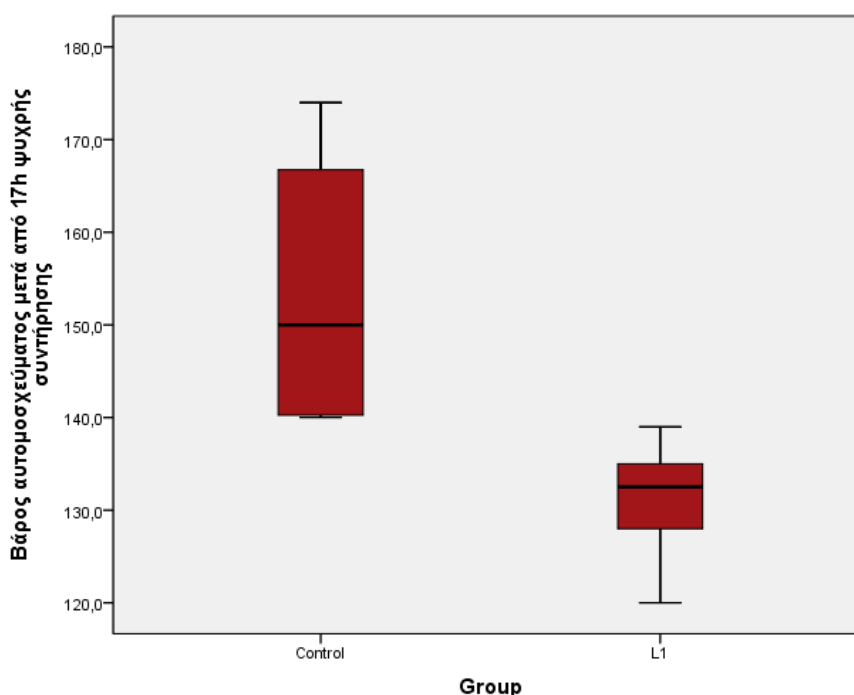


Εικόνα 10.1: Θηκογράμματα για τις παραμέτρους CK (A) και LDH (B) του διαλύματος συντήρησης των δύο ομάδων μετά από 17 h, όπου απεικονίζονται οι διάμεσοι, το 25ο-, 75ο-εκατοστημόριο. Τα whiskers αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης των παραμέτρων

Στον πίνακα 10.2 και στην εικόνα 10.2 παρουσιάζονται οι διάμεσες τιμές (εύρη) του βάρους του νεφρικού μοσχεύματος μετά τη αριστερή νεφρεκτομή και την ολοκλήρωση της συντήρησης και οι προκύπτουσες τιμές p.

	Ομάδα ελέγχου βάρος σε gr (εύρος)	Ομάδα μελέτης βάρος σε gr (εύρος)	Ελέγχου vs μελέτης
Βάρος μοσχεύματος μετά τη AP νεφρεκτομή	154,6(68)	141(40)	p=0,710
Βάρος μοσχεύματος μετά από 17h ψυχρής συντήρησης	150(34)	132,5(19)	p=0,001
AP Νεφρεκτομή vs 17h ψυχρής συντήρησης	p=0,612	p=0,018	-

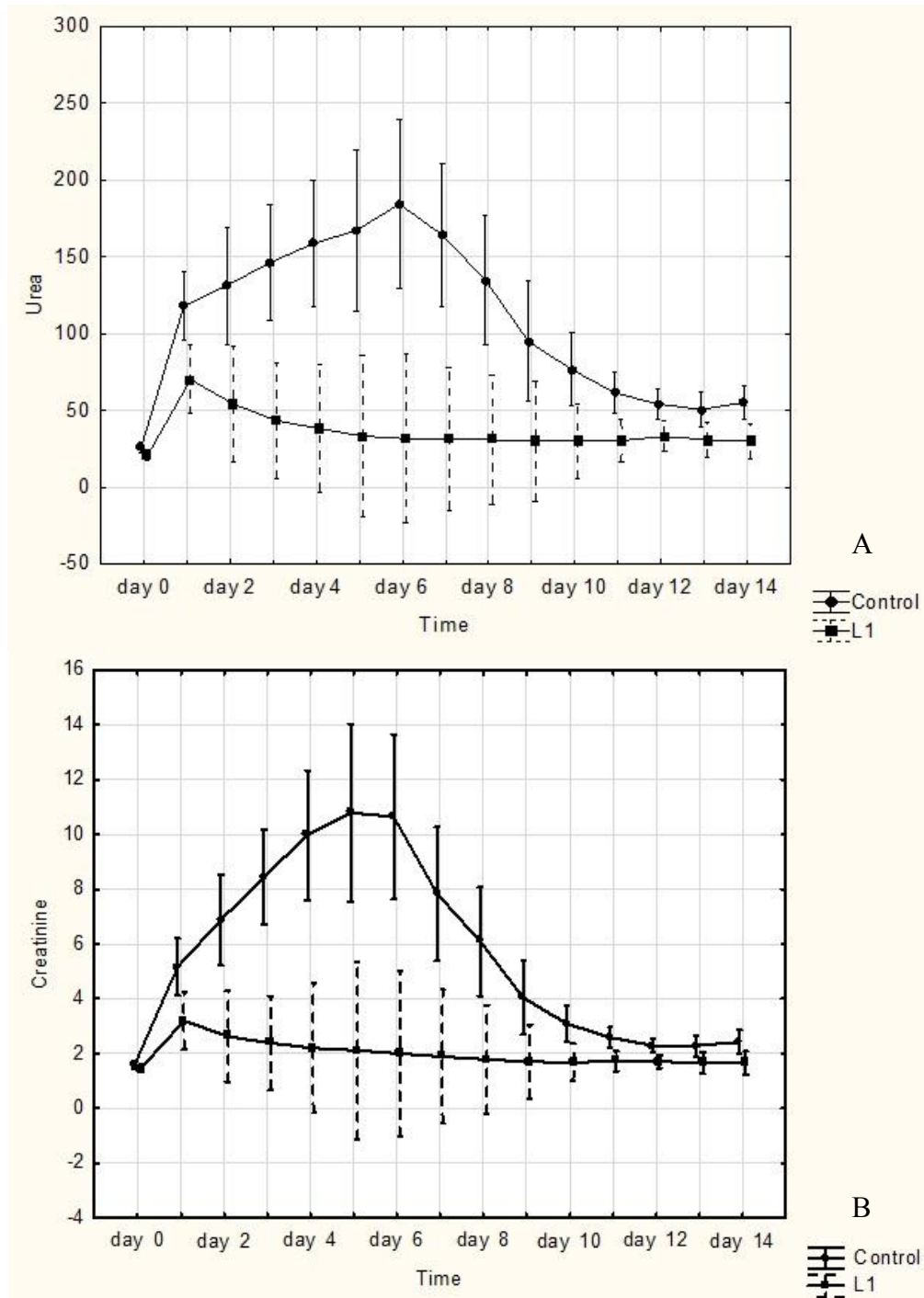
Πίνακας 10.2: Σύγκριση διάμεσων τιμών (εύρος) του βάρους του νεφρικού μοσχεύματος μεταξύ των ομάδων μετά την αριστερή νεφρεκτομή και στο τέλος των 17 h συντήρησης



Εικόνα 10.2: Θηκόγραμμα για το βάρος (σε gr) του μοσχεύματος των δύο ομάδων μετά το τέλος των 17h ψυχρής συντήρησης. Απεικονίζονται οι διάμεσοι, το 25^ο-, 75^ο-εκατοστημόρο. Τα whiskers αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης της παραμέτρου

Από τον πίνακα 10.2 και την εικόνα 10.2 συμπεραίνουμε ότι τα νεφρικά αυτομοσχεύματα της ομάδας μελέτης εμφάνιζαν σημαντικά μικρότερο βάρος, σε σχέση με αυτά της ομάδας ελέγχου, που αντανακλά το μικρότερο βαθμό του αναπτυχθέντος κυτταρικού οιδήματος.

10.2 Ουρία και κρεατινίνη



Εικόνα 10.3: Απεικόνιση μέσω τιμών και whiskers που αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης της Urea (A) και Creat (B) των δύο ομάδων, για κάθε ημέρα

Ημέρα	Ομάδα		Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	-95% CI	95% CI	Τιμή p Control vs L1
0 ημέρα	Control	Urea	25,71429	4,386125	21,65780	29,77078	Urea: 1
		Creat	1,594	0,169	1,438	1,751	
	L1	Urea	20,57143	3,952094	16,91635	24,22651	Creat: 1
		Creat	1,473	0,148	1,336	1,610	
1 ημέρα	Control	Urea	118,0000	37,01351	83,76821	152,2318	Urea: 0,935
		Creat	5,164	1,683	3,608	6,720	
	L1	Urea	70,1429	9,90671	60,98068	79,3050	Creat: 0,995
		Creat	3,203	0,629	2,621	3,785	
2 ημέρα	Control	Urea	131,2857	64,89919	71,26398	191,3075	Urea: 0,136
		Creat	6,873	2,811	4,273	9,473	
	L1	Urea	54,1429	8,02971	46,71662	61,5691	Creat: 0,060
		Creat	2,634	0,439	2,228	3,041	
3 ημέρα	Control	Urea	146,2857	64,36281	86,76004	205,8114	Urea: 0,003
		Creat	8,454	2,935	5,740	11,168	
	L1	Urea	43,2857	7,25062	36,58001	49,9914	Creat: 0,000
		Creat	2,384	0,349	2,062	2,707	
4 ημέρα	Control	Urea	158,5714	70,79044	93,10120	224,0417	Urea: 0,000
		Creat	9,961	4,042	6,223	13,700	
	L1	Urea	38,1429	5,45981	33,09338	43,1923	Creat: 0,000
		Creat	2,201	0,421	1,812	2,591	
5 ημέρα	Control	Urea	167,1429	90,37225	83,56247	250,7232	Urea: 0,000
		Creat	10,783	5,563	5,638	15,927	
	L1	Urea	33,2857	3,54562	30,00656	36,5649	Creat: 0,000
		Creat	2,119	0,249	1,888	2,349	
6 ημέρα	Control	Urea	184,4286	94,0458	97,45068	271,4065	Urea: 0,000
		Creat	10,637	5,140	5,883	15,391	
	L1	Urea	31,5714	3,8235	28,03529	35,1076	Creat: 0,000
		Creat	2,000	0,163	1,849	2,151	
7 ημέρα	Control	Urea	164,1429	79,19897	90,89603	237,3897	Urea: 0,000
		Creat	7,834	4,186	3,963	11,705	
	L1	Urea	31,4286	5,38074	26,45222	36,4049	Creat: 0,000
		Creat	1,891	0,125	1,775	2,007	

Πίνακας 10.3: Σύγκριση της μέσης τιμής (σε mg/dL), της τυπικής απόκλισης και του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης των παραμέτρων urea και creat για τις δύο ομάδες, σε κάθε ημέρα του πειράματος

Ημέρα	Ομάδα		Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	-95% CI	95% CI	Τιμή p Control vs L1
8 ημέρα	Control	Urea	134,7143	71,91596	68,20312	201,2255	Urea: 0,002 Creat: 0,051
		Creat	6,093	3,410	2,939	9,247	
	L1	Urea	31,0000	3,21455	28,02704	33,9730	
		Creat	1,790	0,084	1,712	1,868	
9 ημέρα	Control	Urea	94,85714	67,33357	32,58398	157,1303	Urea: 0,444 Creat: 0,956
		Creat	4,041	2,321	1,895	6,188	
	L1	Urea	29,85714	2,19306	27,82890	31,8854	
		Creat	1,710	0,063	1,652	1,768	
10 ημέρα	Control	Urea	76,71429	41,05165	38,74784	114,6807	Urea: 0,948 Creat: 1
		Creat	3,096	1,152	2,031	4,161	
	L1	Urea	29,85714	2,91139	27,16456	32,5497	
		Creat	1,689	0,063	1,630	1,747	
11 ημέρα	Control	Urea	61,42857	23,37989	39,80578	83,05136	Urea: 0,999 Creat: 1
		Creat	2,597	0,580	2,061	3,134	
	L1	Urea	30,28571	3,19970	27,32648	33,24495	
		Creat	1,726	0,235	1,509	1,943	
12 ημέρα	Control	Urea	54,28571	15,78728	39,68492	68,88651	Urea: 1 Creat: 1
		Creat	2,297	0,381	1,945	2,649	
	L1	Urea	33,14286	5,45981	28,09338	38,19234	
		Creat	1,716	0,152	1,576	1,856	
13 ημέρα	Control	Urea	50,57143	18,72482	33,25385	67,88900	Urea: 1 Creat: 1
		Creat	2,289	0,655	1,683	2,895	
	L1	Urea	30,85714	4,70562	26,50517	35,20912	
		Creat	1,654	0,107	1,555	1,753	
14 ημέρα	Control	Urea	55,14286	18,81868	37,73848	72,54724	Urea: 0,999 Creat: 1
		Creat	2,433	0,692	1,793	3,073	
	L1	Urea	29,85714	4,33699	25,84609	33,86819	
		Creat	1,666	0,177	1,502	1,829	

Πίνακας 10.3 (συνέχεια): Σύγκριση της μέσης τιμής (σε mg/dL), της τυπικής απόκλισης και του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης των παραμέτρων urea και creat για τις δύο ομάδες, σε κάθε ημέρα του πειράματος

Τιμή p για την παράμετρο urea

Ομάδα	0 vs 1 ημέρα	0 vs 2 ημέρα	0 vs 3 ημέρα	0 vs 4 ημέρα	0 vs 5 ημέρα	0 vs 6 ημέρα	0 vs 7 ημέρα	0 vs 8 ημέρα	0 vs 9 ημέρα
Control	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,115
L1	0,781	0,998	0,999	1	1	1	1	1	1

Τιμή p για την παράμετρο urea

Ομάδα	0 vs 10 ημέρα	0 vs 11 ημέρα	0 vs 12 ημέρα	0 vs 13 ημέρα	0 vs 14 ημέρα
Control	0,729	0,995	0,999	0,999	0,999
L1	1	1	1	1	1

Πίνακας 10.4: Τιμές p συγκρίνοντας την 0 ημέρα (προ-μεταμοσχευτική ημέρα) με όλες τις άλλες ημέρες μετά την αυτομεταμόσχευση (1^{n} - 14^{n} μετεγχειρητική ημέρα) για την παράμετρο urea στην ομάδα control και στην ομάδα L1

Τιμή p για την παράμετρο creat

Ομάδα	0 vs 1 ημέρα	0 vs 2 ημέρα	0 vs 3 ημέρα	0 vs 4 ημέρα	0 vs 5 ημέρα	0 vs 6 ημέρα	0 vs 7 ημέρα	0 vs 8 ημέρα	0 vs 9 ημέρα
Control	0,080	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,801
L1	0,997	1	1	1	1	1	1	1	1

Τιμή p για την παράμετρο creat

Ομάδα	0 vs 10 ημέρα	0 vs 11 ημέρα	0 vs 12 ημέρα	0 vs 13 ημέρα	0 vs 14 ημέρα
Control	0,999	1	1	1	1
L1	1	1	1	1	1

Πίνακας 10.5: Τιμές p συγκρίνοντας την 0 ημέρα (προ-μεταμοσχευτική ημέρα) με όλες τις άλλες ημέρες μετά την αυτομεταμόσχευση (1^{n} - 14^{n} μετεγχειρητική ημέρα) για την παράμετρο creat στην ομάδα control και στην ομάδα L1

Στην εικόνα 10.3 και στον πίνακα 10.3 παρουσιάζεται η σύγκριση των μέσων τιμών, η τυπική απόκλιση και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης για την Urea και Creat σε κάθε ομάδα, για κάθε ημέρα. Παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση της Urea της ομάδας μελέτης κυμάνθηκε στατιστικά σε σημαντικά χαμηλότερες τιμές, σε σχέση με την συγκέντρωση της ομάδας ελέγχου και ιδιαίτερα από τη 3^η και μέχρι την 8^η μετεγχειρητική ημέρα. Ομοίως, η συγκέντρωση Creat κυμάνθηκε και αυτή στατιστικά σε σημαντικά χαμηλότερες τιμές στην ομάδα μελέτης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και ιδιαίτερα από τη 3^η και μέχρι την 7^η μετεγχειρητική ημέρα.

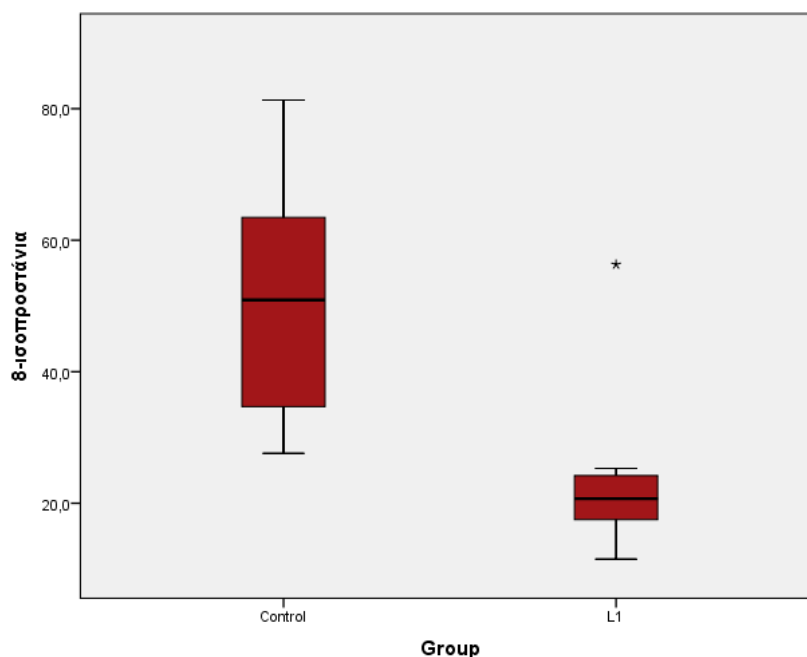
Στην εικόνα 10.3 και στους πίνακες 10.4 και 10.5 παρατηρούμε ότι στην ομάδα ελέγχου η συγκέντρωση της Urea είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη, από την 1^η μέχρι και την 8^η μετεγχειρητική ημέρα, σε σχέση με την προ-μεταμοσχευτική ημέρα (ημέρα 0). Αντίστοιχα και η Creat είναι στατιστικά σημαντικά αυξημένη, από τη 2^η έως και την 8^η μετεγχειρητική ημέρα, σε σχέση με ημέρα 0. Αντίθετα, στην ομάδα μελέτης, τόσο η μετεγχειρητική συγκέντρωση της Urea, όσο και αυτή της Creat, δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της ημέρας 0. Φαίνεται, πως η λειτουργία των νεφρικών μοσχευμάτων της ομάδας μελέτης δεν επηρεάστηκε από τη ιστική βλάβη της ψυχρής συντήρησης και του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Αντίθετα, η λειτουργία των νεφρικών μοσχευμάτων της ομάδας ελέγχου εμφάνισε σημαντική επιδείνωση.

10.3 8-ισοπροστάνια

Στον πίνακα 10.6 και στην εικόνα 10.4 παρουσιάζεται η σύγκριση των διάμεσων τιμών και τα εύρη των συγκεντρώσεων των 8-ισοπροστανίων, που παρήχθησαν στα 30mins μετά την επαναιμάτωση του μοσχεύματος, στις δύο ομάδες.

	Ομάδα ελέγχου	Ομάδα μελέτης	
8-ισοπροστάνια	50,9(53,7)	20,7(44,8)	p=0,007

Πίνακας 10.6: Σύγκριση διάμεσων τιμών (εύρος) της συγκέντρωσης των 8-ισοπροστανίων (pg/mL), στα 30mins μετά την επαναιμάτωση, στις δύο ομάδες



Εικόνα 10.4: Θηκόγραμμα για την συγκέντρωση των 8-ισοπροστανίων (σε pg/ml) των δύο ομάδων, στα 30 mins μετά την επαναιμάτωση. Απεικονίζονται οι διάμεσοι, το 25ο-, 75ο-εκατοστημόριο. Τα whiskers αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης της παραμέτρου

Από τον πίνακα 10.6 και την εικόνα 10.4 συμπεραίνουμε ότι παρήχθησαν στατιστικά σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις 8-ισοπροστανίων στην ομάδα μελέτης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

10.4 Ιστοπαθολογικός δείκτης

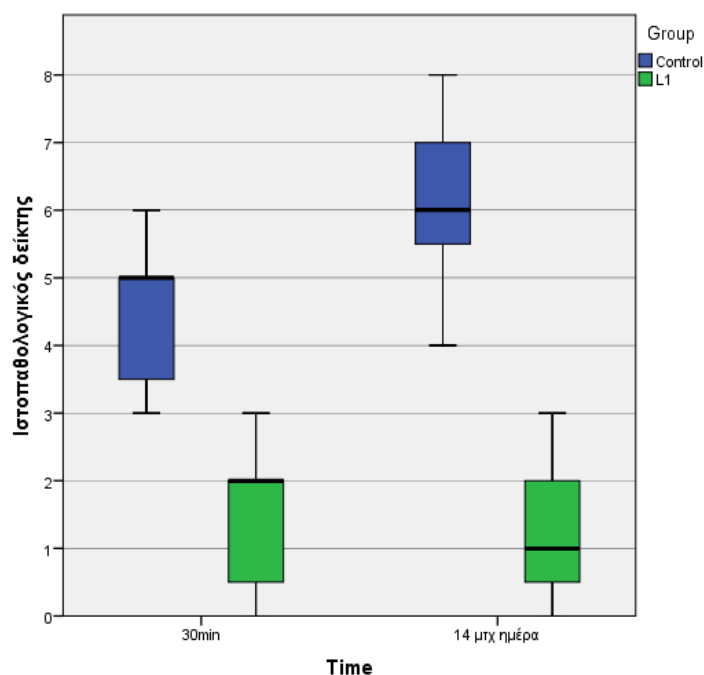
Στον πίνακα 10.7 παρουσιάζονται οι συχνότητες της βαρύτητας κάθε ιστοπαθολογικής αλλοίωσης στα νεφρικά μοσχεύματα, για τις δύο ομάδες στα 30mins μετά την επαναιμάτωσή τους, καθώς και στη 14^η μετεγχειρητική ημέρα. Στον πίνακα 10.8 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις του ιστοπαθολογικού δείκτη, που αποτελεί το σύνολο της έκφρασης των μελετούμενων αλλοιώσεων, στα 30mins από την επαναιμάτωση, καθώς και στην 14^η μετεγχειρητική ημέρα, ενώ στην εικόνα 10.5 παρουσιάζεται το αντίστοιχο θηκόγραμμα.

Χρόνος	Ομάδα	Βαρύτητα αλλοίωσης	Ιστοπαθολογική αλλοίωση					
			Απόλεια ψηκτροειδής παρυφής	Διαστολή σωληναρίων	Σωληναριακά κατακρημνίσματα	Έμβολα αγγείων	Διάμεσο οίδημα	Συρρίκνωση σπειραμάτων
30min	Control	Καμία	0	3	6	2	0	0
		Ήπια	7	4	1	5	7	7
		Μέτρια	0	0	0	0	0	0
		Έντονη	0	0	0	0	0	0
	L1	Καμία	6	4	4	7	7	4
		Ήπια	1	3	3	0	0	3
		Μέτρια	0	0	0	0	0	0
		Έντονη	0	0	0	0	0	0
14 μτχ ημέρα	Control	Καμία	5	1	1	0	0	0
		Ήπια	2	5	6	5	3	6
		Μέτρια	0	1	0	2	4	1
		Έντονη	0	0	0	0	0	0
	L1	Καμία	7	6	5	2	6	7
		Ήπια	0	1	2	5	1	0
		Μέτρια	0	0	0	0	0	0
		Έντονη	0	0	0	0	0	0

Πίνακας 10.7: Οι συχνότητες της βαρύτητας κάθε ιστοπαθολογικής αλλοίωσης στα νεφρικά μοσχεύματα για τις δύο ομάδες στα 30mins από την επαναιμάτωσή τους και στη 14^η μετεγχειρητική ημέρα

Ιστοπαθολογικός δείκτης					
Χρόνος	Ομάδα	Min	Max	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
30min	Control	3	6	4,43	1,134
	L1	0	3	1,43	1,134
14 μτχ ημέρα	Control	4	8	6,14	1,345
	L1	0	3	1,29	1,113

Πίνακας 10.8: Οι μέσες τιμές, οι τυπικές αποκλίσεις, τα μέγιστα και τα ελάχιστα του ιστοπαθολογικού δείκτη για τις δύο ομάδες, στα 30mins μετά την επαναιμάτωση και κατά την 14^η μετεγχειρητική ημέρα



Εικόνα 10.5: Θηκόγραμμα ιστοπαθολογικού δείκτη στα 30mins μετά την επαναιμάτωση και κατά την 14^η μετεγχειρητική ημέρα. Απεικονίζονται οι διάμεσοι, το 25^ο-, 75^ο-εκατοστημόριο. Τα whiskers αντιπροσωπεύουν το 95% διάστημα εμπιστοσύνης

Ιστοπαθολογική αλλοίωση	Τιμές p			
	Ελέγχου vs Μελέτης		30min vs 14 ^η μτχ ημέρα	
	30min	14 ^η μτχ ημέρα	Ελέγχου	Μελέτης
Απώλεια ψηκτροειδής παρυφής	0,005	0,462	0,025	0,317
Διαστολή σωληναρίων	1	0,031	0,083	0,317
Σωληναριακά κατακρημνίσματα	0,559	0,103	0,025	0,564
Έμβολα αγγείων	0,021	0,209	0,102	0,025
Διάμεσο οίδημα	0,001	0,004	0,046	0,317
Συρρίκνωση σπειραμάτων	0,070	0,000	0,317	0,083
ΙΣΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΔΕΙΚΤΗΣ	0,001	0,001	0,042	0,862

Πίνακας 10.9: Σύγκριση ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων και ιστοπαθολογικού δείκτη των δύο ομάδων, σε κάθε χρονική στιγμή και σύγκριση των τιμών στα 30mins vs. της 14^η μτχ ημέρας

Από τους πίνακες 10.7 έως 10.9 και την εικόνα 10.5 συμπεραίνουμε, ότι ο ιστοπαθολογικός δείκτης στην ομάδα μελέτης είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερος, από τον αντίστοιχο της ομάδας ελέγχου, τόσο στα 30mins, όσο και κατά την 14^η μετεγχειρητική ημέρα. Η διαφορά στα 30mins οφείλεται στην ήπιας βαρύτητας απώλεια της ψηκτροειδούς παρυφής, της εμφάνισης αγγειακών εμβόλων και στο διάμεσο οίδημα, ενώ κατά την 14^η ημέρα, στην ήπιας βαρύτητας διαστολή των σωληναρίων, στην συρρίκνωση των σπειραμάτων και στην ανάπτυξη μέτριας βαρύτητας διάμεσου οιδήματος. Φαίνεται, πως στην ομάδα μελέτης, τόσο στα 30mins, όσο και στην 14^η ημέρα, οι προκληθείσες ιστοπαθολογικές αλλοιώσεις ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερης βαρύτητας (κυρίως καμίας βαρύτητας στην ομάδα μελέτης και στις δύο χρονικές στιγμές και κυρίως ήπιας βαρύτητας στα 30mins και κυρίως ήπιας προς μέτριας βαρύτητας κατά την 14^η ημέρα στην ομάδα ελέγχου).

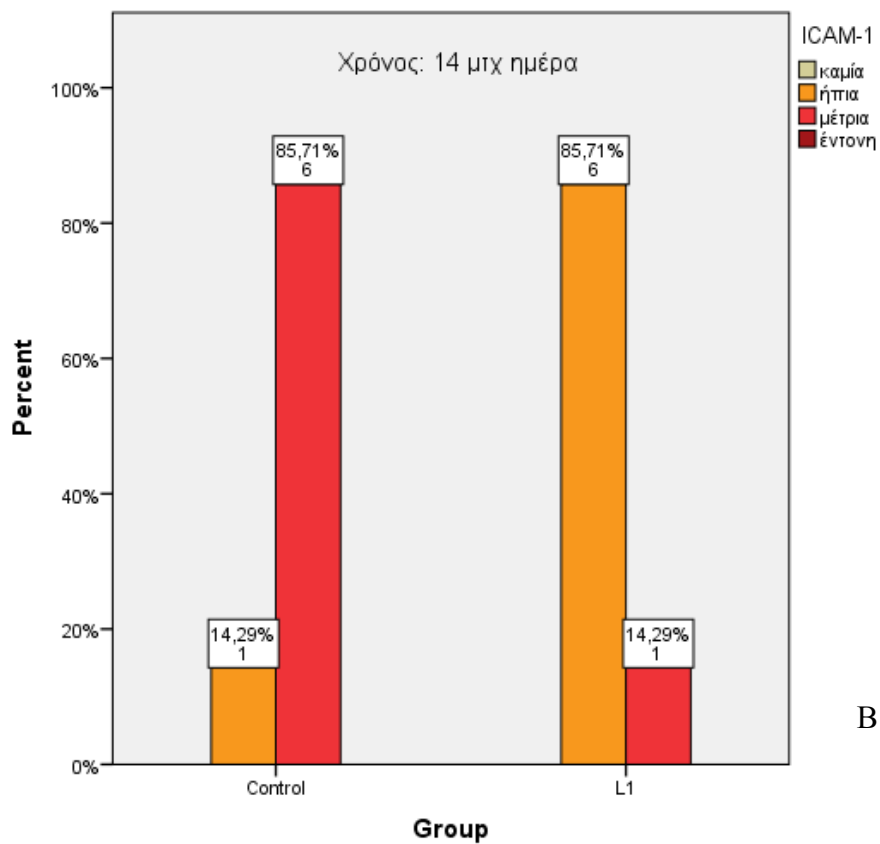
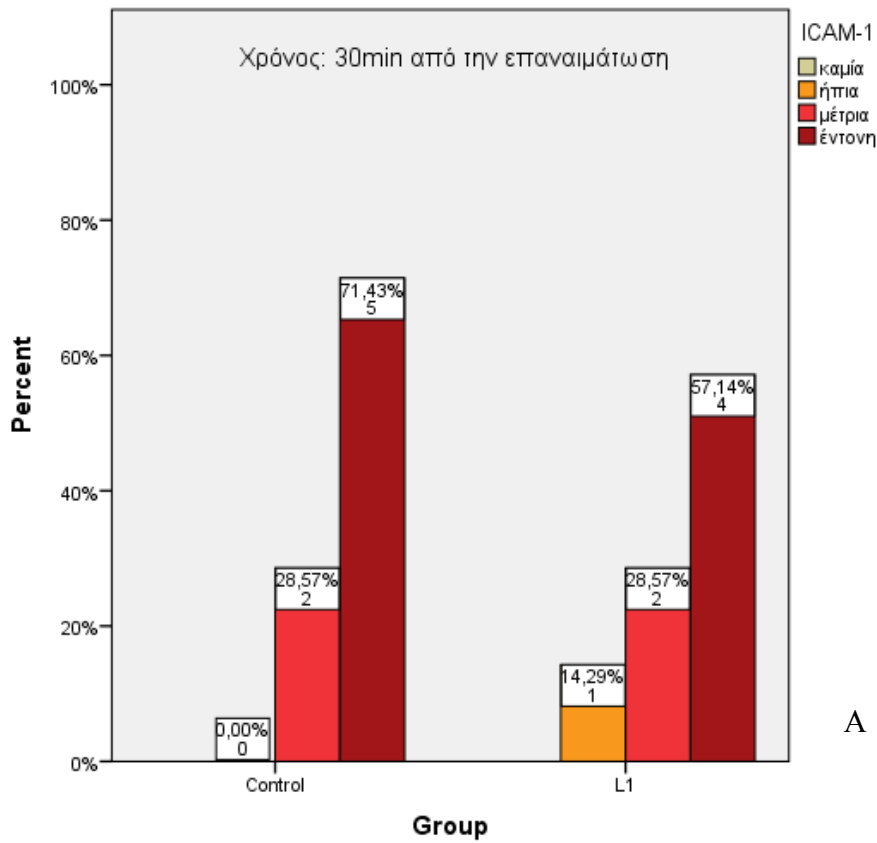
Ακόμη, ο ιστοπαθολογικός δείκτης της ομάδας ελέγχου αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά κατά την 14^η ημέρα, σε σχέση με τα 30mins μετά την επαναιμάτωση. Αντίθετα, στην ομάδα μελέτης αυτός δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές, παρά την επιμέρους αύξηση των αγγειακών εμβόλων κατά την 14^η ημέρα, σε σχέση με τα 30mins. Η αύξηση του ιστοπαθολογικού δείκτη στην ομάδα ελέγχου, ανάμεσα στις δύο χρονικές στιγμές, φαίνεται να οφείλεται στη σημαντική αύξηση των σωληναριακών κατακρημνισμάτων και του διάμεσου οιδήματος, παρότι η απώλεια της ψηκτροειδής παρυφής μειώθηκε σημαντικά.

10.5 Διακυστήριο μόριο προσκόλλησης-1 (ICAM-1)

Στον πίνακα 10.10 και στην εικόνα 10.6 παρουσιάζεται η βαρύτητα έκφρασης του διακυστηρίου μορίου προσκόλλησης-1 (ICAM-1) ως ποσοστό και συχνότητα, για κάθε κατηγορία και για τις δύο ομάδες, στα 30mins μετά την επαναιμάτωση και στην 14^η μετεγχειρητική ημέρα.

ΧΡΟΝΟΣ	ΟΜΑΔΑ	ΕΚΦΡΑΣΗ ICAM-1			
		καμία	ήπια	μέτρια	έντονη
30mins	Ελέγχου	-	-	28,57% (2)	71,43% (5)
	Μελέτης	-	14,29% (1)	28,57% (2)	57,14% (4)
14 ^η μτχ ημέρα	Ελέγχου	-	14,29% (1)	85,71% (6)	-
	Μελέτης	-	85,71% (6)	14,29% (1)	-

Πίνακας 10.10: Έκφραση ICAM-1, ως ποσοστό και συχνότητα, για κάθε κατηγορία και για τις δύο ομάδες, στα 30mins μετά την επαναιμάτωση και στην 14^η μετεγχειρητική ημέρα



Εικόνα 10.6: Ραβδογράμματα έκφρασης του ICAM-1 για τις δύο ομάδες, στα 30mins μετά την επαναιμάτωση (A) και στην 14^η μτχ ημέρα (B)

	Τιμές p			
	Control vs L1		30min vs 14 ^η μτχ ημέρα	
	30mins	14 ^η μτχ ημέρα	Ελέγχου	Μελέτης
ICAM-1	1	0,029	0,034	0,034

Πίνακας 10.11: Τιμές p για τη σύγκριση της βαρύτητας έκφρασης του ICAM-1, στις δύο ομάδες και σε κάθε χρονική στιγμή

Όπως παρατηρούμε στον πίνακα 10.10 και στην εικόνα 10.6, η έκφραση του ICAM-1 σε όλα τα μοσχεύματα, πλην ενός, της ομάδα ελέγχου, είναι μέτρια έως έντονη στα 30mins και μέτρια κατά την 14^η μετεγχειρητική ημέρα. Αντίθετα, σε όλα τα μοσχεύματα (πλην ενός) της ομάδας μελέτης είναι μέτρια έως έντονα στα 30mins και ήπια κατά την 14^η μετεγχειρητική ημέρα. Λαμβάνοντας υπ' όψιν και τον πίνακα 10.11 συμπεραίνουμε, ότι η έκφραση του ICAM-1 είναι σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα ελέγχου, σε σχέση με την ομάδα μελέτης κατά την 14^η μετεγχειρητική ημέρα, ενώ δεν διαφέρει στα 30mins μετά την επαναιμάτωση. Συνεπώς, τα νεφρικά μοσχεύματα της ομάδας ελέγχου εμφανίζουν εντονότερη φλεγμονώδη αντίδραση, σε σχέση με αυτά της ομάδας μελέτης κατά την 14^η μετεγχειρητική ημέρα. Επιπλέον παρατηρούμε, ότι και στις δύο ομάδες η έκφραση του ICAM-1 μειώθηκε σημαντικά κατά την 14^η μετεγχειρητική ημέρα σε σχέση με τα 30mins μετά την επαναιμάτωση, που σημαίνει ότι η φλεγμονώδης διεργασία παρουσιάζει μία τάση μείωσης με την πάροδο του χρόνου και στις δύο ομάδες.

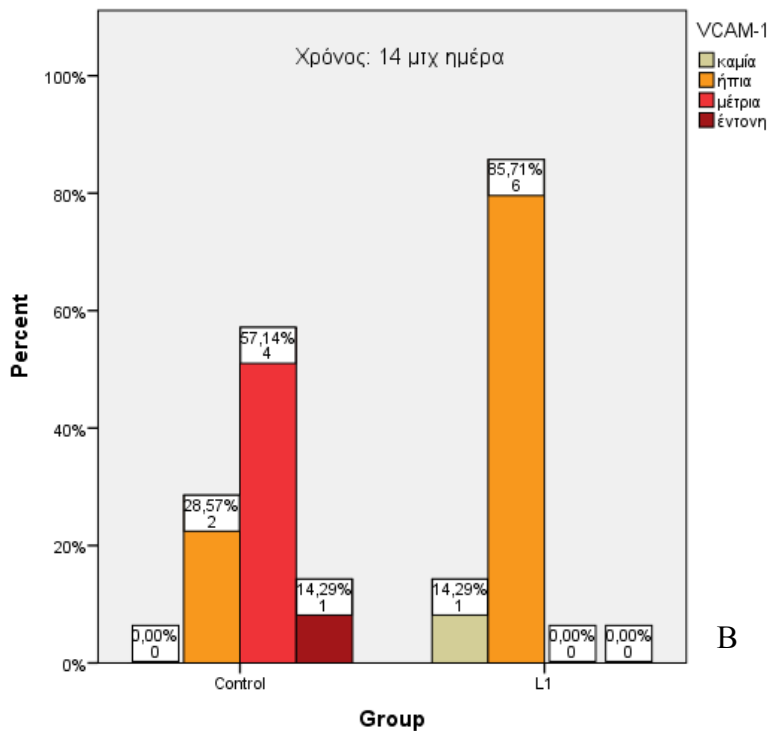
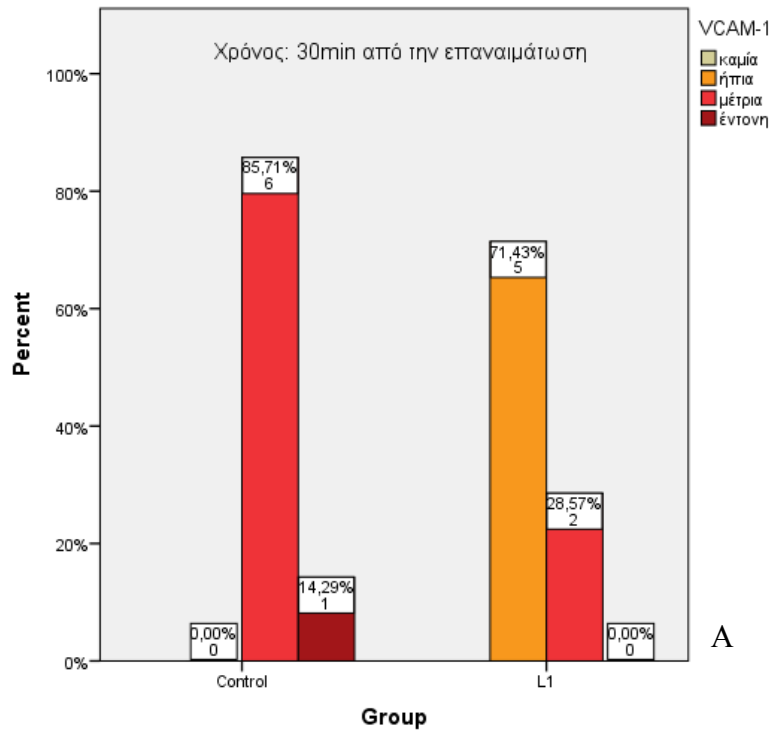
10.6 Μόριο προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων-1 (VCAM-1)

Στον πίνακα 10.12 και στην εικόνα 10.7 παρουσιάζεται η βαρύτητα έκφρασης του μορίου προσκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων (VCAM-1) ως ποσοστό και συχνότητα,

ΧΡΟΝΟΣ	ΟΜΑΔΑ	ΕΚΦΡΑΣΗ VCAM-1			
		καμία	ήπια	μέτρια	έντονη
30mins	Ελέγχου	-	-	85,71% (6)	14,29% (1)
	Μελέτης	-	71,43% (5)	28,57% (2)	-
14 ^η μτχ ημέρα	Ελέγχου	-	28,57% (2)	57,14% (4)	14,29% (1)
	Μελέτης	14,29% (1)	85,71% (6)	-	-

Πίνακας 10.12: Έκφραση VCAM-1 ως ποσοστό και συχνότητα για κάθε κατηγορία και για τις δύο ομάδες, στα 30mins μετά την επαναιμάτωση και στην 14η μετεγχειρητική ημέρα

για κάθε κατηγορία και για τις δύο ομάδες, στα 30mins μετά την επαναιμάτωση και στην 14^η μετεγχειρητική ημέρα.



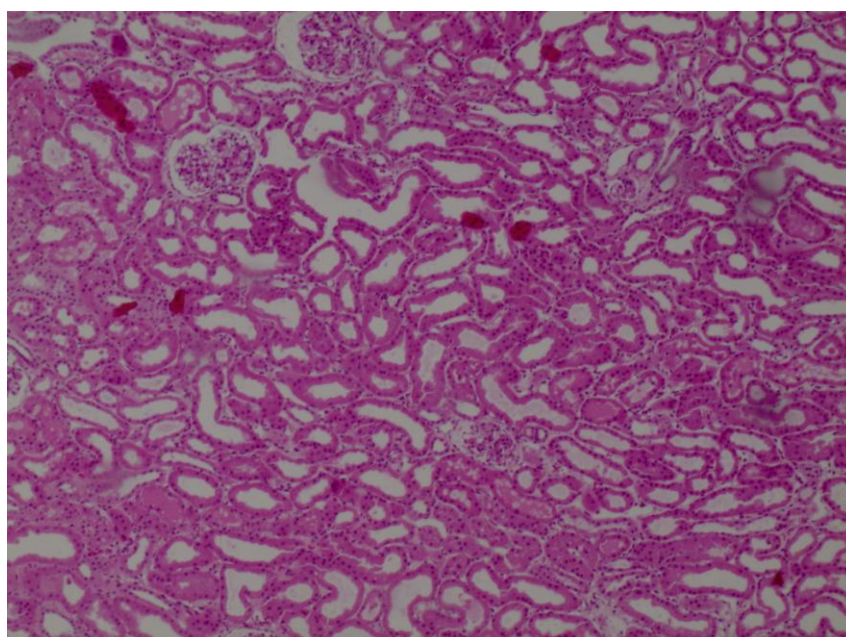
Εικόνα 10.7: Ραβδογράμματα έκφρασης του VCAM-1 για τις δύο ομάδες, στα 30mins μετά την επαναιμάτωση (A) και στην 14^η μηχ ημέρα (B)

	Τιμές p			
	Ελέγχου vs Μελέτης		30mins vs 14 ^η μετχ ημέρα	
	30min	14 ^η μετχ ημέρα	Ελέγχου	Μελέτης
VCAM-1	0,020	0,040	0,414	0,083

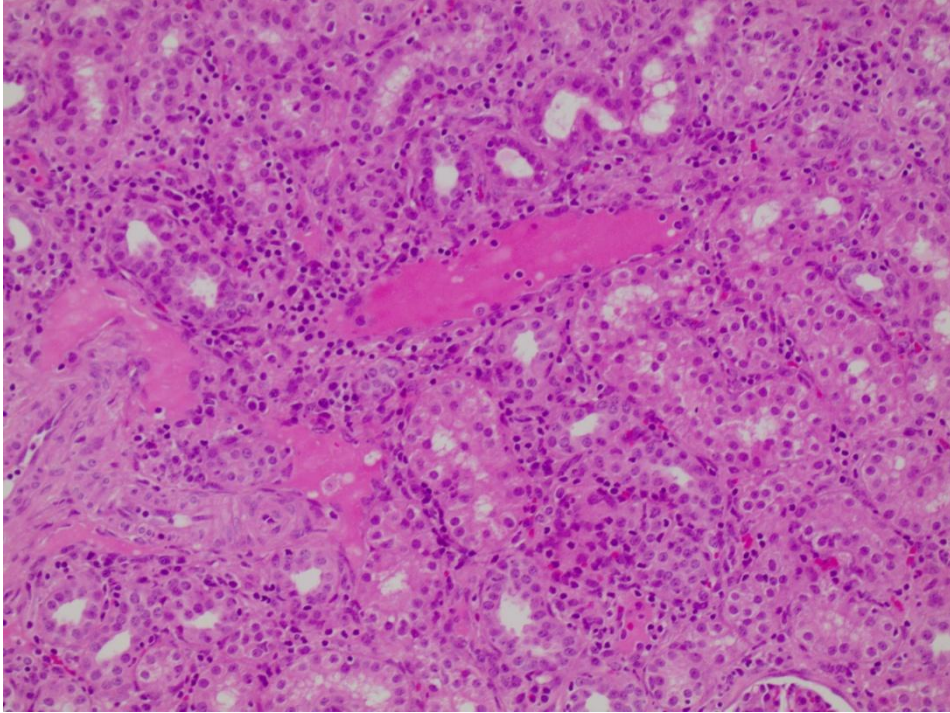
Πίνακας 10.13: Τιμές p για τη σύγκριση της βαρύτητας έκφρασης του VCAM-1, στις δύο ομάδες και σε κάθε χρονική στιγμή

Όπως παρατηρούμε στον πίνακα 10.12 και την εικόνα 10.7, η έκφραση του VCAM-1 σε όλα τα μοσχεύματα (πλην ενός) της ομάδας ελέγχου είναι μέτρια στα 30mins από την επαναιμάτωση και ήπια έως μέτρια στη 14^η μετεγχειρητική ημέρα. Αντίθετα, σε όλα τα μοσχεύματα στην ομάδα μελέτης είναι ήπια έως μέτρια στα 30mins και ήπια στη 14^η μετεγχειρητική ημέρα (πλην ενός). Λαμβάνοντας υπ' όψιν και τον πίνακα 10.13 συμπεραίνουμε, ότι η έκφραση του VCAM-1 είναι σημαντικά υψηλότερη στην ομάδα ελέγχου, σε σχέση με την ομάδα μελέτης και στις δύο χρονικές στιγμές. Συνεπώς, τα νεφρικά μοσχεύματα της ομάδας ελέγχου εμφανίζουν εντονότερη φλεγμονώδη αντίδραση, σε σχέση με αυτά της ομάδας μελέτης και στις δύο χρονικές στιγμές. Επιπλέον, παρατηρούμε ότι η έκφραση του VCAM-1 και στις δύο ομάδες δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών, που σημαίνει ότι η φλεγμονώδης διεργασία παρουσιάζει μία τάση σταθεροποίησης με την πάροδο του χρόνου.

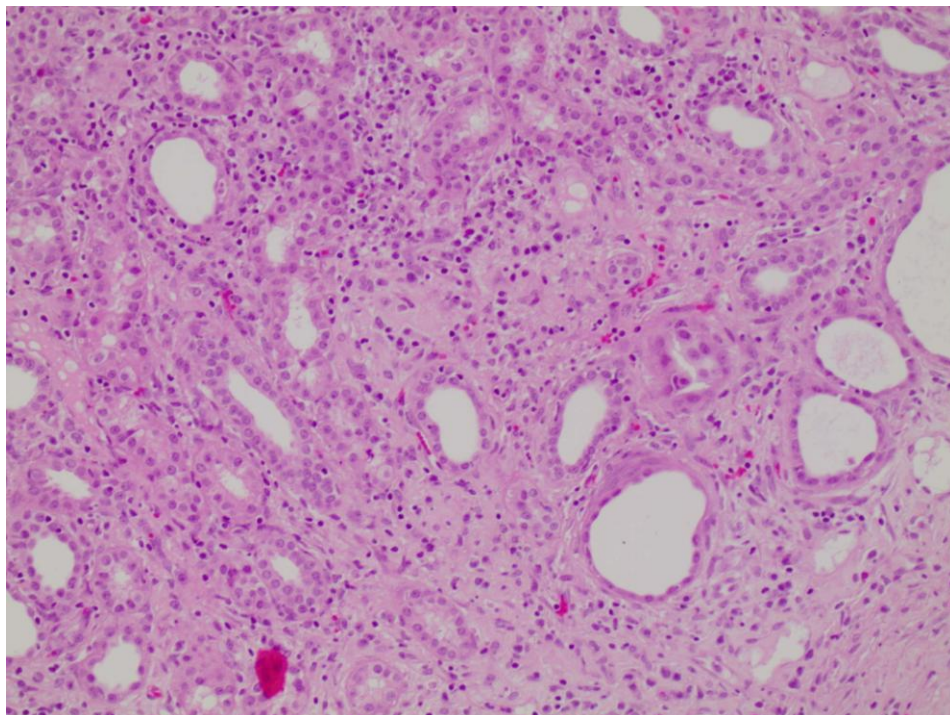
Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικές εικόνες από την ιστολογική και ανοσοϊστοχημική εξέταση των νεφρικών αυτομοσχευμάτων:



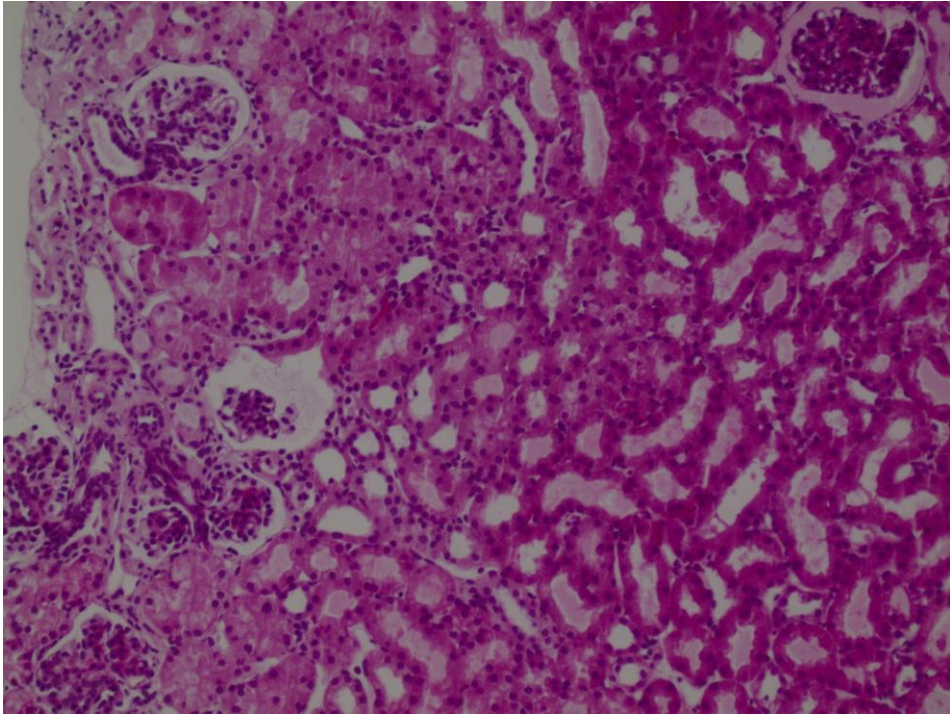
Εικόνα 10.8:
Ήπια διαστολή σωληναρίων,
μεγέθυνση x100



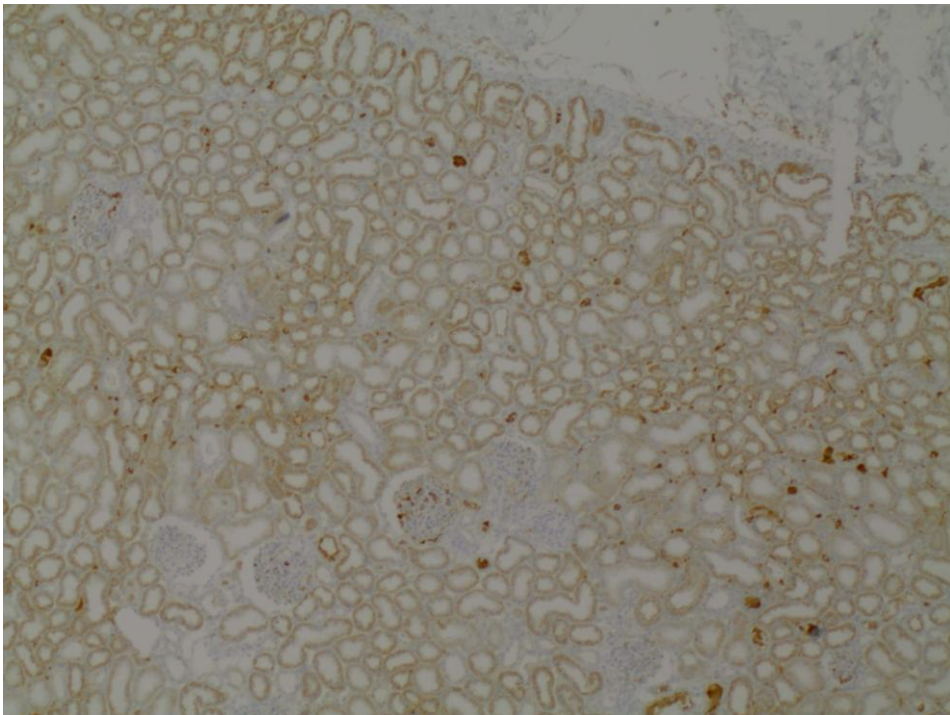
Εικόνα 10.9: Έμβολο αγγείου, μεγέθυνση x200



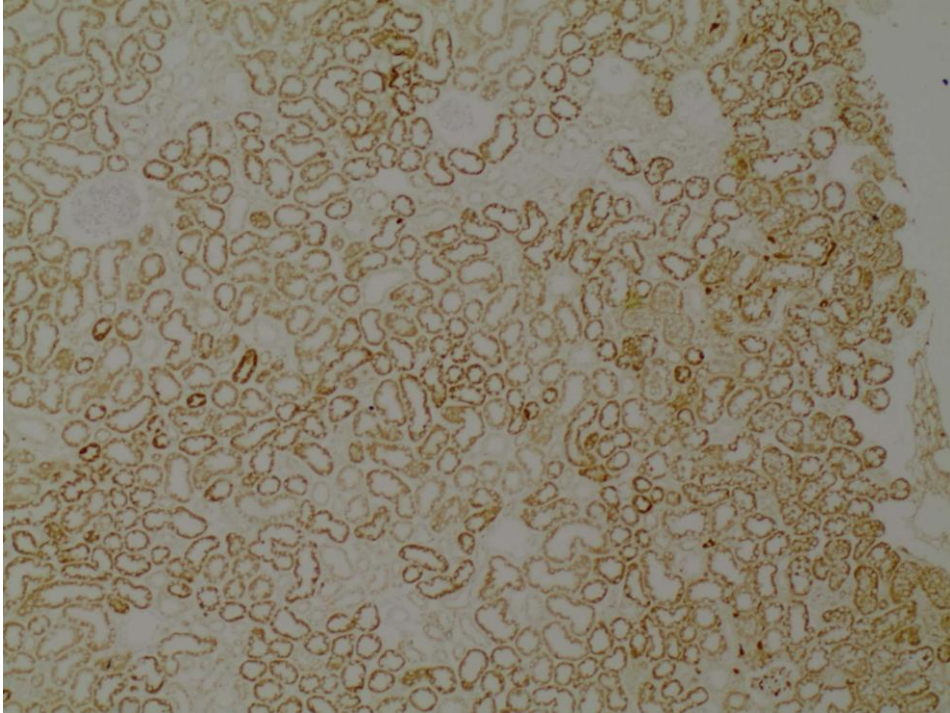
Εικόνα 10.10: Διάμεσο οίδημα, μεγέθυνση x200



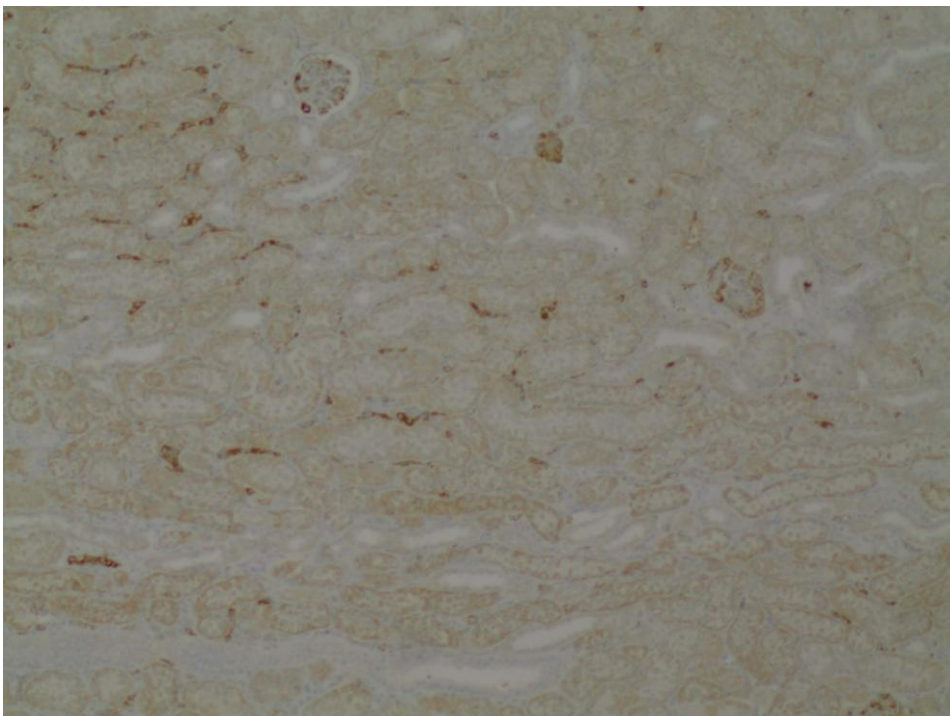
Εικόνα 10.11: Συρρίκνωση σπειραμάτων, μεγέθυνση x200



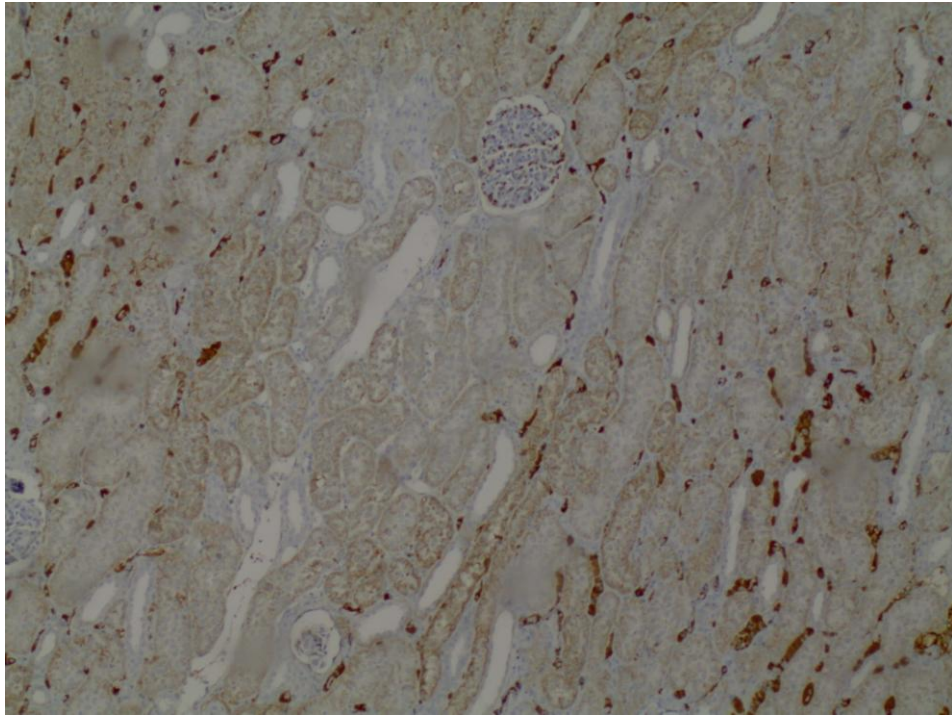
Εικόνα 10.12: Μέτρια έκφραση του ICAM-1 στα 30min, μεγέθυνση x100 (ομάδα L1)



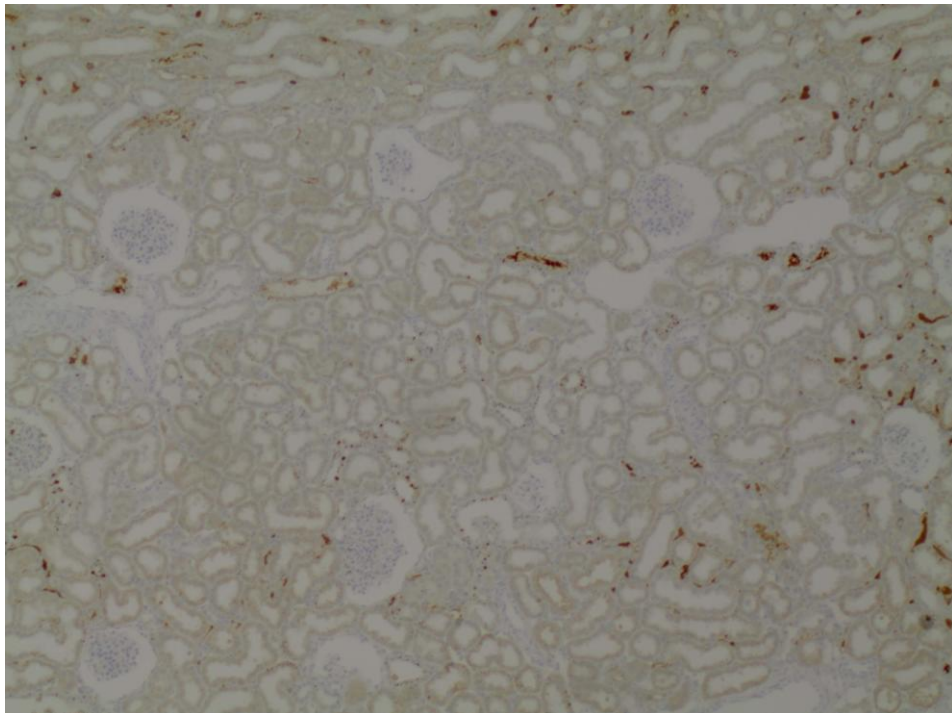
Εικόνα 10.13: Έντονη έκφραση του ICAM-1 στα 30min, μεγέθυνση x100 (ομάδα control)



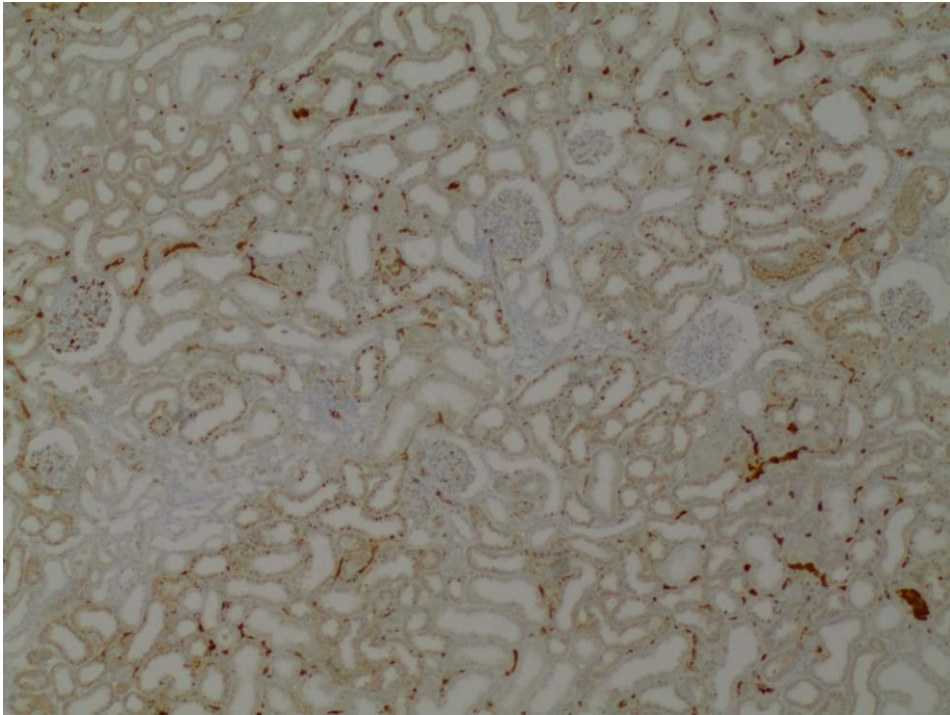
Εικόνα 10.14: Ήπια έκφραση του ICAM-1 στη 14^η μτχ ημέρα, μεγέθυνση x100 (ομάδα L1)



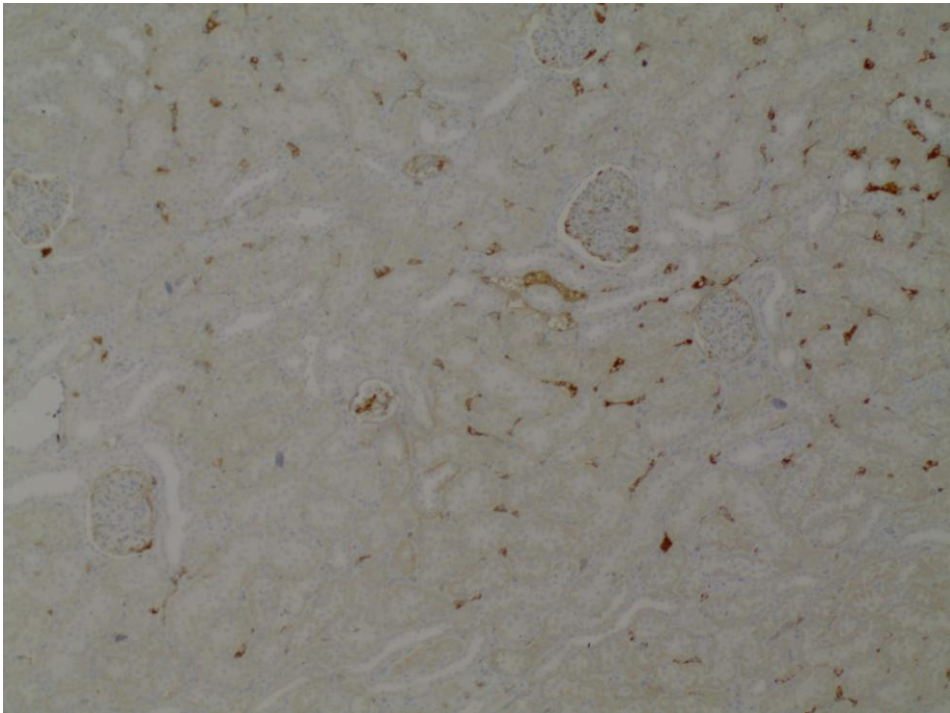
Εικόνα 10.15: Μέτρια έκφραση του ICAM-1 στη 14^η μτχ ημέρα, μεγέθυνση x100 (ομάδα control)



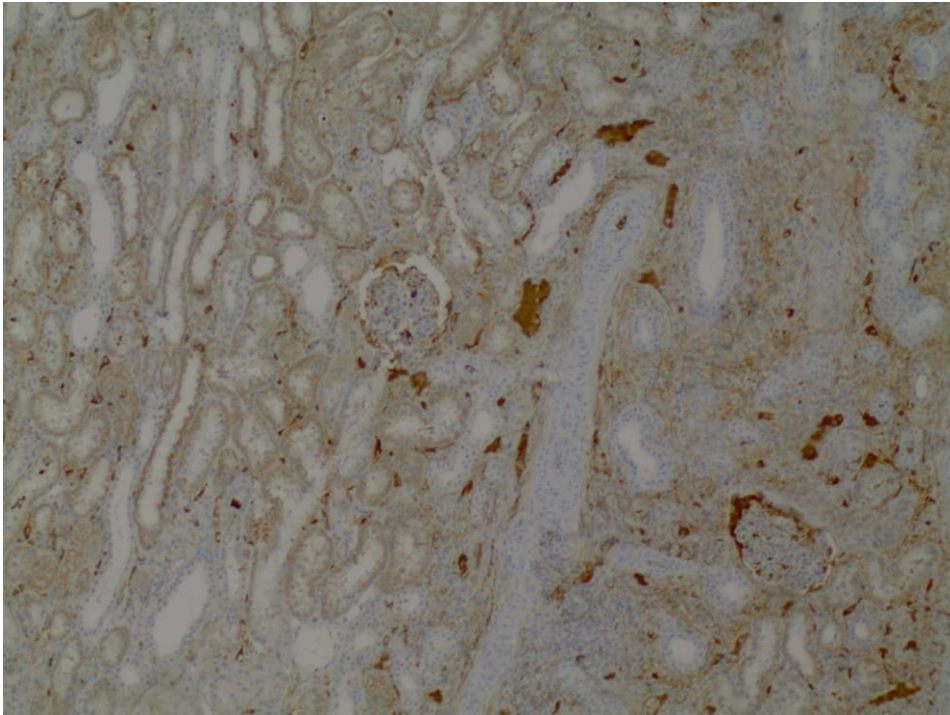
Εικόνα 10.16: Ήπια έκφραση του VCAM-1 στα 30min, μεγέθυνση x100 (ομάδα L1)



Εικόνα 10.17: Μέτρια έκφραση του VCAM-1 στα 30 min, μεγέθυνση x100 (ομάδα L1)



Εικόνα 10.18: Ήπια έκφραση του VCAM-1 στη 14^η μτχ ημέρα, μεγέθυνση x100 (ομάδα L1)



Εικόνα 10.19: Μέτρια έκφραση του VCAM-1 στη 14^η μτχ ημέρα, μεγέθυνση x100 (ομάδα control)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπό της παρούσης διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της πιθανής προστατευτικής επίδρασης της L1 στη μεταμόσχευση νεφρού. Ειδικότερα, μελετήθηκε η πιθανή προστατευτική της δράση στην ιστική βλάβη του νεφρικού μοσχεύματος, τόσο κατά τη φάση της ψυχρής του συντήρησης, όσο και μετά την επαναιμάτωσή του, μέσω βιοχημικών και ιστολογικών δεικτών. Επιπλέον, το πρωτόκολλο σχεδιάστηκε έτσι ώστε να προσομοιάζει και να μπορεί να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη σε μεταμόσχευση νεφρού από αποβιώσαντα δότη με τη χορήγηση της L1 στο δότη κατά τη νοσηλεία του στη ΜΕΘ, στη συντήρηση του νεφρικού μοσχεύματος και τελικά στο λήπτη πριν τη μεταμόσχευση.

Η επιλογή του χοίρου ως πειραματόζωο της μελέτης βασίστηκε στη διεθνώς αποδεκτή αντίληψη, πως αποτελεί το πειραματόζωο εκλογής για μοντέλα μεταμόσχευσης, για δύο κυρίως λόγους. Πρώτον, εμφανίζει στενή ομοιότητα της ανατομίας και της φυσιολογίας του νεφρού του σε σχέση με αυτή του ανθρώπου, όπως επίσης και περιορισμένη γενετική ποικιλομορφία.¹⁸³ Δεύτερον, αφορά πειραματόζωο εύκολα διαθέσιμο, χωρίς ιδιαίτερες απαιτήσεις εκτροφής και χειρισμού και σχετικά οικονομικό στην αγορά του. Επιπλέον, με την επιλογή ζώων ηλικίας 4-6 μηνών και βάρους 65-75kg, εξασφαλίζεται κατάλληλο μέγεθος, που διευκολύνει τους χειρουργικούς χειρισμούς και προσομοιάζει σε αυτό του ανθρώπου. Η χρησιμοποίηση μοντέλου αυτόλογης και όχι ετερομεταμόσχευσης επιλέχθηκε, ώστε να μην προκύπτουν ζητήματα ανοσιακής απόρριψης, που θα απαιτούσαν πλέον πολύπλοκες μεθόδους με τη χρήση πρωτοκόλλων ιστοσυμβατότητας και ανοσοκαταστολής.

Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται τρεις θέσεις μεταμόσχευσης νεφρού σε χοίρο, στην υπονεφρική αορτή και κάτω κοίλη φλέβα,^{173, 174} στα έξω λαγόνια αγγεία¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ και στα νεφρικά αγγεία^{174, 178}. Ωστόσο, κατά την αρχική φάση του πειράματός μας διαπιστώσαμε πως και οι τρεις αυτές θέσεις εμφανίζουν πολλά μειονεκτήματα και περιορισμούς.

Η μεταμόσχευση στην υπονεφρική αορτή και κάτω κοίλη φλέβα, όπως έχει μέχρι σήμερα περιγραφεί, αποτελεί μία απαιτητική επέμβαση, που προϋποθέτει διπλή λαπαροτομία (για τη λήψη και εμφύτευση του μοσχεύματος), με ότι αυτό συνεπάγεται για τη συνολική οικονομία του οργανισμού του πειραματόζωου. Απαιτεί παρασκευή μειζόνων αγγειακών

στελεχών, με απολίνωση οσφυϊκών κλάδων και πιθανότητα τραυματισμού λεμφικών αγγείων. Επίσης, η διεγχειρητική διαχείριση του εντέρου του ζώου και η ανάγκη μετακίνησής του, ώστε να δημιουργηθεί το κατάλληλο χειρουργικό πεδίο, οδηγεί σε βαθμό ισχαιμίας του και μετά την επαναφορά του στη φυσιολογική θέση συνθήκες επαναιμάτωσής του. Η διαδικασία αυτή περιπλέκει την εκτίμηση αποτελεσμάτων μελετών αντίστοιχων με τη δική μας, στην οποία βασική παράμετρος ήταν και η εκτίμηση του οξειδωτικού stress, που προκύπτει από την επαναιμάτωση του μοσχεύματος. Μείζον δε μειονέκτημα προκύπτει και λόγω της μη επαρκούς καθήλωσης του μοσχεύματος, μιας και μετεγχειρητικά και μετά την άρση του ζώου, αυτό μετακινείται σε κάθετη θέση, με αποτέλεσμα συχνά την γωνίωση των αγγείων του και την πιθανή θρόμβωσή τους.

Η μεταμόσχευση νεφρού στα έξω λαγόνια αγγεία, μετά λήψη του μοσχεύματος μέσω λαπαροτομίας, αφ' ενός μεν δημιουργεί τα περισσότερα προβλήματα της λαπαροτομίας, που αναφέρθηκαν παραπάνω, αφ' ετέρου δε προσθέτει ένα ιδιαίτερο πρόβλημα, εφ' όσον επιλεγεί η εξωπεριτοναϊκή προσπέλαση για παρασκευή των λαγονίων αγγείων και εμφύτευσης του μοσχεύματος. Ο χώρος που προκύπτει είναι συνήθως ανεπαρκής για την ομαλή τοποθέτησή του, παρότι στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε χοίρους μεγάλου βάρους. Επιπρόσθετα, μετά την άρση του ζώου, η προκύπτουσα γωνία των 90°, μεταξύ του χώρου αυτού και του σκέλους του πειραματοζώου, επιδεινώνει το πρόβλημα. Ως αποτέλεσμα διαπιστώσαμε την ανάπτυξη «συνδρόμου αυξημένης πίεσης», που υπονομεύει την μετεγχειρητική ομαλή πορεία της λειτουργίας του μοσχεύματος και εγκαταλείψαμε την τεχνική αυτή.

Τέλος, η τεχνική της μεταμόσχευσης στα νεφρικά αγγεία με διαπεριτοναϊκή προσπέλαση, απαιτεί διπλή λαπαροτομία με τα μειονεκτήματα που περιγράφηκαν παραπάνω. Επίσης, μετά την εμφύτευση η καθήλωση του μοσχεύματος δεν είναι καθόλου ευχερής, λόγω του τραυματισμού του πλαγίου περιτοναίου κατά την δεξιά νεφρεκτομή.

Για τους παραπάνω λόγους, προβήκαμε στην εφαρμογή ενός νέου, ίδιου, μοντέλου, που πραγματοποιείται με ολικά εξωπεριτοναϊκό τρόπο, με επαρκέστατη καθήλωση του μοσχεύματος, με πλήρη αποφυγή ισχαιμίας άλλων οργάνων (π.χ. έντερο) και με δυνατότητα άριστης επαναληψιμότητας των χειρισμών και το οποίο περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο περί υλικού και μεθόδων.

Η επιλογή της συνδυασμένης μεθόδου συντήρησης (μηχανική έκπλυση και στατική συντήρηση) βασίστηκε στη σκέψη, πως η έκπλυση του μοσχεύματος μέσω της μηχανικής

οδού, δίνει την για ώρες δυνατότητα προσφοράς της δεφεριπρόνης εντός της μικροκυκλοφορίας του μοσχεύματος και έτσι της μεγαλύτερης πιθανότητας σιδηροδέσμησης.

Η μέθοδος και η διάρκεια συντήρησης επηρεάζουν την πρώιμη και όψιμη λειτουργία του μοσχεύματος, με αποτέλεσμα τα νεφρικά μοσχεύματα από αποβιώσαντες δότες να παρουσιάζουν μικρότερη πενταετή επιβίωση, σε σχέση με αυτά από ζώντες δότες (74,3% vs. 85,5%).²³ Το μόσχευμα κατά τη φάση της ψυχρής του συντήρησης βρίσκεται σε συνθήκες ανοξίας, με αποτέλεσμα την εκτροπή του μεταβολισμού του προς την αναερόβια φάση και την επακόλουθη δραματική μείωση του παραγόμενου ATP. Η μείωση του ATP οδηγεί σε δυσλειτουργία των ενεργητικών αντλιών ομοιοστασίας, που έχει ως βασικό, αλλά όχι και μόνο, επακόλουθο την άρση λειτουργίας της Na^+/K^+ -ATPάσης. Το Na^+ εισρέει αθρόα στα κύτταρα συμπαρασύροντας και μεγάλες ποσότητες ύδατος που οδηγεί σε ανάπτυξη κυτταρικού οιδήματος.⁴⁶ Επιπλέον, έχουμε αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{2+} , παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων δραστικών μορφών οξυγόνου, καταστροφή μεμβρανών και απελευθέρωση πρωτεασών, με τελικό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο.^{51-55, 59, 61} Περαιτέρω, η βλάβη του μοσχεύματος επιτείνεται κατά την επαναιμάτωσή του, λόγω της ανάπτυξης του συνδρόμου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Σε αυτή παρατηρείται το φαινόμενο της οξειδωτικής έκρηξης, με υπερπαραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, αύξηση του Ca^{2+} , μετανάστευση και διήθηση ουδετερόφιλων, έκλυση κυτοκινών και χυμοκινών και ενεργοποίηση μονοπατιών που οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο.^{98, 99, 101, 101, 106-109}

Ο σίδηρος, ως μέταλλο μετάπτωσης, παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενδοκυττάρια οξειδοαναγωγική διαδικασία, συμμετέχοντας στις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss για την παραγωγή ρίζας υδροξυλίου και άλλων δραστικών μορφών οξυγόνου.¹⁴⁰ Οι σιδηροδεσμευτικοί παράγοντες δεσφεροξαμίνη και δεφεριπρόνη έχουν μελετηθεί κυρίως σε πολυμεταγγιζόμενους αιματολογικούς ασθενείς με υπερφόρτωση σιδήρου. Ο πλεονάζων σίδηρος εναποτίθεται σε ζωτικά όργανα (καρδιά, ήπαρ, σπλήνας), με αποτέλεσμα την βλάβη τους και την μείωση του προσδόκιμου ζωής των ασθενών αυτών. Οι δύο αυτοί παράγοντες φαίνεται να έχουν ισοδύναμα αποτελέσματα στη μείωση των επιπέδων φερριτίνης ορού, σιδήρου στο ήπαρ και παρόμοια επίπεδα αποβολής σιδήρου από τα ούρα.¹⁶⁵⁻¹⁶⁹ Ωστόσο, η δεφεριπρόνη παρουσιάζει υπεροχή έναντι της δεσφεροξαμίνης στη μείωση των επιπέδων σιδήρου από τον καρδιακό μυ και στη βελτίωση του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας.¹⁶⁸⁻¹⁷² Η αποτελεσματικότερη δράση της πιθανά οφείλεται στην ικανότητά της να εισέρχεται πιο γρήγορα στο κύτταρο και να δεσμεύει ικανοποιητικά τον ελεύθερο σίδηρο, σε

αντίθεση με τη δεσφεροξαμίνη. Η ιδιότητα αυτή οφείλεται στο μικρότερο μοριακό της βάρος, στο ουδέτερο φορτίο και τον υδρόφιλο και λιπόφιλο χαρακτήρα της, σε σχέση με τη δεσφεροξαμίνη, που της επιτρέπει να διαχέεται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών.^{151, 157, 184}

Κατά τη διάρκεια της στατικής ψυχρής συντήρησης των μοσχευμάτων έχει παρατηρηθεί αύξηση της ποσότητας του ελεύθερου κυτταροπλασματικού σιδήρου (Labile Iron Pool-LIP). Όταν η δεσφεροξαμίνη προστεθεί στο διάλυμα συντήρησης φαίνεται να μειώνει την ιστική βλάβη και τα επίπεδα του οξειδωτικού stress, με αποτέλεσμα βελτιωμένη μετεγχειρητική νεφρική λειτουργία.^{159-161, 164, 182, 185, 186} Τα 8-ισοπροστάνια είναι σύμπλοκα παρόμοια της προσταγλανδίνης και σχηματίζονται λόγω της υπεροξείδωσης των λιπιδίων από τις δραστικές μορφές οξυγόνου, χωρίς τη διαμεσολάβηση της κυκλοοξυγενάσης. Βασική δράση τους είναι η αγγειοσυσπασση και η ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων.^{187, 188} Τα βιβλιογραφικά δεδομένα καταδεικνύουν, πως το οξειδωτικό stress, και τα εξ' αυτού παραγόμενα 8-ισοπροστάνια αυξάνονται σε βιολογικά συστήματα που υπόκεινται σε σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και μειώνονται με τη χρησιμοποίηση δεσφεροξαμίνης.^{160-162, 186, 189} Επίσης, φαίνεται πως η δεσφεροξαμίνη μειώνει την παραγωγή κυτοκινών και την έκφραση μορίων προσκόλλησης, σε μοντέλα αυτομεταμόσχευσης, ενώ παράλληλα είναι γνωστό πως η έκφραση των μορίων αυτών σχετίζεται με αύξηση αντιγονικότητας.¹⁹⁰⁻²⁰¹

Τόσο σε πειραματικές, όσο και σε κλινικές μελέτες έχει φανεί, πως η δεφεριπρόνη αποτελεί ένα αντιοξειδωτικό παράγοντα με σημαντική ανασταλτική δράση στην δραστηριότητα του ελεύθερου κυτταροπλασματικού σιδήρου και χαλκού, με αποτέλεσμα τη μείωση της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και της ιστικής βλάβης. Για παράδειγμα, σε ασθενείς με καρδιομυοπάθεια απότοκη θαλασσαιμίας, με διαβητική νεφροπάθεια, με σπειραματονεφρίτιδα, με αταξία του Friedreich και με αναιμία Fancony έχει αποδειχθεί σημαντική κλινική βελτίωση και αναστροφή της ιστικής βλάβης.²⁰²⁻²⁰⁵ Όμως, μόνο σε τρεις μελέτες έχει εξετασθεί η επίδρασή της σε μοντέλα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (καρδιά, νωτιαίος μυελός και ήπαρ), όπου και εμφάνισε σημαντική δραστηριότητα έναντι της παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου και ιστική προστατευτική δράση στα όργανα μελέτης.²⁰⁶⁻²⁰⁸ Παρόλα αυτά και παρά τον σημαντικό αριθμό μελετών που είχαμε την ευκαιρία να προσπελάσουμε στην προσβάσιμη σε μας διεθνή βιβλιογραφία, δεν κατέστη δυνατόν να ανευρεθεί μελέτη που να αφορά στη δράση της δεφεριπρόνης σε μοντέλο μεταμόσχευσης συμπαγών οργάνων κοιλίας και ιδιαίτερα νεφρού, ενώ αντίθετα υπάρχουν

αρκετές μελέτες για τη δράση της δεσφεροξαμίνης. Θεωρήσαμε λοιπόν εύλογο να μελετήσουμε την δράση του παράγοντα αυτού σε πειραματικό μοντέλο αυτομεταμόσχευσης νεφρού.

Τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης έδειξαν ότι η δεφεριπρόνη μειώνει την ανάπτυξη κυτταρικού οιδήματος και ως εκ τούτου το βάρος του μοσχεύματος μετά το πέρας της συντήρησής του. Επιπλέον, μειώνει την παραγωγή των 8-ισοπροστανίων άμεσα μετά την επαναιμάτωση, που αντανακλά την μείωση του παραγόμενου οξειδωτικού stress. Αυτά εκφράζονται σε μείωση της έκφρασης των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 και συνολική μείωση της ιστοπαθολογικής βλάβης του μοσχεύματος, που τελικά οδηγούν σε βελτίωση της μετεγχειρητικής του λειτουργίας, αλλά και πιθανή μείωση της αντιγονικότητάς του. Τα ευρήματα αυτά είναι μοναδικά στη διεθνή βιβλιογραφία και θεωρούμε, πως μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για περαιτέρω έρευνα στη νεφροπροστατευτική δράση της δεφεριπρόνης στο κλινικό επίπεδο της μεταμόσχευσης νεφρού. Οι χρονικές φάσεις χορήγησης του παράγοντα αυτού, οι κατάλληλες δόσεις που θα πρέπει να χορηγούνται στον υποψήφιο λήπτη και δότη και να εμπλουτίζουν το διάλυμα συντήρησης, θα πρέπει να αποτελέσουν πεδία συστηματικής διερεύνησης. Εκτός των παραπάνω, θεωρούμε πως η περιγραφή του νέου, ίδιου, πειραματικού μοντέλου αυτομεταμόσχευσης, με τα σαφή πλεονεκτήματα που προσφέρει, έρχεται να προσθέσει ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο μελέτης στη διεθνή βιβλιογραφία, χωρίς τους σημαντικούς περιορισμούς των ήδη υφιστάμενων ανάλογων μοντέλων, που αναφέρθηκαν.

Παρά τα θετικά ευρήματα της μελέτης μας, δεν μπορούμε να μην αναφερθούμε και σε πιθανούς περιορισμούς της. Στο πειραματικό μας μοντέλο απουσιάζει η θερμή ισχαιμία του μοσχεύματος προ της λήψης του. Πιθανά αντίστοιχο μοντέλο, που να αναπαριστά διαδικασία μεταμόσχευσης από εγκεφαλικά ή καρδιολογικά νεκρό δότη, θα είναι εξαιρετικά χρήσιμο. Στις περιπτώσεις αυτές, η ύπαρξη μικρότερου ή μεγαλύτερου βαθμού θερμής ισχαιμίας του μοσχεύματος αντίστοιχα, θα μπορούσε να επηρεάσει το αποτέλεσμα, προς τη μία ή την άλλη κατεύθυνση, αν και πιστεύουμε πως όσο θα αυξάνεται ο χρόνος θερμής ισχαιμίας, τόσο θα γίνεται εμφανέστερη η νεφροπροστατευτική δράση του παράγοντα πειραματισμού μας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης συμπεραίνουμε, πως η δεφεριπρόνη προστιθέμενη στο διάλυμα έκπλυσης, στο διάλυμα του συνδυασμού υποθερμικής μηχανικής έκπλυσης και στατικής ψυχρής συντήρησης και χορηγούμενη πριν την επαναιμάτωση:

1. Οδηγεί σε μικρότερο βάρος του νεφρικού μοσχεύματος μετά την ολοκλήρωση της συντήρησής του, μέσω μείωσης της ανάπτυξης του κυτταρικού οιδήματος,
2. Μειώνει την παραγωγή τελικών προϊόντων υπεροξειδωσής λιπιδίων (8-ισοπροστάνια), μέσω μείωσης της έντασης του οξειδωτικού stress που επάγεται από το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης,
3. Μειώνει την ένταση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 του νεφρικού μοσχεύματος, μετά την επαναιμάτωση, οδηγώντας σε μείωση της φλεγμονώδους απάντησης και πιθανά της αντιγονικότητάς του,
4. Περιορίζει την μετεγχειρητική ιστική βλάβη του μοσχεύματος, και τελικά,
5. Οδηγεί σε στατιστικά σημαντική μείωση των μετεγχειρητικών συγκεντρώσεων ουρίας και κρεατινίνης ορού, ασκώντας άρα σημαντική προστατευτική δράση στο νεφρικό μόσχευμα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η μη ανοσολογικής αρχής ιστική βλάβη του νεφρικού μόσχευματος, λόγω της υποθερμικής συντήρησής του και του φαινομένου ισχαιμίας-επαναιμάτωσης μετά την εμφύτευσή του, σχετίζεται ευθέως ανάλογα με την πρόιμη και όψιμη λειτουργία του. Ο ελεύθερος εντός των κυττάρων σίδηρος συμμετέχει στη βλάβη αυτή, λόγω του κεντρικού του ρόλου στα φαινόμενα οξειδωαναγωγής και μελέτες με δεσφεροξαμίνη έχουν αποδείξει ένα σχετικά ευεργετικό ρόλο. Η δεφεριπρόνη, λόγω των φυσικοχημικών της ιδιοτήτων, φαίνεται να υπερτερεί της δεσφεροξαμίνης σε ασθενείς με αιμοσιδήρωση, δείχνοντας μεγαλύτερη δυνατότητα διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών και πιθανά μεγαλύτερη δέσμευση του ελεύθερου σιδήρου.

Σκοπός: Σκοπό της μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση της πιθανής ευεργετικής επίδρασης της δεφεριπρόνης στη μεταμόσχευση νεφρού, μελετώντας τη βλάβη στο νεφρικό μόσχευμα κατά τη ψυχρή ισχαιμία, την επαναιμάτωση και μετεγχειρητικά.

Υλικό και Μέθοδος: Χρησιμοποιήθηκαν 14 ενήλικες χοίροι φάρμας (ΣΒ: 65-75kg). Τα 7 πειραματόζωα αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου, ενώ στα υπόλοιπα 7 που αποτέλεσαν την ομάδα μελέτης χορηγήθηκε δεφεριπρόνη ενδοφλεβίως σε δοσολογία 50mg/kg δύο φορές την ημέρα για 3 ημέρες και μία δόση πριν τη μεταμόσχευση. Η αριστερή νεφρεκτομή και η μεταμόσχευση του αριστερού νεφρού στα δεξιά νεφρικά αγγεία, με συνοδό δεξιά νεφρεκτομή, πραγματοποιήθηκαν με ένα καινοτόμο πειραματικό μοντέλο με εξολοκλήρου εξωπεριτοναϊκή προσπέλαση. Το μόσχευμα (αριστερός νεφρός) και στις δύο ομάδες εκπλύθηκε με διάλυμα Custodiol® και αμέσως μετά συνδέθηκε σε μηχανή εξωσωματικής κυκλοφορίας στους 4°C, με ροή στα 50-100ml/min, διατηρώντας την πίεση του διαλύματος KPS-1® κάτω από 35-40mmHg για 4h. Μετά συντηρούνταν το μόσχευμα σε υποθερμία σε διάλυμα Custodiol® για 13h (συνολική ψυχρή ισχαιμία: 17h). Στην ομάδα L1, 0,1gr L1 προστέθηκε στα διαλύματα Custodiol® και KPS-1®. Εργαστηριακοί και ιστολογικοί δείκτες νεφρικής βλάβης εκτιμήθηκαν κατά τη διάρκεια α) της ψυχρής συντήρησης (βάρος μόσχευματος, CK/LDH διαλύματος συντήρησης), β) στα 30mins από την επαναιμάτωση (8-ισοπροστάνια, βιοψία), γ) κατά τη μετεγχειρητική περίοδο (συγκέντρωση ουρίας και κρεατινίνης ορού) και πριν την ευθανασία των πειραματόζωων τη 14^η μετεγχειρητική ημέρα (βιοψία). Οι βιοψίες εξετάστηκαν από δύο ανεξάρτητους παθολογοανατόμους για να

εκτιμήσουν τη βλάβη του μοσχεύματος μέσω του ιστοπαθολογικού δείκτη και της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1.

Αποτελέσματα: Όλα τα πειραματόζωα επέζησαν μέχρι τη 14^η μετεγχειρητική ημέρα. Μετά από 17h ψυχρής ισχαιμίας, τόσο το βάρος, όσο και οι συγκεντρώσεις των ενζύμων κυτταρικής βλάβης, ήταν στατιστικά χαμηλότερα στην ομάδα μελέτης, σε σχέση με αυτά της ομάδας ελέγχου ($p=0,001$ για το βάρος, $p=0,001$ για την CK και $p=0,007$ για την LDH, αντίστοιχα). Αντίστοιχα ήταν και τα αποτελέσματα για τη συγκέντρωση των 8-ισοπροστανίων στα 30mins μετά την επαναιμάτωση ($p=0,007$). Ο ιστοπαθολογικός δείκτης ήταν στατιστικά μικρότερος στην ομάδα μελέτης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, τόσο στα 30mins από την επαναιμάτωση, όσο και κατά τη 14^η μετεγχειρητική ημέρα ($p=0,001$ και $p=0,001$, αντίστοιχα). Επιπλέον, ενώ αυτός αυξήθηκε στην ομάδα ελέγχου, μεταξύ των 30mins και της 14^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας, αντίθετα παρέμεινε σταθερός στην ομάδα μελέτης ($p=0,042$ και $p=0,862$, αντίστοιχα). Η έκφραση των μορίων προσκόλλησης ICAM-1 και VCAM-1 κατά την 14^η μετεγχειρητική ημέρα ήταν μικρότερη στην ομάδα μελέτης, σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p=0,029$ και $p=0,04$, αντίστοιχα), ενώ στα 30mins αντίστοιχα μικρότερη ήταν η έκφραση του VCAM-1 ($p=0,02$). Η έκφραση του ICAM-1 μειώθηκε και στις δύο ομάδες από 30mins στη 14^η μετεγχειρητική ημέρα (ομάδα ελέγχου: $p=0,034$ και ομάδα μελέτης: $p=0,034$), ενώ η έκφραση του VCAM-1 παρέμεινε σταθερή και στις δύο ομάδες (ομάδα ελέγχου: $p=0,414$ και ομάδα μελέτης: $p=0,083$). Τέλος, από την 3^η μέχρι την 8^η μετεγχειρητική ημέρα η συγκέντρωση της ουρίας ορού και από την 3^η μέχρι την 7^η μετεγχειρητική ημέρα η συγκέντρωση της κρεατινίνης ορού ήταν μικρότερες στην ομάδα μελέτης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (και τα δύο $p<0,05$).

Συμπεράσματα: Η δεφεριπρόνη ασκεί προστατευτική δράση στο νεφρικό μόσχευμα, τόσο κατά τη φάση συντήρησής του, όσο και μετά την επαναιμάτωσή του, με αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική βελτίωση της μετεγχειρητικής του λειτουργίας και πιθανά μικρότερης αντιγονικότητας.

Effect of deferiprone on in vivo model of autologous renal transplantation (Experimental study in pigs)

Vasileios I. Tatsis
Surgeon

SUMMARY

Introduction: Ischemia-reperfusion syndrome (IRI) represents the major non-immune factor which leads to renal graft damage. Iron features prominently in IRI processes and several studies have shown a beneficial role of iron-chelating agent desferoxamine. Another chelating agent deferiprone (L1) has been used in iron overload patients showing better results possibly due to its different physicochemical properties.

Purpose: The purpose of this study was to assess any possible protective effect of L1 on a kidney autotransplantation model by studying the damage caused to kidney graft during cold ischemia, reperfusion and post-surgery phases.

Material and Method: 14 pigs (65-75kg body weight) were used and consisted the control group (7) and the study group (L1-7). Pigs in L1 group received twice daily 50mg/kg of L1 for 3 consecutive days plus another dose just before the implantation of graft. Left nephrectomy and graft (left kidney) implantation to right renal vascular pedicle, with concomitant right nephrectomy, were done with a novel experimental model using total extra-peritoneal approaches. In both groups, after left kidney removal, it was flushed with Custodiol[®] solution and immediately was connected to an extracorporeal circulatory machine at 4°C with flow of 50-100ml/min, maintaining fluid (KPS-1[®] solution) pressure not to exceed 35-40 mmHg, for a period of 4h. Then it was cold stored in Custodiol[®] solution for another 13h (total cold ischemic period: 17h). In L1 group, 0.1gr of L1 were diluted in KPS-1[®] and Custodiol[®] solutions. Laboratory and histologic markers of kidney damage were evaluated during a) cold preservation phase (weight of graft, CK/LDH concentrations into the preservation solution), b) at 30mins after reperfusion phase (8-isoprostane, biopsy), c) during

post-surgery phase (Urea, Creat serum concentrations) and before sacrifice of animals at 14th postoperative day (biopsy). Biopsy specimens were examined by two independent pathologists to assess the degree of graft damage through the histopathological index and expression of adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1.

Results: All animals survived until 14th postoperative day. After 17h cold ischemia period, the mean weight of grafts and CK/LDH concentrations were lower in L1 group compared to control group ($p=0.001$, $p=0.001$ and $p=0.007$, respectively). At 30mins after reperfusion the mean concentration of 8-isoprostanes was lower in L1 group compared to control group ($p=0.007$). Histopathological index at 30mins after reperfusion was significantly lower in L1 group compared to control group ($p=0.001$) and the same result was seen at 14th postoperative day ($p=0.001$). Additionally, between 30mins and 14th postoperative day, the histopathological index was increased in control group ($p=0.042$), while it remained stable in L1 group ($p=0.862$). At 30mins after reperfusion, expression of VCAM-1 in L1 group was lower compared to L1 group ($p=0.02$). The same result between two groups was obvious for ICAM-1 and VCAM-1 at 14th day ($p=0.029$ and $p=0.04$, respectively). ICAM-1 expression was reduced in both groups from 30mins to 14th postoperative day (control group: $p=0.034$ and L1 group: $p=0.034$), while VCAM-1 expression remained constant in both groups (control group: $p=0.414$ and L1 group: $p=0.083$). From 3rd up to 8th postoperative day Urea serum concentrations and from 3rd up to 7th postoperative day Creat serum concentrations were constantly lower in L1 group compared to control group (all $p<0.05$).

Conclusions: Due to above promising results, it seems that deferiprone manifests a clear cytoprotective role in renal autotransplantation model by reducing kidney damage both at preservation period and after reperfusion, resulting in better graft function during postoperative phase and possibly lowering graft's immunogenicity.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Marino IR, Cirillo C. An abridged photographic history of organ transplantation. *Exp Clin Transplant*. 2014 Mar;12 Suppl 1:11-6.
2. Χίμαιρα (μυθολογία), [ανάκτηση 16/04/2017]. Διαθέσιμο στο [https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A7%CE%AF%CE%BC%CE%B1%CE%B9%CF%81%CE%B1_\(%CE%BC%CF%85%CE%B8%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1\)](https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%A7%CE%AF%CE%BC%CE%B1%CE%B9%CF%81%CE%B1_(%CE%BC%CF%85%CE%B8%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1)).
3. Barker CF, Markmann JF. Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Apr 01;3(4):a014977.
4. Dangoor JY, Hakim DN, Singh RP, Hakim NS. Transplantation: a brief history. *Exp Clin Transplant*. 2015 Feb;13(1):1-5.
5. Shrestha B, Haylor J, Raftery A. Historical perspectives in kidney transplantation: an updated review. *Prog Transplant*. 2015 Mar;25(1):64-9, 76.
6. Magoha GA, Ngumi ZW. Renal transplantation during the twentieth century: a review. *East Afr Med J*. 2001 Jun;78(6):317-21.
7. Shayan H. Organ transplantation: from myth to reality. *J Invest Surg*. 2001 May-Jun;14(3):135-8.
8. Zuber K, Howard T, Davis J. Transplant in the 21st century. *JAAPA*. 2014 Nov;27(11):26-34.
9. De Georgia MA. History of brain death as death: 1968 to the present. *J Crit Care*. 2014 Aug;29(4):673-8.
10. Starzl TE, Makowka L. Organ transplantation--then and now. *Hosp Physician*. 1987 Aug;23(8):28-33, 6.
11. Kahan BD. Forty years of publication of transplantation proceedings--the second decade: the cyclosporine revolution. *Transplant Proc*. 2009 Jun;41(5):1423-37.
12. Kahan BD. Forty years of publication of transplantation proceedings--the third decade: the expansion of the enterprise. *Transplant Proc*. 2009 Dec;41(10):3975-4020.
13. Cooper DK. A brief history of cross-species organ transplantation. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*. 2012 Jan;25(1):49-57.
14. Cooper DK, Ekser B, Tector AJ. A brief history of clinical xenotransplantation. *Int J Surg*. 2015 Nov;23(Pt B):205-10.

15. Fort J. Chronic renal failure: a cardiovascular risk factor. *Kidney Int Suppl.* 2005 Dec(99):S25-9.
16. Edwards EB, Bennett LE, Cecka JM. Effect of HLA matching on the relative risk of mortality for kidney recipients: a comparison of the mortality risk after transplant to the mortality risk of remaining on the waiting list. *Transplantation.* 1997 Nov 15;64(9):1274-7.
17. Krakauer H, Grauman JS, McMullan MR, Creede CC. The recent U.S. experience in the treatment of end-stage renal disease by dialysis and transplantation. *N Engl J Med.* 1983 Jun 30;308(26):1558-63.
18. Port FK, Wolfe RA, Mauger EA, Berling DP, Jiang K. Comparison of survival probabilities for dialysis patients vs cadaveric renal transplant recipients. *JAMA.* 1993 Sep 15;270(11):1339-43.
19. Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, Van Der Woude FJ. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Nov;9(11):2135-41.
20. Vollmer WM, Wahl PW, Blagg CR. Survival with dialysis and transplantation in patients with end-stage renal disease. *N Engl J Med.* 1983 Jun 30;308(26):1553-8.
21. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999 Dec 02;341(23):1725-30.
22. Laupacis A, Keown P, Pus N, Krueger H, Ferguson B, Wong C, et al. A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation. *Kidney Int.* 1996 Jul;50(1):235-42.
23. Organ Procurement and Transplantation Network, National Data [ανάκτηση 20/05/2017]. Διαθέσιμο στο <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/national-data/>.
24. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med.* 2002 Feb 21;346(8):580-90.
25. Qiu J, Cai J, Terasaki PL. Death with a functioning graft in kidney transplant recipients. *Clin Transpl.* 2004:379-86.

26. Gjertson DW. Explainable variation in renal transplant outcomes: a comparison of standard and expanded criteria donors. *Clin Transpl.* 2004:303-14.
27. Collaborative Transplant Study [ανάκτηση 20/05/2017]. Διαθέσιμο στο <http://www.ctstransplant.org/public/graphics/sample.shtml>.
28. Debout A, Foucher Y, Trebern-Launay K, Legendre C, Kreis H, Mourad G, et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney Int.* 2015 Feb;87(2):343-9.
29. Parsons RF, Guarrera JV. Preservation solutions for static cold storage of abdominal allografts: which is best? *Curr Opin Organ Transplant.* 2014 Apr;19(2):100-7.
30. Gore JL, Pham PT, Danovitch GM, Wilkinson AH, Rosenthal JT, Lipshutz GS, et al. Obesity and outcome following renal transplantation. *Am J Transplant.* 2006 Feb;6(2):357-63.
31. Pirsch JD, Armbrust MJ, Knechtle SJ, D'Alessandro AM, Sollinger HW, Heisey DM, et al. Obesity as a risk factor following renal transplantation. *Transplantation.* 1995 Feb 27;59(4):631-3.
32. Meier-Kriesche HU, Arndorfer JA, Kaplan B. The impact of body mass index on renal transplant outcomes: a significant independent risk factor for graft failure and patient death. *Transplantation.* 2002 Jan 15;73(1):70-4.
33. Marroquin CE, Edwards EB, Collins BH, Desai DM, Tuttle-Newhall JE, Kuo PC. Half-life analysis of pancreas and kidney transplants. *Transplantation.* 2005 Jul 27;80(2):272-5.
34. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant.* 2004 Jun;4(6):905-13.
35. Chapman J, Webster A. Cancer Report. In: Excell L, McDonald S, editors. Australia and New Zealand Dialysis and Transplant Registry. Adelaide, South Australia: ANZDATA Registry Report 2004; 2004. p. 101-3.
36. Sheil A. Cancer Report. In: Disney A, editor. Australia and New Zealand Dialysis and Transplant Registry. Adelaide, South Australia: ANZDATA Registry Report 1997; 1997. p. 138-46.
37. Davison JM, Bailey DJ. Pregnancy following renal transplantation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2003 Aug;29(4):227-33.
38. Sibanda N, Briggs JD, Davison JM, Johnson RJ, Rudge CJ. Pregnancy after organ transplantation: a report from the UK Transplant pregnancy registry. *Transplantation.* 2007 May 27;83(10):1301-7.

39. Thompson BC, Kingdon EJ, Tuck SM, Fernando ON, Sweny P. Pregnancy in renal transplant recipients: the Royal Free Hospital experience. *QJM*. 2003 Nov;96(11):837-44.
40. Neipp M, Karavul B, Jackobs S, Meyer zu Vilsendorf A, Richter N, Becker T, et al. Quality of life in adult transplant recipients more than 15 years after kidney transplantation. *Transplantation*. 2006 Jun 27;81(12):1640-4.
41. Moons P, Vanrenterghem Y, van Hooff JP, Squifflet JP, Margodt D, Mullens M, et al. Steroids may compromise quality of life of renal transplant recipients on a tacrolimus-based regimen. *Transplant Proc*. 2002 Aug;34(5):1691-2.
42. Diemont WL, Vrugink PA, Meuleman EJ, Doesburg WH, Lemmens WA, Berden JH. Sexual dysfunction after renal replacement therapy. *Am J Kidney Dis*. 2000 May;35(5):845-51.
43. Habwe VQ. Posttransplantation quality of life: more than graft function. *Am J Kidney Dis*. 2006 Apr;47(4 Suppl 2):S98-110.
44. Storey KB. Out cold: biochemical regulation of mammalian hibernation - a mini-review. *Gerontology*. 2010;56(2):220-30.
45. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annu Rev Med*. 1995;46:235-47.
46. Calne RY, Pegg DE, Pryse-Davies J, Brown FL. Renal Preservation by Ice-Cooling: An Experimental Study Relating to Kidney Transplantation from Cadavers. *Br Med J*. 1963 Sep 14;2(5358):651-5.
47. Jamieson NV, Sundberg R, Lindell S, Claesson K, Moen J, Vreugdenhil PK, et al. Preservation of the canine liver for 24-48 hours using simple cold storage with UW solution. *Transplantation*. 1988 Oct;46(4):517-22.
48. McAnulty JF, Reid TW, Waller KR, Murphy CJ. Successful six-day kidney preservation using trophic factor supplemented media and simple cold storage. *Am J Transplant*. 2002 Sep;2(8):712-8.
49. Leuvenink H, Rutger P. Abdominal Organ Preservation and Resuscitation. In: Kirk A, Knechtle S, Larsen C, Madsen J, Pearson T, Webber S, editors. *Textbook of Organ Transplantation*. UK: Wiley-Blackwell; 2014. p. 320.
50. 'THart N, Leuvenink H, Ploeg R. New solutions in organ preservation. *Transplantation Reviews*. 2002;16(3):131-41.
51. Sumimoto R, Jamieson NV, Kamada N. Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution. *Transplantation*. 1990 Oct;50(4):573-6.

52. Wahlberg JA, Love R, Landegaard L, Southard JH, Belzer FO. 72-hour preservation of the canine pancreas. *Transplantation*. 1987 Jan;43(1):5.
53. Marshall V. Preservation by simple hypothermia. In: Collins G, Dubernard J, Land W, et al editors. *Procurement, Preservation, and Allocation of Vascularized Organs*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1997. p. 115-29.
54. Bonventre JV, Cheung JY. Effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia. *Am J Physiol*. 1985 Jul;249(1 Pt 1):C149-59.
55. Kuppusamy P, Zweier JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem*. 1989 Jun 15;264(17):9880-4.
56. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985 Jan 17;312(3):159-63.
57. Schachter M, Foulds S. Free radicals and the xanthine oxidase pathway. In: Grace P, Mathie R, editors. *Ischaemia-Reperfusion Injury*. Malden, Mass.: Blackwell Science; 1999. p. 137-56.
58. Byrne A, Johnson A. Lipid peroxidation. In: Grace P, Mathie R, editors. *Ischaemia-Reperfusion Injury*. Malden, Mass.: Blackwell Science; 1999. p. 148-56.
59. Kosieradzki M, Kuczynska J, Piwowarska J, Wegrowicz-Rebandel I, Kwiatkowski A, Lisik W, et al. Prognostic significance of free radicals: mediated injury occurring in the kidney donor. *Transplantation*. 2003 Apr 27;75(8):1221-7.
60. Pearlstein DP, Ali MH, Mungai PT, Hynes KL, Gewertz BL, Schumacker PT. Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Apr 01;22(4):566-73.
61. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*. 1999 Oct;79(4):1127-55.
62. Murphy E, Steenbergen C. Ion transport and energetics during cell death and protection. *Physiology (Bethesda)*. 2008 Apr;23:115-23.
63. Kohli V, Gao W, Camargo CA, Jr., Clavien PA. Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Aug 19;94(17):9354-9.
64. Topp SA, Upadhyaya GA, Strasberg SM. Cold preservation of isolated sinusoidal endothelial cells in MMP 9 knockout mice: effect on morphology and platelet adhesion. *Liver Transpl*. 2004 Aug;10(8):1041-8.

65. Upadhyga GA, Strasberg SM. Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology*. 2000 May;31(5):1115-22.
66. Duval M, Plin C, Elimadi A, Vallerand D, Tillement JP, Morin D, et al. Implication of mitochondrial dysfunction and cell death in cold preservation--warm reperfusion-induced hepatocyte injury. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006 May;84(5):547-54.
67. Leuvenink H, Ploeg R. Renal Preservation. In: Morris P, Knechtle S, editors. *Kidney Transplantation: Principles and Practice*. 6 ed. U.S.A.: Saunders; 2008. p. 126-7, 131.
68. Yuan X, Theruvath AJ, Ge X, Floerchinger B, Jurisch A, Garcia-Cardena G, et al. Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives. *Transpl Int*. 2010 Jun;23(6):561-70.
69. Baatard R, Pradier F, Dantal J, Karam G, Cantarovich D, Hourmant M, et al. Prospective randomized comparison of University of Wisconsin and UW-modified, lacking hydroxyethyl-starch, cold-storage solutions in kidney transplantation. *Transplantation*. 1993 Jan;55(1):31-5.
70. Collins GM, Wicomb WN, Warren R, Wong L, Bry WI, Feduska NJ, et al. Canine and cadaver kidney preservation with sodium lactobionate sucrose solution. *Transplant Proc*. 1993 Feb;25(1 Pt 2):1588-90.
71. Ben Abdennebi H, Steghens JP, Margonari J, Ramella-Virieux S, Barbieux A, Boillot O. High-Na⁺ low-K⁺ UW cold storage solution reduces reperfusion injuries of the rat liver graft. *Transpl Int*. 1998;11(3):223-30.
72. Shiiya N, Paul M, Benvenuti C, Astier A, Ferrer MJ, Loisanse D. A lactobionate-based extracellular-type solution for donor heart preservation. *J Heart Lung Transplant*. 1993 May-Jun;12(3):476-83.
73. de Boer J, De Meester J, Smits JM, Groenewoud AF, Bok A, van der Velde O, et al. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. *Transpl Int*. 1999;12(6):447-53.
74. Catena F, Coccolini F, Montori G, Vallicelli C, Amaduzzi A, Ercolani G, et al. Kidney preservation: review of present and future perspective. *Transplant Proc*. 2013 Nov;45(9):3170-7.
75. Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry--ten years of kidney transplants. *Clin Transpl*. 1997:1-14.

76. Eugene M. Polyethyleneglycols and immunocamouflage of the cells tissues and organs for transplantation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004 May;50(3):209-15.
77. Codas R, Petruzzo P, Morelon E, Lefrancois N, Danjou F, Berthillot C, et al. IGL-1 solution in kidney transplantation: first multi-center study. *Clin Transplant*. 2009 Jun-Jul;23(3):337-42.
78. Bessems M, Doorschodt BM, van Vliet AK, van Gulik TM. Machine perfusion preservation of the non-heart-beating donor rat livers using polysol, a new preservation solution. *Transplant Proc*. 2005 Jan-Feb;37(1):326-8.
79. Bessems M, Doorschodt BM, van Vliet AK, van Gulik TM. Improved rat liver preservation by hypothermic continuous machine perfusion using polysol, a new, enriched preservation solution. *Liver Transpl*. 2005 May;11(5):539-46.
80. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation*. 2007 May 27;83(10):1289-98.
81. Wilson CH, Asher JF, Gupta A, Vijayanand D, Wyrley-Birch H, Stamp S, et al. Comparison of HTK and hypertonic citrate to intraarterial cooling in human non-heart-beating kidney donors. *Transplant Proc*. 2007 Mar;39(2):351-2.
82. Kay MD, Hosgood SA, Bagul A, Nicholson ML. Comparison of preservation solutions in an experimental model of organ cooling in kidney transplantation. *Br J Surg*. 2009 Oct;96(10):1215-21.
83. Ross H, Marshall VC, Escott ML. 72-hr canine kidney preservation without continuous perfusion. *Transplantation*. 1976 Jun;21(6):498-501.
84. Toledo-Pereyra L, Palma-Vargas J, Toledo A. Kidney Preservation. In: Toledo-Pereyra L, editor. *Organ Preservation for Transplantation*. 3 ed. Austin, Texas, USA: Landes Bioscience; 2010. p. 129, 132, 137-8.
85. Polyak MM, Arrington BO, Stubenbord WT, Boykin J, Brown T, Jean-Jacques MA, et al. The influence of pulsatile preservation on renal transplantation in the 1990s. *Transplantation*. 2000 Jan 27;69(2):249-58.
86. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2009 Jan 01;360(1):7-19.
87. Balupuri S, Buckley P, Snowden C, Mustafa M, Sen B, Griffiths P, et al. The trouble with kidneys derived from the non heart-beating donor: a single center 10-year experience. *Transplantation*. 2000 Mar 15;69(5):842-6.

88. Matsuno N, Kozaki K, Degawa H, Narumi Y, Suzuki N, Kikuchi K, et al. A useful predictor in machine perfusion preservation for kidney transplantation from non-heart-beating donors. *Transplant Proc.* 2000 Feb;32(1):173-4.
89. Wight JP, Chilcott JB, Holmes MW, Brewer N. Pulsatile machine perfusion vs. cold storage of kidneys for transplantation: a rapid and systematic review. *Clin Transplant.* 2003 Aug;17(4):293-307.
90. Schold JD, Kaplan B, Howard RJ, Reed AI, Foley DP, Meier-Kriesche HU. Are we frozen in time? Analysis of the utilization and efficacy of pulsatile perfusion in renal transplantation. *Am J Transplant.* 2005 Jul;5(7):1681-8.
91. Matsuoka L, Shah T, Aswad S, Bunnapradist S, Cho Y, Mendez RG, et al. Pulsatile perfusion reduces the incidence of delayed graft function in expanded criteria donor kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2006 Jun;6(6):1473-8.
92. Stratta RJ, Moore PS, Farney AC, Rogers J, Hartmann EL, Reeves-Daniel A, et al. Influence of pulsatile perfusion preservation on outcomes in kidney transplantation from expanded criteria donors. *J Am Coll Surg.* 2007 May;204(5):873-82; discussion 82-4.
93. Hosgood SA, Saeb-Parsy K, Hamed MO, Nicholson ML. Successful Transplantation of Human Kidneys Deemed Untransplantable but Resuscitated by Ex Vivo Normothermic Machine Perfusion. *Am J Transplant.* 2016 Nov;16(11):3282-5.
94. Watson CJ, Kosmoliaptsis V, Randle LV, Russell NK, Griffiths WJ, Davies S, et al. Preimplant Normothermic Liver Perfusion of a Suboptimal Liver Donated After Circulatory Death. *Am J Transplant.* 2016 Jan;16(1):353-7.
95. Murphy E, Steenbergen C. Ion transport and energetics during cell death and protection. *Physiology (Bethesda).* 2008 Apr;23:115-23.
96. Pac-Soo CK, Mathew H, Ma D. Ischaemic conditioning strategies reduce ischaemia/reperfusion-induced organ injury. *Br J Anaesth.* 2015 Feb;114(2):204-16.
97. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Yoo YD. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells.* 2011 Dec;32(6):491-509.
98. Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res.* 2000 Sep 15;87(6):460-6.
99. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2010 Feb;47(2):122-9.

100. Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 2006 Apr;34(Pt 2):232-7.
101. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317.
102. Lejay A, Fang F, John R, Van JA, Barr M, Thaveau F, et al. Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus. *J Mol Cell Cardiol.* 2016 Feb;91:11-22.
103. Ansley DM, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *J Pathol.* 2013 Jan;229(2):232-41.
104. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2010 Oct 29;107(9):1071-82.
105. Silachev DN, Plotnikov EY, Pevzner IB, Zorova LD, Babenko VA, Zorov SD, et al. The mitochondrion as a key regulator of ischaemic tolerance and injury. *Heart Lung Circ.* 2014 Oct;23(10):897-904.
106. Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2003 Apr;35(4):339-41.
107. Morciano G, Giorgi C, Bonora M, Punzetti S, Pavasini R, Wieckowski MR, et al. Molecular identity of the mitochondrial permeability transition pore and its role in ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2015 Jan;78:142-53.
108. Di Paola M, Lorusso M. Interaction of free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. *Biochim Biophys Acta.* 2006 Sep-Oct;1757(9-10):1330-7.
109. Morgan MJ, Kim YS, Liu ZG. TNFalpha and reactive oxygen species in necrotic cell death. *Cell Res.* 2008 Mar;18(3):343-9.
110. Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2012 Feb 01;52(3):556-92.
111. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant.* 2015 Jun 24;5(2):52-67.
112. Menke J, Sollinger D, Schamberger B, Heemann U, Lutz J. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft. *Curr Opin Organ Transplant.* 2014 Aug;19(4):395-400.

113. Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jul;1790(7):682-93.
114. Waldvogel-Abramowski S, Waeber G, Gassner C, Buser A, Frey BM, Favrat B, et al. Physiology of iron metabolism. *Transfus Med Hemother*. 2014 Jun;41(3):213-21.
115. Anderson CP, Shen M, Eisenstein RS, Leibold EA. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Sep;1823(9):1468-83.
116. Rushton DH, Dover R, Sainsbury AW, Norris MJ, Gilkes JJ, Ramsay ID. Iron deficiency is neglected in women's health. *BMJ*. 2002 Nov 16;325(7373):1176.
117. Milman N. Serum ferritin in Danes: studies of iron status from infancy to old age, during blood donation and pregnancy. *Int J Hematol*. 1996 Feb;63(2):103-35.
118. Silva MR, Dias G, Ferreira CL, Franceschini SC, Costa NM. Growth of preschool children was improved when fed an iron-fortified fermented milk beverage supplemented with *Lactobacillus acidophilus*. *Nutr Res*. 2008 Apr;28(4):226-32.
119. Munoz M, Villar I, Garcia-Erce JA. An update on iron physiology. *World J Gastroenterol*. 2009 Oct 07;15(37):4617-26.
120. Greenberg GR, Wintrobe MM. A labile iron pool. *J Biol Chem*. 1946 Sep;165(1):397.
121. Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med*. 2002 Oct 15;33(8):1037-46.
122. Petrat F, de Groot H, Sustmann R, Rauen U. The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Chem*. 2002 Mar-Apr;383(3-4):489-502.
123. Andrews NC. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet*. 2000 Dec;1(3):208-17.
124. McKie AT, Latunde-Dada GO, Miret S, McGregor JA, Anderson GJ, Vulpe CD, et al. Molecular evidence for the role of a ferric reductase in iron transport. *Biochem Soc Trans*. 2002 Aug;30(4):722-4.
125. Breuer W, Epsztejn S, Millgram P, Cabantchik IZ. Transport of iron and other transition metals into cells as revealed by a fluorescent probe. *Am J Physiol*. 1995 Jun;268(6 Pt 1):C1354-61.
126. Picard V, Epsztejn S, Santambrogio P, Cabantchik ZI, Beaumont C. Role of ferritin in the control of the labile iron pool in murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem*. 1998 Jun 19;273(25):15382-6.

127. Cozzi A, Corsi B, Levi S, Santambrogio P, Albertini A, Arosio P. Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: in vivo role of ferritin ferroxidase activity. *J Biol Chem*. 2000 Aug 18;275(33):25122-9.
128. Alayash AI, Patel RP, Cashon RE. Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications. *Antioxid Redox Signal*. 2001 Apr;3(2):313-27.
129. Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res*. 1991 Feb 01;51(3):974-8.
130. Dennery PA, McDonagh AF, Spitz DR, Rodgers PA, Stevenson DK. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med*. 1995 Oct;19(4):395-404.
131. Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J*. 1999 Oct;13(13):1800-9.
132. Beinert H. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. *J Biol Inorg Chem*. 2000 Feb;5(1):2-15.
133. Brazzolotto X, Gaillard J, Pantopoulos K, Hentze MW, Moulis JM. Human cytoplasmic aconitase (Iron regulatory protein 1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro but is not activated for iron-responsive element binding. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21625-30.
134. Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat Res*. 2003 Oct 29;531(1-2):81-92.
135. Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev*. 2005 Dec;57(4):547-83.
136. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*. 1990;186:1-85.
137. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest*. 2003 Jan;111(2):163-9.
138. Rytter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*. 2000 Jan 15;28(2):289-309.
139. Huang X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. *Mutat Res*. 2003 Dec 10;533(1-2):153-71.

140. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Jan 15;202(2):199-211.
141. Preiser JC. Oxidative stress. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2012 Mar;36(2):147-54.
142. Γαλάρης Δ. Χημική δομή του οξυγόνου. In: Γαλάρης Δ, editor. *Ελεύθερες ρίζες: χημεία-βιοχημεία*. Ιωάννινα: Εκδόσεις Πανεπιστημίου Ιωαννίνων; 2001. p. 17-9.
143. Noori S. An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. *Open Access Scientific Reports.* 2012;1(8):1-9.
144. Vajdovich P. Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008 Jan;38(1):31-123, v.
145. Al-Dalaen S, Al-Qtaitat A. Review article: Oxidative stress versus antioxidants *American Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2014;2(5):60-71.
146. Gao L, Laude K, Cai H. Mitochondrial pathophysiology, reactive oxygen species, and cardiovascular diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008 Jan;38(1):137-55, vi.
147. Mandelker L. Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2008 Jan;38(1):1-30, v.
148. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan;5(1):9-19.
149. Yoshikawa T, Naito Y. What Is Oxidative Stress? *JMAJ.* 2002;124(11):1549–53.
150. al-Refaie FN, Hoffbrand AV. Oral iron-chelating therapy: the L1 experience. *Baillieres Clin Haematol.* 1994 Dec;7(4):941-63.
151. Barman Balfour JA, Foster RH. Deferiprone: a review of its clinical potential in iron overload in beta-thalassaemia major and other transfusion-dependent diseases. *Drugs.* 1999 Sep;58(3):553-78.
152. Victor Hoffbrand A. Deferiprone therapy for transfusional iron overload. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005 Jun;18(2):299-317.
153. Hoffbrand AV, Cohen A, Hershko C. Role of deferiprone in chelation therapy for transfusional iron overload. *Blood.* 2003 Jul 01;102(1):17-24.
154. Sajid R, Ghani F, Adil S, Khurshid M. Oral iron chelation therapy with deferiprone in patients with *Thalassemia Major*. *J Pak Med Assoc.* 2009 Jun;59(6):388-90.
155. Piga A, Roggero S, Vinciguerra T, Sacchetti L, Gallo V, Longo F. Deferiprone: New insight. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054:169-74.

156. Olivieri NF, Brittenham GM, Matsui D, Berkovitch M, Blendis LM, Cameron RG, et al. Iron-chelation therapy with oral deferiprone in patients with thalassemia major. *N Engl J Med.* 1995 Apr 06;332(14):918-22.
157. Kontoghiorghes GJ, Pattichi K, Hadjigavriel M, Kolnagou A. Transfusional iron overload and chelation therapy with deferoxamine and deferiprone (L1). *Transfus Sci.* 2000 Dec;23(3):211-23.
158. Viprakasit V, Kriengsoontornkij W. Metal antagonists. *Side Effects of Drugs Annual.* 2014;35:419-33.
159. Huang H, Salahudeen AK. Cold induces catalytic iron release of cytochrome P-450 origin: a critical step in cold storage-induced renal injury. *Am J Transplant.* 2002 Aug;2(7):631-9.
160. Zager RA, Conrad DS. Deferoxamine confers striking protection against cold storage injury to isolated mouse proximal tubules. *Kidney Int.* 1996 Dec;50(6):2109-11.
161. Huang H, He Z, Roberts LJ, 2nd, Salahudeen AK. Deferoxamine reduces cold-ischemic renal injury in a syngeneic kidney transplant model. *Am J Transplant.* 2003 Dec;3(12):1531-7.
162. Pincemail J, Defraigne JO, Detry O, Franssen C, Meurisse M, Limet R. Ischemia-reperfusion injury of rabbit kidney: comparative effects of desferrioxamine and N-acetylcysteine as antioxidants. *Transplant Proc.* 2000 Mar;32(2):475-6.
163. Gower JD, Healing G, Fuller BJ, Simpkin S, Green CJ. Protection against oxidative damage in cold-stored rabbit kidneys by desferrioxamine and indomethacin. *Cryobiology.* 1989 Aug;26(4):309-17.
164. Baron P, Gomez-Marin O, Casas C, Heil J, Will N, Condie R, et al. Renal preservation after warm ischemia using oxygen free radical scavengers to prevent reperfusion injury. *J Surg Res.* 1991 Jul;51(1):60-5.
165. Calvaruso G, Vitrano A, Di Maggio R, Lai E, Colletta G, Quota A, et al. Deferiprone versus deferoxamine in thalassemia intermedia: Results from a 5-year long-term Italian multicenter randomized clinical trial. *Am J Hematol.* 2015 Jul;90(7):634-8.
166. Nielsen P, Fischer R, Engelhardt R, Tondury P, Gabbe EE, Janka GE. Liver iron stores in patients with secondary haemosiderosis under iron chelation therapy with deferoxamine or deferiprone. *Br J Haematol.* 1995 Dec;91(4):827-33.
167. Olivieri NF, Koren G, Hermann C, Bentur Y, Chung D, Klein J, et al. Comparison of oral iron chelator L1 and desferrioxamine in iron-loaded patients. *Lancet.* 1990 Nov 24;336(8726):1275-9.

168. Xia S, Zhang W, Huang L, Jiang H. Comparative efficacy and safety of deferoxamine, deferiprone and deferasirox on severe thalassemia: a meta-analysis of 16 randomized controlled trials. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e82662.
169. Pennell DJ, Berdoukas V, Karagiorga M, Ladis V, Piga A, Aessopos A, et al. Randomized controlled trial of deferiprone or deferoxamine in beta-thalassemia major patients with asymptomatic myocardial siderosis. *Blood*. 2006 May 01;107(9):3738-44.
170. Anderson LJ, Wonke B, Prescott E, Holden S, Walker JM, Pennell DJ. Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia. *Lancet*. 2002 Aug 17;360(9332):516-20.
171. Neufeld EJ. Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. *Blood*. 2006 May 01;107(9):3436-41.
172. Filosa A, Vitrano A, Rigano P, Calvaruso G, Barone R, Capra M, et al. Long-term treatment with deferiprone enhances left ventricular ejection function when compared to deferoxamine in patients with thalassemia major. *Blood Cells Mol Dis*. 2013 Aug;51(2):85-8.
173. Golriz M, Fonouni H, Nickkholgh A, Hafezi M, Garoussi C, Mehrabi A. Pig kidney transplantation: an up-to-date guideline. *Eur Surg Res*. 2012;49(3-4):121-9.
174. Treckmann J, Nagelschmidt M, Saad S, Hoffmann J, Waldmann K, Broelsch C, et al. Decreasing surgical complications in porcine kidney autotransplantation by a new technique of implantation. *Journal of Experimental Animal Science*. 2007;43(4):231-6.
175. Faure A, Maurin C, Bruzzese L, Rolland PH, Coulange C, Pype J, et al. An experimental porcine model of heterotopic renal autotransplantation. *Transplant Proc*. 2013 Mar;45(2):672-6.
176. Nicholson ML, Hosgood SA, Metcalfe MS, Waller JR, Brook NR. A comparison of renal preservation by cold storage and machine perfusion using a porcine autotransplant model. *Transplantation*. 2004 Aug 15;78(3):333-7.
177. La Manna G, Conte D, Cappuccilli ML, Nardo B, D'Addio F, Puviani L, et al. An in vivo autotransplant model of renal preservation: cold storage versus machine perfusion in the prevention of ischemia/reperfusion injury. *Artif Organs*. 2009 Jul;33(7):565-70.
178. Jochmans I, Lerut E, Heedfeld V, Wylín T, Pirenne J, Monbaliu D. Reproducible model for kidney autotransplantation in pigs. *Transplant Proc*. 2009 Oct;41(8):3417-21.

179. Snoeijs MG, Matthijsen RA, Seeldrayers S, Marcus MA, Daemen JW, Peutz-Kootstra CJ, et al. Autologous transplantation of ischemically injured kidneys in pigs. *J Surg Res.* 2011 Dec;171(2):844-50.
180. Ureteric injuries. In: Boffard KD, editor. *Manual of Definitive Surgical Trauma Care.* 3rd ed. London: International Association for Trauma Surgery and Intensive Care, Hodder Arnold; 2011. p. 140.
181. Gunabushanam V, Matas A, Humar A. Kidney Transplantation. In: Humar A, Sturdevant M, editors. *Atlas of Organ Transplantation.* 2nd ed. London: Springer; 2015. p. 130.
182. Paller MS, Hedlund BE. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. *Kidney Int.* 1988 Oct;34(4):474-80.
183. Sachs DH. The pig as a potential xenograft donor. *Vet Immunol Immunopathol.* 1994 Oct;43(1-3):185-91.
184. Glickstein H, El RB, Shvartsman M, Cabantchik ZI. Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: a fluorescence study of chelator action in living cells. *Blood.* 2005 Nov 01;106(9):3242-50.
185. 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.* 2000 Oct;14(13):1953-64.
186. 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.
187. Roberts LJ, 2nd, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta.* 1997 Apr 01;1345(2):121-35.
188. Ting HJ, Khasawneh FT. Platelet function and Isoprostane biology. Should isoprostanes be the newest member of the orphan-ligand family? *J Biomed Sci.* 2010 Apr 06;17(1):24.
189. 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 alpha and prevented by deferoxamine. *Liver Transpl.* 2014 Aug;20(8):904-11.
190. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery.* 2000 Feb;127(2):117-26.

191. Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 1999 Sep;277(3 Pt 2):R922-9.
192. Patel NS, Chatterjee PK, Di Paola R, Mazzon E, Britti D, De Sarro A, et al. Endogenous interleukin-6 enhances the renal injury, dysfunction, and inflammation caused by ischemia/reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Mar;312(3):1170-8.
193. Colletti LM, Remick DG, Campbell DA, Jr. Desferal attenuates TNF release following hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res*. 1994 Oct;57(4):447-53.
194. Turner ML. Cell adhesion molecules: a unifying approach to topographic biology. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1992 Aug;67(3):359-77.
195. Elangbam CS, Qualls CW, Jr., Dahlgren RR. Cell adhesion molecules--update. *Vet Pathol*. 1997 Jan;34(1):61-73.
196. Brady HR. Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int*. 1994 May;45(5):1285-300.
197. Bishop GA, Hall BM. Expression of leucocyte and lymphocyte adhesion molecules in the human kidney. *Kidney Int*. 1989 Dec;36(6):1078-85.
198. Zhou T, Sun GZ, Zhang MJ, Chen JL, Zhang DQ, Hu QS, et al. Role of adhesion molecules and dendritic cells in rat hepatic/renal ischemia-reperfusion injury and anti-adhesive intervention with anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody. *World J Gastroenterol*. 2005 Feb 21;11(7):1005-10.
199. Kelly KJ, Williams WW, Jr., Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest*. 1996 Feb 15;97(4):1056-63.
200. Koo SW, Casper KA, Otto KB, Gira AK, Swerlick RA. Iron chelators inhibit VCAM-1 expression in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*. 2003 May;120(5):871-9.
201. Zhang WJ, Frei B. Intracellular metal ion chelators inhibit TNFalpha-induced SP-1 activation and adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2003 Mar 15;34(6):674-82.
202. Kontoghiorghes GJ, Efsthathiou A, Kleanthous M, Michaelides Y, Kolnagou A. Risk/benefit assessment, advantages over other drugs and targeting methods in the use of deferiprone as a pharmaceutical antioxidant in iron loading and non iron loading conditions. *Hemoglobin*. 2009;33(5):386-97.

203. Kontoghiorghes GJ. Prospects for introducing deferiprone as potent pharmaceutical antioxidant. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2009 Jun 01;1:161-78.
204. Kontoghiorghes CN, Kolnagou A, Kontoghiorghes GJ. Antioxidant targeting by deferiprone in diseases related to oxidative damage. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2014 Jun 01;19:862-85.
205. Eybl V, Kotyzova D, Kolek M, Koutensky J, Nielsen P. The influence of deferiprone (L1) and deferoxamine on iron and essential element tissue level and parameters of oxidative status in dietary iron-loaded mice. *Toxicol Lett*. 2002 Mar 10;128(1-3):169-75.
206. Moridani MY, O'Brien PJ. Iron complexes of deferiprone and dietary plant catechols as cytoprotective superoxide radical scavengers(1). *Biochem Pharmacol*. 2001 Dec 15;62(12):1579-85.
207. van der Kraaij AM, van Eijk HG, Koster JF. Prevention of postischemic cardiac injury by the orally active iron chelator 1,2-dimethyl-3-hydroxy-4-pyridone (L1) and the antioxidant (+)-cyanidanol-3. *Circulation*. 1989 Jul;80(1):158-64.
208. Reuter DG, Tacker WA, Jr., Babbs CF, Badylak SF, Voorhees WD, 3rd, Konrad PE. Preliminary results of deferoxamine and L1 treatment of spinal cord ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995 May;109(5):1017-9.

