

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ**

**Χ Ε Ι Ρ Ο Υ Ρ Γ Ι Κ Ο Ι   Τ Ο Μ Ε Α Σ  
ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Ο ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α. Α. ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ: 1999-2000

ΑΡΙΘΜΟΣ: 1437

**Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ  
ΤΗΣ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΗΣ  
ΣΤΙΣ ΙΣΧΑΙΜΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ  
ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ  
ΗΠΑΤΙΚΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ  
ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ**

**ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ Β. ΒΡΟΧΙΔΗΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ  
ΣΤΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΟΥ ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2000**

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΕΩΝ**

**ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Ο ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α. Α. ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΕΤΟΣ: 1999-2000

ΑΡΙΘΜΟΣ:1437

**Η ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΤΗΣ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΗΣ  
ΣΤΙΣ ΙΣΧΑΙΜΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ  
ΚΑΤΑ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ  
ΗΠΑΤΙΚΩΝ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ ΣΕ ΕΠΙΜΥΕΣ**

**ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ Β. ΒΡΟΧΙΔΗΣ  
ΙΑΤΡΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΠΟΥ ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ  
ΣΤΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΟΥ ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

**ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2000**

## Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

<b>Α. Α. ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ,</b>	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
<b>Ε. ΓΙΑΚΟΥΣΤΪΔΗΣ,</b>	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
<b>Π. ΣΠΑΝΟΣ ,</b>	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

## Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

<b>Ε. ΓΙΑΝΝΟΥΛΗΣ,</b>	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
<b>Ν. ΕΥΓΕΝΙΔΗΣ,</b>	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
<b>Ε. ΝΕΝΟΠΟΥΛΟΥ,</b>	ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
<b>Μ. ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ,</b>	ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2).

**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΙΑΤΡΙΚΟ ΤΜΗΜΑ**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ: Ο ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α. ΤΟΥΡΚΑΝΤΩΝΗΣ**

Στους γονείς μου,  
Μάγδα και Βασίλη,  
των οποίων η καλοσύνη και η εργατικότητα  
οδηγούν πάντα τα βήματα μου

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ		v
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ		ix
ΠΡΟΛΟΓΟΣ		1
Α.	Γενικά	1
Β.	Ευχαριστίες	2
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		5
Α.	Υαλουρονάνη	7
1.	Ιστορική αναδρομή και ονοματολογία	7
2.	Δομή	7
α.	Πρωτοταγής δομή, μοριακό βάρος και γραμμικό μέγεθος	7
β.	Δευτεροταγής δομή	10
γ.	Τριτοταγής δομή και μοριακό σχήμα	11
δ.	Τεταρτοταγής δομή	12
3.	Φυσικοχημικές ιδιότητες	13
α.	Γενικά	13
β.	Ιξώδες και ελαστικότητα	13
γ.	Ωσμωτικότητα	17
δ.	Υδατική διαπερατότητα	17
ε.	Ιονισμός και άλατα	18
4.	Βιοσύνθεση	18
α.	Μοντέλο	18
β.	Συνθάσεις	20
γ.	Ρύθμιση	20
5.	Καταβολισμός	21
α.	Γενικά	21
β.	Ιστικός καταβολισμός	22
γ.	Λεμφαδενικός καταβολισμός	22
δ.	Ηπατικός καταβολισμός	22
6.	Ιστική κατανομή	25
α.	Αδρή κατανομή	25
β.	Ειδική κατανομή	26
7.	Υαλουρονασσυγκολλητίνες	28
α.	Γενικά	28
β.	Υαλουρονασσυγκολλητίνες εξωκυττάριου χώρου	29
γ.	Υαλουρονασσυγκολλητίνες κυτταροπλασματικής μεμβράνης	30
8.	Βιολογική σημασία	32
α.	Η υαλουρονάνη ως μακρομόριο	32
i.	Δομή εξωκυττάριου χώρου	32
ii.	Στερικός αποκλεισμός	33
iii.	Απενεργοποίηση ελεύθερων ριζών O <sub>2</sub>	33
iv.	Λίπανση κινούμενων επιφανειών	33
v.	Κατακράτηση νερού (οίδημα)	33
β.	Οι αλληλεπιδράσεις της υαλουρονάνης με τα κύτταρα	34
i.	Κυτταρικός πολλαπλασιασμός	34
ii.	Μετανάστευση	35

	iii.	Διαφοροποίηση	36
	iv.	Φαγοκυττάρωση	37
	v.	Σηματογωγά συστήματα	37
9.		Κλινικές εφαρμογές	38
	α.	Μέτρηση ενδογενούς υαλουρονάνης	38
	β.	Προσθήκη εξωγενούς υαλουρονάνης	40
B.		Υαλουρονιδάσες	43
	1.	Κατηγορίες υαλουρονιδασών	43
	2.	Υπόστρωμα δράσης υαλουρονιδασών	43
	3.	Κλινικές εφαρμογές υαλουρονιδασών	45
	4.	Ορχεική υαλουρονιδάση	45
Γ.		Ηπατική μεταμόσχευση σε αρουραίους	47
	1.	Ορθοτοπική τεχνική	47
	α.	Γενικά	47
	β.	Ιστορική αναδρομή	48
	γ.	Τρέχουσα τεχνική	48
	i.	Εισαγωγή	48
	ii.	Λήψη του μοσχεύματος	49
	iii.	Τοποθέτηση των cuff	49
	iv.	Τοποθέτηση του μοσχεύματος	50
	2.	Ετεροτοπική τεχνική	51
	α.	Γενικά	51
	β.	Ιστορική αναδρομή	52
	γ.	Τρέχουσα τεχνική	52
	i.	Λήψη του μοσχεύματος	52
	ii.	Προετοιμασία του μοσχεύματος	54
	iii.	Τοποθέτηση του μοσχεύματος	54
Δ.		Βλάβες ηπατικού μοσχεύματος λόγω συντήρησης	56
	1.	Εισαγωγή	56
	2.	Βλάβες ισχαιμίας	58
	α.	Γενικά	58
	β.	Εκλυτικοί παράγοντες βλαβών ηπατικού μοσχεύματος λόγω ισχαιμίας	58
	i.	Οξέωση	58
	ii.	Κατανάλωση ενδοκυττάρου ATP και ADP	59
	iii.	Αναστολή λειτουργίας κυτταρικής αντλίας Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>	59
	γ.	Χαρακτήρες βλαβών ηπατικού μοσχεύματος λόγω ισχαιμίας	59
	3.	Βλάβες επαναιμάτωσης	59
	α.	Εκλυτικοί παράγοντες βλαβών ηπατικού μοσχεύματος λόγω επαναιμάτωσης	59
	i.	Γενικά	60
	ii.	Ελεύθερες ρίζες O <sub>2</sub>	60
	iii.	PLA <sub>2</sub>	63
	iv.	PAF	63
	v.	Κυτοκίνες	64
	vi.	Πρωτεάσες	65
	vii.	Εικοσανοειδή	65
	viii.	NO	65
	ix.	Ενδοθηλίνες	66
	x.	Ενδοτοξίνη	67
	xi.	Ca <sup>2+</sup>	67

	β.	Χαρακτήρες βλαβών ηπατικού μοσχεύματος λόγω επαναιμάτωσης	68
	i.	Άμεση κυτταρική καταστροφή	68
	ii.	Βλάβη ενδοθηλιακών κυττάρων ηπατικών κολλοειδών	68
	iii.	Αύξηση προσκολλητικότητας λευκοκυττάρων	69
	iv.	Αύξηση προσκολλητικότητας και συγκολλητικότητας αιμοπεταλίων	71
	v.	Αύξηση πηκτικής ικανότητας αίματος μέσα στο μόσχευμα	72
E.		Προφύλαξη του ηπατικού μοσχεύματος από τη συντήρηση - Ισχύουσες απόψεις	73
	1.	Ιστορική αναδρομή	73
	2.	Προσυντήρηση	73
	a.	Επιλογή δότη	73
	β.	Διατροφική κατάσταση δότη	74
	γ.	Ειδική φαρμακευτική αγωγή δότη	74
	i.	Γενικά	74
	ii.	Λαζαροειδή	75
	iii.	Βιταμίνες	75
	iv.	Ανοσοσφαιρίνες	75
	v.	Αναστολείς της δράσης των κυττάρων Kupffer.	76
	3.	Συντήρηση - Φάση ισαιμίας	76
	a.	Εισαγωγή	76
	β.	Έκπλυση	76
	γ.	Ψύξη	77
	δ.	Εμπλουτισμός διαλυμάτων συντήρησης	77
	i.	Γενικά	77
	ii.	Κολλοειδή	78
	iii.	Μέσου μοριακού βάρους ωσμωνεργές ουσίες	79
	iv.	Ινσουλίνη	80
	v.	ATP-MgCl <sub>2</sub> και αδενοσίνη	81
	vi.	Αποκλειστές διαύλων Ca <sup>2+</sup> τύπου διυδροπιριδίνης	81
	vii.	Γλουταθειόνη	81
	viii.	Αλλοπουρινόλη	81
	ix.	Αναστολείς της λευκοκυτταρικής προσκόλλησης	82
	x.	Προσταγλανδίνες	83
	xi.	Χλωροπρομαζίνη	82
	xii.	Γλυκίνη και ιστιδίνη	82
	xiii.	Δεξαμεθαζόνη	83
	e.	Σύσταση εμπορικών διαλυμάτων συντήρησης	83
	4.	Απομάκρυνση διαλύματος συντήρησης - Φάση επαναιμάτωσης	83
	a.	Εισαγωγή	83
	β.	Σύσταση διαλυμάτων απομάκρυνσης	83
	i.	Διάλυμα RL	83
	ii.	Διάλυμα ανοσοτροποποιημένων ερυθρών	86
	iii.	Διάλυμα Carolina	86
	γ.	Θερμοκρασία διαλυμάτων απομάκρυνσης	86
	δ.	Οξυγόνωση διαλυμάτων απομάκρυνσης	87
	5.	Συνοπτική ισχύουσα προσέγγιση συντήρησης ηπατικών μοσχευμάτων	87
ΣΤ.		Προφύλαξη του ηπατικού μοσχεύματος από τη συντήρηση - Προτεινόμενη προσέγγιση	89
	1.	Γενικά	89
	2.	Προηγούμενες έρευνες	90



	3.	Καταβολισμός περικυτταρικής γέλης	90
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ			93
A.		Πειραματικό υλικό	95
	1.	Πειραματοζώα	95
	2.	Πειραματικός σχεδιασμός	95
B.		Μέθοδοι	102
	1.	Μεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους - Τεχνική ενός ατόμου	102
	a.	Αήψη του μοσχεύματος	102
	β.	Τοποθέτηση των cuff	106
	γ.	Τοποθέτηση του μοσχεύματος	108
	2.	Μονιμοποίηση ιστικών τεμαχίων ήπατος	114
	a.	Διάλυμα μονιμοποίησης	114
	β.	Εγκλεισμός σε παραφίνη - Τομές	114
	3.	Προσδιορισμός ιστικής υαλουρονάνης	114
	a.	Ποιοτικός προσδιορισμός	114
	β.	Ποσοτικός προσδιορισμός	115
	4.	Μέτρηση δεικτών βιωσιμότητας μοσχεύματος	116
	a.	Υαλουρονόνη ορού	116
	β.	Άλλοι δείκτες βιωσιμότητας	117
	5.	Στατιστική ανάλυση	118
Γ.		Αποτελέσματα	119
	1.	Αξιοπιστία τεχνικής ενός ατόμου	119
	2.	Συντήρηση μοσχεύματος με την προσθήκη υαλουρονιδάσης	120
	a.	Βέλτιστη συγκέντρωση υαλουρονιδάσης	120
	β.	Επιβίωση πειραματοζώων	123
	γ.	Δείκτες βιωσιμότητας μοσχευμάτων	125
	i.	Υαλουρονόνη ορού	125
	ii.	Άλλοι δείκτες βιωσιμότητας	129
	δ.	Οπτική μικροσκόπηση - Χρώσεις	131
	ε.	Ποσοτική μέτρηση ιστικής υαλουρονάνης μοσχευμάτων	135
	στ.	Οίδημα μοσχευμάτων	135
ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ			137
A.		Τεχνική ενός ατόμου	139
B.		Συντήρηση με υαλουρονιδάση	141
ΠΕΡΙΛΗΨΗ			147
SUMMARY			149
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ			151
A.		Κύρια	151
B.		Μη σχετιζόμενη με παραπομπές	161



# ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AC:	AcetyloCholine
ADH:	AntiDiuretic Hormone
ADP:	Adenosine DiPhosphate acid
ANOVA:	Analysis Of VAriances
AP 1:	Activating Protein - 1
ARDS:	Adult Respiratory Distress Syndrome
ATP:	Adenosine TriPhosphate acid
BEHAB:	Brain-Enriched HyAluronan Binding protein
BSA:	Bovine Serum Albumin
bFGF:	basic Fibroblast Growth Factor
CaM:	CalModulin
cAMP:	cyclic Adenosine MonoPhosphate acid
cGMP:	cyclic Guanosine MonoPhosphate acid
CD 11:	Cluster Differentiation 11
CD 18:	Cluster Differentiation 18
CD 44:	Cluster Differentiation 44
CD 44 H:	Cluster Differentiation 44 Haematopoeitic
CD 62:	Cluster Differentiation 62
cm:	centimeter/s
CoA:	Coenzyme A
CPK-BB:	Creatine Phosphate Kinase - BB
d:	day/s
D:	Dalton/s
D5:	Dextrose 5%
dl:	deciliter/s
ECM:	ExtraCellular Matrix
EGF:	Epidermal Growth Factor
ELAM 1:	Endothelial and Leukocyte Adhesion Molecule - 1
FSH:	Follicle Stimulating Hormone
G-6-P:	Glucose - 6 - Phosphate
gr:	gram/s
HABP:	HyAluronan Binding Protein
HABP 102:	HyAluronan Binding Protein - 102
has:	hyaluronan synthase
HAS:	HyAluronan Synthase
HFR:	Hydroxyl Free Radicals
Hz:	Herz/s
h:	hour/s
HARC:	HyAluronan Receptor Complex
hu:	human
HYA:	HYAluronan
HYADASE:	HYAluroniDASE
ICAM 1:	InterCellular Adhesion Molecule - 1
IGF-1:	Insulin-like Growth Factor - 1
I-κBa:	Inhibitor of kappa Ba

IL-1:	Interleukin - 1
IL-1b:	InterLeukin - 1b
IL-6:	InterLeukin - 6
IL-8:	InterLeukin - 8
i-NOS:	inducible Nitric Oxide Synthase
IU:	International Unit/s
kD:	kiloDalton/s
kg:	kilogram
LDH-H <sub>4</sub> :	Lactate DeHydrogenase - H <sub>4</sub>
LDH-M <sub>4</sub> :	Lactate DeHydrogenase - M <sub>4</sub>
LEC:	Liver Endothelial Cells
log:	logarithm
LRF:	Leukocyte Rolling Factors
lt:	liter/s
LTB <sub>4</sub> :	LeukoTriene B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub> :	LeukoTriene C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub> :	LeukoTriene D <sub>4</sub>
M:	Molarity
MHC II:	Major Histocompatibility Complex II
min:	minute/s
MIP 1a:	Macrophage Inflammatory Protein - 1a
MIP 1b:	Macrophage Inflammatory Protein - 1b
mg:	milligram/s
ml:	milliliter/s
MLCK:	Myosine Light Chain Kinase
mm:	millimeter/s
mmol:	millimole/s
mOsm:	miliOsmol/s
mPas:	miliPascal/s
mRNA:	messenger RiboNucleic Acid
mu:	murine
NF-kb:	Nuclear Factor kappa b
nm:	nanometer/s
NO:	Nitric Oxide
NS:	Normal Saline
OFR:	Oxygen Free Radicals
PAF:	Platelet Activating Factor
PBS:	Phosphate Buffered saline Solution
PC:	Parenchymal Cells
PDGF-AB:	Platelet Derived Growth Factor - AB
PDGF-BB:	Platelet Derived Growth Factor - BB
PGE:	ProstaGlandin E
PGE <sub>1</sub> :	ProstaGlandin E <sub>1</sub>
PGE <sub>2</sub> :	ProstaGlandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>1</sub> :	ProstaGlandin F <sub>1</sub>
PI 3:	Phosphatidyl - 3 - Inositol
PKA:	Protein Kinase A

PKC:	Protein Kinase C
PLA <sub>1</sub> :	PhosphoLipase A <sub>1</sub>
PLA <sub>2</sub> :	PhosphoLipase A <sub>2</sub>
PLC-γ:	PhosphoLipase C - γ
PNF:	Primary Non - Function
PTH:	ParaThyroid Hormone
RANTES:	Regulated upon Activation, Normal T Expressed and presumably Secreted
RHAMM:	Receptor for HyAluronan Mediated Motility
ROI:	Reactive Oxygen Intermediates
RL:	Ringer's Lactate
sec:	second/s
SEC:	Sinusoidal Endothelial Cells
SHAP:	Serum derived Hyaluronate Associated Protein
STAT 1:	Signal Transducers and Activators of Transcription - I
TGF-β:	Transforming Growth Factor - β
TGF-βI:	Transforming Growth Factor - βI
TK:	Thymidine Kinase
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TNF-α:	Tumor Necrosis Factor - α
TPA:	12 - ortho - Tetradecanoyl - Phorbol - 13 - Acetate
TRIS:	TRISma base
TS 6:	Tumor necrosis factor Stimulated gene - 6
TX:	ThromboXane
TXA <sub>2</sub> :	ThromboXane A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub> :	ThromboXane B <sub>2</sub>
U:	Units
UDP:	Uridine DiPhosphate acid
UW:	University of Winsconsin
VCAM 1:	Vascular Cell Adhesion Molecule - I
VIP:	Vasoactive Intestinal Peptide
XO:	Xanthine Oxidase
γ-INF:	γ - ιντερφερόνη
μg:	μικρογραμμάρια/α
μm:	μικρόμετρο/α
μmol:	micromole/s

# ΠΡΟΛΟΓΟΣ

## A. ΓΕΝΙΚΑ

Η ανάπτυξη και καθιέρωση της μεταμόσχευσης ήπατος για τη θεραπεία της ηπατικής ανεπάρκειας (οξείας ή χρόνιας) άλλαξε δραματικά το προσδόκιμο επιβίωσης των ηπατοπαθών αρρώστων[1, 2]. Η συγκεκριμένη επέμβαση έπαψε να θεωρείται πειραματική διαδικασία αλλά κλινική θεραπεία, ύστερα από τις εργασίες του συνεδρίου "Consensus Development Conference of the National Institutes of Health", το οποίο πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο του 1983[3].

Σε κάθε ηπατικό μόσχευμα προκαλούνται βλάβες κατά τη διάρκεια της συντήρησής του. Εξαπίας των βλαβών αυτών μερικά όργανα δεν μπορούν να επαναλειτουργήσουν (πρωτοπαθής μη λειτουργία), ενώ κάποια άλλα εμφανίζουν σημαντικές διαταραχές[4-7] (πρωτοπαθής δυσλειτουργία). Η χρήση του UW για τη συντήρηση των οργάνων βελτίωσε σημαντικά τα αποτελέσματα των ηπατικών μεταμοσχεύσεων[8]. Παρ' όλα αυτά, οι βλάβες συντήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων εξακολουθούν να παρουσιάζονται σε ποσοστά έως και 20%, με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο του λήπτη[9-11]. Μία από τις αιτίες για την εμφάνιση του υψηλού αυτού ποσοστού, αποτελεί το γεγονός ότι τμήματα του ηπατικού μοσχεύματος καθίστανται κατά το στάδιο της ψυχρής ισχαιμίας μη αρδεύσιμα, εξαιτίας των επικείμενων (κατά την επαναιμάτωση) διαταραχών της μικροκυκλοφορίας. Ανάμεσα στα αίτια που προκαλούν τις διαταραχές αυτές συγκαταλέγεται και η ενυδάτωση ουσιών του διαμεσοκυττάριου χώρου που συμπεριφέρονται σε γέλη[12, 13].

Η χρησιμοποίηση αουραιών για τη μελέτη ανοσολογικών προβλημάτων που σχετίζονται με τις μεταμοσχεύσεις οργάνων υπερέχει σημαντικά σε σχέση με άλλα πειραματόζωα[14, 15]. Ωστόσο, η Ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος στους αουραιούς συνοδεύεται από πολλαπλά διεγχειρητικά προβλήματα, τα οποία αποτρέπουν την ευρεία εφαρμογή του πειραματικού αυτού μοντέλου. Η χρησιμοποίηση cuff στη διενέργεια των αγγειακών αναστομών επέλυσε κάποια από τα προβλήματα αυτά και οδήγησε στη μείωση των απωλειών πειραματοζώων[16].

Η υαλουρονάνη είναι ένας υψηλού μοριακού βάρους πολυσακχαρίτης του εξωκυττάριου στρώματος. Στην υαλουρονάνη έχουν αποδοθεί ποικίλες βιολογικές και φυσιολογικές λειτουργίες, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται η ομοιοστασία του νερού και των πρωτεϊνών του πλάσματος, καθώς και η προαγωγή του κυπαρικού πολλαπλασιασμού και της κυπαρικής μετανάστευσης[17, 18]. Όσον αφορά στην ομοιοστασία του νερού, ο πολυσακχαρίτης αυτός ευθύνεται για σημαντική υδατική κατακράτηση. Το μέγεθος της κατακράτησης αυτής ανέρχεται σε 1 lt νερού / mole υαλουρονάνης[19]. Στον ηπατικό ιστό ο πολυσακχαρίτης εδράζεται περιαγγειακά και περιχολαγγειακά[20]. Με βάση τα προαναφερόμενα, στην υαλουρονάνη αποδίδεται η ανάπτυξη περιαγγειακού οιδήματος[21]. Ο πολυσακχαρίτης καταβολίζεται από ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των υαλου-

ρονιδασών[22, 23].

Σήμερα είναι γνωστό πως οι ουσίες του διαμεσοκυττάριου χώρου που συμπεριφέρονται σα γέλη[12, 13] και οι οποίες ευθύνονται για τις διαταραχές της μικροκυκλοφορίας του μοσχεύματος ταυτίζονται με την υαλουρονάνη. Στην παρούσα μελέτη λοιπόν γίνεται η υπόθεση πως όταν ο ιστικός πολυσακχαρίτης ενυδατώνεται κατά τη διάρκεια της παραμονής των μοσχευμάτων στα διαλύματα συντήρησης, επεκτείνεται, με αποτέλεσμα τη δημιουργία εξωκυττάριου, περιαγγειακού οιδήματος[21,24]. Ο καταβολισμός του πολυσακχαρίτη με τη χρήση υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης του ηπατικού μοσχεύματος θα μπορούσε να οδηγήσει στην αφυδάτωση του εξωκυττάριου (περιαγγειακού) χώρου και στην επιστροφή του στην προοιδηματική αρχιτεκτονική διαμόρφωση. Φυσικά, η ελάτωση του περιαγγειακού οιδήματος συντήρησης του ηπατικού μοσχεύματος έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη επαναϊμάτωση και επομένως τη βελτιωμένη λειτουργία του οργάνου.

## **B. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής του Ιατρικού τμήματος του Α.Π.Θ., κύριο επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής και δάσκαλό μου, κ. Αντώνιο Α. Αντωνιάδη για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την παρούσα μελέτη. Επιπλέον, τον ευχαριστώ για τις διορθώσεις, τις υποδείξεις, την κριτική και την καθοριστική καθοδήγηση, δίχως τις οποίες θα ήταν αδύνατη η συγγραφή της διατριβής. Τέλος, τον ευχαριστώ για την απεριόριστη υπομονή και κατανόηση του.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους κ.κ. Ευθύμιο Γιακουσιδίδη, Καθηγητή Χειρουργικής του Ιατρικού τμήματος του Α.Π.Θ. και Παναγιώτη Σπανό, Καθηγητή Καρδιοχειρουργικής του Ιατρικού τμήματος του Α.Π.Θ. Οι προαναφερόμενοι, ως μέλη της τριμελούς επιτροπής της διδακτορικής μου διατριβής, παρακολούθησαν την πορεία των πειραμάτων και με τις επικριτικές συμβουλές τους συνέβαλαν σημαντικά στη δημιουργία του παρόντος πονήματος.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης στο Χειρουργό, Αναπληρωτή Διευθυντή του ΕΣΥ. κ. Βασίλειο Παπανικολάου για το χρόνο που μου αφιέρωσε διδάσκοντας και παρακολουθώντας την εκτέλεση του τεχνικού μέρους, τόσο στη Σουηδία όσο και στην Ελλάδα, διαδραματίζοντας έτσι βασικό ρόλο στη συγγραφή της διδακτορικής μου διατριβής. Επιπλέον, τον ευχαριστώ γιατί, χωρίς τη διαμεσολάβησή του, θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίηση ικανού τμήματος των πειραμάτων στα εργαστήρια του BMC, στο πανεπιστήμιο της Ουψάλας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά το Χειρουργό, Επιμελητή Α' του ΕΣΥ. κ. Δημήτριο Γάκη για τις πολλές ώρες εργασίας του στο πειραματικό χειρουργείο, χωρίς τις οποίες θα ήταν αδύνατη η εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στον αγαπητό φίλο, Χειρουργό, Επιστημονικό Συνεργάτη της Χειρουργικής Κλινικής Μεταμοσχεύσεων, κ. Ιωάννη Φούζα για τους επιστημονικούς δρόμους που μου άνοιξε και για τις χειρουργικές βάσεις που μου έδωσε.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Ιατρικού τμήματος του Α.Π.Θ., κ. Δημήτριο Χριστοδούλου για την καθοδήγηση στην επιλογή μου σχετικά με το αντικείμενο της κλινικής μου σταδιοδρομίας.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τους κ.κ. Είη Heldin, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας του Πανεπιστημίου της Ουψάλας και Torvard C. Laurent, Καθηγητή Βιοχημείας του Πανεπιστημίου της Ουψάλας, πρώην Πρόεδρο της Επιτροπής Απονομής Βραβείων Nobel. Οι προαναφερόμενοι συνέβαλαν τα μέγιστα στον καθορισμό θέματος της διδακτορικής μου διατριβής.

Πολλές ευχαριστίες οφείλω επίσης στους κ.κ. Φανή Ντογραμματζή, Βιοχημικό, Καλλιόπη Πατσιαούρα, Παθολογοανατόμο, Επιμελήτρια Α' του ΕΣΥ, και Χάρη Χατζηκωνσταντίνου, Βιοχημικό, Διευθυντή του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Ιπποκρατείου Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης. Οι προαναφερόμενοι συνέβαλαν αποφασιστικά στην παραγωγή και ανάλυση πειραματικών δεδομένων από τμήματα του παρόντος πονήματος.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τους κ.κ. Δημήτριο Τακούδα, Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής του Ιατρικού τμήματος του Α.Π.Θ., Γεώργιο Βέργουλα, Νεφρολόγο, Αναπληρωτή Διευθυντή του ΕΣΥ., Γεώργιο Ίμβριο, Χειρουργό, Επιμελητή Α' του ΕΣΥ., Ανδρέα Παπαγιάννη, Χειρουργό, Επιμελητή Α' του ΕΣΥ., Γεώργιο Βισβάρδη, Νεφρολόγο, Επιμελητή Β' του ΕΣΥ., Ελένη Κατσικά, Αναισθησιολόγο, Επιμελητή Β' του ΕΣΥ., Γρηγόριο Μυσερλή, Νεφρολόγο, Επιμελητή Β' του ΕΣΥ., Φυλλιώ Σολωνάκη, Νεφρολόγο, Επιμελητή Β' του ΕΣΥ. και Μιχάλη Μαντέλα, Ειδικευόμενο Χειρουργικής. Οι προαναφερόμενοι, ως προσωπικό της Χειρουργικής Κλινικής Μεταμοσχεύσεων, βοήθησαν σημαντικά στην πραγματοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω επίσης στους κ.κ. Βασιλική Λαγκάζαλη, Προϊσταμένη της Χειρουργικής Κλινικής Μεταμοσχεύσεων, Αναγνώστη Αγγελίδη, Παρασκευαστή, Kaisa Lilja, Παρασκευάστρια, Marianne Svarvare, Παρασκευάστρια, Dagny Ytterberg, Παρασκευάστρια, Κωνσταντίνο Πουρπουτίδη, Ζωοκόμο και Θεοδώρα Σπαροπούλου, Ζωοκόμο για την έξοχη τεχνική υποστήριξη που πρόσφεραν κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην ευχαριστήσω τους κ. κ. Αθανασία Αρβαντιτίδου, Σταύρο Καραμανλίδη, Σωτήριο Σιγκούνα, Παναγιώτη Τσιρκινίδη και Νικόλαο Χατζηχρίστο για την επιμέλεια των παρουσιάσεων της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης, στη συγγραφή του παρόντος πονήματος βοήθησαν οι κ.κ. Α. Αποστόλου, Ε. Αρκομάνη, Σ. Αυγερινός, Σ. Βογιατζή, Γ. Γαλακτίδου, Β. Γεωργάκη, Α. Δουλγερίδου, Δ. Κουτσαφάρα, Ε. Κυρίτσης,

Δ. Λιάπης, Ε. Λόρτου, Ε. Μανωλόπουλος, Χ. Μικέ, Μ. Μιλτσούδη, Α. Μοσχόπουλος, Μ. Νταουντάκη, Κ. Πάχτα, Α. Ποταμοπούλου, Α. Σαλαμού, Δ. Σαχπαζίδου, Α. Σιδηρά, Γ. Σιώκης, Ν. Τράντα, Β. Τριανταφυλλίδου, Α. Τσαχουρίδης, Ε. Τσιρέλλα, Ε. Τσομπανόγλου, Η. Pertoft, Β. Smedsrod και J. Wahlberg.

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους κ.κ. Χ. Βραγγάλα, Β. Γαβριηλίδη, Β. Διαγουμά, Μ. Ευσταθιάδη, Κ. Κατώπη, Ι. Μαρλάκα, Σ. Μπένη, Χ. Μπένη, Μ. Μπινοπούλου, Ι. Μπράβο, Μ. Οικονόμου, Χ. Οικονόμου, Κ. Τσακίρη, Λ. Χαβούζη, Ο. Χατζηχρίστου, Ε. Χατζοπούλου, Α. L. Louboutin και Μ. Thuneson για τη βοήθεια τους στην πραγματοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής.



## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

# A. ΥΑΛΟΥΡΟΝΑΝΗ

## I. Ιστορική αναδρομή και ονοματολογία

Ο πολυσακχαρίτης υαλουρονάνη ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στο υαλοειδές σώμα του οφθαλμού το 1934 από τους Meyer και Palmer[25]. Κατόπιν και έως το 1947 απομονώθηκε από τον ομφάλιο λώρο, το υδατοειδές υγρό του οφθαλμού, το αρθρικό υγρό και το δέρμα[26].

Αρχικά, η υαλουρονάνη είχε ονομαστεί υαλουρονικό οξύ επειδή πρωτοαπομονώθηκε στο υαλοειδές σώμα και βρέθηκε να περιέχει ουρονικό οξύ. Η επίσημη μετονομασία του υαλουρονικού οξέως σε υαλουρονάνη πραγματοποιείται το 1985[27]. Η νέα ονομασία καταργεί την ανάγκη καθορισμού του καπόντος που συνδέεται με το υαλουρονικό ανιόν στις *in vivo* συνθήκες. Επιπλέον, εναρμονίζει την ονοματολογία όλων των συναφών πολυσακχαρπών. Συγκεκριμένα, η υαλουρονάνη, η θειική κερατάνη, η θειική ηπαράνη, η θειική χονδρότινη και η ηπαρίνη αποτελούν την ομάδα των γλυκοζαμινογλυκανών[28]. Με την εξαίρεση της υαλουρονάνης, όλες οι γλυκοζαμινογλυκάνες συνδέονται ομοιοπολικά με πεπτιδία[29] (πρωτεογλυκάνες). Οι γλυκοζαμινογλυκάνες μαζί με τα φυτικές προέλευσης πολυουρονικά οξέα αποτελούν την ομάδα των όξινων βλενοπολυσακχαρπών.

Η πρωτοταγής δομή της υαλουρονάνης καθορίστηκε από το Meyer τη δεκαετία του '50[30]. Για πολλά χρόνια η βιολογική σημασία του πολυσακχαρίτη αυτού παρέμενε ένα αίνιγμα. Οι περισσότεροι ερευνητές θεωρούσαν την υαλουρονάνη κατάλληλη μόνο για να γεμίζει το μεσοκυπάριο χώρο[17]. Όμως, κατά τις αρχές της δεκαετίας του '80, ύστερα από την καθιέρωση εύχρηστων και αξιόπιστων μεθόδων ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού της[31], η υαλουρονάνη απέσπασε τη διεθνή επιστημονική προσοχή. Κάτω από την καθοδήγηση των πρωτοπόρων στην έρευνα της υαλουρονάνης E. A. Balazs και T. C. Laurent σχηματίστηκαν ερευνητικές ομάδες οι οποίες αποσαφήνισαν την ιστική κατανομή[32], το μεταβολισμό[33], τη βιολογική σημασία[34] και τις κλινικές εφαρμογές του πολυσακχαρίτη αυτού[35, 36]. Επίσης, κατά τις αρχές της δεκαετίας του '90, ύστερα από την "έκρηξη" των τεχνικών μελέτης του DNA, άρχισαν να αποσαφηνίζονται οι γονιδιακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη σύνθεση της υαλουρονάνης[37].

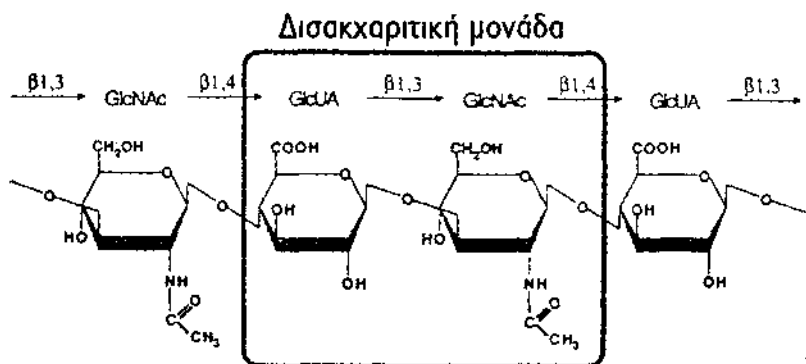
Αν και η διερεύνηση των κλινικών εφαρμογών χρήσης και μέτρησης του πολυσακχαρίτη αυτού έχει μόλις αρχίσει, υπόσχεται πολλά και πιθανόν να γνωρίσει αλματώδη ανάπτυξη την επόμενη εικοσαετία.

## 2. Δομή

### α. Πρωτοταγής δομή, μοριακό βάρος και γραμμικό μέγεθος

Η υαλουρονάνη είναι ένας γραμμικός πολυμερής υδατάνθρακας[38]. Με ποικίλες φυσικοχημικές

και ενζυμικές μεθόδους έχει αποδειχθεί ότι η βασική δομική του μονάδα είναι ο δισακχαρίτης [D-γλυκουρονικό οξύ (1-β-3) N-ακετυλο-O-γλυκοζαμίνη (1-β-4)]. Επομένως, η πρωτοταγής δομή της υαλουρονάνης απεικονίζεται με τον τύπο [D-γλυκουρονικό οξύ (1-β-3) N-ακετυλο-υ-γλυκοζαμίνη (1-β-4)]<sub>n</sub>, όπου η ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων δισακχαριτών που ανιχνεύονται σε ένα μόριο της (Εικόνα Γ/Α2.1).



**Εικόνα Γ/Α2.1:** Η πρωτοταγής δομή της υαλουρονάνης. GlcNAc N-ακέτυλο-D-γλυκοζαμίνη. GluUA: γλυκουρονικό οξύ.

Το μοριακό βάρος της υαλουρονάνης καθορίζεται από τον αριθμό η των δισακχαριτών που ανιχνεύονται στο μόριο της. Το μοριακό βάρος του κάθε δισακχαρίτη είναι 400 D[34]. Κατά συνέπεια, ένα μόριο υαλουρονάνης που αποτελείται από 2500 δισακχαρίτες (δηλαδή η=2500) έχει μοριακό βάρος 1X10<sup>6</sup> D. Η υαλουρονάνη που απομονώνεται από διάφορους ιστούς θηλαστικών εμφανίζει ποικίλα μοριακά βάρη (Πίνακας Γ/Α2.1). Συγκεκριμένα, η υαλουρονάνη που βρίσκεται στο ανθρώπινο αρθρικό υγρό έχει μοριακό βάρος 7X10<sup>6</sup> D[39], ενώ αυτή που ανιχνεύεται στον ανθρώπινο ομφάλιο λώρο 4X10<sup>6</sup> D[40]. Επιπλέον, η υαλουρονάνη που απεκκρίνεται στα κυκλοφορούντα σωματικά υγρά, η υαλουρονάνη που ανιχνεύεται στους γερασμένους ιστούς και η υαλουρονάνη που απομονώνεται από φλεγμαίνοντες ιστούς υφίστανται διάφορου βαθμού καταβολισμό, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν μειωμένο μοριακό βάρος. Έτσι, η υαλουρονάνη του αίματος έχει μοριακό βάρος 200000 D[41], η υαλουρονάνη του γερασμένου (90 ετών) ανθρώπινου αρθρικού χόνδρου 300000 D[42] και η υαλουρονάνη του φλεγμαίνοντος (ρευματοειδής αρθρίτιδα) ανθρώπινου αρθρικού υγρού 4X10<sup>6</sup> D[39] (Πίνακας Γ/Α2.1). Αυτή η μείωση του μοριακού βάρους αποδίδεται σε προσρόφηση των μεγαλύτερων πολυμερών από μεταβολικούς υποδοχείς[43, 44] (λεμφαδένες, ήπαρ, κ.τ.λ.), σε ενζυμική δραστηριότητα[38], σε μηχανική διάσπαση[38], σε επίδραση των OFR[45] και σε τροποποιήσεις στη διαδικασία παραγωγής της υαλουρονάνης[42].

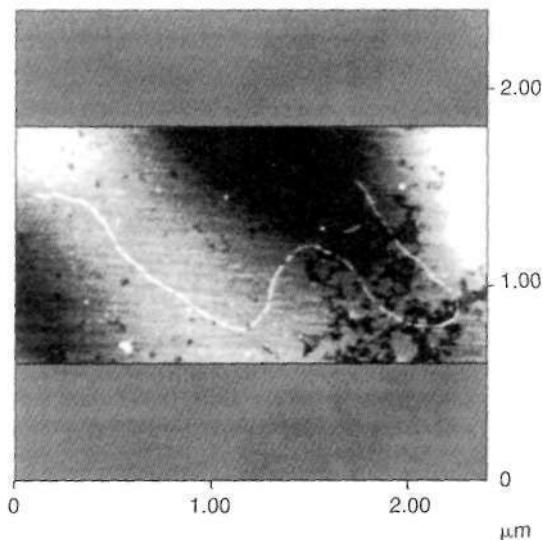
Το γραμμικό μέγεθος του μορίου της υαλουρονάνης, δηλαδή το μήκος της αλύσου του πολυσακχαρίτη, καθορίζεται από τον αριθμό η των δισακχαριτών που ανιχνεύονται στο μόριο της. Το μήκος του κάθε δισακχαρίτη είναι 1 ημ[38]. Κατά συνέπεια, ένα μόριο υαλουρονάνης που αποτε-

Ιστός	Μοριακό βάρος ( $\times 10^6$ D)	Βιβλιογραφία
Ομφάλιος λώρος ανθρώπου	4	40
Αμνιακό υγρό ανθρώπου	2	352
Αρθρικός χόνδρος ανθρώπου (μικρής ηλικίας)	2	42
Αρθρικός χόνδρος ανθρώπου (μεγάλης ηλικίας)	0,3	42
Αρθρικό υγρό ανθρώπου (φυσιολογικό)	7	39
Αρθρικό υγρό ανθρώπου (φλεγμονώδες)	4	39
Υαλώδες σώμα ανθρώπου	4	353
Δέρμα ανθρώπου	1	20
Λέμφος ανθρώπου (βουβωνικών λεμφαγγείων)	2,3	41
Λέμφος ανθρώπου (μείζονος θωρακικού πόρου)	1,4	41
Αίμα ανθρώπου	0,2	41
Ούρα ανθρώπου	0,01	354
Εγκεφαλονωτιαίο υγρό ανθρώπου	3	38
Αρθρικός χόνδρος βοδιού (μικρής ηλικίας)	0,45	355
Αρθρικός χόνδρος βοδιού (μεγάλης ηλικίας)	0,25	355
Ρινικός χόνδρος βοδιού (μικρής ηλικίας)	0,73	355
Ρινικός χόνδρος βοδιού (μεγάλης ηλικίας)	0,65	355
Χόνδρος επιφύσεων βοδιού	1	355
Αρθρικό υγρό βοδιού	9	40
Υαλώδες σώμα βοδιού	0,5	40
Υαλώδες σώμα λαγού	3	356
Υδατοειδές υγρό λαγού	5	356
Αμνιακό υγρό προβάτου	1	357

**Πίνακας Γ/Α2.1:** Αντιστοιχία μοριακού βάρους υαλουρονάνης και ιστού απομόνωσής της.

Κείται από 4000 δισακχαρίτες (δηλαδή  $n=4000$ ) έχει μήκος αλύσου 4  $\mu\text{m}$  (Εικόνα Γ/Α2.2), είναι δηλαδή ένα πάρα πολύ μακρύ μόριο.

Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες γλυκοζαμινογλυκάνες η υαλουρονάνη δεν είναι πρωτεογλυκάνη, δηλαδή δεν ανιχνεύεται πεπτιδικό τμήμα στο μόριο της. Αυτό έχει αποδειχθεί τόσο με τη βοήθεια των νέων μεθόδων απομόνωσης του πολυσακχαρίτη, όσο και με την αποσαφήνιση του μηχανισμού παραγωγής του. Συγκεκριμένα, η παραγωγή των υπόλοιπων γλυκοζαμινογλυκανών αρχίζει με τη σύνθεση ενός πεπτιδίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο και συνεχίζεται με τη γλυκοσυλίωσή του στο σύστημα Golgi[17]. Αντίθετα, η υαλουρονάνη παράγεται άμεσα στην εξωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ως αμιγής πολυσακχαρίτης[46]. Ωστόσο, κατά την ανάλυση της τε-



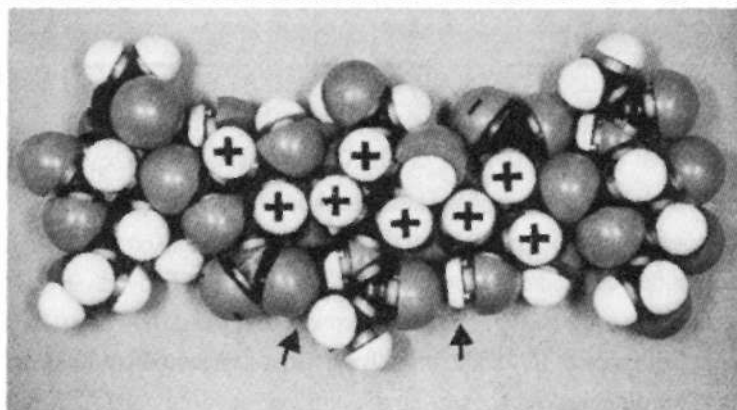
**Εικόνα Γ/A2.2:** Μικροσκοπική εμφάνιση υαλουρονάνης. Απεικονίζεται το γραμμικό μόριό της σε διάλυμα με συγκέντρωση 1 μg/ml.

ταρτοταγούς δομής του πολυσακχαρίτη έχουν ανιχνευθεί δευτερεύουσας σημασίας ομοιοπολικές συνδέσεις με πεπτίδια[47].

## β. Δευτεροταγής δομή

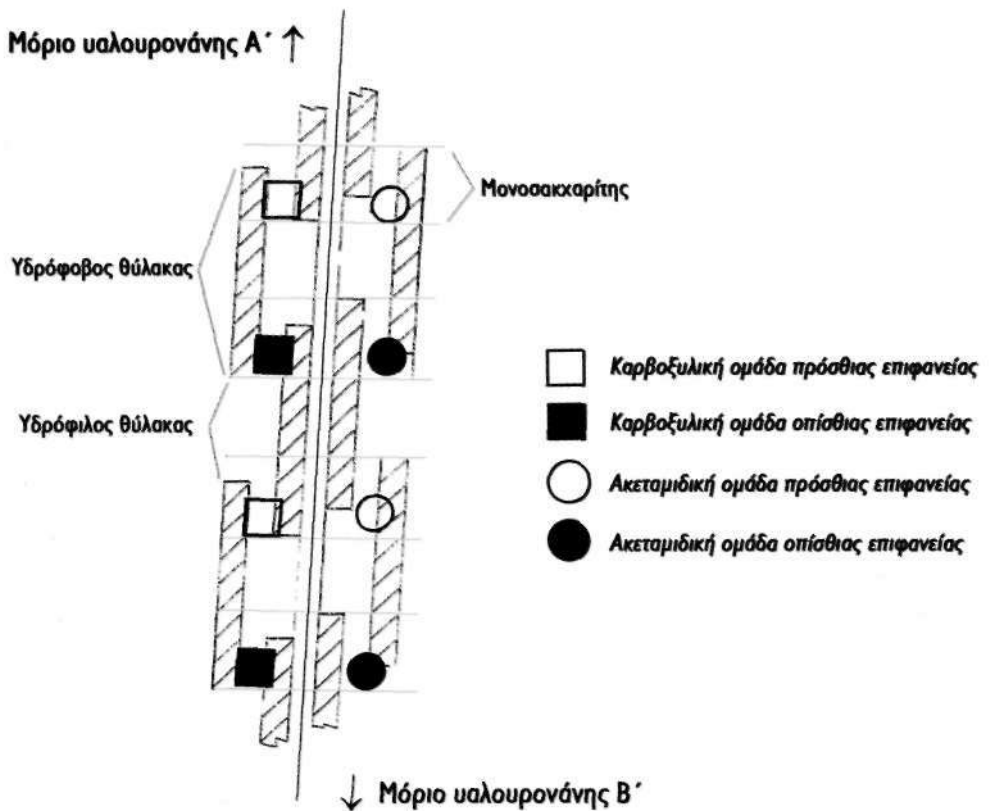
Η φυσιολογία των αραιών υδατικών διαλυμάτων της υαλουρονάνης[48] και η ηλεκτρονική μικροσκόπηση του μορίου της[49] (τεχνική Kleinschmidt) απέδειξαν ότι ο πολυσακχαρίτης συμπεριφέρεται σα δύσκαμπτο ελατήριο. Οι ενδομοριακές δυνάμεις απόθησης είναι υπεύθυνες για το φαινόμενο αυτό[50].

Οι σχέσεις των ατόμων μέσα στο μόριο της υαλουρονάνης δεν είναι τυχαίες αλλά καθορίζονται από ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου (Εικόνα Γ/A2.3) και το προσανατολίζουν κατά τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργούνται εναλλάξ



**Εικόνα Γ/A2.3:** Πεντασακχαρίτης υαλουρονάνης κατασκευασμένος από άτομα Courtauld. Είναι εμφανής η ελικοειδής διαμόρφωση του μορίου. Τα βέλη δεικνύουν θέσεις ανάπτυξης δεσμών υδρογόνου. Οι σταυροί δεικνύουν θέση ύπαρξης υδρόφοβου θύλακα.

υδρόφοβοι (οκτώ συνεχόμενες CH-ομάδες) και υδρόφιλοι θύλακες (Εικόνα Γ/A2.4). Η ύπαρξη των προαναφερομένων θυλάκων καθιστά την υαλουρονάνη αμφίφιλο μόριο και εξηγεί πολλές από τις πειραματικά απο-



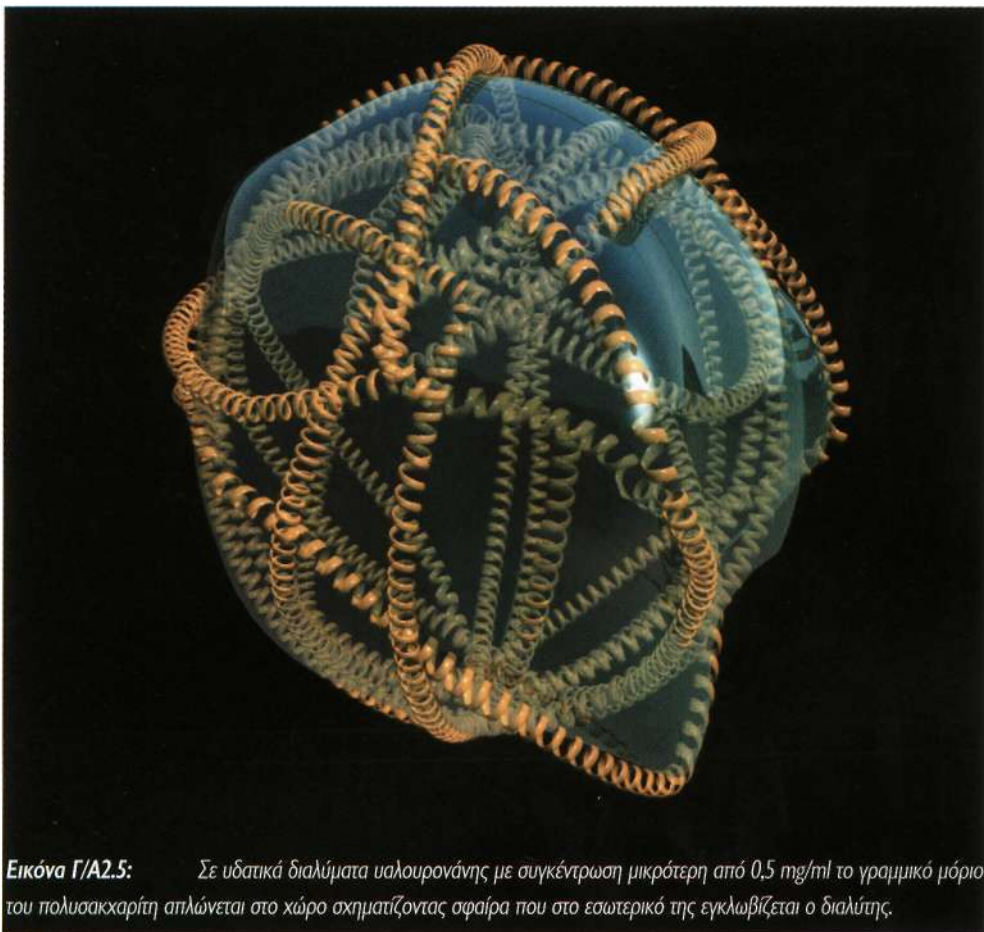
**Εικόνα Γ/Α2.4:** Σχηματική πλάγια όψη δύο μορίων υαλουρονάνης που είναι τοποθετημένα αντιπαράλληλα (τεταρτοταγής δομή). Οι διακεκομμένες γραμμές δεικνύουν το όριο μεταξύ δύο γειτονικών μονοσακχαριτών. Οι καρβοξυλικές και οι ακεταμιδικές ομάδες σχηματίζουν μεταξύ τους δεσμούς υδρογόνου.

δεδειγμένες φυσιολογικές ιδιότητες της[48] (σύνδεση με τον PAF, αύξηση της ρευστότητας της ερυθροκυτταρικής μεμβράνης, κτλ.). Επιπλέον, οι ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου αυξάνουν τη δυσκαμψία του πολυσακχαρίτη[50].

Κάθε 5 δισακχαρίτες το μόριο της υαλουρονάνης εμφανίζει ένα κοίλο και ένα κυρτό κατά τον επιμήκη άξονα του, τόσο στο οριζόντιο όσο και στο κάθετο επίπεδο[48] (Εικόνα Γ/Α2.4). Οι δυνάμεις απώθησης και οι δεσμοί υδρογόνου ευθύνονται για τη διαμόρφωση αυτή.

## γ. Τριτοταγής δομή και μοριακό σχήμα

Σε υδατικά διαλύματα η γραμμική και δύσκαμπτη αλυσίδα δισακχαριτών της υαλουρονάνης απλώνεται στο χώρο σχηματίζοντας σφαίρα της οποίας η επιφάνεια καταλαμβάνεται από τον πολυσακχαρίτη και το εσωτερικό της από το νερό-διαλύτη (Εικόνα Γ/Α2.5). Όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος της υαλουρονάνης, τόσο μεγαλύτερη είναι η διάμετρος της σφαίρας που σχηματίζεται [51]. Συγκεκριμένα, πολυσακχαρίτης με μοριακό βάρος 300000 D σχηματίζει σφαίρα διαμέ-



**Εικόνα Γ/Α2.5:** Σε υδατικά διαλύματα υαλουρονάνης με συγκέντρωση μικρότερη από 0,5 mg/ml το γραμμικό μόριο του πολυσακχαρίτη απλώνεται στο χώρο σχηματίζοντας σφαίρα που στο εσωτερικό της εγκλωβίζεται ο διαλύτης.

τρου 122 nm[52], ενώ πολυσακχαρίτης με μοριακό βάρος  $14 \times 10^6$  D σχηματίζει σφαίρα διαμέτρου 760 nm[53]. Συγκριτικά αναφέρεται ότι η διάμετρος του βακτηριδίου *E. Coli* είναι 800 nm, το μήκος της αλβουμίνης είναι 1200 nm και η διάμετρος των ιών *Μυχονίρις* είναι 1600 nm[38]. Η διαμόρφωση αυτή παρατηρείται σε συγκεντρώσεις υαλουρονάνης μικρότερες των 0,5 mg/ml νερού, πέραν των οποίων η αλυσίδα του μορίου περιπλέκεται και χάνει το σφαιρικό της σχήμα[54].

#### δ. Τεταρτοταγής δομή

Η ηλεκτρονική μικροσκόπηση και η μελέτη μοντέλων μοριακής δυναμικής απέδειξαν πως δύο αλυσίδες δισακχαριτών υαλουρονάνης αλληλεπιδρούν με αποτέλεσμα το σχημασμό διπλής έλικας. Συγκεκριμένα, όταν δύο αλυσίδες υαλουρονάνης τοποθετούνται αντιπαράλληλα, τα κοίλα και τα κυρτά τους ευθυγραμμίζονται, έτσι ώστε να αντιστοιχίζονται οι υδρόφοβοι και οι υδρόφιλοι θύλακες τους[48] (Εικόνα Γ/Α2.4). Η σύνδεση αυτή των δύο αλυσίδων του πολυσακχαρίτη ευνοείται από την ύπαρξη υδρόφωβων και υδρογονικών δεσμών και παρεμποδίζεται από την ανάπτυξη δυνάμεων ηλεκτροστατικής απώθησης, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τη διπλή έλικα του DNA[50].

### 3. Φυσικοχημικές ιδιότητες

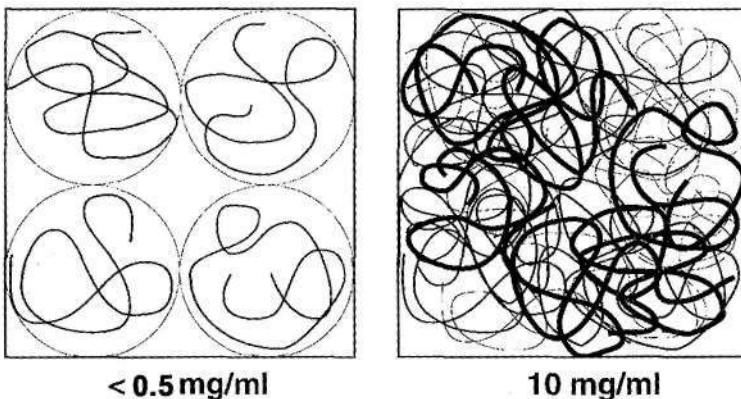
#### α. Γενικά

Η δομή της υαλουρονάνης είναι υπεύθυνη για το σύνολο των φυσικοχημικών ιδιοτήτων που επιδεικνύουν τα κolloειδή διαλύματα της. Όταν ο πολυσακχαρίτης εντοπίζεται στους ιστούς, αλληλεπιδρώντας με άλλα συστατικά του εξωκυττάριου χώρου και με άλλα κύτταρα, οι ιδιότητες αυτές παραμένουν σε γενικές γραμμές αναλλοίωτες. Επομένως, η μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της υαλουρονάνης σε διάλυμα επιτρέπει την κατανόηση της "συμπεριφοράς" του πολυσακχαρίτη και σε ιστικό περιβάλλον[55].

#### β. Ιξώδες και ελαστικότητα

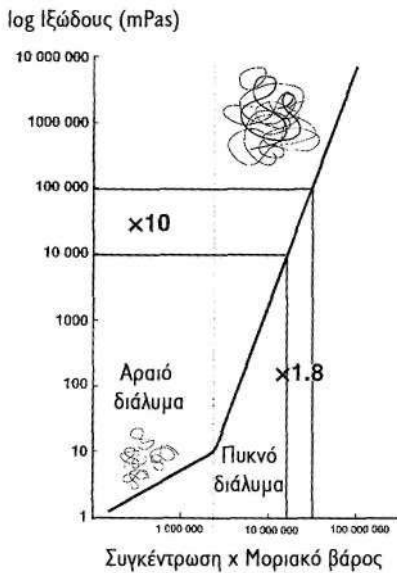
Το σπουδαιότερο φυσιολογικό χαρακτηριστικό της υαλουρονάνης είναι η ψευδοπλαστική, μη Νευτόνια συμπεριφορά της. Αυτό σημαίνει ότι το ιξώδες διαλύματος υαλουρονάνης συγκεντρωμένης συγκέντρωσης δεν είναι σταθερό αλλά εξαρτάται, τόσο από τη ροή του διαλύματος όσο και από το μοριακό βάρος του διαλυμένου πολυσακχαρίτη[56].

Σε υδατικά διαλύματα η αλυσίδα διασακχαριτών της υαλουρονάνης απλώνεται στο χώρο σχηματίζοντας σφαίρα. Η διαμόρφωση αυτή παρατηρείται σε συγκεντρώσεις υαλουρονάνης μικρότερες των 0,5 mg/ml νερού, πέραν των οποίων η αλυσίδα του μορίου περιπλέκεται και χάνει το σφαιρικό της σχήμα[54]. Έπε έχοντας σφαιρικό σχήμα είτε περιπλεκόμενα σε ακανόνιστο δίκτυο, τα μόρια του πολυσακχαρίτη καταλαμβάνουν ισομερώς όλο το χώρο που τους προσφέρεται από το διάλυμα[57] (Εικόνα Γ/Α3.1).



**Εικόνα Γ/Α3.1:** Σχηματική παράσταση υδατικών διαλυμάτων υαλουρονάνης. Όταν η συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη είναι  $< 0,5 \text{ mg/ml}$ , τότε το μόριο του σχηματίζει σφαίρα. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η αλυσίδα του μορίου περιπλέκεται. Πάντως, σε κάθε περίπτωση η υαλουρονάνη καταλαμβάνει όλο το χώρο που της προσφέρεται.





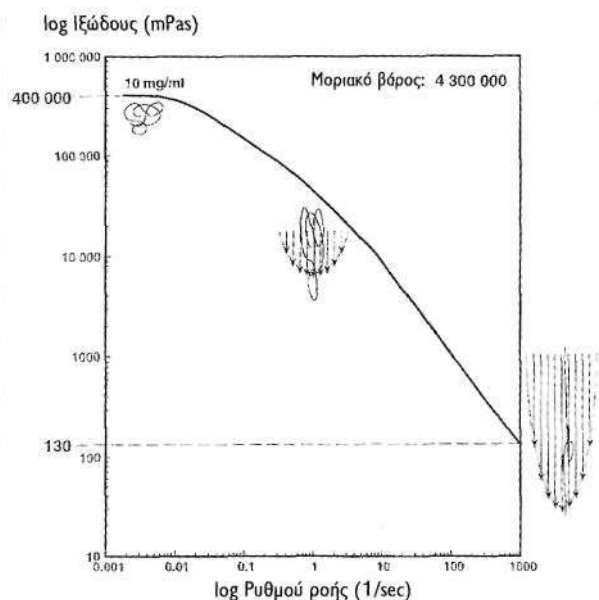
**Εικόνα Γ/Α3.2:** Εξάρτηση του ιξώδους διαλυμάτων υαλουρονάνης σε ηρεμία από το γινόμενο της συγκέντρωσής τους επί τη μοριακή μάζα του πολυσακχαρίτη.

Η ψευδοελαστική συμπεριφορά των διαλυμάτων υαλουρονάνης παρατηρείται μόνο όταν οι αλυσίδες των μορίων της είναι περιπλεγμένες, δηλαδή σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 0,5 mg/ml [58]. Στη συνέχεια του εδαφίου κάθε αναφορά σε διάλυμα υαλουρονάνης αντιστοιχεί σε υδατικό διάλυμα του πολυσακχαρίτη με συγκέντρωση τουλάχιστον 0,5 mg/ml.

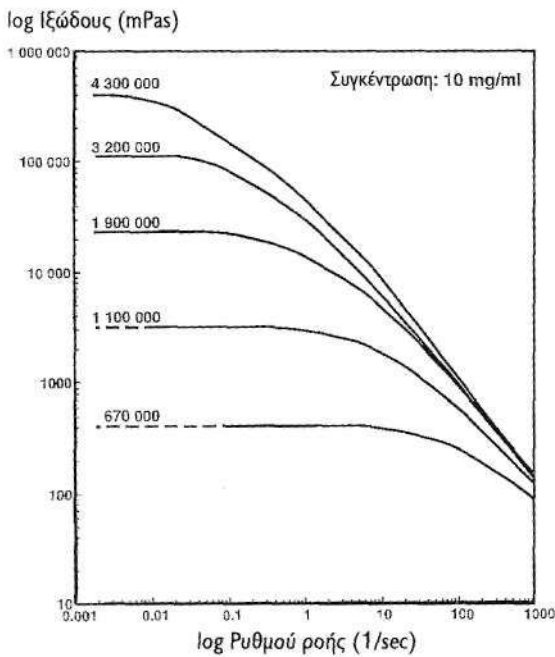
Το ιξώδες των διαλυμάτων υαλουρονάνης που βρίσκονται σε ηρεμία εξαρτάται από το γινόμενο της συγκέντρωσης επί το μοριακό βάρος του πολυσακχαρίτη (Εικόνα Γ/Α3.2). Διπλασιασμός είτε της συγκέντρωσης είτε του μοριακού βάρους του πολυσακχαρίτη επιφέρει υπερδεκαπλασιασμό του ιξώδους του. Συγκεκριμένα, διάλυμα υαλουρονάνης 10 mg/ml έχει ιξώδες 3000 mPas, αν το μοριακό βάρος του πολυσακχαρίτη είναι  $1 \times 10^6$  D, ενώ το ίδιο διάλυμα έχει ιξώδες 400000 mPas, αν το μοριακό βάρος είναι  $4 \times 10^6$  D [57]. Εύκολα συνάγεται πως το

ιξώδες των διαλυμάτων υαλουρονάνης είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στη δράση των υαλουρονιδασών. Ένα μόριο υαλουρονάνης με μοριακό βάρος  $4 \times 10^6$  εμπεριέχει 20000 γλυκοσυδικούς δεσμούς. Το σπάσιμο ενός και μόνο από τους δεσμούς αυτούς θα επιφέρει τη δημιουργία δύο μορίων υαλουρονάνης με μέσο μοριακό βάρος  $2 \times 10^6$  D και επομένως θα οδηγήσει στη μείωση του ιξώδους του πολυσακχαρικού διαλύματος κατά τουλάχιστον 10 φορές [57].

Το ιξώδες των ρεόντων διαλυμάτων υαλουρονάνης εξαρτάται από το ρυθμό ροής τους, εφόσον η



**Εικόνα Γ/Α3.3:** Μείωση του ιξώδους ρεόντων διαλυμάτων υαλουρονάνης με την αύξηση του ρυθμού ροής των. Η συγκέντρωση των διαλυμάτων και το μοριακό βάρος του πολυσακχαρίτη παραμένουν σταθερά.



**Εικόνα Γ/Α3.4:** Επίτευξη κοινού ελάχιστου ιξώδους ρεόντων διαλυμάτων υαλουρονάνης με διαφορετικό μοριακό βάρος, ύστερα από την αύξηση του ρυθμού ροής των. Η συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη παραμένει σταθερή.

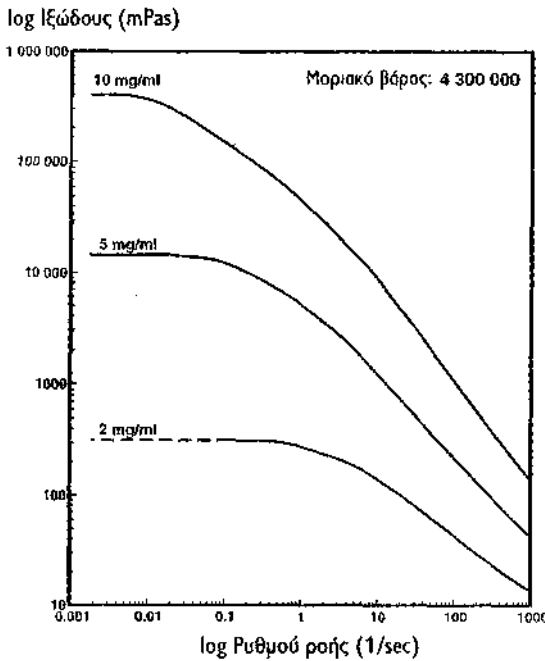
συγκέντρωση και το μοριακό βάρος του πολυσακχαρίτη παραμένουν σταθερά. Όταν διάλυμα υαλουρονάνης υπόκειται σε αύξηση του ρυθμού ροής του (π.χ. διερχόμενο μέσα από βελόνη σύριγγας), τότε το μόριο του πολυσακχαρίτη επιμηκώνεται, τοποθετείται παράλληλα με τα παρακείμενα ρέοντα μόρια και κατά συνέπεια "εμποδίζει" λιγότερο τη ροή (Εικόνα Γ/Α3.3). Επομένως, αύξηση του ρυθμού ροής των διαλυμάτων υαλουρονάνης επιφέρει τη μείωση του ιξώδους τους[58].

Η αύξηση του ρυθμού ροής διαλυμάτων υαλουρονάνης με σταθερή συγκέντρωση και διαφορετικό ιξώδες (λόγω διαφορετικού μοριακού βάρους) οδηγεί σε κοινό σημείο ελάχιστου ιξώδους (Εικόνα Γ/Α3.4). Αυτό συμβαίνει γιατί στους υψηλούς ρυθμούς ροής το μόριο της υαλου-

ρονάνης είναι πλήρως επιμηκυσμένο και επομένως το εξαρτώμενο από το μοριακό βάρος σχήμα του δεν επηρεάζει πια το ιξώδες του διαλύματος[57].

Αντίθετα, η αύξηση του ρυθμού ροής υαλουρονάνης με ίδιο μοριακό βάρος και διαφορετικό ιξώδες (λόγω διαφορετικής συγκέντρωσης) οδηγεί σε διαφορετικά ελάχιστα ιξώδη. Συγκεκριμένα, όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση του διαλύματος του πολυσακχαρίτη, τόσο μικρότερο είναι το ελάχιστο ιξώδες που παρατηρείται (Εικόνα Γ/Α3.5). Αυτό συμβαίνει γιατί ακόμα και στους υψηλούς ρυθμούς ροής το ιξώδες εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ των μορίων της υαλουρονάνης και επομένως από τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη στο διάλυμα[57].

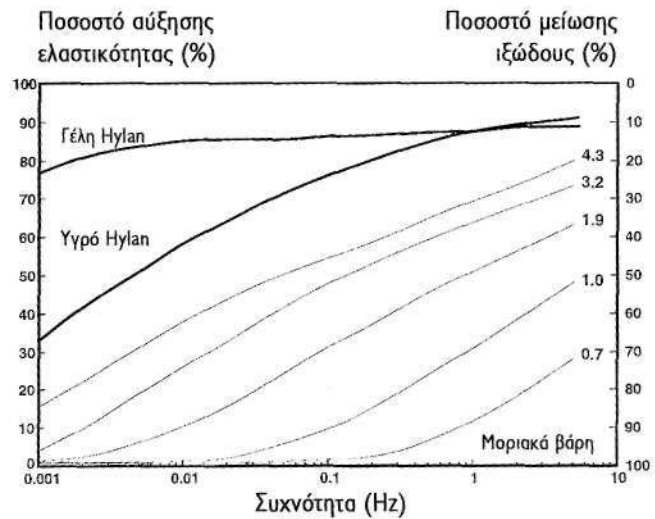
Η μικροσκοπική εμφάνιση των αλύσεων υαλουρονάνης σε διάλυμα είναι παρόμοια με αυτή των γελών. Κατά συνέπεια, τα διαλύματα υαλουρονάνης, εκτός από την πλαστική μη-Νευτώνεια συμπεριφορά τους, παρουσιάζουν και ελαστικά χαρακτηριστικά γέλης. Όσο περισσότερες ενδομοριακές συνδέσεις υπάρχουν, τόσο μεγαλύτερη ελαστικότητα παρουσιάζει το διάλυμα. Επομένως, για δεδομένη συγκέντρωση, όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος του πολυσακχαρίτη, τόσο μεγαλύτερη ελαστικότητα επιδεικνύει το διάλυμα του[57].



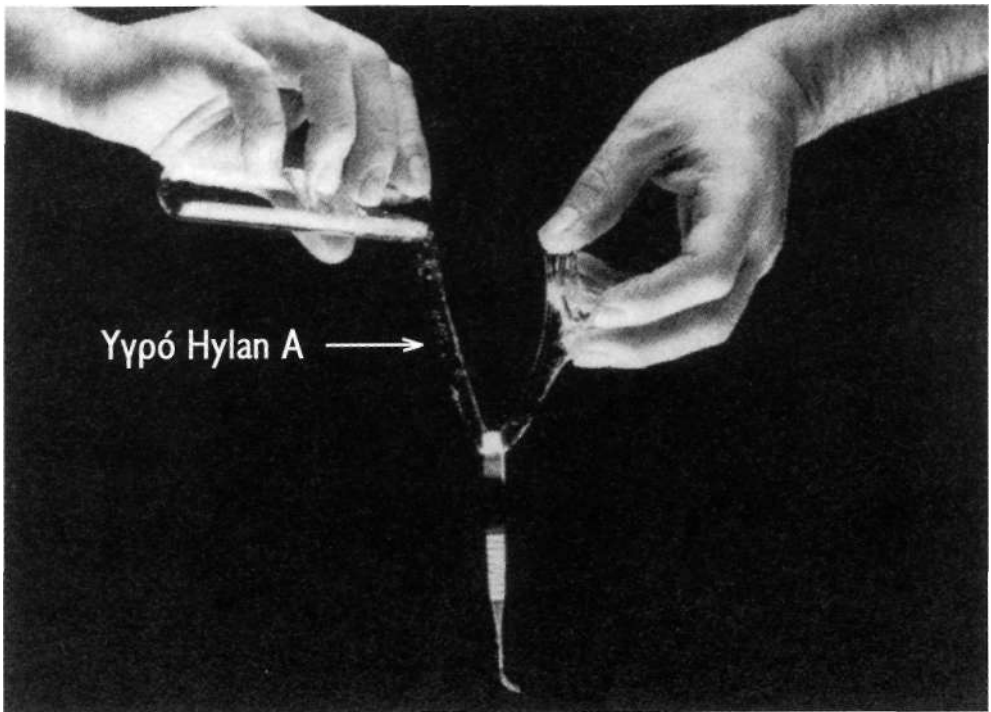
**Εικόνα Γ/Α3.5:** Επίτευξη διαφορετικών ελάχιστων ιξωδών ρεόντων διαλυμάτων υαλουρονάνης διαφορετικής συγκέντρωσης, ύστερα από την αύξηση του ρυθμού ροής των. Το μοριακό βάρος του πολυσακχαρίτη παραμένει σταθερό.

Η ελαστικότητα ενός διαλύματος υαλουρονάνης αποδεικνύεται όταν αυτό υποβάλλεται σε ταλάντωση. Όσο αυξάνεται η συχνότητα της ταλάντωσης, τόσο αυξάνεται η ελαστικότητα του πολυσακχαρίτη. Αυτό συμβαίνει γιατί τα μόρια της υαλουρονάνης, ενώ κατά την αργή ταλάντωση "έχουν χρόνο" να αποσυνδεθούν και να αλλάξουν θέση (συμπεριφορά διαλύματος), κατά τη γρήγορη ταλάντωση "δεν προλαβαίνουν" να απεμπλακούν και να μετακινηθούν[57] (συμπεριφορά γέλης). Για σταθερή συχνότητα ταλάντωσης, η αύξηση της ελαστικότητας ενός διαλύματος υαλουρονάνης με δεδομένη συγκέντρωση είναι ανάλογη με το μοριακό βάρος του πολυσακχαρίτη (Εικόνα Γ/Α3.6). Επιπλέον, για σταθερή συχνότητα

ταλάντωσης, η αύξηση της ελαστικότητας ενός διαλύματος υαλουρονάνης με δεδομένο μοριακό βάρος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη[57]. Τέλος, διαλύματα υαλουρονάνης που, ύστερα από μικρή χημική τροποποίηση, έχουν υποστεί αύξηση των συνδέσεων μεταξύ των μορίων του πολυσακχαρίτη, επιδεικνύουν αυξημένες ελαστικές ιδιότητες[59] (Εικόνα Γ/Α3.7).



**Εικόνα Γ/Α3.6:** Αύξηση της ελαστικότητας και μείωση του ιξώδους διαλυμάτων υαλουρονάνης σταθερής συγκέντρωσης, ύστερα από αύξηση της συχνότητας ταλάντωσης των. Το φαινόμενο είναι εντονότερο σε διαλύματα μεγαλομοριακών πολυσακχαριτών.



**Εικόνα Γ/Α3.7:** Διάλυμα χημικά τροποποιημένης υαλουρονάνης (υγρό Hylan A) με συγκέντρωση 10 mg/ml. Το διάλυμα εμφανίζει τόσο συνάφεια και ελαστικότητα, ώστε να παρέχει μηχανική υποστήριξη. Ωστόσο, εξακολουθεί να διαθέτει τις ιδιότητες της αραίωσης, της ροής και της πλήρους κατάληψης του περιέχοντος δοχείου.

## γ. Ωσμωτικότητα

Η υαλουρονάνη εμφανίζει μη ιδανική ωσμωτική συμπεριφορά. Η αύξηση της συγκέντρωσης του διαλύματος του πολυσακχαρίτη επιφέρει αύξηση της ωσμωτικότητάς του. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, η ωσμωτική δύναμη που παρατηρείται σε διάλυμα υαλουρονάνης είναι ίση με αυτή που αναπτύσσεται σε διάλυμα αλβουμίνης με την ίδια συγκέντρωση[60]. Επιπλέον, το κοινό διάλυμα των δύο προαναφερόμενων ουσιών σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις παρουσιάζει ακόμα μεγαλύτερη ωσμωτικότητα από αυτή που εμφανίζουν τα ξεχωριστά διαλύματα υαλουρονάνης και αλβουμίνης στις ίδιες συγκεντρώσεις[61]. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει συνεργεία στην ωσμωτική συμπεριφορά των ουσιών αυτών.

## δ. Υδατική διαπερατότητα

Η υαλουρονάνη επιδεικνύει σημαντική ικανότητα ελάττωσης της ροής του νερού που διέρχεται διαμέσου των μορίων της. Το φαινόμενο αυτό έχει εκτιμηθεί τόσο με άμεσες μετρήσεις[62], όσο και με υπολογισμό της σταθεράς διαπερατότητας του πολυσακχαρίτη με τη μέθοδο της υπερφυγοκεντρικής καθίζησης[53].

## ε. Ιονισμός και άλατα

Η υαλουρονάνη ( $pK=2,9$ ) είναι πολυανιόν. Στον οργανισμό ανιχνεύεται πάντοτε στην πλήρως ιονισμένη μορφή της. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η υαλουρονάνη που βρίσκεται μέσα στα λυσοσωμάτια[63]. Σχηματίζει άλατα με το  $N\alpha^+$ . Αντίθετα, συνήθως δε σχηματίζει άλατα με το  $Ca^{2+}$ , λόγω των πολύ ασθενών δυνάμεων Van Der Waals που αναπτύσσει με αυτό[38].

## 4. Βιοσύνθεση

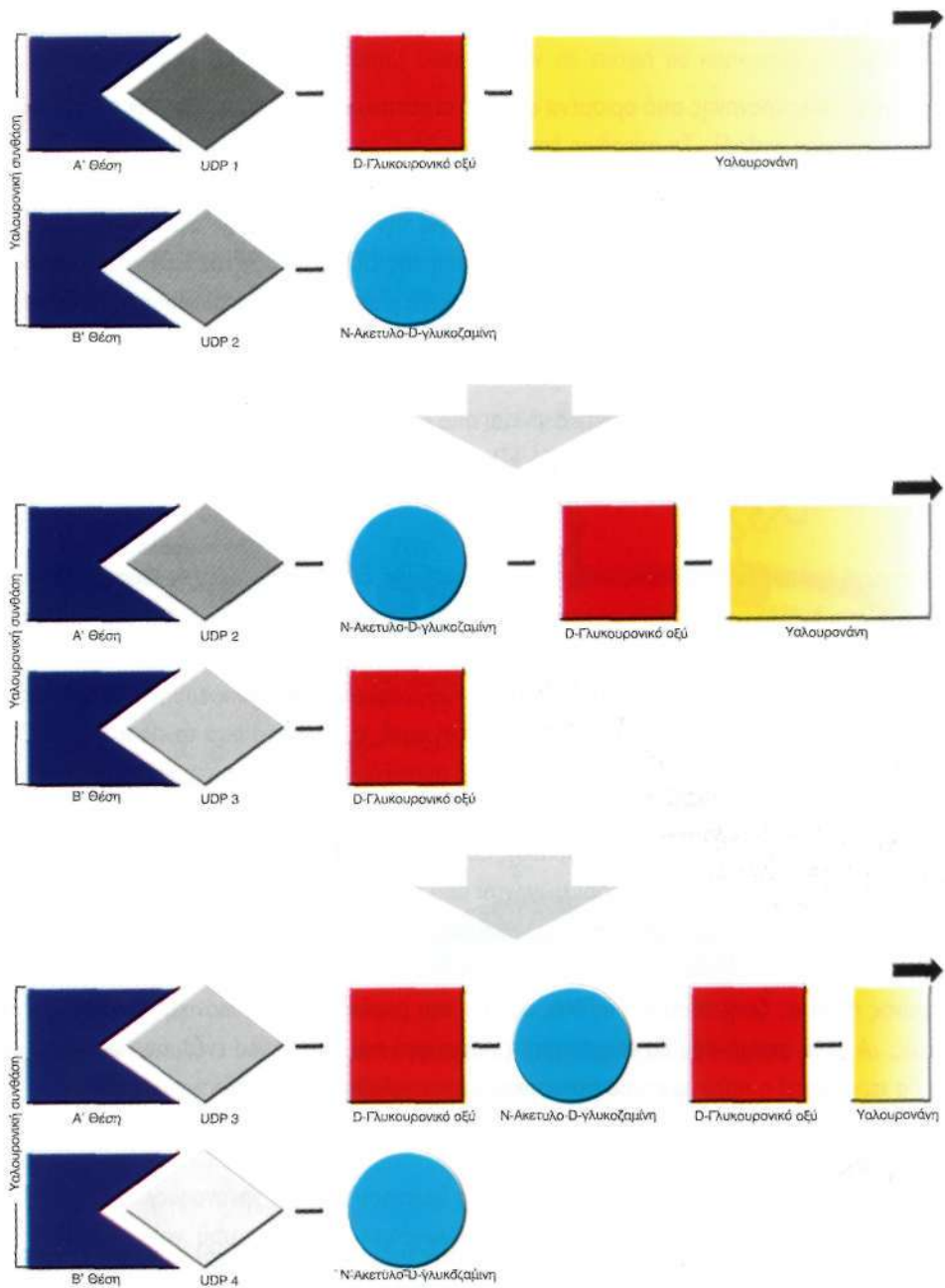
### α. Μοντέλο

Τα ένζυμα που ευθύνονται για την παραγωγή της υαλουρονάνης (υαλουρονικές συνθάσες) εδράζονται στην έσω επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Ο νεοσχηματισθείς πολυσακχαρίτης οδηγείται στον εξωκυττάριο χώρο διαμέσου αυτής[46].

Η αύξηση του μήκους ενός παραγόμενου μορίου υαλουρονάνης επιτυγχάνεται με την προσθήκη δομικών μονάδων (είτε D-γλυκουρονικού οξέος είτε N-ακετυλο-D-γλυκοζαμίνης) στο αναγωγικό άκρο της πολυσακχαριτικής αλυσίδας[64]. Συγκεκριμένα, στην Α' θέση του ενεργού κέντρου της υαλουρονικής συνθάσης, το σακχαρικό κατάλοιπο του αναγωγικού άκρου του παραγόμενου μορίου υαλουρονάνης παραμένει ομοιοπολικά συνδεδεμένο με ένα μόριο UDP. Επιπλέον, στη Β' θέση ανευρίσκεται η επόμενη δομική μονάδα της παραγόμενης πολυσακχαριτικής αλυσίδας με τη μορφή ενός UDP- μονοσακχαρίτη (είτε UDP-D-γλυκουρονικού οξέος είτε UDP-N-ακετυλο-O-γλυκοζαμίνης). Η σύνθεση του μορίου της υαλουρονάνης συνεχίζεται με την αντικατάσταση του UDP μορίου του αναγωγικού άκρου της πολυσακχαριτικής αλυσίδας από τον UDP-μονοσακχαρίτη της Β' θέσης (Εικόνα Γ/Α4.1). Με αυτόν τον τρόπο, κάθε UDP μόριο που ενσωματώνεται κατά την προσθήκη μίας δομικής μονάδας στην αλυσίδα της υαλουρονάνης αντικαθίσταται από νέο UDP μόριο κατά την προσθήκη της αμέσως επόμενης δομικής μονάδας.

Η παραγωγή της υαλουρονάνης είναι "διαμερισματοποιημένη". Συγκεκριμένα, η απαραίτητη για τη σύνθεση του πολυσακχαρίτη ενσωμάτωση UDP μορίων στους δομικούς μονοσακχαρίτες εξαρτάται από την παροχή ATP. Ωστόσο, η παραγωγή υαλουρονάνης δε διακόπτεται ακόμα και σε συνθήκες χαμηλής ενεργειακής παροχής, όταν σε όλο το κύτταρο έχει σταματήσει η σύνθεση UDP μορίων. Επομένως, οι περιοχές παραγωγής του πολυσακχαρίτη διαθέτουν, εκτός από υαλουρονική συνθάση, ένζυμα για την παραγωγή UDP μορίων και τοπικά αποθηκευτικά συστήματα ενέργειας, αποτελούν δηλαδή ξεχωριστά κυτταρικά "διαμερίσματα"[46].

Σε αντίθεση με την υαλουρονάνη, οι υπόλοιπες γλυκοζαμινογλυκάνες συντίθενται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύστημα Golgi γύρω από πεπτιδία-πυρήνες. Η μεταφορά τους στον εξωκυττάριο χώρο γίνεται με κυτταροπλασματικά κυστίδια. Η επιμήκυνση της πολυσακχαριτικής τους



**Εικόνα Γ/Α4.1:** Σχηματικός μηχανισμός επιμήκυνσης του μορίου της υαλουρονάνης.

αλυσίδας γίνεται από το μη-αναγωγικό άκρο της. Τέλος, η παραγωγή τους δεν είναι "διαμερισματοποιημένη" [64].

## β. Συνθάσες

Η παραγωγή υαλουρονάνης από ορισμένα στελέχη στρεπτόκοκκων προϋποθέτει την ενεργοποίηση του οπερονίου *has*[64]. Το οπερόνιο *has* περιλαμβάνει τα γονίδια *hasA*, *hasB* και *hasC*. Το γονίδιο *hasA* ευθύνεται για την παραγωγή μίας πρωτεΐνης μοριακού βάρους 42 kD η οποία είναι μία υαλουρονική συνθάση. Το γονίδιο *hasB* ευθύνεται για την παραγωγή μίας αφυδρογονάσης της UDP-γλυκόζης, ένζυμο απαραίτητο για τη μετατροπή της UDP-γλυκόζης σε UDP-γλυκουρονικό οξύ. Τέλος, το γονίδιο *hasC* ευθύνεται για την παραγωγή μίας πυροφωσφορυλάσης της UDP-γλυκόζης, ένζυμο απαραίτητο για την παραγωγή της UDP-γλυκόζης.

Η παραγωγή υαλουρονάνης στα τρωκτικά γίνεται από δύο διαφορετικές συνθάσες. Η πρώτη ονομάζεται *muHAS1* και έχει μοριακό βάρος 65 kD. Η δεύτερη ονομάζεται *muHAS2* και έχει μοριακό βάρος 63 kD. Η μεταξύ τους ομολογία ανέρχεται στο 55%[64].

Η παραγωγή υαλουρονάνης στους ανθρώπους γίνεται από δύο διαφορετικές συνθάσες. Η πρώτη ονομάζεται *huHAS1* και η δεύτερη *huHAS2*. Η μεταξύ τους ομολογία ανέρχεται στο 52%[65],

Σε όλες τις υαλουρονικές συνθάσες που έχουν απομονωθεί έως τώρα ανιχνεύθηκε, ανάμεσα στα υδρόφοβα άκρα τους, υδρόφιλη περιοχή. Η περιοχή αυτή, ανεξάρτητα από το είδος της υαλουρονικής συνθάσης, επιδεικνύει σταθερή αλληλουχία αμινοξέων. Στο συγκεκριμένο τμήμα των υαλουρονικών συνθασών συμπεριλαμβάνονται το ενεργό κέντρο του κάθε ενζύμου και τα σημεία εξάρτησης της παραγόμενης πολυσακχαρπικής αλυσίδας[65]. Τέλος, στο συγκεκριμένο τμήμα περιέχονται οι αλληλουχίες που φωσφορυλιώνονται από τις PKA, PKC και TK και επομένως ευθύνονται για την αλλαγή της συμπεριφοράς των υαλουρονικών συνθασών[65].

Ο χρόνος ημίσειας ζωής τόσο του mRNA, όσο και του μορίου της υαλουρονικής συνθάσης είναι βραχύς. Από τη στιγμή που θα σταματήσει η παραγωγή του mRNA του ενζύμου έως τη στιγμή που θα τερματιστεί η παραγωγή του πολυσακχαρίτη μεσολαβούν περίπου τρεις ώρες[64].

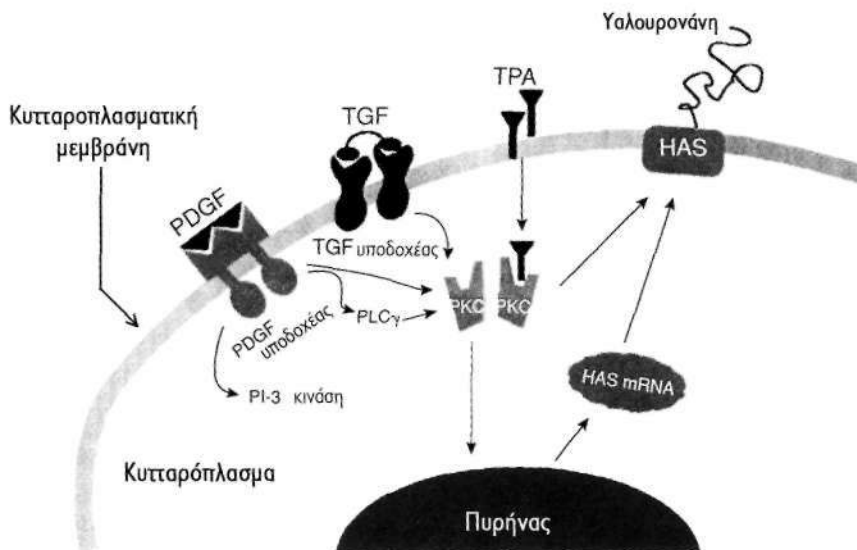
## γ. Ρύθμιση

Η αύξηση της παραγωγής της υαλουρονάνης κατά την εμβρυϊκή περίοδο[66], κατά την αποκατάσταση των ιστικών βλαβών[67], κατά τις διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις[68] και κατά την καρκινογένεση[69] οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η σύνθεση του πολυσακχαρίτη εξαρτάται από πολλούς παράγοντες.

Οι αυξητικοί παράγοντες που ευθύνονται για την επιτάχυνση της παραγωγής της υαλουρονάνης είναι οι PDGF-BB[70], TGF-β[70], IGF-I[71], EGF[70] και βFGF[66]. Στο σχηματισμό νέων μορίων του πολυσακχαρίτη συμμετέχουν επίσης οι κυττοκίνες[72], ο TNF[71], η PGE<sub>2</sub>[71], το TPA[38], η

PTH[38] και η FSH[64]. Τέλος, φυσιολογικά κύτταρα που παράγουν υαλουρονάνη αυξάνουν το ρυθμό σχηματισμού του πολυσακχαρίτη όταν έρθουν σε επαφή με καρκινικές κυτταρικές σειρές[73].

Ο PDGF-BB, ο TGF- $\beta$ , ο EGF, το TPA και η FSH επιφέρουν αύξηση της παραγωγής της υαλουρονάνης ενεργοποιώντας το ενδοκυττάριο σηματοδότη σύστημα της PKC. Η PKC επάγει την παραγωγή και την ενεργοποίηση της υαλουρονικής συνθάσης (Εικόνα Γ/Α4.2). Στην ενεργοποίηση του ενζύμου συμμετέχουν και τα σηματοδότη συστήματα της PKA και της TK[65]. Τέλος, η FSH ενεργοποιεί την υαλουρονική συνθάση και με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττρίου cAMP[64].



**Εικόνα Γ/Α4.2:** Ρύθμιση σύνθεσης της υαλουρονάνης. Παρατηρείται ο σχηματισμός του πολυσακχαρίτη στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.

Η παρουσία υαλουρονάνης υψηλού μοριακού βάρους αναστέλλει την παραγωγή του πολυσακχαρίτη[74]. Επιπλέον, ύστερα από την παραγωγή μακρών αλυσίδων υαλουρονάνης, η συνθάση του πολυσακχαρίτη αποπίπτει από την κυτταρική μεμβράνη και απενεργοποιείται[64].

## 5. Καταβολισμός

### α. Γενικά

Η απομάκρυνση της υαλουρονάνης από το ανθρώπινο σώμα γίνεται με τον πλήρη καταβολισμό



της σε διοξειδίο του άνθρακα και νερό. Μία μικρή ποσότητα των ενδιάμεσων καταβολικών παραγών του πολυσακχαρίτη χρησιμοποιείται για τον επανασχηματισμό του[33]. Απέκκριση της υαλουρονάνης από τους νεφρούς συντελείται σε ποσοστό 1%[38].

Στα θηλαστικά ανχνεύονται περίπου 250 mg υαλουρονάνης/kgg σωματικού βάρους. Καθημερινά καταβολίζεται (και βεβαίως αναπαράγεται) το ένα τρίτο της ποσότητας αυτής[75]. Ο καταβολισμός της υαλουρονάνης λαμβάνει χώρα σε τρία στάδια. Αρχικά, μέρος του πολυσακχαρίτη διασπάται στους ιστούς στους οποίους παράγεται. Η υπόλοιπη ποσότητα εκθλιβεται από τους παραγωγούς ιστούς, μεταφέρεται μέσω της λέμφου στους λεμφαδένες και διασπάται στο μεγαλύτερο ποσοστό της. Η εναπομείνασα υαλουρονάνη εισέρχεται στην αιματική κυκλοφορία και καταβολίζεται από το ήπαρ (κυρίως), τους νεφρούς, το σπλήνα και το μυελό των οστών[76].

## β. Ιστικός καταβολισμός

Ο ρυθμός απομάκρυνσης της παραγόμενης υαλουρονάνης διαφέρει ανάλογα με τον ιστό αντίσχυσης της. Συγκεκριμένα, ο χρόνος ημίσειας ζωής του πολυσακχαρίτη είναι 60 min για το υδατοειδές υγρό, 12 h για το αρθρικό υγρό και 70 ημέρες για το υαλώδες σώμα[17].

Η απομάκρυνση της υαλουρονάνης από τους ιστούς που την παράγουν οφείλεται κατά 70% στην έκθλιψη της στην λεμφική κυκλοφορία και κατά 30% στον τοπικό καταβολισμό της[44]. Μάλιστα, σε ιστούς που δεν διαθέτουν λεμφική παροχή, η απομάκρυνση του πολυσακχαρίτη επιτυγχάνεται εξ ολοκλήρου με τοπικό καταβολισμό. Ο καταβολισμός αυτός αποδίδεται[77] τόσο στις παραμorfωτικές δυνάμεις που αναπτύσσονται σε διάφορους ιστούς (π.χ. αρθρώσεις, δέρμα, κ.τ.λ.), όσο και στη δράση κυττάρων της περιοχής (ιστικά μακροφάγα, επιδερμοκύτταρα, χονδροκύτταρα, νοβλάστες, κ.τ.λ.).

## γ. Λεμφαδενικός καταβολισμός

Η εκθλιβόμενη από τους παραγωγούς ιστούς υαλουρονάνη εισέρχεται στη λεμφική κυκλοφορία και καταβολίζεται στους λεμφαδένες σε ποσοστό μεγαλύτερο από 70%[44]. Η πρόσληψη του πολυσακχαρίτη από τους λεμφαδένες επιτυγχάνεται με την ύπαρξη ειδικών υποδοχέων, οι οποίοι συνδέονται και με τη θειική χονδροϊτίνη[78].

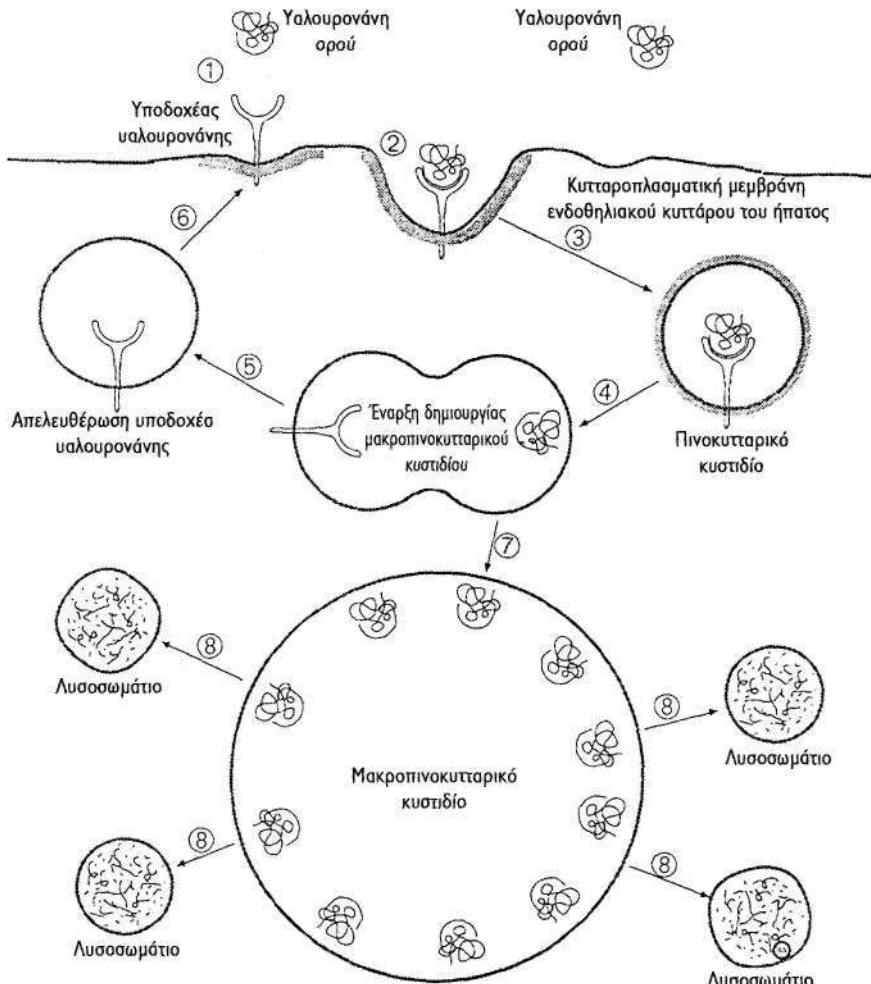
## δ. Ηπατικός καταβολισμός

Η ποσότητα της υαλουρονάνης που δεν καταβολίστηκε ούτε στους ιστούς παραγωγής της, ούτε στους λεμφαδένες, εισέρχεται τελικά στην αιματική κυκλοφορία[79]. Καθημερινά, η εισροή αυτή ανέρχεται περίπου σε 1 mg πολυσακχαρίτη/kgg σωματικού βάρους[75]. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της υαλουρονάνης στο αίμα είναι περίπου 120 sec[80]. Η αιματική κάθαρση του πολυσακχαρίτη,

με βάση την κινητική Michaelis-Menten, χαρακτηρίζεται από  $K_m = 0,20 \mu\text{g/l}$  και από  $V_{max} = 200 \text{ mg/24 h}$ [76].

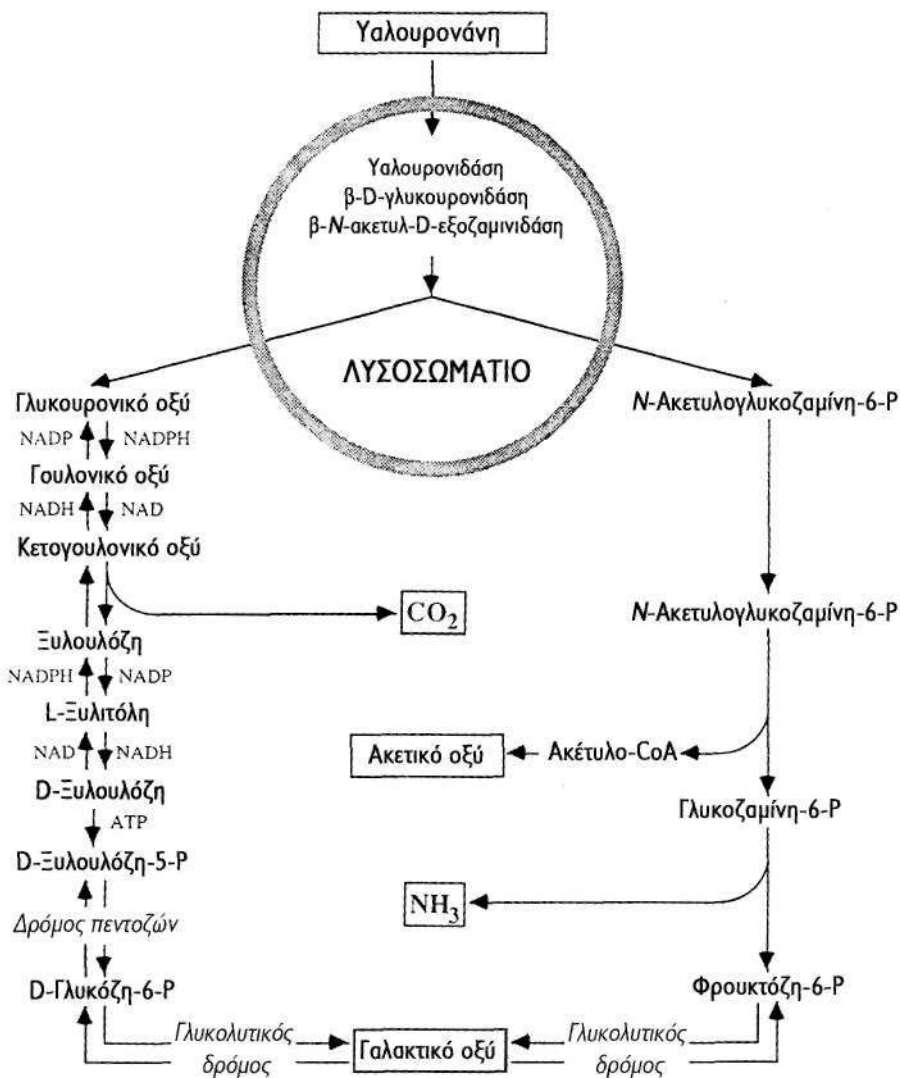
Η υαλουρονάνη που ανιχνεύεται στο αίμα δεσμεύεται κατά 90% στο ήπαρ και κατά 10% στους νεφρούς, στο σπλήνα και στο μυελό των οστών[77].

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολλοειδών είναι τα μόνα υπεύθυνα για την πρόσληψη του πολυσακχαρίτη από το ήπαρ[80]. Ο συγκεκριμένος κυτταρικός πληθυσμός φέρει στην επιφάνειά του ειδικό υποδοχέα για τη δέσμευση της υαλουρονάνης[33] (Εικόνα Γ/Α5.1). Ο υποδοχέας αυτός έχει μοριακό βάρος 100000 D. Η συνάφειά του με την υαλουρονάνη αυξάνει ανάλογα με το μήκος της



**Εικόνα Γ/Α5.1:** Στάδια καταβολισμού της υαλουρονάνης του ορού από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος. Οι αριθμοί δεικνύουν χρονική σειρά.

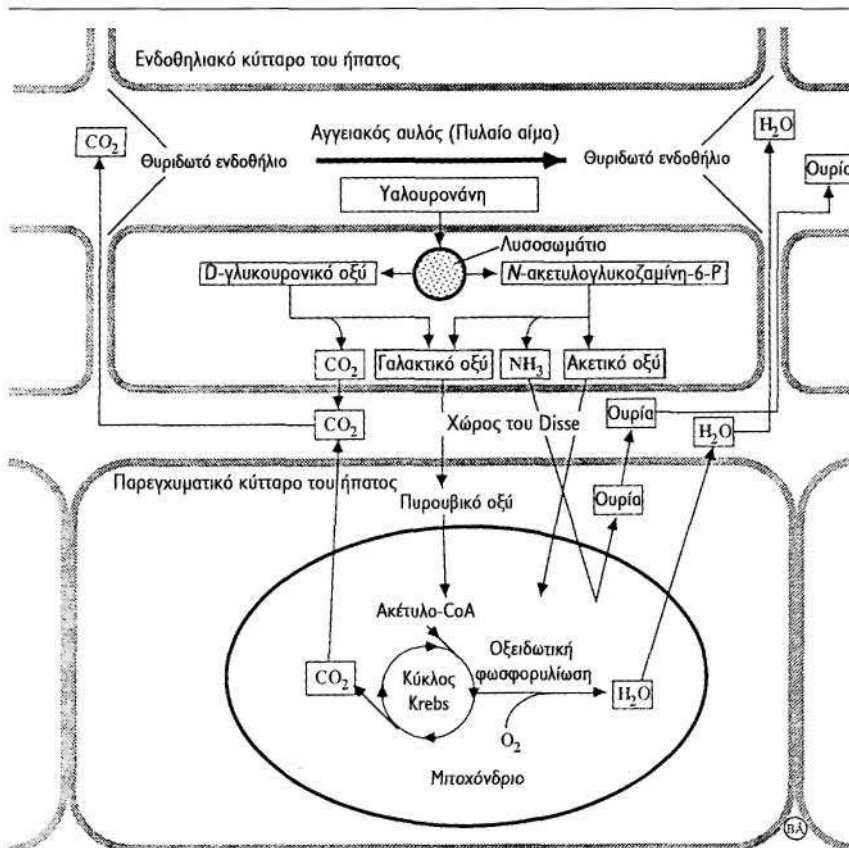
πολυσακχαρτικής αλυσίδας[81]. Εκτός από την υαλουρονάνη, ο υποδοχέας συνδέεται και με τη θεική χονδροϊτίνη[77] (τρεις φορές ισχυρότερα). Σε κάθε ενδοθηλιακό κύτταρο των ηπατικών κολποειδών ανιχνεύονται 500000 υποδοχείς, 100000 από τους οποίους βρίσκονται στην έξω επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Η σύνδεση της υαλουρονάνης με τον υποδοχέα οδηγεί στην από κοινού ενδοκύπωσή τους[33].



**Εικόνα Γ/Α5.2:** Οι μεταβολικοί δρόμοι που εμπλέκονται στον καταβολισμό της υαλουρονάνης του ορού από τα ενδοθηλιακά κύτταρα του ήπατος

Μετά την ενδοκύπωσή της η υαλουρονάνη αποδεσμεύεται από τον υποδοχέα και μεταφέρεται στα λυσοσωμάτια όπου και διασπάζεται από την υαλουρονιδάση, τη β-γλυκουρονιδάση και τη β-N-ακε-

τυλογλυκοζαμινιδάση[77]. Ο λυσοσωματικός καταβολισμός του πολυσακχαρίτη αποδίδει D-γλυκουρονικό οξύ και η N-ακετυλογλυκοζαμίνη, προϊόντα που μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα. Στη συνέχεια, το D-γλυκουρονικό οξύ και η N-ακετυλογλυκοζαμίνη καταβολίζονται περαιτέρω και αποδίδουν διοξείδιο του άνθρακα, γαλακτικό οξύ, ακετικό οξύ και αμμωνία (Εικόνα Γ/Α5.2). Τέλος, το γαλακτικό και το ακετικό οξύ εισέρχονται στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος και καταβολίζονται σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό[33] (Εικόνα Γ/Α5.3).



**Εικόνα Γ/Α5.3:** Συνεργασία ενδοθηλιακών και παρεγχυματικών κυττάρων του ήπατος κατά τον καταβολισμό της υαλουρονάνης του ορού.

## 6. Ιστική κατανομή

### α. Αδρή κατανομή

Περισσότερο από το μισό της συνολικής ποσότητας υαλουρονάνης του σώματος των θηλαστικών ανιχνεύεται στο δέρμα. Το ένα τέταρτο αυτής ανευρίσκεται στις αρθρώσεις. Τέλος, το ένα δέκατο

του πολυσακχαρίτη απομονώνεται από τους μύες[20] (Πίνακας Γ/Α6.1). Η συγκέντρωση υαλουρονάνης είναι σταθερή για τον ίδιο ιστό στα διάφορα θηλαστικά [17].

Οργανισμός	Ιστός	Συγκέντρωση (mg υαλουρονάνης/gr ιστού)
Άνθρωπος	Ομφάλιος λώρος	4100
	Αρθρικό υγρό	3600
	Υαλώδες σώμα	300
	Λέμφος	15
	Ούρα	0,5
	Αίμα	0,05
Αρουραίος	Δέρμα	840
	Αρθρώσεις	280
	Μύες	130
	Εγκέφαλος	74
	Λεπτό έντερο	44
	Πνεύμονες	34
	Νεφρός	30
	Ήπαρ	4
Βοοειδή	Ρινικός χόνδρος	1200
Πτεεινός	Λειρί	7500

**Πίνακας Γ/Α6.1:** Αντιστοιχία συγκέντρωσης υαλουρονάνης και ιστού απομόνωσής της.

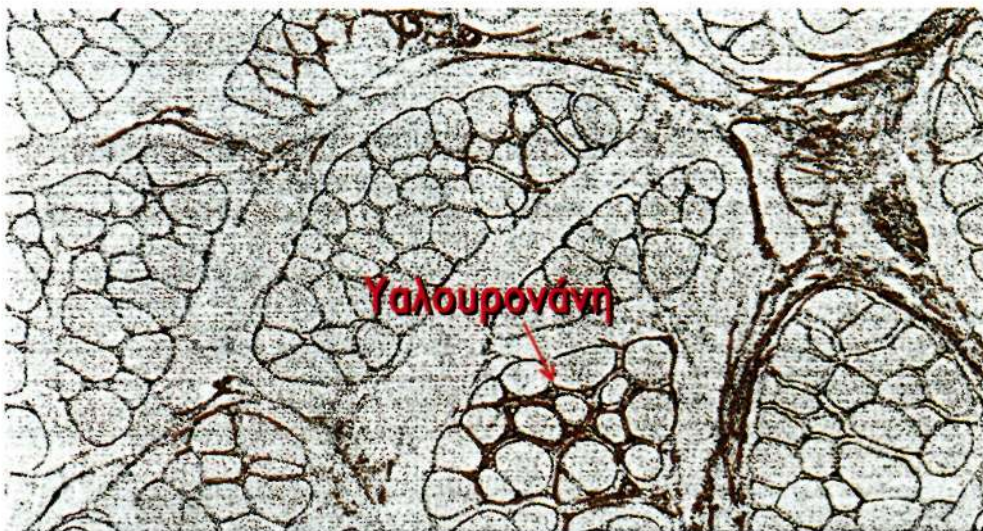
## β. Ειδική κατανομή

Στο συνδετικό ιστό, η υαλουρονάνη ανιχνεύεται στις περιοχές ανάπτυξης δικτύων κολλαγόνου. Τα δίκτυα αυτά μπορεί να είναι είτε αραιά και ευαίσθητα, όπως στο υαλώδες σώμα του οφθαλμού, είτε πυκνά και ισχυρά, όπως στο δέρμα. Επιπλέον, στο συνδετικό ιστό περιοχών αυξημένης κινητικότητας (π.χ. τενόντια έλυτρα, περιμύια, κ.τ.λ.) ανευρίσκεται θεμέλια ουσία υψηλής περιεκτικότητας σε υαλουρονάνη[38].

Στον έξω χιτώνα όλων των αγγείων ανιχνεύεται υαλουρονάνη, ανεξάρτητα από το μέγεθος τους, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές (π.χ. φλεγμονές, όγκοι, κ.τ.λ.) καταστάσεις[82]. Το ποσό του πολυσακχαρίτη που απομονώνεται από τις αρτηρίες είναι μεγαλύτερο από αυτό των φλεβών[38]. Οι αρτηρίες με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε υαλουρονάνη είναι οι πνευμονικές[83].

Στους γραμμωτούς μύες, η υαλουρονάνη ανευρίσκεται στα ενδομύια, στα περιμύια και στα λοιπά

μυϊκά έλυτρα[82] (Εικόνα Γ/Α6.1). Το ίδιο ισχύει και για τον καρδιακό μυ[38]. Αντίθετα, ο πολυσακχαρίτης δεν απομονώνεται από τις λείες μυϊκές ίνες[38].



**Εικόνα Γ/Α6.1:** Στους γραμμωτούς μύς, η υαλουρονόνη εντοπίζεται στα ενδομύια, περιμύια και λοιπά μυϊκά έλυτρα. Ο καφέ χρωματισμός δεικνύει την ύπαρξη του πολυσακχαρίτη.

Όσον αφορά στο νευρικό σύστημα, η υαλουρονόνη ανιχνεύεται κυρίως στη λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού και στο μεσολόβιο. Επίσης, ανευρίσκεται γύρω από τους κόμβους του Ranvier[84]. Τέλος, ο πολυσακχαρίτης που απομονώνεται από τον εμβρυϊκό νευρικό ιστό είναι περισσότερος από αυτόν του ώριμου[85].



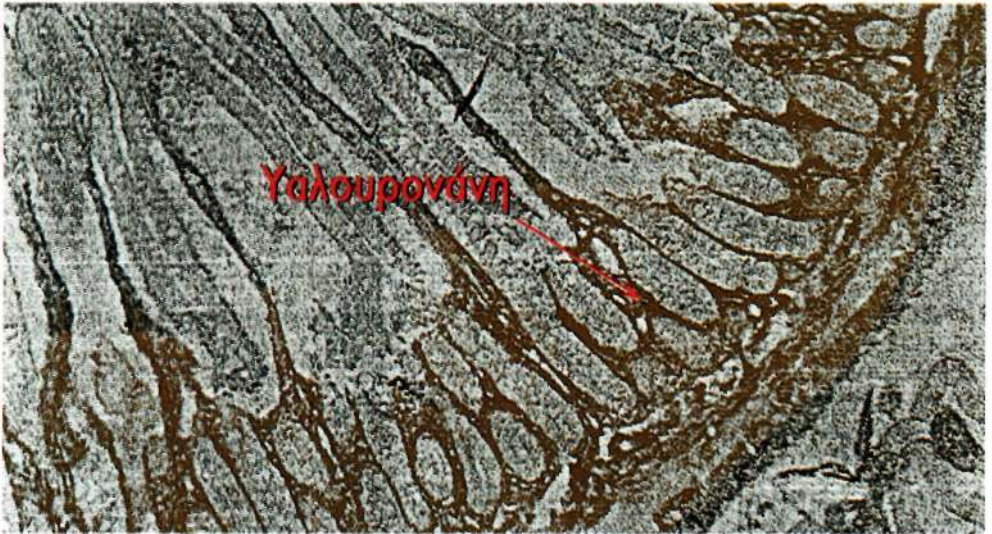
**Εικόνα Γ/Α6.2:** Στο ήπαρ, η υαλουρονόνη εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη του κολαγγειακού επιθηλίου, στο χώρο του Disse και στον έξω χιτώνα όλων των ηπατικών αγγείων. Ο καφέ χρωματισμός δεικνύει την ύπαρξη του πολυσακχαρίτη.

Στο ήπαρ, η υαλουρονάνη ανιχνεύεται στις βασικές μεμβράνες των χολαγγειακών επιθηλίων. Επίσης, ανευρίσκται στο χώρο του Disse. Τέλος, ο πολυσακχαρίτης εντοπίζεται στον έξω χιτώνα όλων των ηπατικών αγγείων[20] (Εικόνα Γ/Α6.2).

Όσον αφορά στο νεφρό, η υαλουρονάνη ανιχνεύεται περισσότερο στη μυελώδη μοίρα και στις θηλές και λιγότερο στο φλοιό[86].

Στο λεπτό έντερο, η υαλουρονάνη εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη του θηλώδους επιθηλίου, στην υποβλεννογόνιο στιβάδα και στον περιλεμφαγγειακό χώρο[82] (Εικόνα Γ/Α6.3).

Τέλος, όσον αφορά στα βιολογικά υγρά, η υαλουρονάνη ανιχνεύεται κυρίως στη λέμφο, στο αρθρικό, στο πλευρικό, στο περικαρδιακό και στο περιτοναϊκό υγρό, ενώ απομονώνεται σε μικρότερη ποσότητα από το αίμα και από τα ούρα[38].

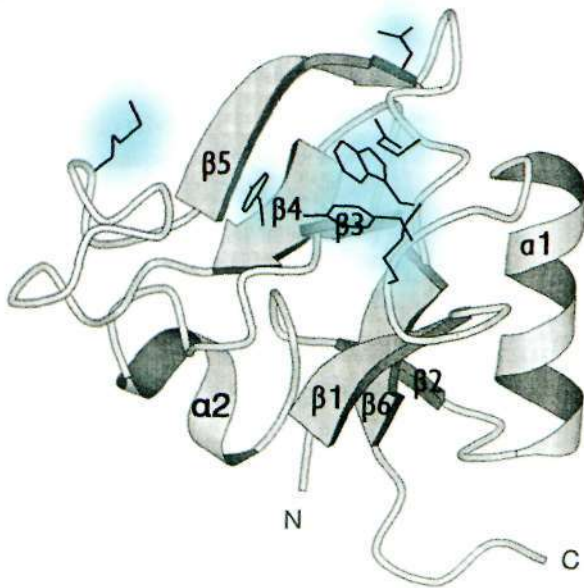


**Εικόνα Γ/Α6.3:** Στο λεπτό έντερο, η υαλουρονάνη εντοπίζεται στη βασική μεμβράνη του θηλώδους επιθηλίου, στην υποβλεννογόνιο στιβάδα και στον περιλεμφαγγειακό χώρο. Ο καφέ χρωματισμός δεικνύει την ύπαρξη του πολυσακχαρίτη.

## 7. Υαλουρονανοσυγκολλητίνες

### α. Γενικά

Η υαλουρονάνη συνδέεται με πολλά από τα συστατικά του εξωκυττάρου χώρου. Επίσης, προσκολλάται στην επιφάνεια ποικίλων ειδών κυττάρων. Οι προαναφερόμενες συνδέσεις επιτυγχάνο-



**Εικόνα Γ/Α7.1:** Απεικόνιση της τεταρτοταγούς δομής του στοιχείου σύνδεσης. Η πρωτεΐνη αποτελείται από δύο α έλικες, την α1 και την α2, και από δύο αντιπαράλληλες β διαμορφώσεις την SI (β1, β2, β6) και την SII (β3, β4, β6). Ο μπλε χρωματισμός δεικνύει τα σημεία σύνδεσης της υαλουρονάνης.

αλυσίδες που απαρτίζουν μόριο με υδρόφοβο πυρήνα[89] (Εικόνα Γ/Α7.1). Μία υαλουρονανοσυγκολλητίνη μπορεί να φέρει και τους δύο μηχανισμούς σύνδεσης. Μάλιστα, τις περισσότερες φορές η αμινοξείκη αλληλουχία B(X<sub>7</sub>)B εδράζεται "μέσα" στο στοιχείο σύνδεσης[89]. Τέλος, οι

υαλουρονανοσυγκολλητίνες του εξωκυττάριου χώρου συνδέουν κατ' ελάχιστο υαλουρονάνη μήκους 3 δισακχαριτών, ενώ οι υαλουρονανοσυγκολλητίνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης συνδέουν κατ' ελάχιστο υαλουρονάνη μήκους 5 δισακχαριτών [38].

## β. Υαλουρονανοσυγκολλητίνες εξωκυττάριου χώρου

Οι υαλουρονανοσυγκολλητίνες του εξωκυττάριου χώρου είτε είναι πρωτεογλυκάνες είτε είναι πρωτεΐνες (Πίνακας Γ/Α7.1). Οι εξωκυττάριες υαλουρονανοσυγκολλητίνες-πρωτεογλυκάνες είναι μακρομόρια μεγάλου μεγέθους, το καρβοξυτελικό τους άκρο παρουσιάζει ομολογία με τη λεκτίνη και συνδέουν την υαλουρονάνη με τη βοήθεια ενός ή περισσότερων στοιχείων σύνδεσης[90]. Από τις πέντε υαλουρονανοσυγκολλητίνες-πρωτεογλυκάνες που έχουν απομονωθεί, καλύτερα χαρακτηρισμένη είναι η αγκρεκάνη[90]. Οι εξωκυττάριες υαλουρονανοσυγκολλητίνες-πρωτεΐνες ονομάζονται και υαλουρονανολεκτίνες. Η μελέτη και των εννέα υαλουρονανολεκτινών που έχουν απομονωθεί βρίσκεται ακόμα στα σπάργανα.

νται με τη βοήθεια ειδικών πρωτεογλυκανών και πρωτεϊνών, οι οποίες ονομάζονται υαλουρονανοσυγκολλητίνες[87]. Έχουν αναχνευθεί δύο μηχανισμοί με τους οποίους οι υαλουρονανοσυγκολλητίνες συνδέουν την υαλουρονάνη. Ο πρώτος ονομάζεται "αμινοξείκη αλληλουχία B(X<sub>7</sub>)B", όπου το B αντιπροσωπεύει κατάλοιπο αργινίνης ή λυσίνης, ενώ το X<sub>7</sub> αντιπροσωπεύει αλληλουχία 7 υδρόπων, εκ των οποίων τουλάχιστον το ένα είναι βασικό[88]. Ο δεύτερος ονομάζεται "στοιχείο σύνδεσης", αποτελεί πρωτεΐνη μεγέθους 100 αμινοξείκων καταλοίπων και σχηματίζεται από 4 πολυπεπτιδικές



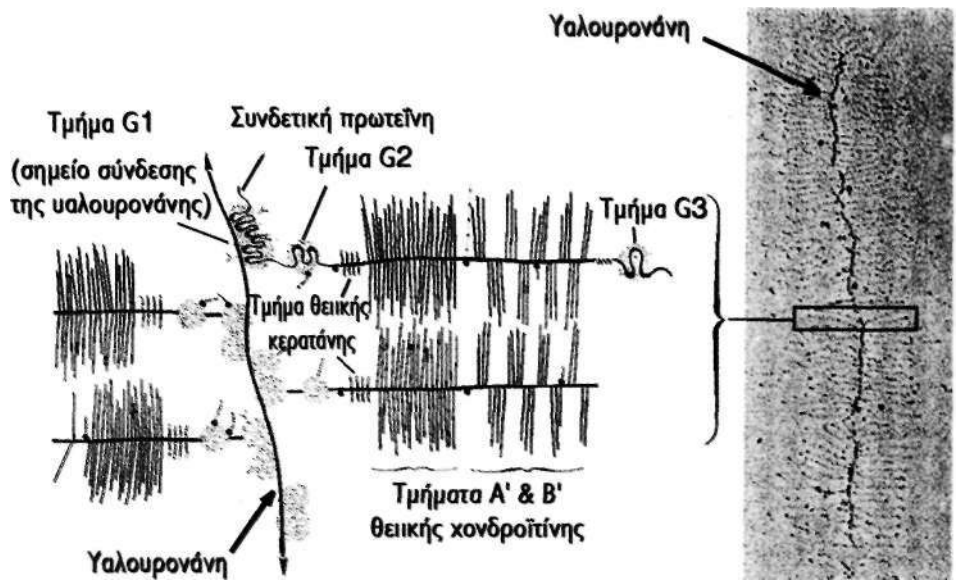
Κατηγορία	Όνομασία	Ιστός απομόνωσης
Πρωτεογλυκάνες	Αγκρεκάνη	Χόνδρος
	Βερσικάνη	Ολοσωματικά
	Μπρεβικάνη	Εγκέφαλος
	Νευροκάνη	Εγκέφαλος
	Ινοβλαστοκάνη	Ινώδης ιστός
Πρωτεΐνες	TS-6	Ολοσωματικά
	Κολλαγόνο VI	Ολοσωματικά
	Φιμπρονεκτίνη	Ολοσωματικά
	Αιμοπηξίνη	Ολοσωματικά
	BEHAP	Εγκέφαλος
	SHAP	Αρθρικό υγρό
	CIq	Αρθρικό υγρό
	P-32	Νεφρός
HABR-102	Χονδροσάρκωμα	

**Πίνακας Γ/Α7.1:** Υαλουρονανοσυγκολλητίνες εξωκυττάριου χώρου.

Το αμινοτελικό άκρο του πρωτεϊνικού πυρήνα της αγκρεκάνης ονομάζεται G1, εμπεριέχει δύο στοιχεία σύνδεσης υαλουρονάνης και επιδεικνύει δομή ανοσοσφαιρίνης[90]. Το G1 τμήμα της αγκρεκάνης αλληλεπιδρά με ομόλογο, ανεξάρτητο πολυπεπίδιο που ονομάζεται "συνδετική πρωτεΐνη". Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην ισχυρή σύνδεση της υαλουρονάνης με το σύμπλεγμα G1-συνδετική πρωτεΐνη. Κατά την προαναφερόμενη σύνδεση, από κάθε σύμπλεγμα δεσμεύονται 10 δι-σακχαρίτες της υαλουρονάνης. Επομένως, κατά μήκος της αλυσίδας του πολυσακχαρίτη βρίσκονται συνδεδεμένα πολλά μόρια αγκρεκάνης (Εικόνα Γ/Α7.2). Στη συνέχεια του πρωτεϊνικού πυρήνα της αγκρεκάνης ανιχνεύονται το τμήμα G2 (ομόλογο με το G1), το πλούσιο σε θειική κερατάνη τμήμα και το υψηλού αρνητικού φορτίου και πλούσιο σε θειική χονδροϊτίνη τμήμα[90]. Τέλος, ακολουθεί το τμήμα G3, στο οποίο συμπεριλαμβάνονται το ομόλογο με τον EGF κομμάτι, το ομόλογο με πρωτεΐνη ρύθμισης του συμπληρώματος κομμάτι και το ομόλογο με τη λεκτίνη καρβοξυτελικό άκρο του πρωτεϊνικού πυρήνα της αγκρεκάνης[90].

### γ. Υαλουρονανοσυγκολλητίνες κυτταροπλασματικής μεμβράνης

Οι υαλουρονανοσυγκολλητίνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης χαρακτηρίζονται ως κυτταρικοί υποδοχείς της υαλουρονάνης. Μέχρι σήμερα έχουν ανακαλυφθεί και μελετηθεί ο υποδοχέας CD 44, ο υποδοχέας RHAMM, ο υποδοχέας των LEC και οι υποδοχείς της ομάδας Ivd 4[87].



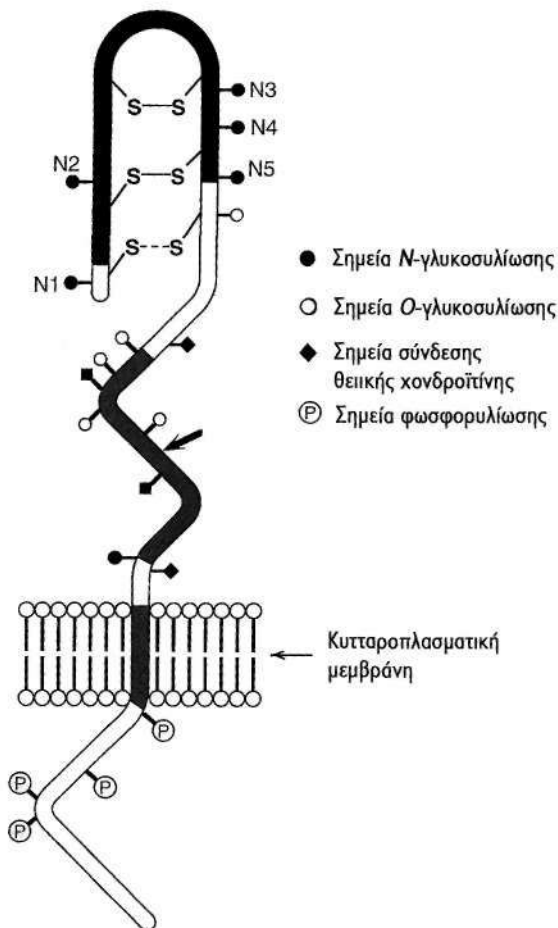
**Εικόνα Γ/Α7.2:** Σχηματική αναπαράσταση σε μεγέθυνση της μικροσκοπικής εικόνας δεξιά. Απεικονίζεται το σύμπλεγμα της υαλουρονάνης με την αγκρεκάνη και τις υπόλοιπες πρωτεογλυκάνες.

Ο CD 44 ανήκει στις τύπου I διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης[91]. Έχουν ανιχνευθεί τουλάχιστον 10 ισομορφές του υποδοχέα, οι οποίες στο σύνολο τους συνδέουν την υαλουρονάνη[92]. Η ευρύτερα διαδεδομένη ισόμορφη ονομάζεται CD 44 H και βρίσκεται στο σύνολο του μεσεγχύματος και στους ιστούς μεσοδερμικής προέλευσης[91]. Αποτελεί τη "μήτρα" παραγωγής των υπόλοιπων ισόμορφων με τη διαδικασία ενσωμάτωσης διαφορετικών εξονίων. Έχει μοριακό βάρος 85 kD και μήκος 341 αμινοξικά κατάλοιπα, από τα οποία, τα 248 είναι εξωκυτάρια, τα 21 διαμεμβρανικά και τα 72 ενδοκυτάρια (Εικόνα Γ/Α7.3). Τα πρώτα 170 από τα 248 εξωκυτάρια αμινοξικά κατάλοιπα εμπεριέχουν δύο αμινοξικές αλληλουχίες B(X<sub>7</sub>)B και ένα στοιχείο σύνδεσης[88, 89]. Στα υπόλοιπα 78 επισυμβαίνουν οι αλλαγές που οδηγούν στη δημιουργία των ισομορφών του υποδοχέα. Κατά μήκος και των 341 αμινοξικών καταλοίπων ανιχνεύονται ειδικές θέσεις για γλυκοσυλιώσεις, φωσφορυλιώσεις, μεθυλιώσεις, παλμπολιώσεις και για συνδέσεις με θειική χονδροϊτίνη[91]. Η σύνδεση του CD 44 με την υαλουρονάνη ρυθμίζεται με αλληλεπιδράσεις του υποδοχέα με άλλα μακρομόρια του εξωκυτάριου χώρου, με ενεργοποίηση των ενδοκυττάρων σηματογωγών συστημάτων, με μετα-μεταφραστικές μοριακές μετατροπές (π.χ. γλυκοσυλιώσεις, φωσφορυλιώσεις, κ.τ.λ.), με αλλαγές στην επιφανειακή κατανομή του υποδοχέα, με αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τον κυτταρικό σκελετό και με έκφραση περισσότερων του ενός ισομορφών του υποδοχέα[91].

Ο RHAMM αντιστοιχεί σε μία από τις τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες που απαρτίζουν τον υποδοχέα HARC. Έχουν ανιχνευθεί δύο ισομορφές του υποδοχέα, οι οποίες βρίσκονται κυρίως σε νο-

βλάστες, αλλά και σε πολλά άλλα είδη κυττάρων. Το μοριακό του βάρος είναι 58 kD[93]. Ο υποδοχέας εμπεριέχει μία αμινοξειική αλληλουχία B(X<sub>7</sub>)B [88]. Η σύνδεση του RHAMM με την υαλουρονάνη ρυθμίζεται με μεταμεταφραστικές μοριακές μετατροπές και με αλληλεπίδραση του υποδοχέα με anti-RHAMM αντισώματα[88]. Η έκφραση του RHAMM στην κυτταρική μεμβράνη αυξάνεται κάτω από την επίδραση του TGF-β[94].

Στον υποδοχέα των LEC δεν ανιχνεύεται κανένας από τους δύο γνωστούς μηχανισμούς σύνδεσης. Το ίδιο ισχύει και για τους υποδοχείς της ομάδας IVd 4[88, 89]. Στους τελευταίους συμπεριλαμβάνονται τρεις πρωτεΐνες με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 50 έως 95 kD. Οι πρωτεΐνες αυτές βρίσκονται στα διάφορα είδη εγκεφαλικών κυττάρων[84].



**Εικόνα Γ/Α7.3:** Ο ανθρώπινος CD 44 H<sub>1</sub>. Το μαύρο τμήμα δεικνύει τις αλληλουχίες των στοιχείων σύνδεσης της υαλουρονάνης. Το γκρι τμήμα δεικνύει την περιοχή μέγιστης ποικιλότητας ανάμεσα στις ισομορφές του CD 44.

## 8. Βιολογική σημασία

### α. Η υαλουρονάνη ως μακρομόριο

#### *Δομή εξωκυττάρου χώρου*

Η υαλουρονάνη αποτελεί την κύρια γλυκοζαμινογλυκάνη της θεμέλιας ουσίας του εξωκυττάρου χώρου σε όλα τα σημεία του σώματος[34]. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη ανευρίσκεται σε ιστούς νευροεξωδερμικής και μεσοδερμικής προέλευσης[85]. Στον ώριμο οργανισμό απομονώνεται από

τους μαλθακούς ιστούς, τις φλεγμονώδεις εστίες και τους όγκους[38].

## ii. *Στερικός αποκλεισμός*

Αν ένα διάλυμα που περιέχει υαλουρονάνη και αλβουμίνη έρθει σε επαφή με σκέτο διαλύτη διαμέσου διαπερατής στην αλβουμίνη αλλά όχι στην υαλουρονάνη μεμβράνης, τότε, μετά την επίτευξη χημικής ισορροπίας, η συγκέντρωση της αλβουμίνης θα είναι σημαντικά μεγαλύτερη στο διάλυμα που δεν περιέχει τον πολυσακχαρίτη[95] (απλοποιημένο μοντέλο). Το φαινόμενο αυτό, το οποίο αποδεικνύει πως η υαλουρονάνη "αποδιώχνει" την αλβουμίνη από το κοινό τους διάλυμα, ονομάζεται στερικός αποκλεισμός. Ο στερικός αποκλεισμός που ασκεί ο πολυσακχαρίτης έχει εφαρμογή σε όλα τα μακρομόρια που ανιχνεύονται στον εξωκυττάριο χώρο και ενισχύεται με την αύξηση του μοριακού βάρους της υαλουρονάνης[51]. Τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου φαινομένου επιπυγχάνονται με μηχανικό και όχι με ηλεκτροστατικό ή άλλο χημικό τρόπο. Ο στερικός αποκλεισμός ρυθμίζει τη μεταφορά και την κατανομή των πρωτεϊνών του πλάσματος στους διάφορους ιστούς[17].

## iii. *Απενεργοποίηση ελεύθερων ριζών $O_2$*

Η έκθεση διαφόρων ιστών σε υπερϊώδη ακτινοβολία επάγει την παραγωγή υαλουρονάνης[96]. Η ύπαρξη του πολυσακχαρίτη στο εξωκυττάριο στρώμα προστατεύει τα κύτταρα από την επίδραση των ROI[97]. Συγκεκριμένα, η υαλουρονάνη εξουδετερώνει τις ROI διασπώμενη σε μικρότερες πολυσακχαρικές αλυσίδες[98]. Επιπλέον, το περικυττάριο δίκτυο υαλουρονάνης εμποδίζει την κυτταρική προσβολή από καταστρεπτικά ένζυμα και από τις ουσίες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης[97].

## iv. *Λίπανση κινούμενων επιφανειών*

Οι ρεολογικές ιδιότητες της υαλουρονάνης (εξώδες και ελαστικότητα) καθιστούν τον πολυσακχαρίτη ιδανική λιπαντική ουσία. Πράγματι, η υαλουρονάνη ανιχνεύεται σε ιστικές επιφάνειες που γλιστρούν η μία επάνω στην άλλη (π.χ. γραμμωτές μυϊκές ίνες μεταξύ τους, τένοντες με τα έλυτρα τους, κ.τ.λ.) λειτουργώντας ως λιπαντικό[17]. Επίσης, ο πολυσακχαρίτης εντοπίζεται στο αρθρικό υγρό, με αμφιλεγόμενες ωστόσο λιπαντικές ιδιότητες[56].

## v. *Κατακράτηση νερού (οίδημα)*

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ψευδοπλαστική, μη-Νευτόνια συμπεριφορά της υαλουρονάνης και τα ελαστικά χαρακτηριστικά της προσδίδουν στα διαλύματα του πολυσακχαρίτη ωσμωρυσμικές ιδιότητες.

Εκτός από την ανάπτυξη ωσμωτικών δυνάμεων, η υαλουρονάνη κατακρατά νερό και με διαφορετικό μηχανισμό. Όταν το μόριο του πολυσακχαρίτη έχει τη σφαιρική του διαμόρφωση, έχει την

ικανότητα να συγκρατεί με μηχανικό τρόπο μεγάλες ποσότητες νερού-διαλύτη στο εσωτερικό του. Στη μέγιστη δυνατή συγκέντρωση που επιτρέπει τη σφαιρική διαμόρφωση (0,5 mg/ml) η υαλουρονάνη αποκτά τη μέγιστη δυνατή προσροφητικότητα νερού (1000 φορές τη μάζα της). Αυτό σημαίνει πως αν σε ένα lt νερού προσθέσουμε 0,5 gr υαλουρονάνης, τα 500 ml του διαλύτη θα "εγκλωβιστούν" από τον πολυσακχαρίτη[51, 54].

Επιπλέον, όπως έχει προαναφερθεί, στον πρωτεϊνικό πυρήνα των υαλουρονανοσυγκολλητινών τύπου ανγκρεκάνης ανιχνεύεται τμήμα πλούσιο σε θειική χονδροϊτίνη, το οποίο φέρει υψηλό αρνητικό φορτίο. Η υαλουρονάνη οργανώνει σε γειτονία μεγάλο αριθμό τέτοιων υαλουρονανοσυγκολλητινών (Εικόνα Γ/Α7.2). Η αλληλεπίδραση των αρνητικά φορτισμένων τμημάτων τους με τα μοριακά δίπολα του νερού οδηγεί σε υδατική κατακράτηση[90].

Σε όσες από τις πνευμονικές παθήσεις αναπτύσσεται διάμεση ίκωση με συνοδό οίδημα(π.χ. νόσος του Farmer, ARDS, σαρκοειδωση, κ.τ.λ.) ανιχνεύονται αυξημένα ποσά ιστικής υαλουρονάνης[68]. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας του πολυσακχαρίτη και της βαρύτητας του οιδήματος.

Η δυσκαμψία και η δυσκινησία που παρατηρείται στο μυοκάρδιο ύστερα από έμφραγμα σχετίζεται με την ανάπτυξη διάμεσου οιδήματος. Στο μετεμφραγματικό καρδιακό ιστό ανιχνεύονται πολύ υψηλά ποσά υαλουρονάνης[99]. Υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας του πολυσακχαρίτη και της βαρύτητας του οιδήματος.

Όσον αφορά στις παθήσεις του μυοσκελετικού (π.χ. αρθρίτιδες, τενοντίτιδες, μυϊκές κακώσεις, κ.τ.λ.), η ανάπτυξη διάμεσου οιδήματος συσχετίζεται θετικά με την ανίχνευση αυξημένης ιστικής υαλουρονάνης[100].

Τόσο στο γενικευμένο (υποθυρεοειδισμός) όσο και στο τοπικό (υπερθυρεοειδισμός) μυξοίδημα ανιχνεύονται πολύ μεγάλες ποσότητες υαλουρονάνης στους οιδηματώδεις ιστούς[38].

Τέλος, έχει παρατηρηθεί σταδιακή αύξηση της φλοιικής υαλουρονάνης των νεφρικών μοσχευμάτων που υφίστανται απόρριψη[86, 101], Μάλιστα, υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της έντασης της απόρριψης, της ιστικής ποσότητας του πολυσακχαρίτη και του αναπτυσσόμενου διάμεσου οιδήματος. Παρόμοιο, υαλουρονανοεξαρτώμενο, διάμεσο οίδημα παρουσιάζουν τα καρδιακά μοσχεύματα κατά την απόρριψή τους[102].

## β. Οι αλληλεπιδράσεις της υαλουρονάνης με τα κύτταρα

### i. Κυτταρικός πολλαπλασιασμός

Στους ταχέως αναπτυσσόμενους εμβρυϊκούς ιστούς ανιχνεύονται ικανές ποσότητες μικρομοριακής

και μεσομοριακής υαλουρονάνης. Όσο λιγότερο διαφοροποιημένα είναι τα εμβρυϊκά κύτταρα, τόσο μεγαλύτερες ποσότητες πολυσακχαρίτη παράγουν[84, 85]. Η υαλουρονάνη παρέχει το κατάλληλο υπόστρωμα για τον ταχύ κυτταρικό πολλαπλασιασμό που παρατηρείται κατά την ενδομήτρια ζωή. Η ποσότητα της υαλουρονάνης περιορίζεται θεαματικά κατά την μετεμβρυϊκή περίοδο, όταν μειώνεται η ταχύτητα της ιστικής ανάπτυξης[103]. Η ευθέως ανάλογη σύνδεση μεταξύ της παραγωγής του πολυσακχαρίτη και της μιτωτικής δραστηριότητας των εμβρυϊκών κυττάρων επάγεται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες (π.χ. bFGF[104], TGF-β[105], κ.τ.λ.) και ενισχύεται από την απουσία λεμφαγγείων στους νεοσχηματιζόμενους ιστούς[106].

Εκτός από τον εμβρυϊκό οργανισμό οι μιτωγόνες ιδιότητες της υαλουρονάνης έχουν παρατηρηθεί και σε ώριμους ιστούς[67, 85]. Συγκεκριμένα, ο παραγόμενος πολυσακχαρίτης βοηθά στην αποκόλληση του κυττάρου από περιβάλλον εξωκυττάριο στρώμα και επομένως διευκολύνει τη μιτωτική διαδικασία[72]. Μάλιστα, το μικρό μοριακό βάρος και η αυξημένη συγκέντρωση της υαλουρονάνης (εφόσον δεν ξεπερνά τα 7 mg/ml ) επιταχύνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό[107].

Η υαλουρονάνη εμπλέκεται στην εμφάνιση και στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών ινών που ανιχνεύονται στις αθηρωματώδεις αρτηριακές πλάκες. Η εμφάνιση του πολυσακχαρίτη προηγείται της εισβολής των λείων μυϊκών ινών στο έσω αρτηριακό τοίχωμα[108]. Το φαινόμενο επάγεται από προϊόντα αιμοπεταλιακής διάσπασης[109].

Οι περισσότεροι όγκοι είναι εμπλουτισμένοι σε υαλουρονάνη. Ο πολυσακχαρίτης επάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, η υαλουρονάνη παρέχει ένα καλά ενυδατωμένο περικυττάριο στρώμα, κατάλληλο για την προώθηση της άναρχης μιτωτικής διαδικασίας[110]. Επιπλέον, το περικυτταρικό δίκτυο του πολυσακχαρίτη παρεμποδίζει τους ανοσοολογικούς, αντικαρκινικούς μηχανισμούς του οργανισμού να καταστρέψουν τον αναπτυσσόμενο όγκο[111].

## ii. Μετανάστευση

Όταν πρόκειται να λάβει χώρα κυτταρική μετανάστευση, η ιστική ποσότητα της υαλουρονάνης αυξάνει. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με πολλά είδη κυττάρων[112] (π.χ. ινοβλάστες, λείες μυϊκές ίνες, κ.τ.λ.). Ο πολυσακχαρίτης προάγει την κυτταρική μετανάστευση, εφόσον το μοριακό βάρος του είναι μικρότερο των 10<sup>3</sup> kD και η συγκέντρωση του χαμηλότερη των 7 mg/ml. Όσο μικρότερο είναι το γινόμενο του μοριακού βάρους επί τη συγκέντρωση της υαλουρονάνης, τόσο περισσότερο ενεργοποιείται η κυτταρική μετανάστευση. Αντίθετα, μεγάλα γινόμενα οδηγούν σε αναστολή της κίνησης των κυττάρων[107]. Έχουν ανιχνευθεί δύο μηχανισμοί με τους οποίους εξηγείται το προαναφερόμενο φαινόμενο. Συγκεκριμένα, η υαλουρονάνη είναι υπεύθυνη για τη διάνοξη υδάτινων "διαδρόμων" για τα μετακινούμενα κύτταρα, δηλαδή λειτουργεί με μηχανικό τρόπο[112]. Επιπλέον, ο πολυσακχαρίτης επάγει την εμφάνιση μίας μεμβρανικής υαλουρονανοσυγκολλητίνης μοριακού βάρους 70 kD, η οποία, αφού συνδεθεί με την υαλουρονάνη, ενεργοποιεί τα συστήματα

των πρωτεϊνικών κινασών, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η κυτταρική κινητικότητα έως και 10 φορές[93].

Όπως ακριβώς συμβαίνει και με τις υπόλοιπες κατηγορίες κυττάρων, η μετανάστευση των κυττάρων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της φλεγμονώδους αντίδρασης επηρεάζεται από την παρουσία υαλουρονάνης. Συγκεκριμένα, η παρουσία μικρομοριακού πολυσακχαρίτη σε περιορισμένες συγκεντρώσεις βελτιστοποιεί τη φλεγμονή. Αντίθετα, όταν το μοριακό βάρος της υαλουρονάνης είναι μεγαλύτερο των  $10^3$  kD και η συγκέντρωση της μεγαλύτερη των 7 mg/ml, αναστέλεται η μετακίνηση των πολυμορφοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των μονοκυττάρων[107].

Κατά την αποκατάσταση της ιστικής βλάβης (π.χ. δερματικό τραύμα, ηπατεκτομή, κ.τ.λ.) ανιχνεύεται αυξημένη παραγωγή υαλουρονάνης[67]. Η αύξηση της συγκέντρωσης του πολυσακχαρίτη αποδίδεται στην ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων που βρίσκονται μακριά από το σημείο της ιστικής βλάβης. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί κάποιες κυτταρικές ομάδες του κατεστραμμένου ιστού στην αύξηση της παραγωγής της υαλουρονάνης[38]. Η μεγάλη τοπική αύξηση της συγκέντρωσης του πολυσακχαρίτη αναστέλει τη μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων στην περιοχή της ιστικής βλάβης[111]. Με το μηχανισμό αυτό περιορίζεται η φλεγμονώδης αντίδραση και προάγεται η ουλοποίηση ή η ιστική αναγέννηση.

Ο μεταβολισμός της υαλουρονάνης αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της μετάστασης (μετανάστευση καρκινικών κυττάρων) και της αύξησης (νεοαγγείωση) των κακοηθών όγκων[113]. Συγκεκριμένα, τόσο η μετανάστευση καρκινικών κυττάρων όσο και η νεοαγγείωση των κακοηθών όγκων προάγεται από την ύπαρξη άφθονης μικρομοριακής (έως και 20 δισακχαρίτες) υαλουρονάνης. Αντίθετα, τα προαναφερόμενα φαινόμενα αναστέλλονται με την απουσία ή με την ύπαρξη μεγαλομορίων του πολυσακχαρίτη.

### m. *Διαφοροποίηση*

Η υαλουρονάνη έχει την ικανότητα αφενός να σχηματίζει μακρομοριακά κυτταρικά υποστρώματα και αφετέρου να "εγκλωβίζει" μεγάλες ποσότητες νερού[51, 54]. Οι ιδιότητες αυτές την καθιστούν ικανή τόσο να εμποδίζει (δημιουργώντας εξωκυττάρια "φράγματα"), όσο και να προάγει (δημιουργώντας υδάτινους "διαδρόμους") την υπερπλασία και τη μετέπειτα διαφοροποίηση ενός νεοσχηματιζόμενου ιστού[107]. Το μοριακό βάρος του πολυσακχαρίτη είναι ο παράγοντας που καθορίζει την επίδραση του στην κυτταρική διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, υαλουρονάνη με μοριακό βάρος μικρότερο από  $10^3$  kD προάγει την υπερπλασία και τη μετέπειτα διαφοροποίηση των νεοσχηματιζόμενων ιστών, ενώ αντίθετα, υαλουρονάνη με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από  $10^3$  kD εμποδίζει το φαινόμενο[107].

#### iv. Φαγοκυττάρωση

Το φαινόμενο της φαγοκυττάρωσης διαιρείται στη φάση της κυτταρικής προσκόλλησης και στη φάση της πέψης των προς απομάκρυνση ουσιών. Τα διαλύματα υαλουρονάνης μπορούν είτε να προάγουν είτε να εμποδίσουν τις δύο αυτές φαγοκυτταρικές φάσεις. Συγκεκριμένα, ενώ τα διαλύματα του πολυσακχαρίτη προάγουν τη φαγοκυττάρωση, η σταδιακή αύξηση του ιξώδους τους αρχικά μειώνει και τελικά εμποδίζει την εκδήλωση του φαινομένου[107]. Η αύξηση του ιξώδους των διαλυμάτων της υαλουρονάνης επιτυγχάνεται με την αύξηση είτε της συγκέντρωσης είτε του μοριακού βάρους του πολυσακχαρίτη.

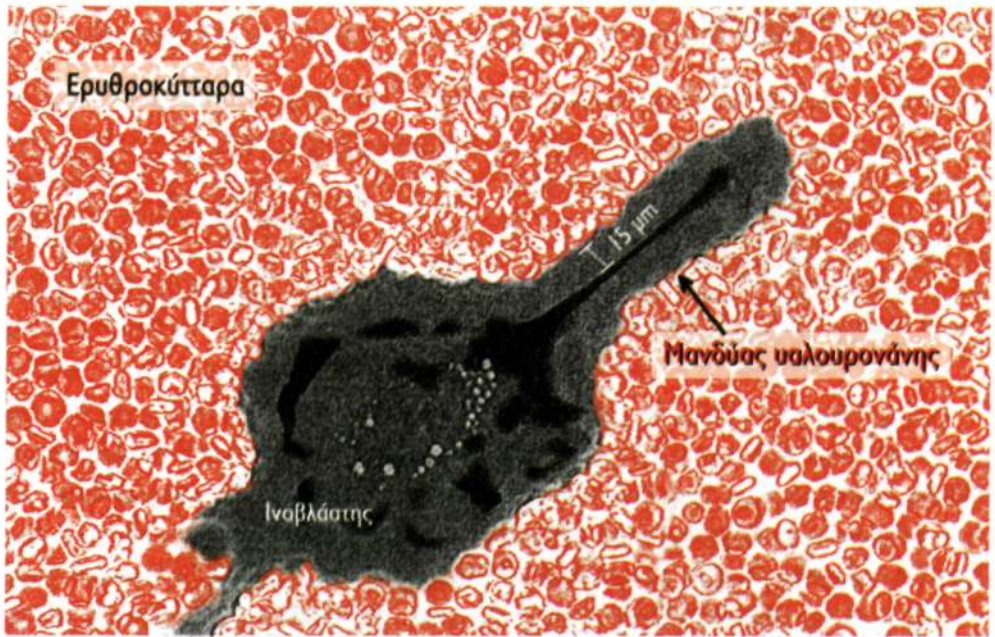
Η προαγωγή της φαγοκυττάρωσης από τα μικρού ιξώδους διαλύματα υαλουρονάνης σχετίζεται με την ύπαρξη υποδοχέων στα φαγοκύτταρα[114]. Συγκεκριμένα, εφόσον τα μόρια του πολυσακχαρίτη τέτοιων διαλυμάτων έχουν μέγεθος μεγαλύτερο από έξι δομικές μονάδες, μπορούν να συνδεθούν με προενεργοποιημένους, μεμβρανικούς υποδοχείς CD 44 των ιστικών μακροφάγων. Η σύνδεση αυτή οδηγεί σε έκφραση των γονιδίων MIP-1α, MIP-1β, crg-2, RANTES, I-κΒα και iNOS. Η ενεργοποίηση των προαναφερόμενων γονιδίων επάγει την παραγωγή των IL-1 β, TNF-α, IGF-1, καθώς και της συνθάσης του NO[115].

Αντίθετα, η ανάσχεση της φαγοκυττάρωσης από τα μεγάλα ιξώδους διαλύματα υαλουρονάνης γίνεται με μηχανικό τρόπο. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι διαλύματα άλλων μακρομοριακών ουσιών (π.χ. πρωτεϊνών, πυρηνικών οξέων, κ.τ.λ.) με παρόμοιο ιξώδες εμποδίζουν εξίσου το φαινόμενο[107].

#### v. Σηματαγωγά συστήματα

Πολλά είδη κυττάρων (π.χ. ινοβλάστες, μεσοθηλιακά κύτταρα, χονδροκύτταρα, κ.τ.λ.) στις *in vitro* καλλιέργειες τους αναπτύσσουν ένα μανδύα (Εικόνα Γ/Α8.1), του οποίου το πάχος ανέρχεται έως και 30 μm[116]. Το μέγεθος του περικυττάρου μανδύα είναι παρόμοιο με το μέγεθος του εξωκυττάρου στρώματος που αναλογεί σε κάθε ένα από τα προαναφερόμενα κύτταρα, όταν αυτά εντοπίζονται *in vivo*[107]. Ο περικυττάριος μανδύας αποτελείται κυρίως από υαλοουράνη[74]. Η υαλοουράνη του μανδύα που περιβάλλει ταχέως πολλαπλασιαζόμενα, χαμηλής διαφοροποίησης κύτταρα είναι συνδεδεμένη με την υαλοουρονική συνθάση της κυτταρικής μεμβράνης και το μόριό της είναι πλήρως εκπτυγμένο, σαν "καρφί". Αντίθετα, η υαλοουράνη του μανδύα που περιβάλλει βραδέως πολλαπλασιαζόμενα, υψηλής διαφοροποίησης κύτταρα είναι συνδεδεμένη με μεμβρανικές υαλοουροανασυγκολλητίνες και το μόριό της είναι περιπλεγμένο, σαν "αχυρόμπαλα"[107]. Επιπλέον, στο μανδύα της πρώτης κατηγορίας ανιχνεύονται σημαντικά ποσά θειικής χονδροϊτίνης και αγκρεκάνης, γεγονός που δεν ισχύει για το μανδύα της δεύτερης κατηγορίας[107]. Επίσης, το πρώτο είδος μανδύα είναι εξαιρετικά ευσταθές, ενώ το δεύτερο είδος αποσυντίθεται με την προσθήκη στην *in vitro* καλλιέργεια εξασακχαριτών υαλοουράνης[117]. Ο κύ-





**Εικόνα Γ/Α8.1:** Η ύπαρξη του περικυτταρικού μανδύα υαλουρονάνης εμποδίζει τα προστιθέμενα *in vitro* ερυθροκύτταρα να προσεγγίσουν τον ινοβλάστη που τον παράγει.

ριος ρόλος του περικυττάρου μανδύα υαλουρονάνης είναι να "προστατεύει" τους διάφορους μεμβρικούς υποδοχείς του κυττάρου από την επίδραση σηματοπαγών μεγαλομορίων[111]. Επιπλέον, παρέχει δομική σταθερότητα στους μηχανοϋποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης, βελτιστοποιώντας την απόκριση τους στα προσλαμβανόμενα ερεθίσματα[111].

Η σύνδεση της υαλουρονάνης με τους υποδοχείς CD 44 και RHAMM οδηγεί στη φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης αρκετών κυτταρικών πρωτεϊνών. Σε αυτές συμπεριλαμβάνεται και η πρωτεΐνη p 125 FAK, η οποία ευθύνεται για την κατάργηση των διακυτταρικών συνδέσεων και κατά συνέπεια την προαγωγή της κυτταρικής κινητικότητας. Παρόμοιος ρόλος έχει αποδοθεί στον ενδοκυττάριο, υαλουρονικό υποδοχέα Cdc 37[1 18].

## 9. Κλινικές εφαρμογές

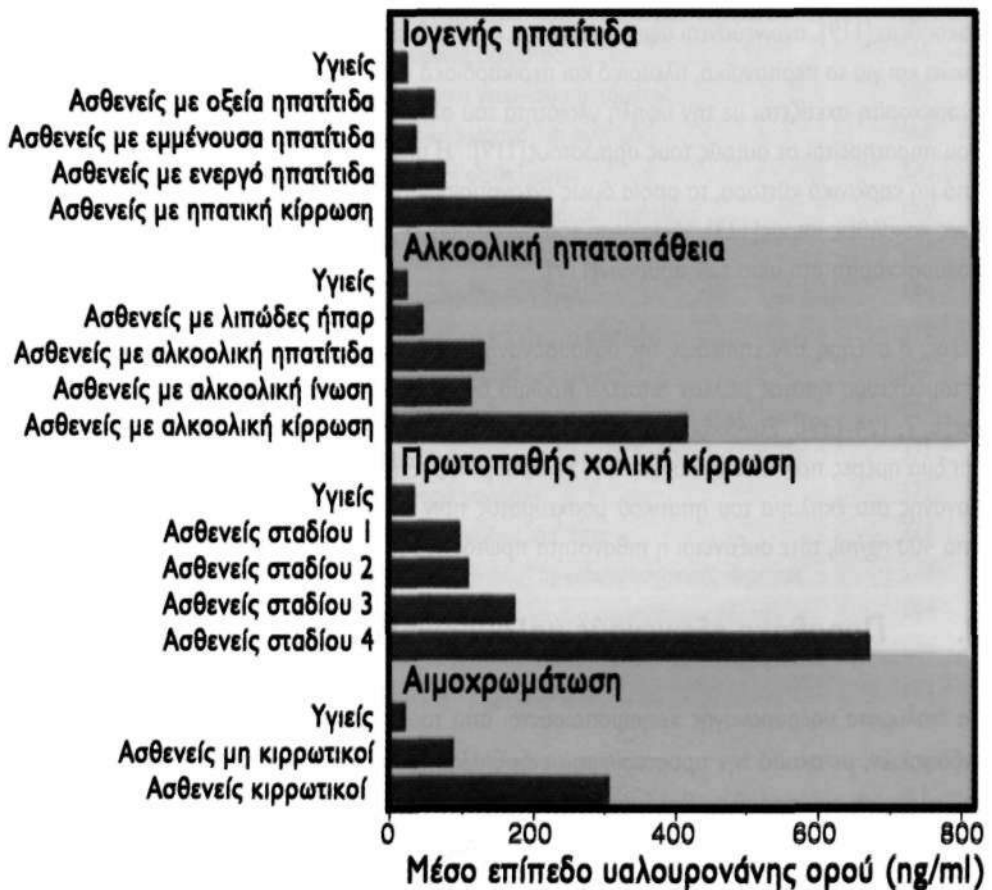
### α. Μέτρηση ενδογενούς υαλουρονάνης

Οι τεχνικές ποιοτικής και ποσοτικής μέτρησης της υαλουρονάνης εξελίχθηκαν τη δεκαετία του 1980[31]. Με τη βοήθειά τους διαπιστώθηκε ότι η ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του πολυσακχαρίτη σε ποικίλα βιολογικά υγρά και ιστικά διαμερίσματα[119]. Επομένως, για ορισμένες κατηγορίες ασθενειών, η ενδογενής υαλουρονάνη απο-

τελεί σημαντικό προγνωστικό δείκτη.

Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα υαλουρονάνης στο αίμα ανιχνεύονται κατά τις φλεγμονώδεις παθήσεις του συνδετικού ιστού [120] (π.χ. ρευματοειδής αρθρίτιδα, σκληρόδερμα, κ.τ.λ.). Η άνοδος των επιπέδων του πολυσακχαρίτη στο αίμα οφείλεται στην έκθλιψη από τις φλεγμαίνουσες αρθρώσεις μεγάλων ποσοτήτων υαλουρονάνης.

Τα αυξημένα επίπεδα της υαλουρονάνης στο αίμα αποτελούν σημαντικότερο προγνωστικό δείκτη εξέλιξης των διαφόρων ηπατοπαθειών[36]. Συγκεκριμένα, ο δεκαπλασιασμός της συγκέντρωσης του πολυσακχαρίτη στο αίμα ηπατοπαθούς σχετίζεται με την ανάπτυξη κίρρωσης[121]. Στην πραγματικότητα, η αύξηση της υαλουρονάνης του αίματος είναι ο πιο ευαίσθητος προγνωστικός, βιοχημικός δείκτης της ηπατικής κίρρωσης (Εικόνα Γ/Α9.1). Η άνοδος των επιπέδων του πολυσακχαρίτη στο αίμα των ηπατοπαθών οφείλεται στην αδρανοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων



Εικόνα Γ/Α9.1: Επίπεδα υαλουρονάνης στον ορό ασθενών με διάφορες ηπατοπάθειες.

των ηπατικών κολποειδών, στη μείωση της πυλαίας αιματικής ροής και στην αύξηση της παραγωγής υαλουρονάνης από το πάσχον ήπαρ[119].

Αυξημένα επίπεδα υαλουρονάνης έχουν ανιχνευθεί στο βρογχικό έκπλυμα ασθενών που πάσχουν από σαρκοειδωση, σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας ενηλίκων, καθώς και από άλλες φλεγμονώδεις, πνευμονικές εξεργασίες[68].

Αυξημένα επίπεδα υαλουρονάνης έχουν ανιχνευθεί στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με μηνιγγίτιδα, στο εντερικό έκπλυμα αρρώστων με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου και στο φυσαλλιδικό υγρό νοσούντων από φλεγμονώδεις δερματοπάθειες[120, 122].

Η υαλουροναίμια σε σηψαιμικούς αρρώστους συμβαδίζει με κακή πρόγνωση. Συγκεκριμένα, οι καταλήγοντες σηψαιμικοί ασθενείς επιδεικνύουν αυξημένα επίπεδα πολυσακχαρίτη στο αίμα σε σχέση με αυτούς που επιβιώνουν[119].

Στο αίμα ασθενών που πάσχουν από όγκο του Wilms[36], από μεσοθηλίωμα[123] και από άλλες κακοήθειες[119], ανιχνεύονται υψηλότερα (έως και 1000 φορές) επίπεδα υαλουρονάνης. Το ίδιο ισχύει και για το περιτοναϊκό, πλευρικό και περικαρδιακό υγρό. Η αυξημένη συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη σχετίζεται με την υψηλή γλοιότητα του αίματος και την υπερθρομβωτική κατάσταση που παρατηρείται σε αυτούς τους αρρώστους[119]. Η υπερπαραγωγή υαλουρονάνης συντελείται από μη καρκινικά κύτταρα, τα οποία όμως ενεργοποιούνται από παράγοντες που εκκρίνονται από τους κακοήθεις ιστούς[123]. Αφαίρεση του όγκου οδηγεί σε δραματική πώση των επιπέδων του πολυσακχαρίτη στο αίμα των ασθενών[119].

Τέλος, η αύξηση των επιπέδων της υαλουρονάνης στο *αίμα* αρρώστων που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση ήπατος μάλλον αποτελεί πρώιμο διαγνωστικό δείκτης απόρριψης του μοσχεύματος[6, 7, 124-139]. Συγκεκριμένα, η άνοδος των επιπέδων του πολυσακχαρίτη παρατηρείται έως και δύο ημέρες πριν από την άνοδο της χολερυθρίνης. Επιπλέον, εάν η συγκέντρωση της υαλουρονάνης στο έκπλυμα του ηπατικού μοσχεύματος πριν την επαναιμάτωσή του είναι μεγαλύτερη από 400 ng/ml, τότε αυξάνεται η πιθανότητα πρωτοπαθούς δυσλειτουργίας και απόρριψης.

## β. Προσθήκη εξωγενούς υαλουρονάνης

Τα διαλύματα υαλουρονάνης χρησιμοποιούνται από τους οφθαλμιάτρους κατά την τοποθέτηση ενδοφακών, με σκοπό την προστασία του ενδοθηλίου του κερατοειδούς. Αυτό επιτυγχάνεται με την πλήρωση του πρόσθιου θαλάμου του οφθαλμού με το διάλυμα του πολυσακχαρίτη. Το διάλυμα της υαλουρονάνης που προορίζεται για οφθαλμοχειρουργική χρήση έχει 1% συγκέντρωση. Το ιξώδες του εξαρτάται από τη ροή του και είναι από 500 έως 500000 φορές μεγαλύτερο από αυτό του νερού [140].

Γενική κατηγορία	Ειδική εφαρμογή	Βιβλιογραφία
Η υαλουρονάνη ως χειρουργικό εργαλείο	Στραβισμός	358
	Νόσος Meniere	359
	Μικροχειρουργική	360
	Ενδοσκοπήσεις	361
	Σκληροθεραπείες	144
Η υαλουρονάνη ως εμφύτευμα	Εμφυτεύματα υαλώδους σώματος	362
	Εμφυτεύματα κοχλία	144
	Εμφυτεύματα φωνητικών χορδών	144
	Κυστεορητηρικά εμφυτεύματα	364
	Οστικά εμφυτεύματα	144
	Δερματικά (και μαστικά) εμφυτεύματα	363
	Κυτταρικά (και νησιδιακά) εμφυτεύματα	365
Η υαλουρονάνη ως προστατευτικό έναντι των συμφύσεων	Χειρουργική αρθρώσεων	144
	Χειρουργική τενόντων	366
	Χειρουργική περιτοναίου, υπεζοκότα, περικαρδίου	367
	Χειρουργική δέρματος	144
	Χειρουργική νευρικού συστήματος	369
	Ενδοναλική χειρουργική αγγείων	368
Η υαλουρονάνη ως ενυδατικός παράγοντας	Ενυδάτωση οφθαλμών	370
	Ενυδάτωση αναπνευστικού επιθηλίου	144
	Ενυδάτωση δέρματος	144
	Ενυδάτωση βλεννογόνων	144
Η υαλουρονάνη ως φορέας θεραπευτικών σκευασμάτων	Διαδερματική χορήγηση φαρμάκων	371
	Χορήγηση φαρμάκων με αεροζόλ	144
	Επιβραδυνόμενη, σταθερή χορήγηση φαρμάκων	144
	Βελτίωση τοπικής και γενικής δράσης φαρμάκων	371
	Μεταφορά γονιδίων	372
Η υαλουρονάνη ως ανοσοτροποποιητικό	Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες	373
	Νεοαγγειογονικές/Μη-νεοαγγειογονικές ιδιότητες	374
	Ενεργοποίηση της μεγακαρουκυτταροποίησης	144
Η υαλουρονάνη στην περιτοναϊκή κάθαρση	Μείωση της υδατικής κατακράτησης	144
	Επιτάχυνση της διύλισης	144

**Πίνακας Γ/Α9.1:** Μελλοντικές εφαρμογές χρήσης της υαλουρονάνης.

Τα διαλύματα υαλουρονάνης χρησιμοποιούνται από τους χειρουργούς-ωτορινολαρυγγολόγους για την επιτάχυνση της επουλωτικής διαδικασίας που αναπτύσσεται ύστερα από τη διάτρηση της τυμπανικής μεμβράνης[14].

Οι ορθοπεδικοί εγχέουν διαλύματα υαλουρονάνης στις αρθρώσεις ασθενών με εκφυλιστικές οστεοαρθρίτιδες, με σκοπό την ανακούφιση από τον πόνο[142]. Την ίδια προσέγγιση εφαρμόζουν και οι κτηνίατροι για την ελαχιστοποίηση των αρθρικών πόνων που υφίστανται τα άλογα αγώνων[143].

Τέλος, με βάση το γεγονός ότι η υαλουρονάνη είναι μία μη τοξική ουσία, έχουν αρχίσει να διερευνώνται πολλές πιθανές εφαρμογές της εξωγενούς προσθήκης της στον οργανισμό[144] (Πίνακας Γ/Α9.1). Επιπλέον, διάφορες χημικές μετατροπές του μορίου του πολυσακχαρίτη έχουν οδηγήσει στην παρασκευή υαλουρονάνης με βελτιωμένες φυσικοχημικές (π.χ. ιξώδες, ελαστικότητα, απενεργοποίηση ROI, κ.τ.λ.) ιδιότητες[59].

## **B. ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΕΣ**

### **I. Κατηγορίες υαλουρονιδασών**

Οι υαλουρονιδάσες ανάλογα με το μηχανισμό υδρόλυσης της υαλουρονάνης χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες[22, 23] (Πίνακας Γ/Β 1.1).

Στην πρώτη ομάδα ανήκουν τα ένζυμα που δρουν ως ενδο-β-N-ακετυλ-D-εξοζαμινιδάσες. Καταβολίζουν την υψηλού μοριακού βάρους υαλουρονάνη ως το επίπεδο του τετρασακχαριδίου GlcUA-GlcNAc-GlcUA-GlcNAc. Ορισμένα από τα ένζυμα της ομάδας αυτής καταλύουν αντιδράσεις γλυκοσυλίωσης, οπότε σε αυτή την περίπτωση τα προϊόντα υδρόλυσης της υαλουρονάνης είναι δι-, τετρα-, εξα- και οκτασακχαρίδια[145, 146]. Οι ενδο-β-N-ακετυλ-D-εξοζαμινιδάσες καταβολίζουν και τη θειική χονδροϊτίνη[23]. Με βάση το βέλτιστο pH δράσης τους διακρίνονται σε εξωκυτάρια (ουδέτερο pH) και ενδοκυττάρια-ενδολυσosomalικά (όξινο pH) δρώντα ένζυμα. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι υαλουρονιδάσες των θηλαστικών, των δηλητηρίων των σπονδυλωτών και των ασπόνδυλων ζώων (Πίνακας Γ/Β 1.1).

Στη δεύτερη ομάδα ανήκουν τα ένζυμα που δρουν ως ενδο-β-D-γλυκουρονιδάσες. Καταβολίζουν την υψηλού μοριακού βάρους υαλουρονάνη ως το επίπεδο του τετρασακχαριδίου GlcNAc-GlcUA-GlcNAc-GlcUA[147]. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι υαλουρονιδάσες των βδελλών, μερικών παρασίτων και μερικών οστρακόδερμων (Πίνακας Γ/Β 1.1).

Στην τρίτη ομάδα ανήκουν τα ένζυμα που δρουν ως N-ακετυλ-D-εξοζαμινιδάσες. Καταβολίζουν την υψηλού μοριακού βάρους υαλουρονάνη με β-εξάλλειψη ως το επίπεδο του δισακχαριδίου[148]. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι υαλουρονιδάσες των βακτηριδίων και των βακτηριοφάγων (Πίνακας Γ/Β 1.1).

Στην τέταρτη κατηγορία ανήκουν τα ένζυμα των οποίων ο μηχανισμός καταβολισμού της υαλουρονάνης, αν και διαφορετικός από τους προηγούμενους τρεις, δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί[23]. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι υαλουρονιδάσες των μυκήτων (Πίνακας Γ/Β 1.1).

### **2. Υπόστρωμα δράσης υαλουρονιδασών**

Το κύριο υπόστρωμα δράσης των υαλουρονιδασών είναι η υαλουρονάνη, ένα πολυμερές επαναλαμβανόμενων δισακχαριτών με δομή (N-ακετυλ- $\beta$ -γλυκοζαμίνη-D-γλυκουρονικό οξύ)<sub>n</sub>. Η υαλουρονάνη είναι η μόνη γλυκοζαμίνη που δε συνδέεται με πρωτεΐνη-πυρίνη. Επίσης, είναι η μόνη μη θειική, φυσικά απαντούμενη γλυκοζαμίνη.

Μηχανισμός δράσης	Γενική κατηγορία	Ειδική εντόπιση	Καταβολισμός χονδροϊτίνης	pH	kD	Βιβλιογραφία
Ενδο-β-Ν-ακετυλ-D-εξοζαμινιδάσες	Ιστοί θηλαστικών	Σπερματοζωάρια	+	5,0-7,0	53-64	145
		Ήπαρ	+	3,7	55-70	375
		Νεφροί	+	3,5		23
		Δέρμα	+	3,7		23
		Προστάτης	+	4,6		23
		Ορός αίματος	+	3,7	55-70	23
		Πλακούντας, οφθαλμός, πνεύμονας	+			23
	Δηλητήρια εσπόνδυλων	Φίδια	+			376
		Σαύρες	+	5,0	63	22
		Πετρόψαρο	-	6,0	62	22
Δηλητήρια	Υμενόπτερα	+			151	
Ενδο-β-D-γλυκουρονιδάσες	Ευκαρυωτικά ασπόνδυλα	Βδέλλα	-	5,3	28,5	23
		Παράσιτα	-	6,0-8,0	49-87	23
		Οστρακόδερμα	-	5,3	80	23
Ν-ακετυλ-D-εξοζαμινιδάσες	Προκαρυωτικά	Βακτήρια	-			148
		Βακτηριοφάγοι	-			377
Άγνωστος	Διάφορα	Μύκητες	-			23

**Πίνακας Γ/ΒΙ.1:** Μηχανισμός δράσης, ιστοί προέλευσης και φυσικοχημικές ιδιότητες υαλουρονιδασών.

Οι γλυκοσυδικοί δεσμοί του μορίου της υαλουρονάνης είναι όλοι β τύπου. Αλλαγή των γλυκοσυδικών δεσμών μορίου πολυ-D-γλυκόζης από α σε β τύπου μετατρέπει το μόριο του αμύλου σε μόριο κυτταρίνης. Παρόμοια, αλλαγή των γλυκοσυδικών δεσμών μορίου πολυ-D-N-ακετυλγλυκοζαμίνης από α σε β τύπου παράγει χιτίνη. Κατά συνέπεια, οι υαλουρονιδάσες έχουν περισσότερες ομοιότητες με τις κυτταρινάσες και τις χιτινάσες, οι οποίες υδρολύουν β γλυκοσυδικούς δεσμούς, παρά με τις αμυλάσες και τη φωσφορυλάση του γλυκογόνου, οι οποίες υδρολύουν α γλυκοσυδικούς δεσμούς[23].

### **3. Κλινικές εφαρμογές υαλουρονιδασών**

Η υαλουρονιδάση έχει χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετο στα κλινικά χημειοθεραπευτικά σχήματα. Έχει δειχθεί πειραματικά ότι η υαλουρονιδάση, εμποδίζει την ανάπτυξη της πρωτοπαθούς εστίας, επιβραδύνει την εισβολή των καρκινικών κυττάρων στους λεμφαδένες και αποτρέπει την εμφάνιση μεταστάσεων[23].

Η υαλουρονιδάση έχει χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία του εμφράγματος του μυοκαρδίου τόσο σε πειραματικό, όσο και σε κλινικό επίπεδο[23, 149].

Η τοπική δράση της υαλουρονιδάσης ως παράγοντα διασποράς στο δέρμα έχει χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της απορρόφησης τοπικών αναισθητικών, καθώς και για την ταχύτερη απομάκρυνση εξαγγειωθεισών ουσιών[23].

Τέλος, η υαλουρονιδάση έχει χρησιμοποιηθεί για την επιτυχή σύγκλιση κατά πρώτο σκοπό παραμελημένων ή επιμολυσμένων τραυμάτων[23].

### **4. Ορχεική υαλουρονιδάση**

Είναι γνωστό από το 1928 ότι παρασκευάσματα από όρχεις θηλαστικών εμφανίζουν δράση υαλουρονιδάσης[22]. Συγκεκριμένα, η ορχεική υαλουρονιδάση εδράζεται στην οπίσθια κεφαλή και στην ακροσωματική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων των θηλαστικών. Αρχικά, το 1983, είχε εντοπισθεί ως ένα άγνωστης λειτουργίας αντιγόνο των σπερματοζωαρίων με την ονομασία PH20[150]. Από το 1990 έως το 1994 η ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων της PH20 πρωτεΐνης διαφόρων θηλαστικών ανέδειξε σημαντικό βαθμό (>30%) ομολογία με την αλληλουχία των αμινοξέων της υαλουρονιδάσης του δηλητηρίου των μελισσών[151]. Επιπλέον, παρασκευάσματα κεκαθαρμένης πρωτεΐνης PH20 εμφάνισαν δράση υαλουρονιδάσης[152]. Με βάση τα προαναφερόμενα πειραματικά δεδομένα, το αντιγόνο PH20 των σπερματοζωαρίων είναι η ορχεική υαλουρονιδάση των θηλαστικών[22]. Το γονίδιο της πρωτεΐνης PH20 έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 7q31.1 και ενεργοποιείται μόνο στα σπερματοζωάρια[23].



Το αντιγόνο PH20 είναι συνδεδεμένο στη μεμβράνη των σπερματοζωαρίων μέσω γλυκοσυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης[153]. Έχει μοριακό βάρος 64 kD και ουδέτερο βέλτιστο pH δράσης. Κατά τη διαδικασία ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων μέρος του συνδεδεμένου στη μεμβράνη αντιγόνου διασπάται σε δύο τμήματα. Το αμινοτελικό τμήμα έχει μοριακό βάρος 41-48 kD ενώ το καρβοξυτελικό τμήμα έχει μοριακό βάρος 27 kD. Τα δύο τμήματα είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους με δισουλφιδικές γέφυρες. Υπάρχει και μη συνδεδεμένη στη μεμβράνη, ευδιάλυτη μορφή του αντιγόνου PH20[152]. Έχει μοριακό βάρος 53 kD, όξινο βέλτιστο pH δράσης και δεκαπλάσια ενζυμική ενεργότητα από τη συνδεδεμένη μορφή του.

Σύγκριση των αμινοξειικών αλληλουχιών των αντιγόνων PH20 διαφόρων θηλαστικών και των υαλουρονιδασών από δηλητήρια υμενόπερων ανέδειξε περιοχή 340 αμινοξέων υψηλότερης ομολογίας. Τέσσερα κατάλοιπα κυστεΐνης που σχημάτιζαν δύο δισουλφιδικές γέφυρες ήταν πάντοτε παρόντα. Επίσης, στην περιοχή αυτή ανιχνεύονται βασικά και όξινα αμινοξέα, απαραίτητα στην υδρόλυση της υαλουρονάνης από το ενεργό κέντρο του ενζύμου[152-154]. Όξινα αμινοξέα βρίσκονται και στο ενεργό κέντρο άλλων ενζύμων που υδρολύουν πολυσακχαρίδια[155, 156] (λυσοζύμη, αμυλάση, κ.τ.λ.). Τέλος, στην περιοχή αυτή ανιχνεύονται κατάλοιπα αμινοξέων με πλευρική αρωματική αλυσίδα (τρυπτοφάνη και τυροσίνη), απαραίτητα για τη σύνδεση του ενζύμου με το πολυανιωνικής φύσης υπόστρωμα του[22].

Κατά τη γονιμοποίηση το σπερματοζωάριο των θηλαστικών πρέπει να διασχίσει το στρώμα των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου που περιβάλλει το ωάριο. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε υπόστρωμα πλούσιο σε υαλουρονάνη. Η ορχεϊκή υαλουρονιδάση, δρώντας στο προαναφερόμενο υπόστρωμα, επιτρέπει τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στον ωοφόρο δίσκο[23].

# Γ. ΗΠΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΜΟΣΧΕΥΣΗ ΣΕ ΑΡΟΥΡΑΙΟΥΣ

## I. Ορθοτοπική τεχνική

### α. Γενικά

Ο αρουραίος θεωρείται εξαιρετικό πειραματόζωο για τη μελέτη της ορθοτοπικής ηπατικής μεταμόσχευσης εξαιτίας της διαθεσιμότητας γενετικά ανασυνδυασμένων στελεχών[14]. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τις ισομεταμοσχεύσεις μεταξύ γενετικά όμοιων απόμων. Έτσι δεν παρατηρείται το φαινόμενο της απόρριψης και είναι δυνατή η μεμονωμένη μελέτη των βλαβών ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Επίσης, η διαθεσιμότητα γενετικά ανασυνδυασμένων στελεχών επιτρέπει τις αλλομεταμοσχεύσεις μεταξύ απόμων με γνωστές διαφορές ιστοσυμβατότητας. Έτσι είναι δυνατή η επισταμένη μελέτη της ανοσολογίας της απόρριψης. Επιπλέον, οι μικροί χρόνοι αναπαραγωγής των αρουραίων[157] έχουν ως αποτέλεσμα τη διάθεση μεγάλου αριθμού πειραματόζωων και επομένως συνεπάγονται τη συντόμηση των πειραματικών πρωτοκόλλων και τη δυνατότητα υψηλής επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων. Συμπερασματικά, η Ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος στους αρουραίους αποτελεί το πλέον αξιόπιστο και φθηνό μοντέλο μελέτης της συμπεριφοράς των ηπατικών μοσχευμάτων.

Ένα αντικείμενο διαφωνίας μεταξύ των ερευνητών που πραγματοποιούν ορθοτοπικές μεταμοσχεύσεις ήπατος σε αρουραίους είναι το κατά πόσο κρίνεται απαραίτητη η αποκατάσταση της αρτηριακής παροχής του μοσχεύματος. Οι πραγματοποιούντες αρτηριακή αναστόμωση υποστηρίζουν πως τα μοσχεύματα χωρίς αρτηριακή παροχή εμφανίζουν βαρείες ιστολογικές αλλοιώσεις[158] (π.χ. πυλαία μονοπυρήνωση, νεόπλαστα χολαγγεία, ίωση, κ.τ.λ), αυξημένη έκφραση των MHC τάξης II στα κύτταρα Kupffer[159], σταδιακή καταστροφή του χολαγγειακού δένδρου[160], αύξηση του αριθμού και της βαρύτητας των απορριπτικών επεισοδίων[159] και κυμαινόμενα ποσοστά επιβίωσης πειραματοζώων[161]. Αντίθετα, οι μη πραγματοποιούντες αρτηριακή αναστόμωση υποστηρίζουν πως τα μοσχεύματα χωρίς αρτηριακή παροχή δεν εμφανίζουν αξιόλογες ιστολογικές αλλοιώσεις, δεν υποφέρουν ιδιαίτερα από χολαγγειακά συμβλήματα, δεν επάγουν απορριπτικά επεισόδια και επιδεικνύουν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης πειραματοζώων[15, 158].

Σήμερα, οι περισσότερες ερευνητικές ομάδες δεν πραγματοποιούν αποκατάσταση της αρτηριακής παροχής του μοσχεύματος για λόγους τεχνικής ευκολίας και επεμβατικής ταχύτητας[158]. Στις περιπτώσεις αυτές η αρτηριακή παροχή αποκαθίσταται με νεόπλαστα αγγεία που εξορμούνται από το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο και το οπισθοπεριτόναιο του αρουραίου[162]. Μάλιστα, τρεις εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση, η αρτηριακή παροχή μοσχευμάτων των οποίων η ηπατική αρτηρία δεν αναστομώθηκε είναι μεγαλύτερη από την αρτηριακή παροχή που παρατηρείται σε μη μεταμοσχευμένα, φυσιολογικά ήπατα[163].

## β. Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη Ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους πραγματοποιήθηκε το 1973 από το Lee και τους συνεργάτες του[164]. Για την επέμβαση αυτή χρησιμοποιήθηκε εξωσωματική πυλαιοσυστηματική παράκαμψη. Ο χοληδόχος πόρος του μοσχεύματος εμφυτεύθηκε στο δωδεκαδάκτυλο του λήπτη. Όλες οι φλεβικές αναστομώσεις (υπερηπατική και υφηπατική κάτω κοίλη φλέβα, πυλαία φλέβα) έγιναν τελικοτελικά, με συνεχείς ραφές. Η αρτηριακή ροή αποκαταστάθηκε με τελικοπλάγια αναστόμωση (συνεχής ραφή) της κοιλιακής αρτηρίας του μοσχεύματος με την αορτή (κάτω από τις νεφρικές αρτηρίες) του λήπτη. Το 1975 ο ίδιος ερευνητής πραγματοποίησε την επέμβαση χωρίς τη χρήση εξωσωματικής πυλαιοσυστηματικής παράκαμψης και χωρίς αποκατάσταση της αρτηριακής ροής[165]. Το 1979, ο Zimmermann και οι συνεργάτες του περιέγραψαν, την διενέργεια χοληδοχο-χοληδοχοαναστόμωσης με τη χρήση τηλεσκοπικών καθετήρων πολυαιθυλενίου[166]. Το 1979 επίσης, ο Kamada και οι συνεργάτες του περιγράφουν τη χρήση cuff από πολυαιθυλένιο για την πραγματοποίηση της πυλαίας αναστόμωσης[16]. Η χρήση cuff στην πυλαία αναστόμωση απλοποίησε την εγχειρητική τεχνική και κατέστηρε την Ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους αξιόπιστο ερευνητικό μοντέλο[158]. Το 1980, ο Miyata και οι συνεργάτες του επεκτείνουν τη χρήση των cuff πολυαιθυλενίου στις αναστομώσεις της υπερηπατικής και της υφηπατικής κάτω κοίλης φλέβας[167]. Το 1985, ο Engemann εισάγει τροποποιήσεις στην τεχνική αποκατάστασης της αρτηριακής ροής στο μόσχευμα[168]. Το 1989, ο Steffen και οι συνεργάτες του περιγράφουν τη χρήση cuff από πολυαιθυλένιο για την πραγματοποίηση της αναστόμωσης μεταξύ της ιδίως ηπατικής αρτηρίας του δότη και της κοινής ηπατικής αρτηρίας του λήπτη[169]. Τέλος, το 1993, ο Gao και οι συνεργάτες του περιγράφουν τη χρήση cuff από πολυαιθυλένιο για την πραγματοποίηση της αναστόμωσης μεταξύ της ιδίως ηπατικής αρτηρίας του δότη και της αντίστοιχης του λήπτη[170].

## γ. Τρέχουσα τεχνική

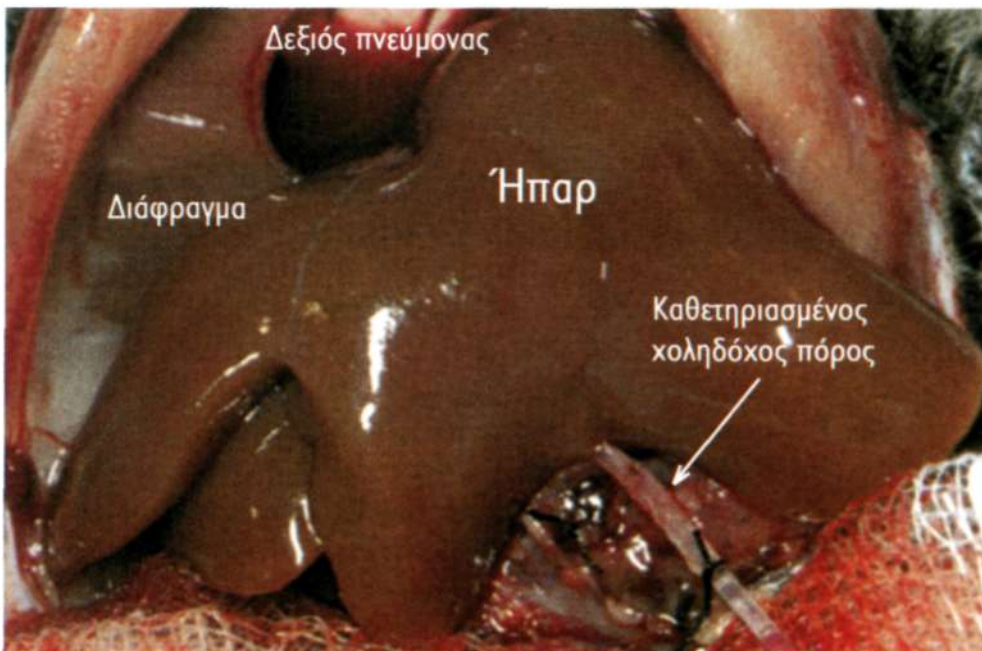
### i. **Εισαγωγή**

Σύμφωνα με την τρέχουσα τεχνική ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος σε αρουραίους, η αρτηριακή παροχή του μοσχεύματος δεν αποκαθίσταται[16]. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται cuff πολυαιθυλενίου για την πραγματοποίηση των αναστομώσεων της πυλαίας και της υφηπατικής κάτω κοίλης φλέβας[158]. Η επέμβαση πραγματοποιείται από δύο άτομα, με τη χρήση μεγενθυτικών (X 4) διοπτρών[161]. Τα εργαλεία που χρησιμοποιούνται είναι καθαρά αλλά μη αποστειρωμένα[16]. Η διάρκεια της ανηπατικής φάσης του λήπτη δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 26 min[16].

Η αναλυτική παρουσίαση της επέμβασης, καθώς και στοιχεία της προεγχειρητικής, διεγχειρητικής και μετεγχειρητικής φροντίδας των πειραματοζώων περιλαμβάνονται σε άλλο σημείο αυτού του πονήματος. Η περιγραφή που ακολουθεί αφορά μόνο στους βασικούς χρόνους της εγχειρητικής τεχνικής.

#### if. Λήψη του μοσχεύματος

Ο δότης αναισθητοποιείται με διαιθυλαιθέρα. Διανοίγεται η περιτοναϊκή κοιλότητα. Διατέμνονται κατά σειρά ο δρεπανοειδής σύνδεσμος, ο αριστερός τρίγωνος σύνδεσμος και οι διαλοβιακοί σύνδεσμοι. Παρασκευάζεται ο κερκοφόρος λοβός. Παρασκευάζονται η υφρηπατική κάτω κοίλη, η δεξιά νεφρική και η δεξιά επινεφρική φλέβα. Οι δύο τελευταίες απολινώνονται. Απολινώνεται η αριστερή διαφραγματική φλέβα. Παρασκευάζονται, απολινώνονται και διατέμνονται η στεφανιαία φλέβα και η ιδίως ηπατική αρτηρία. Καθετηριάζεται ο χοληδόχος πόρος με καθετήρα πολυαιθυλενίου και ύστερα διατέμνεται περιφερικότερα του καθετηριασμού. Παρασκευάζεται, απολινώνεται και διατέμνεται η σπληνική φλέβα. Καθετηριάζεται η πυλαία φλέβα με αγγειακό καθετήρα εύρους 20 G. Διατέμνεται η υφρηπατική κάτω κοίλη φλέβα κάτω από το ύψος των νεφρικών φλεβών. Στην πυλαία φλέβα εγχέονται 10 ml ψυχρού διαλύματος συντήρησης. Διανοίγεται η θωρακική κοιλότητα (Εικόνα Γ/ΓΙ.1) και διατέμνεται η ενδοθωρακική κάτω κοίλη φλέβα. Διατέμνονται οι υπόλοιπες διασυνδέσεις του ήπατος με το σώμα του δότη. Το μόσχευμα τοποθετείται σε λεκάνη με ψυχρό διάλυμα συντήρησης.

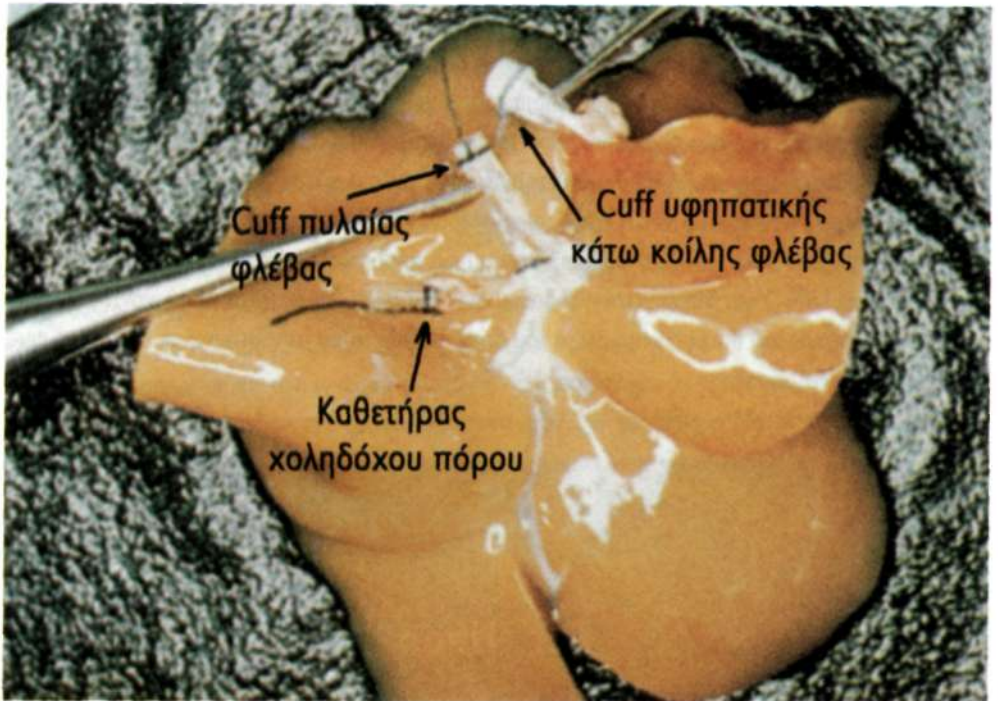


Εικόνα Γ/ΓΙ.1: Διάνοιξη της θωρακικής κοιλότητας του αρουραίου κατά τη λήψη του ηπατικού μοσχεύματος.

#### iii. Τοποθέτηση των cuff

Η τοποθέτηση των cuff διενεργείται ενώ το προς μεταμόσχευση ήπαρ βρίσκεται μέσα σε λεκάνη με ψυχρό διάλυμα συντήρησης. Η πυλαία φλέβα του μοσχεύματος διέρχεται μέσα από το cuff της.

Το χείλος της εκστρέφεται πάνω στο cuff και ακινητοποιείται στη θέση αυτή με τη βοήθεια κυκλωτερών ράμματος. Το cuff της υπερηπατικής κάτω κοίλης φλέβας τοποθετείται με παρόμοιο τρόπο. Τέλος, παρασκευάζονται και απομακρύνονται από το μόσχευμα οι περιττοί ιστοί (Εικόνα Γ/Γ 1.2).

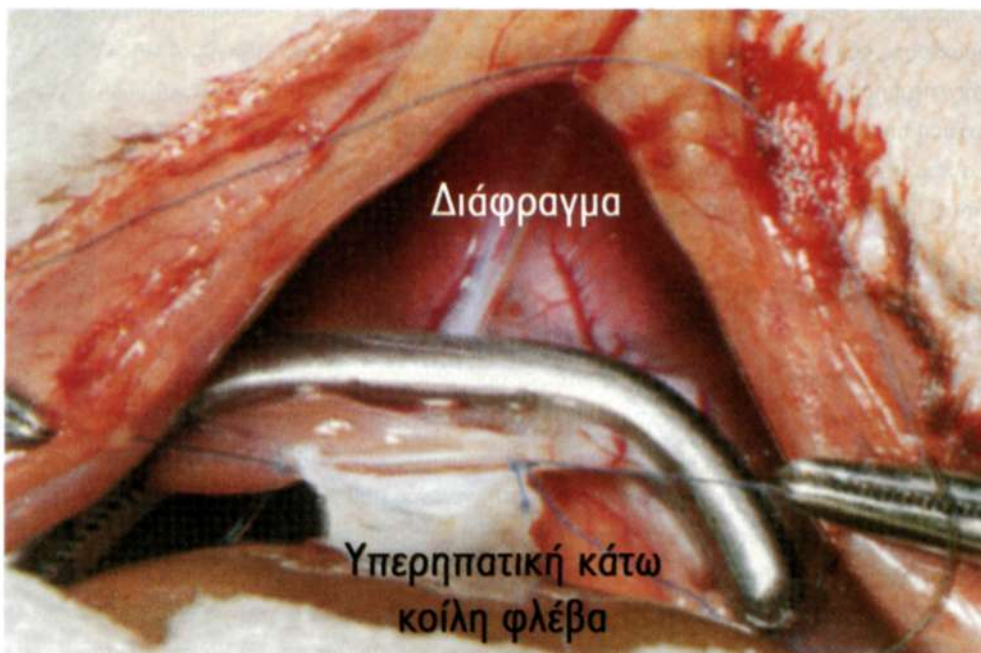


Εικόνα Γ/Γ1.2: Ηπατικό μόσχευμα αρουραίου, έτοιμο προς τοποθέτηση.

#### iv. Τοποθέτηση του μοσχεύματος

Ο λήπτης αναισθητοποιείται με διαιθυλαιθέρα. Διανοίγεται η περιτοναϊκή κοιλότητα. Διατέμνονται κατά σειρά ο δρεπανοειδής σύνδεσμος, ο αριστερός τρίγωνος σύνδεσμος και οι διαλοβιακοί σύνδεσμοι. Παρασκευάζεται ο κερκοφόρος λοβός. Παρασκευάζονται, απολινώνονται και διατέμνονται η αριστερή διαφραγματική φλέβα και η οισοφαγική αρτηρία. Διατέμνονται οι αριστεροί και οι δεξιοί οπίσθιοι ηπατικοί σύνδεσμοι. Οδηγός φακαρόλα περιβρογχίζει την υπερηπατική κάτω κοίλη φλέβα. Παρασκευάζεται, απολινώνεται και διατέμνεται η δεξιά επινεφριδική φλέβα. Παρασκευάζεται η υπερηπατική κάτω κοίλη φλέβα. Παρασκευάζονται, απολινώνονται και διατέμνονται η στεφανιαία φλέβα και η ιδίως ηπατική αρτηρία. Παρασκευάζεται η πυλαία φλέβα. Καθετηριάζεται ο χοληδόχος πόρος με καθετήρα πολυαιθυλενίου και ύστερα διατέμνεται κεντρικότερα του καθετηριασμού. Με τη χρήση αγγειολαβίδων αποκλείονται κατά σειρά η υπερηπατική κάτω κοίλη, η πυλαία και η υπερηπατική κάτω κοίλη φλέβα. Εκτέμνεται το ιθαγενές ήπαρ. Το μόσχευμα τοποθετείται ορθοτοπικά στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Με συνεχή ραφή αναστο-

μώνεται πρώτα το οπίσθιο (από μέσα προς τα έξω) και κατόπιν το πρόσθιο (από έξω προς τα μέσα) τοίχωμα της υπερηπατικής κάτω κοίλης φλέβας (Εικόνα Γ/Γ1.3). Μέσω φλεβοτομής, τοποθετείται το πυλαίο cuff του μοσχεύματος μέσα στη πυλαία φλέβα του λήπτη. Ακινητοποιείται στη θέση αυτή με τη βοήθεια κυκλοτερούς ράμματος. Τοποθετείται αγγειολαβίδα στην υπερηπατική κάτω κοίλη του μοσχεύματος.



**Εικόνα Γ/Γ1.3:** Αναστόμωση υπερηπατικής κάτω κοίλης φλέβας κατά τη διενέργεια ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος σε αρουραίους.

Αφαιρούνται οι αγγειολαβίδες της υπερηπατικής κάτω κοίλης και της πυλαίας φλέβας. Το μόσχευμα επαναμειώνεται. Μέσω φλεβοτομής, τοποθετείται το cuff της υπερηπατικής κάτω κοίλης του μοσχεύματος μέσα στην υπερηπατική κάτω κοίλη του λήπτη. Ακινητοποιείται στη θέση αυτή με τη βοήθεια κυκλοτερούς ράμματος. Αφαιρούνται οι αγγειολαβίδες της υπερηπατικής κάτω κοίλης του μοσχεύματος και του λήπτη. Η αναστόμωση του χοληδόχου πόρου πραγματοποιείται με την ενσφήνωση του χοληδόχου καθετήρα του μοσχεύματος στον (ελάχιστο μεγαλύτερο) χοληδόχο καθετήρα του λήπτη. Συγκλείεται το χειρουργικό τραύμα.

## 2. Ετεροτοπική τεχνική

### α. Γενικά

Η ετεροτοπική μεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους μπορεί να είναι επικουρική ή μη επικουρική.

Στην επικουρική μεταμόσχευση διατηρείται το ιθαγενές ήπαρ του λήπτη. Στη μη επικουρική εκτέμνεται. Στις επικουρικές μεταμοσχεύσεις παρατηρείται το φαινόμενο ανταγωνισμού μεταξύ του ιθαγενούς ήπατος και του ηπατικού *μοσχεύματος*. Συγκεκριμένα, όποιο από τα δύο ήπατα εμφανίζει τη μεγαλύτερη λειτουργική υστέρηση σταδιακά (μέσα σε 15 ημέρες) ατροφεί[171].

Ο αρουραίος θεωρείται εξαιρετικό πειραματόζωο για τη μελέτη της ετεροτοπικής ηπατικής μεταμόσχευσης. Οι λόγοι είναι ίδιοι με αυτούς που προαναφέρθηκαν στην περιγραφή της ορθοτοπικής επέμβασης. Ωστόσο, αν και ευκολότερη τεχνικά από την Ορθοτοπική, η ετεροτοπική μεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους δε χρησιμοποιήθηκε ιδιαίτερα ως ερευνητικό πρωτόκολλο. Τα αίτια που προκάλεσαν το γεγονός αυτό είναι η περιορισμένη χωρητικότητα της περιτοναϊκής κοιλότητας[172] και οι συχνές μετεγχειρητικές επιπλοκές[171].

## β. Ιστορική αναδρομή

Η πρώτη ετεροτοπική μεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους πραγματοποιήθηκε το 1966 από τους Lee και Edington[173]. Ήταν μία επικουρική μεταμόσχευση στην οποία τόσο το μόσχευμα όσο και το ιθαγενές ήπαρ του λήπτη υποβλήθηκαν σε 70% ηπατεκτομή. Η πυλαία του μοσχεύματος αναστομώθηκε τελικοτελικά με την πυλαία του λήπτη, γεγονός που είχε ως συνέπεια τη διακοπή της πυλαίας παροχής του ιθαγενούς ήπατος. Η κοιλιακή αρτηρία του μοσχεύματος αναστομώθηκε τελικοπλάγια με την αορτή (κάτω από τις νεφρικές αρτηρίες) του λήπτη. Η υφηπατική κάτω κοίλη του μοσχεύματος αναστομώθηκε τελικοτελικά με την υφηπατική κάτω κοίλη φλέβα του λήπτη. Η υπερηπατική κάτω κοίλη και ο χοληδόχος πόρος του μοσχεύματος απολινώθηκαν. Έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές τροποποιήσεις στην τεχνική των Lee και Edington (Πίνακας Γ/Γ2.1).

## γ. Τρέχουσα τεχνική

### ι. Λήψη του μοσχεύματος

Ο δότης αναισθητοποιείται με διαιθυλαιθέρα. Διανοίγεται η περιτοναϊκή κοιλότητα. Διατέμνονται κατά σειρά ο δρεπανοειδής σύνδεσμος, ο αριστερός τρίγωνος σύνδεσμος και οι διαλοβιακοί σύνδεσμοι. Παρασκευάζεται ο κερκοφόρος λοβός. Παρασκευάζονται η υφηπατική κάτω κοίλη, η δεξιά νεφρική και η δεξιά επινεφριδική φλέβα. Οι δύο τελευταίες απολινώνονται. Απολινώνεται η αριστερή διαφραγματική φλέβα. Παρασκευάζονται, απολινώνονται και διατέμνονται η στεφανιαία και η σπληνική φλέβα, καθώς και η γαστροδωδεκαδακτυλική, η αριστερή γαστρική, η σπληνική και η άνω μεσεντέριος αρτηρία. Καθετηριάζεται ο χοληδόχος πόρος με καθετήρα πολυαιθυλενίου και ύστερα διατέμνεται περιφερικότερα του καθετηριασμού. Καθετηριάζεται η πυλαία φλέβα με αγγειακό καθετήρα εύρους 20 G. Καθετηριάζεται η κοιλιακή αορτή (κάτω από τις νεφρικές αρτηρίες) με αγγειακό καθετήρα εύρους 24 G. Ακολουθεί διπλή απολίνωση της αορτής στο λαγόνιο διχασμό και στο διαφραγματικό τρήμα. Διατέμνεται η υφηπατική κάτω κοίλη φλέβα κάτω από το

Έτος δημοσίευσης	Προσαγωγός αιμάτωση		Απαγωγός αιμάτωση (Λ-Δ)	Χοληφόρα (Λ-Δ)	Επικουρική	Βιβλιογραφία
	Από πυλαία (Λ-Δ)	Από αρτηρία (Λ-Δ)				
1968	Π-Π / T-T ρ	A-A / T-Π ρ	ΚΚ-ΚΚ / T-Π ρ	-	Ναί	378
1971	Π-Π / T-T ρ	-	ΚΚ-ΚΚ / T-Π ρ	-	Ναί	378
1972	Π-Π / T-T ρ	-	ΚΚ-ΚΚ / T-Π ρ	Δωδεκαδάκτυλο	Ναί	379
1979	Π-Π / T-T ρ	-	Νφλ-ΚΚ / T-T ρ	Δωδεκαδάκτυλο	Όχι	380
1983	Ναρ-Π / T-T ρ	-	Νφλ-ΚΚ / T-T ρ	Ουρητήρας	Ναί	381
1985	Π-Π / T-T c	-	Νφλ-ΚΚ / T-T c	Δωδεκαδάκτυλο	Ναί	382
1987	Π-Π / T-T c	-	Νφλ-ΚΚ / T-T c	Χ-Χ / T-T c	Ναί	383
1990	Π-Π / T-T c	-	ΚΚ-ΚΚ / T-Π ρ	Δωδεκαδάκτυλο	Ναί	384
1991	Καρ-Π / T-T c	-	ΚΚ-ΚΚ / T-Π ρ	Νήστιδα	Ναί	385
1994	ΕΣ-Π / T-T c	ΕΚ-A / T-T c	ΕΣ-ΚΚ / T-T c	-	Ναί	386
1994	Π-Π / T-T ρ	A-A / T-Π ρ	ΚΚ-ΚΚ / T-Π ρ	Δωδεκαδάκτυλο	Ναί	387
1994	ΚΚ-Π / T-Π ρ	A-A / T-Π ρ	ΚΚ-ΚΚ / T-Π ρ	Δωδεκαδάκτυλο	Ναί	387
1994	ΚΜ-Π / T-T ρ	A-A / T-Π ρ	ΚΚ-ΚΚ / T-Π ρ	Δωδεκαδάκτυλο	Ναί	387

**Πίνακας Γ/Γ2.1:** Τεχνικές τροποποιήσεις της ετεροτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος σε αρουραίους. Λ: λήπτης. Δ: δότης. Π: πυλαία φλέβα. ΕΣ: έσω σφαγιτίδα φλέβα. ΚΚ: υψηλική κάτω κοίλη φλέβα. ΚΜ: κάτω μεσεντέριος φλέβα. Νφλ: νεφρική φλέβα. Ναρ: νεφρική αρτηρία. Καρ: κοιλιακή αρτηρία. Α: αορτή. ΕΚ: έσω καρωτίδα αρτηρία. Χ: χοληδόχος πόρος. T-T ρ: τελικοτελική συνεχής ραφή. T-T c: τελικοτελική αναστόμωση με suff. T-Π ρ: τελικοπλάγια συνεχής ραφή.



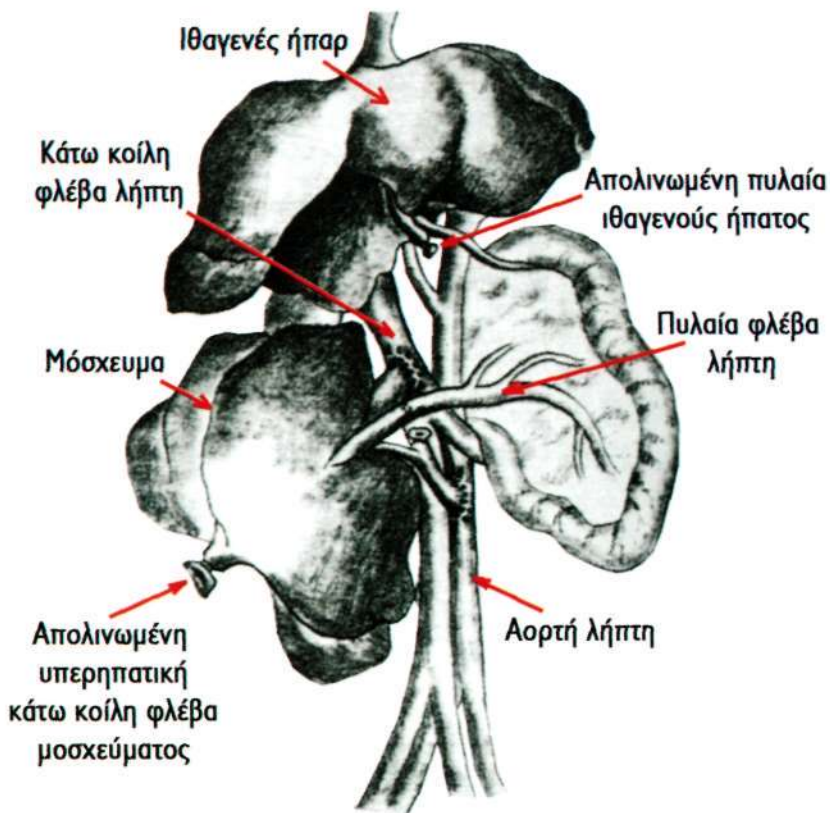
ύψος των νεφρικών φλεβών. Στην πυλαία φλέβα εγχέονται 10 ml ψυχρού διαλύματος συντήρησης. Στην κοιλιακή αορτή εγχέονται 5 ml ψυχρού διαλύματος συντήρησης. Διανοίγεται η θωρακική κοιλότητα και διατέμνεται η ενδοθωρακική κάτω κοίλη φλέβα. Διατέμνονται οι υπόλοιπες διασυνδέσεις του ήπατος με το σώμα του δότη. Το μόσχευμα τοποθετείται σε λεκάνη με ψυχρό διάλυμα συντήρησης.

». *Προετοιμασία του μοσχεύματος*

Η προετοιμασία του μοσχεύματος διενεργείται μέσα σε λεκάνη με ψυχρό διάλυμα συντήρησης. Απολινώνεται η υπερηπατική κάτω κοίλη φλέβα. Τέλος, παρασκευάζονται και απομακρύνονται από το μόσχευμα οι περιττοί ιστοί.

iii». *Τοποθέτηση του μοσχεύματος*

Ο λήπτης αναισθητοποιείται με διαιθυλ αιθέρα. Διανοίγεται η περιτοναϊκή κοιλότητα. Τα έντερα μετατοπίζονται αριστερά. Αποκαλύπτονται η κάτω κοίλη φλέβα και η αορτή κάτω από τα νεφρικά



Εικόνα Γ/Γ2.1: Σχηματική απεικόνιση τεχνικής ετεροτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος σε αρουραίους.

αγγεία. Τοποθετούνται αγγειολαβίδες στην κάτω κοίλη φλέβα (2), στην αορτή (2) και στην πυλαία του λήπτη. Το μόσχευμα τοποθετείται στο δεξιό παρασπονδυλικό χώρο (Εικόνα Γ/Γ2.1). Με συνεχή ραφή αναστομώνεται τελικοπλάγια η υπηπατική κάτω κοίλη του μοσχεύματος στην κάτω κοίλη του λήπτη. Με συνεχή ραφή αναστομώνεται τελικοτελικά η πυλαία φλέβα του μοσχεύματος στην πυλαία φλέβα του λήπτη. Αφαιρούνται οι αγγειολαβίδες της κάτω κοίλης και της πυλαίας φλέβας. Το μόσχευμα επαναιματώνεται. Με συνεχή ραφή αναστομώνεται τελικοπλάγια η κοιλιακή αρτηρία του μοσχεύματος στην αορτή του λήπτη. Αφαιρούνται οι αγγειολαβίδες της αορτής. Ο χοληδόχος πόρος του μοσχεύματος εμφυτεύεται στο δωδεκαδάκτυλο (Εικόνα Γ/Γ2.2). Συγκλείεται το χειρουργικό τραύμα.

---



**Εικόνα Γ/Γ2.2:** Εμφύτευση χοληδόχου πόρου του μοσχεύματος στο δωδεκαδάκτυλο του λήπτη κατά την ετεροτοπική μεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους.

# Δ. ΒΛΑΒΕΣ ΗΠΑΤΙΚΟΥ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΛΟΓΩ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ

## I. Εισαγωγή

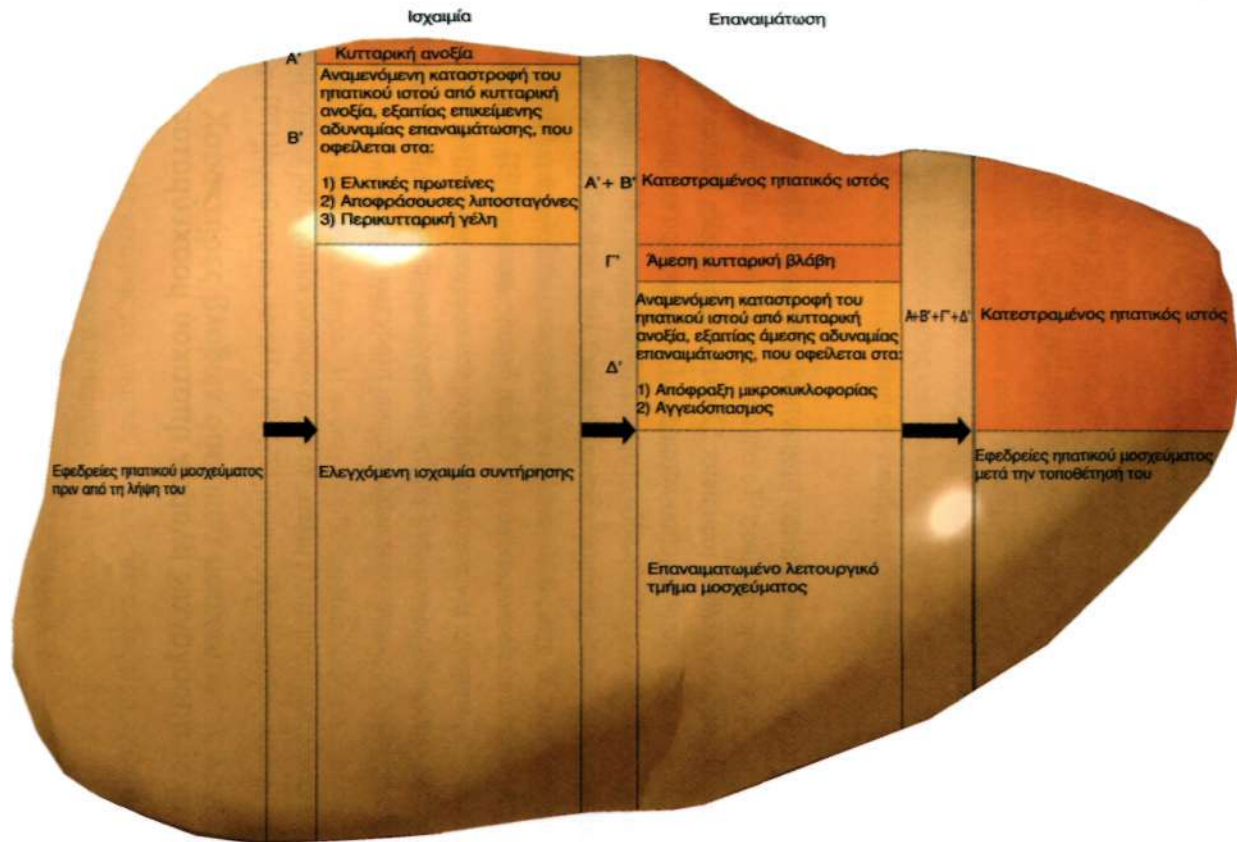
Κατά τη συντήρηση του ήπατος ένα σημαντικό τμήμα του οργάνου υφίσταται βλάβες οι οποίες είναι μη αναστρέψιμες. Οι βλάβες αυτές ευθύνονται για την πρωτοπαθή δυσλειτουργία ή τη μη λειτουργία του μοσχεύματος. Κατά τη συντήρηση βλάπτονται τόσο τα παρεγχυματικά, όσο και τα μη παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος. Αντίθετα, σε βλάβες από άλλους παράγοντες (ιογενείς ηπατίτιδες, φαρμακευτικές ηπατίτιδες, κ.τ.λ.) επηρεάζονται κυρίως μόνο τα ηπατοκύτταρα[174].

Ανάμεσα στο στάδιο της ψυχρής ισχαιμίας και στο στάδιο της επαναιμάτωσης του ηπατικού μοσχεύματος είναι δυνατό, ανάλογα με την εξέλιξη της επέμβασης, να παρεμβληθεί ένα βραχύχρονο στάδιο θερμής ισχαιμίας. Επιπλέον, όσο περισσότερο διαρκεί η ισχαιμία του μοσχεύματος (ψυχρή ή θερμή), τόσο καταστρεπτικότερες είναι οι συνέπειες της επαναιμάτωσής του[175, 176].

Τα κύτταρα του ηπατικού ιστού καταστρέφονται είτε από κυτταρική ανοξία είτε από προσβολή των κυτταρικών συστατικών από διάφορες οξειδωτικές ουσίες. Η μη ανατάξιμη κυτταρική *ανοξία* παρατηρείται τόσο στη φάση της ισχαιμίας, όσο και στη φάση της επαναιμάτωσης. Η προσβολή των κυτταρικών συστατικών από διάφορες οξειδωτικές ουσίες παρατηρείται κυρίως στη φάση της επαναιμάτωσης.

Κατά το στάδιο της ισχαιμίας μερικά από τα κύτταρα του ηπατικού μοσχεύματος εξοιδαίνονται και τελικά καταστρέφονται λόγω της ανοξίας. Από τα υπόλοιπα κύτταρα, όσα βρίσκονται σε αρδύσιμο ιστό θα μεταβούν στο στάδιο της επαναιμάτωσης, ενώ όσα βρίσκονται σε μη αρδύσιμο ιστό θα καταστραφούν εξαιτίας της μη ανατάξιμης κυτταρικής ανοξίας. Τμήματα του ηπατικού μοσχεύματος καθίστανται μη αρδύσιμα εξαιτίας διαταραχών της μικροκυκλοφορίας. Οι διαταραχές αυτές οφείλονται στην αδρανοποίηση των πρωτεϊνών (ιντεγκρίνες) που διατηρούν σε τάση το διαμεσοκυττάριο χώρο[177], στην απόφραξη από λιποσταγόνες που προέρχονται από κατεστραμένα ηπατοκύτταρα[178] και στην ενυδάτωση ουσιών του διαμεσοκυττάριου χώρου που συμπεριφέρονται σα γέλη[12, 13] (Εικόνα Γ/Δ 1.1).

Ένας αριθμός κυττάρων που εισέρχονται στο στάδιο της επαναιμάτωσης καταστρέφεται ύστερα από την έκθεση στα παραγόμενα ROI. Από τα υπόλοιπα κύτταρα, όσα βρίσκονται σε αρδύσιμο ιστό θα αποτελέσουν το λειτουργικό τμήμα του μοσχεύματος, ενώ όσα βρίσκονται σε μη αρδύσιμο ιστό θα καταστραφούν εξαιτίας της κυτταρικής ανοξίας. Τμήματα του ηπατικού μοσχεύματος καθίστανται κατά το στάδιο της επαναιμάτωσης μη αρδύσιμα εξαιτίας διαταραχών της μικροκυκλοφορίας. Οι διαταραχές αυτές οφείλονται σε απόφραξη και σε αγγειόσπασμο. Η απόφραξη της



**Εικόνα Γ/ΔΙ.1:** Διάγραμμα αλληλουχίας φαινομένων που καταλήγουν σε καταστροφή μέρους του ηπατικού ιστού κατά τη συντήρηση του μοσχεύματος. Το μέγεθος των κατεστραμμένων ηπατικών τμημάτων (Α', Β', Γ και Δ') είναι σχηματικό και δεν αντιστοιχεί στο αληθές ποσοστό του ηπατικού ιστού που βλέπεται. Ο κόκκινος χρωματισμός αντιστοιχεί στο σχηματικό τμήμα του μοσχεύματος που έχει ήδη καταστραφεί. Ο πορτοκαλί χρωματισμός αντιστοιχεί στο σχηματικό τμήμα του μοσχεύματος που πρόκειται να καταστραφεί.

μικροκυκλοφορίας σχετίζεται με τα αποπίπτοντα ενδοθηλιακά κύτταρα[175, 179-181], την αυξημένη προσκολλητικότητα των λευκοκυττάρων[182, 183], την αυξημένη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων[184, 185] και την αυξημένη ηπική ικανότητα του αίματος[184, 186]. Ο αγγειόσπασμος σχετίζεται με τη σύσπαση (αλλαγή του σχήματος) των ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, εκλύεται δε με τη διαμεσολάβηση των RO1[187-189], των εικοσανοειδών[190], της ελάτωσης του NO[191] και της αύξησης του ενδοπλασματικού  $Ca^{2+}$ [192] (Εικόνα Γ/ΔΙ.Ι).

Στις ακόλουθες παραγράφους αναλύονται οι ισχύουσες θεωρίες έκλυσης και χαρακτηριστικών των βλαβών που παρατηρούνται κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση του ήπατος.

## **2. Βλάβες ισχαιμίας**

### **α. Γενικά**

Οι εκλυτικοί παράγοντες και οι χαρακτήρες των βλαβών του μοσχεύματος είναι οι ίδιοι είτε πρόκειται περί θερμής είτε περί ψυχρής ισχαιμίας. Το σημείο διαφοράς αυτών των δύο ειδών ισχαιμίας είναι ο χρόνος έλευσης των βλαβών του ήπατος. Συγκεκριμένα, η ψύξη ελαπώνει το μεταβολικό ρυθμό και την ταχύτητα αυτόλυσης του κυττάρου. Τα περισσότερα ενζυμικά συστήματα των ομοιόθερμων ζώων περίπου υποδιπλασιάζουν την ενεργότητά τους για κάθε μείωση στη θερμοκρασία της τάξης των 10 °C. Με βάση την εξίσωση του Van't Hoff υπολογίζεται πως η μείωση της θερμοκρασίας από τους 37 στους 0 °C επιφέρει ελάτωση του μεταβολικού ρυθμού κατά 12 φορές[8]. Εφόσον το ηπατικό μόσχευμα ανέχεται 60 min θερμής ισχαιμίας[193], η μείωση της θερμοκρασίας στους 0 °C επιτρέπει την ασφαλή συντήρηση του οργάνου για 12 h[8]. Αν μάλιστα διενεργούνται ταυτόχρονα και άλλοι χειρισμοί για την αποφυγή των ισχαιμικών βλαβών, τότε τα όρια ασφαλούς συντήρησης του οργάνου επεκτείνονται και πέραν των 24 h[10].

Σύμφωνα με τις υπάρχουσες πειραματικές μελέτες τα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος είναι πιο ανθεκτικά από τα μη παρεγχυματικά στην ψυχρή[179, 194] αλλά όχι και στη θερμή[179] ισχαιμία.

### **β. Εκλυτικοί παράγοντες βλαβών ηπατικού μοσχεύματος λόγω ισχαιμίας**

#### **i. Οξέωση**

Η οξέωση που αναπτύσσεται κατά την ισχαιμία του μοσχεύματος οφείλεται στο γαλακτικό οξύ το οποίο παράγεται από την ενεργοποίηση του μεταβολικού δρόμου της αναερόβιας γλυκόλυσης[195].

Η οξέωση απορρυθμίζει την πρωτεϊνική δραστηριότητα του κυττάρου και του εξωκυττάρου χώρου[8]. Ωστόσο, ορισμένες πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν πως το ήπια όξινο ενδοκυττάριο περιβάλλον (pH 7,1-7,2) είναι επωφελές για το ηπατικό μόσχευμα[196].

## ii. **Κατανάλωση ενδοκυττάρου ATP και ADP**

Η ισχαιμία οδηγεί σε ταχύτερη μείωση των αποθεμάτων του κυττάρου σε ATP και ADP εξαιτίας της ανικανότητας του δρόμου της αναερόβιας γλυκόλυσης να καλύψει τις ενεργειακές απαιτήσεις[174]. Το συνολικό ποσό των νουκλεοτιδίων της αδενίνης μειώνεται κατά 90% ύστερα από 120 min θερμής ισχαιμίας του ηπατικού μοσχεύματος[197]. Επίσης, το ποσό του ATP μειώνεται κατά 70% ύστερα από 48 h ψυχρής ισχαιμίας[198]. Τέλος, έχει αποδειχθεί θετική συσχέτιση μεταξύ του αποτελέσματος της μεταμόσχευσης και των ηπατικών αποθεμάτων ATP[199], εφόσον το μόσχευμα είναι πλήρες γλυκογόνου[185] κατά την έναρξη της συντήρησης.

## iii. **Αναστολή λειτουργίας κυτταρικής αντλίας $Na^+/K^+$**

Η αντλία  $Na^+/K^+$  είναι ένα ένζυμο που εδράζεται στη μεμβράνη όλων των κυττάρων. Λειτουργεί καταναλώνοντας ATP. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες βγάζει  $Na^+$  έξω από τα κύτταρα για να εξισορροπήσει το υπερωσμωτικό φαινόμενο Donnan που οφείλεται στα ενδοκυττάρια μακρομόρια[200]. Η έλλειψη ATP και η υποθερμία αναστέλλουν τη λειτουργία του ενζύμου αυτού, γεγονός που επιτρέπει την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης  $Na^+$  και κατά συνέπεια την απώλεια του ενδοκυττάρου αρνητικού φορτίου. Για να αποκατασταθεί το ενδοκυττάριο αρνητικό φορτίο εισέρχεται  $Cl^-$  στο κύτταρο και εξέρχεται  $K^+$  από αυτό. Η ενδοκυττάρια αύξηση του  $Na^+$  ισούται με το αλγεβρικό άθροισμα της ενδοκυττάριας αύξησης του  $Cl^-$  και της ενδοκυττάριας απώλειας του  $K^+$ . Από τη στιγμή που δεν εξισορροπείται πια το υπερωσμωτικό φαινόμενο Donnan εισέρχεται νερό μέσα στο κύτταρο. Η ανάπτυξη ενδοκυττάριας οίδημας οδηγεί τελικά στη λύση του κυττάρου[8].

## γ. **Χαρακτήρες βλαβών ηπατικού μοσχεύματος λόγω ισχαιμίας**

Κατά το στάδιο της ισχαιμίας του ηπατικού μοσχεύματος τα λιγότερο ανθεκτικά κύτταρα εξοιδαίνονται και τελικά καταστρέφονται εξαιτίας της αναστολής λειτουργίας της κυτταρικής αντλίας  $Na^+/K^+$ , όπως έχει ήδη περιγραφεί.

## 3. **Βλάβες επαναιμάτωσης**

### α. **Εκλυτικοί παράγοντες βλαβών ηπατικού μοσχεύματος λόγω**

## επαναιματοωσης

### i. Γενικά

Τα κύτταρα Kupffer αποτελούν τον πολυαριθμότερο πληθυσμό ιστικά καθηλωμένων μακροφάγων. Βρίσκονται στα ηπατικά κολποειδή έχοντας άμεση επαφή τόσο με τα παρεγχυματικά, όσο και με τα υπόλοιπα, μη παρεγχυματικά κύτταρα του οργάνου. Έχει προταθεί πως η ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer διαδραματίζει βασικό ρόλο στην εμφάνιση βλαβών επαναιμάτωσης του συντηρημένου μοσχεύματος[127, 181, 201-203]. Συγκεκριμένα, σε μοντέλα ηπατικής μεταμόσχευσης σε αρουραίους παρατηρήθηκε αύξηση της επιβίωσης των ληπτών ύστερα από απενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer[201]. Επίσης, σε παρόμοια μοντέλα, ανιχνεύθηκε ενεργοποίηση του συνόλου των κυττάρων Kupffer 15 min μετά την επαναιμάτωση του μοσχεύματος[181]. Ωστόσο, η συμμετοχή των κυττάρων Kupffer στην έκλυση της βλάβης επαναιμάτωσης του ηπατικού μοσχεύματος δεν έχει γίνει αποδεκτή από όλους τους ερευνητές[138, 204]. Η ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer αποδίδεται στην ανοξία, καθώς και σε αυτοκρινείς, παρακρινείς και ενδοκρινείς μηχανισμούς. Τα διεγερμένα κύτταρα Kupffer παράγουν ROI,  $PLA_2$ , PAF, κυττοκίνες, πρωτεάσες, εικοσανοειδή, NO, καθώς και άλλα παράγωγα[205].

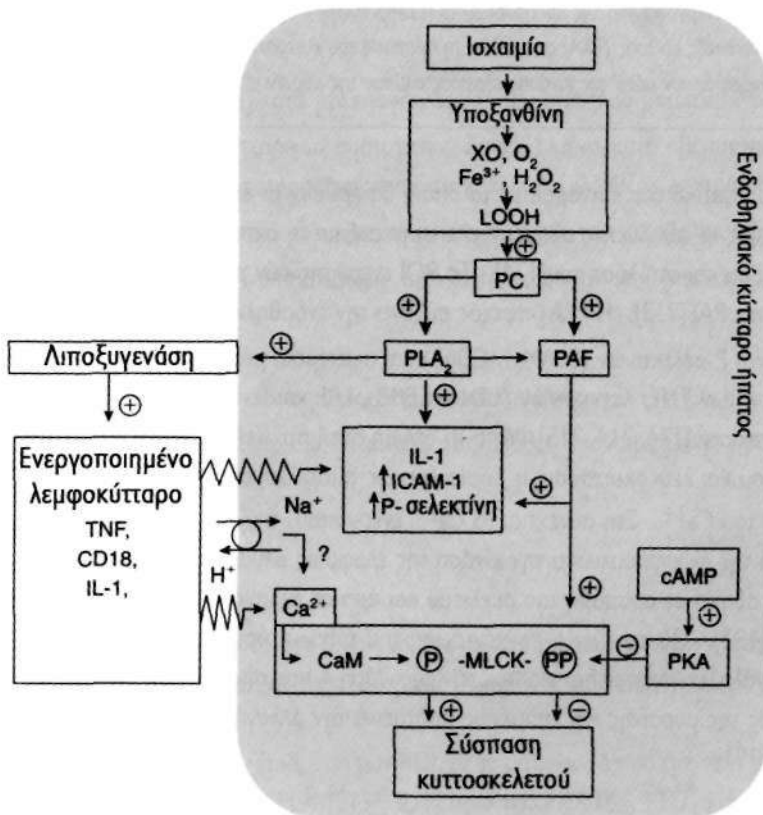
Εκτός από τα κύτταρα Kupffer, σημαντική θέση στην έκλυση βλάβης επαναιμάτωσης του ηπατικού μοσχεύματος κατέχουν τα ενδοθηλιακά και τα παρεγχυματικά κύτταρα του οργάνου, καθώς επίσης τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια του αίματος του λήπτη. Συγκεκριμένα, τα ηπατικά ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται από την ανοξία, καθώς και από αυτοκρινείς, παρακρινείς και ενδοκρινείς μηχανισμούς και παράγουν ROI,  $PLA_2$ , PAF, ενδοθελίνες και NO[174]. Επίσης, τα παρεγχυματικά κύτταρα ενεργοποιούνται με τον ίδιο τρόπο και παράγουν ROI, κυττοκίνες και NO[174]. Επιπλέον, τα λευκοκύτταρα του αίματος του λήπτη ενεργοποιούνται και αυτά από την ανοξία, και τους αυτοκρινείς, παρακρινείς και ενδοκρινείς μηχανισμούς και παράγουν ROI, PAF, κυττοκίνες και πρωτεάσες[174, 189, 206]. Τέλος, με το ίδιο τρόπο ενεργοποιούνται και τα αιμοπετάλια του αίματος του λήπτη και παράγουν ROI,  $PLA_2$  και PAF[174, 207].

### Η. *Ελεύθερες ρίζες $O_2$*

Πολλές πειραματικές έρευνες έχουν υποστηρίξει ότι κατά την επαναιμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος επιταχύνεται η παραγωγή ROI, η οποία έχει ήδη αρχίσει από τη φάση της συντήρησης του[187, 202, 208, 209]. Επίσης, έχουν μελετηθεί αρκετές από τις βλαπτικές επιδράσεις των ROI στον ηπατικό ιστό, οι οποίες παρατηρούνται κυρίως τις τέσσερις πρώτες ώρες μετά την επαναιμάτωση[208]. Μερικές από αυτές είναι η άμεση καταστροφή των συστατικών του κυττάρων, η αλλαγή του σχήματος των, η αύξηση της προσκολλητικότητας των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων και η αύξηση της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων.

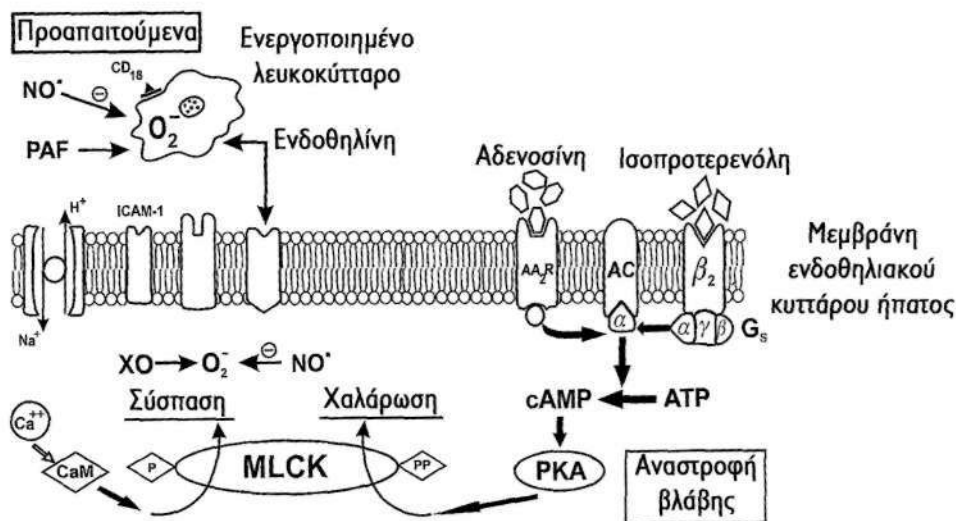
Η έναρξη της παραγωγής ROI γίνεται με δύο τρόπους. Ο πρώτος σχετίζεται με το φαινόμενο της "αναπνευστικής έκρηξης". Το εξαρτώμενο από το NADPH σύστημα οξειδάσης της μεμβράνης των κυττάρων (κυρίως των Kupffer και των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων) υπολείπεται. Όμως, κάτω από την επίδραση των κυποκινών ενεργοποιείται και ανάγει το προσφερόμενο κατά την επαναϊμάτωση  $O_2$  σε  $H_2O_2$  και OFR[210]. Ο δεύτερος τρόπος σχετίζεται με το μεταβολισμό των πουρινών. Η ισχαιμία έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση της υποξανθίνης από τον καταβολισμό του ATP. Επίσης, οδηγεί στη μετατροπή της ξανθιναναγωγίας σε ξανθινοξειδάση[211]. Η μετατροπή αυτή επιτυγχάνεται με τη μεταφορά  $e^-$  στο  $O_2$  που έχει ως συνέπεια την παραγωγή OFR. Κατά την επαναϊμάτωση αυξάνεται η προσφορά του  $O_2$  στον ιστό και επομένως αυξάνεται η παραγωγή OFR[212].

Στη συνέχεια ο δρόμος παραγωγής των ROI γίνεται κοινός[191] (Εικόνες Γ/Δ3.1, Γ/Δ3.2). Οι OFR και το  $H_2O_2$ , με τη βοήθεια  $Fe^{3+}$ , παράγουν HFR. Οι HFR είναι εξαιρετικά τοξικές και οξει-



**Εικόνα Γ/Δ3.1:** Αλληλεπίδραση μεταξύ ηπατικών ενδοθηλιακών κυττάρων και λεμφοκυττάρων κατά τη φάση ισχαιμίας του οργάνου. Η ενεργοποίηση της καλμοδουλίνης (CaM) οδηγεί στη σύσπαση του κυττοσκελετού. Η απελευθέρωση της Α πρωτεϊνικής κινάσης (PKA) αναστέλλει τη σύσπαση του κυττοσκελετού. Τόσο η καλμοδουλίνη, όσο και η Α πρωτεϊνική κινάση δρουν μέσω της κίνησης ελαφράς αλυσού της μυοσίνης (MLCK).





**Εικόνα Γ/Δ3.2:** Σχηματική απεικόνιση των φαινομένων που παρατηρούνται κατά τη φάση ισχαιμίας του ηπατικού μοσχεύματος. Η ενεργοποίηση της καλμοδουλίνης (CaM) οδηγεί στη σύσπαση του κυττοσκελετού. Η απελευθέρωση της Α πρωτεϊνικής κινάσης (PKA) αναστέλλει τη σύσπαση του κυττοσκελετού. Τόσο η καλμοδουλίνη, όσο και η Α πρωτεϊνική κινάση δρουν μέσω της κινάσης ελαφράς αλύσου της μιοσίνης (MLCK).

δώνουν κάθε συστατικό του κυττάρου με το οποίο θα έρθουν σε επαφή, παράγοντας έτσι τα διάφορα ROI. Αυτές οι οξειδώσεις οδηγούν είτε στην αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης του κυττάρου ή ακόμα και στη λύση του [174]. Τα ROI ενεργοποιούν τη φωσφατιδυλοχολίνη η οποία παράγει PLA<sub>2</sub> και PAF [213]. Η PLA<sub>2</sub> αφενός αυξάνει την ενδοθηλιακή συγκέντρωση των ICAM-1, VCAM-1, IL-1 και Ρ-σελεκτινών (ELAM-1, CD62) και αφετέρου, μέσω της λιποξυγενάσης, αυξάνει τη συγκέντρωση των TNF, ιντεγκρινών (CD 11, CD 18), LRF και IL-1 των παρακείμενων στο ενδοθήλιο λευκοκυττάρων [174, 214, 215]. Από τη στιγμή αυτή αρχίζει η επικοινωνία μεταξύ ενδοθηλιακού κυττάρου και λευκοκυττάρου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοθηλιακής συγκέντρωσης του Ca<sup>2+</sup>. Στη συνέχεια, το Ca<sup>2+</sup> ενεργοποιεί την καλμοδουλίνη. Η καλμοδουλίνη με τη σειρά της φωσφορυλιώνει την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μιοσίνης. Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί σε σύσπαση του σκελετού και άρα σε αλλαγή του σχήματος του ενδοθηλιακού κυττάρου [192]. Πάντως, αν η συγκέντρωση του ενδοκυττάρου cAMP ή του ενδοκυττάρου cGMP είναι μεγάλη, ενεργοποιείται μία πρωτεϊνική κινάση Α που απενεργοποιεί την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μιοσίνης και επομένως αποτρέπει την αλλαγή του σχήματος του ενδοθηλιακού κυττάρου [191].

Ωστόσο, η σημασία των ROI στην έκλυση της βλάβης επαναιμάτωσης του ηπατικού μοσχεύματος έχει αμφισβητηθεί. Η συγκέντρωση της Ξανθιναναγωγάσης στο φυσιολογικό ηπατοκύτταρο είναι πενταπλάσια της Ξανθινοξειδάσης, η δε μετατροπή του ενζύμου από τη μία μορφή στην άλλη απαιτεί, σε συνθήκες υποθερμίας, πολλές ημέρες [216]. Επίσης, υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί άμυνας

απέναντι στα ROI είτε ενζυμικοί[217] (δισμουτάση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, καταλάση, υπεροξειδάσες, μιτοχονδριακό οξειδωτικό σύστημα του κυττοχρώματος, κ.τ.λ.) είτε μη ενζυμικοί[218, 219] (γλουταθειόνη, ασκορβικό οξύ, βιταμίνη E, α-τοκοφερόλη, β-καροτίνη, κ.τ.λ.). Επιπλέον, τα λευκοκύτταρα που προσκολλώνται στο ενδοθήλιο του μοσχεύματος συνεισφέρουν στην άμυνα κατά των ROI[220]. Τέλος, πειραματικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η ηπατική ικανότητα εξουδετέρωσης ROI είναι πολύ μεγαλύτερη από το οξειδωτικό φορτίο που αναπτύσσεται κατά τη διάρκεια μιας μεταμόσχευσης[221].

### *iii.*      **PLA<sub>2</sub>**

Η PLA<sub>2</sub> ανιχνεύεται τόσο στον ενδοκυττάριο, όσο και στον εξωκυττάριο χώρο[222, 223].

Η PLA<sub>2</sub> παράγεται κατά το μεταβολισμό της φωσφατιδυλοχολίνης με τη βοήθεια των ROI, PAF, κυττοκινών και Ca<sup>2+</sup> [191, 223]. Ειδικότερα, πειραματικές μελέτες έχουν ανιχνεύσει αύξηση της ενεργότητας της PI<sub>3</sub>A<sub>2</sub> δύο ώρες μετά την έγχυση TNF[215].

Οι βλάβες που επιφέρει η PI<sub>3</sub>A<sub>2</sub> κατά την επαναιμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος σχετίζονται με την άμεση καταστροφή των κυτταρικών συστατικών. Συγκεκριμένα, κατά την αυτοκαταλυόμενη παραγωγή της PLA<sub>2</sub> συμπαράγονται λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και ελεύθερα λιπαρά οξέα[222]. Η αυξημένη συγκέντρωση PLA<sub>2</sub> οδηγεί σε υπερενεργοποίηση αυτού του μεταβολικού δρόμου, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της κυτταρικής και των μιτοχονδριακών μεμβρανών[191].

Επιπλέον, η PLA<sub>2</sub> προάγει την έκλυση άλλων ενεργών παραγόντων[215] (ROI, PAF, πρωτεάσες, εικοσανοειδή, κ.τ.λ.) και συμμετέχει, ως μεσάζων, στις βλάβες επαναιμάτωσης που προκαλούν οι ROI[213] (Εικόνα Γ/Δ3.1).

### *iv.*      **PAF**

Ο PAF είναι ένα φωσφολιπιδές που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα πολλών κυττάρων[207]. Επίσης, ανιχνεύεται και ως υποδοχέας της κυτταρικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων[224].

Ο PAF παράγεται κάτω από την επίδραση των ROI, με το μηχανισμό που έχει ήδη περιγραφεί. Επίσης εκλύεται με τη βοήθεια των PLA<sub>2</sub>[213], IL-1, πρωτεασών, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> και ενδοτοξίνης[207, 225].

Οι βλάβες που προκαλεί ο PAF κατά την επαναιμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος σχετίζονται με την αλλαγή της μορφολογίας των ενδοθηλιακών κυττάρων, την αύξηση της προσκολλητικότητας

των λευκοκυττάρων[206], την αύξηση της προσκολλητικότητας και της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων[207] και την αύξηση της πηκτικής ικανότητας του αίματος[225]. Ο βασικός μηχανισμός πρόκλησης των προαναφερόμενων βλαβών είναι η φωσφορυλίωση της κινάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης[191, 192] (Εικόνα Γ/Δ3.1). Η φωσφορυλίωση αυτή οδηγεί σε σύσπαση του κυτταρικού σκελετού σύμφωνα με το μηχανισμό που έχει ήδη περιγραφεί.

Επιπλέον, ο PAF συνεισφέρει στην έκλυση άλλων παραγόντων που συμμετέχουν στις βλάβες επαναϊμάτωσης του ηπατικού μοσχεύματος και κυρίως των PLA<sub>2</sub>, TNF, IL-1, IL-6, IL-8, πρωτεασών[226] και εικοσανοειδών[213].

#### *v. Κυττοκίνες*

Οι σπουδαιότερες από τις κυττοκίνες που συμμετέχουν στην έκλυση των βλαβών επαναϊμάτωσης του ηπατικού μοσχεύματος είναι οι TNF, IL-1, IL-6, IL-8 και γ-INF[174].

Ο TNF ρυθμίζει τη μορφολογία και τη βιολογική συμπεριφορά των ηπατικών ενδοθηλιακών κυττάρων με την ενεργοποίηση των επιφανειακών αντιγόνων, την αύξηση των μορίων προσκόλλησης της κυτταρικής μεμβράνης και την αναδιαμόρφωση του κυτταρικού σκελετού[227]. Επίσης, αυξάνει τις φαγοκυτταρικές και προσκολλητικές ικανότητες των λεμφοκυττάρων[228]. Επιπλέον, οδηγεί σε αύξηση της πηκτικής ικανότητας του αίματος[229]. Τέλος, συμβάλλει στην έκλυση των υπόλοιπων παραγόντων που συμμετέχουν στις βλάβες επαναϊμάτωσης του ηπατικού μοσχεύματος και κυρίως των ROI, IL-1, IL-8, πρωτεασών, εικοσανοειδών και NO[191, 230-232].

Η IL-1 ρυθμίζει τη μορφολογία και τη βιολογική συμπεριφορά των ηπατικών ενδοθηλιακών κυττάρων και συμμετέχει στην έκλυση των υπολοίπων κυτοκινών, πρωτεασών και του NO[174, 191]. Η IL-6 συμμετέχει στη ρύθμιση της πηκτικότητας του αίματος επάγωντας την παραγωγή ινωδογόνου και αι-αντιπρυψίνης[233]. Η IL-8 αυξάνει τις φαγοκυτταρικές και προσκολλητικές ικανότητες των ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων, οδηγώντας παράλληλα σε αύξηση της παραγωγής ROI[234].

Κάτω από την εποπτεία του TNF, η IL-1 των κυττάρων Kupffer ρυθμίζει την παραγωγή IL-8 των παρεγχυματικών κυττάρων, η οποία με τη σειρά της ρυθμίζει την παραγωγή ROI από τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα. Ο μηχανισμός αυτός έχει οδηγήσει στην αποδοχή του μοντέλου της δικτυακής συνεργασίας των κυττοκινών για την έκλυση των βλαβών επαναϊμάτωσης του ηπατικού μοσχεύματος[233].

Η γ-INF ρυθμίζει τις προσκολλητικές ικανότητες των λεμφοκυττάρων αυξάνοντας την έκφραση των αντιγόνων MHC II. Επίσης συμμετέχει στην έκλυση TNF, IL-1, πρωτεασών και NO[191, 235].

## **vi. Πρωτεάσες**

Στις πρωτεάσες αποδίδονται οι ηπατικές βλάβες επαναιμάτωσης που παρατηρούνται μετά τις τέσσερις πρώτες ώρες αποκατάστασης της κυκλοφορίας. Οι βλάβες αυτές προκαλούνται από την άμεση καταστροφή των κυτταρικών συστατικών[208, 236, 237]. Επιπλέον, οι πρωτεάσες ενοχοποιούνται για την αύξηση της ηηκτικής ικανότητας του αίματος[186]. Τέλος, οι πρωτεάσες μετατρέπουν ενζυμικά την ξανθιναναγωγή σε ξανθινοξειδάση συμβάλλοντας έτσι στην παραγωγή ROI[238].

## **vii. Εικοσανοειδή**

Το αραχιδονικό οξύ μεταβολίζεται με τη βοήθεια δύο βασικών ενζύμων. Λευκοτριένες ονομάζονται τα ενεργά παράγωγα που προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου λιποξυγενάση. Προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και θρομβοξάνες ονομάζονται τα ενεργά παράγωγα που προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου κυκλοξυγενάση. Αυτές οι δύο κατηγορίες παραγών του αραχιδονικού οξέος ονομάζονται εικοσανοειδή[239].

Τα παραγόμενα κατά την επαναιμάτωση ROI οδηγούν στην ενεργοποίηση της  $PLA_2$  σύμφωνα με το μηχανισμό που έχει ήδη περιγραφεί. Στη συνέχεια η  $PLA_2$  μετατρέπει τα φωσφολιποειδή της κυτταρικής μεμβράνης σε αραχιδονικό οξύ, το οποίο μεταβολίζεται περαιτέρω σε εικοσανοειδή[239]. Εικοσανοειδή παράγονται και με τη βοήθεια των PAF[240], TNF και ενδοτοξίνης[241].

Τα εικοσανοειδή απελευθερώνονται σε μεγάλες ποσότητες κατά την επαναιμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος. Τα επίπεδα των  $PGE_2$ ,  $PGF_1$  και  $TXB_2$  στο αίμα των ηπατικών φλεβών αυξάνουν έως και 500 φορές μέσα στα λίγα πρώτα λεπτά αποκατάστασης της κυκλοφορίας, για να επανέλθουν στις φυσιολογικές τους τιμές 24 h αργότερα[190]. Τα αυξημένα επίπεδα TX εκλύουν τη βλάβη επαναιμάτωσης μέσω των αλλαγών που επιφέρουν στη μορφολογία των ηπατικών ενδοθηλιακών κυττάρων[242] (αγγειόσπασμος). Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα  $TXA_2$ ,  $TXB_2$  και  $LTB_4$  εκλύουν τη βλάβη επαναιμάτωσης μέσω των αλλαγών που επιφέρουν στη βιολογική συμπεριφορά των λευκοκυττάρων[174, 243] (χημειοταξία, προσκόλλησι, φαγοκυττάρωση). Τέλος, τα αυξημένα επίπεδα  $TXA_2$  και  $TXB_2$  οδηγούν στην περαιτέρω παραγωγή ROI (φαύλος κύκλος) και πρωτεασών[174, 243]. Ωστόσο, υπάρχουν πειραματικές μελέτες που υποστηρίζουν πως η αύξηση των επιπέδων ορισμένων εικοσανοειδών είναι επωφελής. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί η μείωση του ποσοστού πρωτοπαθούς δυσλειτουργίας των ηπατικών μοσχευμάτων, ύστερα από τη χορήγηση  $PGE_1$ [9].

## **viii. NO**

Το NO παράγεται κατά τη μετατροπή της L-αργινίνης σε L-κίτρουλλίνη από τη NOS. Το ένζυμο

χρησιμοποιεί αρκετές προσθετικές ομάδες όπως FMN, FAD,  $Ca^{2+}$ , κ.τ.λ. Βρίσκεται σε τρεις μορφές. Η πρώτη παράγεται συνεχώς στα εγκεφαλικά νευρικά κύτταρα. Η δεύτερη παράγεται συνεχώς στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. Η τρίτη, 1000 φορές μεγαλύτερης παραγωγικότητας από τις άλλες δύο[244], δεν παράγεται συνεχώς αλλά επάγεται στα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, στα κύτταρα Kurfffer και στα παρεγχυματικά κύτταρα του ήπατος[245].

Η επαγόμενη μορφή NOS παράγεται κάτω από την επίδραση των κυττοκινών TNF, IL-1 και  $\gamma$  INF[246]. Μάλιστα ο προαγωγός του γονιδίου της επαγόμενης NOS περιλαμβάνει τις ήδη γνωστές από άλλα γονίδια αλληλουχίες σύνδεσης των παραγόντων NF- $\kappa$ B, AP-1 και STAT-1 [247]. Οι αλληλουχίες αυτές ανιχνεύονται και σε άλλα γονίδια που επάγονται από τις προαναφερόμενες κυττοκίνες. Επίσης, η επαγόμενη μορφή NOS παράγεται κάτω από την επίδραση πεπτιδίων που απελευθερώνονται από την καταστροφή του εξωκυττάριου υποστρώματος κατά την επαναμίτωση του ηπατικού μοσχεύματος[248]. Τέλος, η επαγόμενη NOS παράγεται κάτω από την επίδραση της αλλαγής του οξειδαναγωγικού δυναμικού του κυττάρου κατά την ιστική επαναμίτωση[191]. Η επαγωγή της τρίτης μορφής NOS αναστέλλεται με την παρουσία των παραγόντων TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB και PDGF-BB[249].

Η παραγωγή NO αποτρέπει την σύσπαση του σκελετού και άρα την αλλαγή του σχήματος του κυττάρου (αγγειοδιασταλτική δράση). Επίσης, μειώνει τη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, το NO αυξάνει τη συγκέντρωση του ενδοκυττάριου cGMP, ενεργοποιώντας τη γουανιλική κυκλάση και έτσι αδρανοποιεί την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης[250] (Εικόνα Γ/Δ3.1). Επιπλέον, αποτρέπει την ενεργοποίηση της προαναφερόμενης κινάσης εξουδετερώνοντας τα ενδοκυττάρια R01[191] (Εικόνα Γ/Δ3.2). Τέλος, συνδεδεμένο μετά συμπλέγματα I και II της αναπνευστικής αλυσίδας, αδρανοποιεί την μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση[251].

Η παραγωγή NO αυξάνει κατά την επαναμίτωση του ηπατικού μοσχεύματος[252]. Μεγάλο ποσοστό του παγιδεύεται από τα υπερπαραγόμενα R01[191]. Τελικά, αν και ανεπαρκής, η ποσότητα του NO συνεισφέρει στην αναστολή της αλλαγής του κυτταρικού σχήματος (αγγειόσπασμος) και της αύξησης της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων[250],

### **ix. Ενδοθηλίνες**

Οι ενδοθηλίνες είναι ολιγοπεπίδια που αποτελούνται από 21 αμινοξέα. Η οικογένεια των ενδοθηλινών περιλαμβάνει τέσσερα ισομερή, τις ενδοθηλίνες -1, -2, -3 και το VIP[253, 254]. Σε φυσιολογικές συνθήκες διαδραματίζουν ρόλο τοπικού αγγειοσυσπαστικού. Η ενδοθηλίνη-1 αποτελεί το ισχυρότερο γνωστό αγγειοσυσπαστικό[254]. Ενδοφλέβια χορήγηση ενδοθηλίνης-1 οδηγεί σε δοσοεξαρτώμενη αύξηση της πίεσης του πυλαίου συστήματος που συνοδεύεται από μείωση του εύρους των κολποειδών[255].

Ανάμεσα στους παράγοντες που επάγουν την παραγωγή των ενδοθηλινών συγκαταλέγονται η υπο-

ξία, η ενδοτοξίνη, η αυξημένη συγκέντρωση  $Ca^{2+}$ , ο TGF-β, η κυκλοσπορίνη, κ.τ.λ.[255, 256]

Οι βλάβες που επιφέρουν οι ενδοθηλίνες κατά την επαναιμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος εκλύονται με την αλλαγή της μορφολογίας τόσο των ενδοθηλιακών, όσο και άλλων κυτταρικών ομάδων[253-255] (αγγειόσπασμος). Ο μηχανισμός δράσης των ενδοθηλινών σχετίζεται με την παρατεταμένη αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης του  $Ca^{2+}$ [256].

#### **χ. Ενδοτοξίνη**

Η ικανότητα των μη παρεγχυματικών κυττάρων του ήπατος να εξουδετερώνει τη συνεχώς παραγόμενη σπλαχνική ενδοτοξίνη ελαττώνεται κατά τη λειτουργική ανεπάρκεια του οργάνου[257]. Επιπλέον, τα κύτταρα Kupffer του μοσχεύματος, επηρεασμένα από την ισχαιμία της συντήρησης, αδυνατούν να επιτελέσουν το αποτοξινωτικό τους έργο με επιτυχία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων σπλαχνικής ενδοτοξίνης που κυκλοφορεί στον οργανισμό του λήπτη[258]. Τα αυξημένα επίπεδα ενδοτοξίνης κατά την προεγχειρητική και άμεση μετεγχειρητική περίοδο συνοδεύονται από αυξημένα ποσοστά πρωτοπαθούς δυσλειτουργίας του ηπατικού μοσχεύματος. Επίσης, τα αυξημένα επίπεδα ενδοτοξίνης κατά την άμεση μετεγχειρητική περίοδο προοιωνίζουν μεγάλη μετεγχειρητική θνησιμότητα, καθώς και την ανάγκη πολλαπλών μεταγγίσεων αιμοπεταλίων και παρατεταμένης χρήσης αναπνευστήρα[259].

Οι βλάβες που επιφέρει η σπλαχνική ενδοτοξίνη κατά την επαναιμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος σχετίζονται με την άμεση καταστροφή των κυτταρικών συστατικών και την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων[260] (χημειοταξία, προσκόλληση, φαγοκυττάρωση). Επίσης, η ενδοτοξίνη επάγει την έκλυση άλλων παραγόντων που συμμετέχουν στις βλάβες επαναιμάτωσης του ηπατικού μοσχεύματος και κυρίως των ROI,  $PLA_2$ , PAF, κυττοκινών, πρωτεασών, εικοσανοειδών, ενδοθηλινών και NO[191, 257, 260].

#### **xi. $Ca^{2+}$**

Η κυτταροπλασματική συγκέντρωση  $Ca^{2+}$  είναι εξαιρετικά χαμηλή ( $10^{-7}$  M). Το  $Ca^{2+}$  διατηρείται έξω από το κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια μοριακών αντλιών που καταναλώνουν ATP. Οι αντλίες αυτές είτε το απομακρύνουν από τον ενδοκυττάριο χώρο είτε το αποθηκεύουν στα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το λιγοστό  $Ca^{2+}$  που παραμένει στο κυτταρόπλασμα δεσμεύεται από τις παρακείμενες πρωτεΐνες[261]. Κατά τη συντήρηση του μοσχεύματος εμφανίζεται ενδοκυττάριο έλλειμα ATP. Το έλλειμα αυτό μεγιστοποιείται στη φάση της επαναιμάτωσης. Οι μοριακές αντλίες σταματούν να δουλεύουν και το  $Ca^{2+}$  εισβάλλει μέσα στα κύτταρα[261]. Επιπλέον, η ολόένα και μεγαλύτερη μείωση του ενδοκυττάρου pH δημιουργεί συνθήκες αυξημένου ιονισμού.

Η αύξηση της συγκέντρωσης του κυτταροπλασματικού  $Ca^{2+}$  οδηγεί σε ορισμένες από τις βλάβες

που εκλύονται κατά την επαναιμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος. Ειδικότερα, παρατηρούνται αλλαγές στη μορφολογία και στη λειτουργικότητα των κυττάρων, άμεση καταστροφή τους, καθώς και αύξηση της προσκολλητικότητας των λευκοκυττάρων. Εφόσον παρατηρηθεί αύξηση της κυτταροπλασματικής συγκέντρωσης του  $Ca^{2+}$ , η βλάβη των παρεγχυματικών κυττάρων θεωρείται μη αναστρέψιμη[192].

Το αυξημένο κυτταροπλασματικό  $Ca^{2+}$  εκλύει τις βλάβες επαναιμάτωσης με δύο τρόπους. Ο πρώτος σχετίζεται με την άμεση ενεργοποίηση των  $PLA_1$ ,  $PLA_2^{*ca}$ ,  $PLC$  που είτε οξειδώνουν και τελικά καταστρέφουν τα κύτταρα είτε ενεργοποιούν τα παρακείμενα λευκοκύτταρα[262]. Ο δεύτερος σχετίζεται με την ενεργοποίηση πρωτεασών που μετατρέπουν την ξανθιναγωγόση σε ξανθοξειδάση και τελικά οδηγούν σε αυξημένη παραγωγή ROI[263]. Τα αυξημένα ROI έχουν ως αποτέλεσμα τις παρατηρούμενες βλάβες επαναιμάτωσης σύμφωνα με το μηχανισμό που έχει ήδη περιγραφεί.

## β. Χαρακτήρες βλαβών ηπατικού μοσχεύματος λόγω επαναιμάτωσης

### i. Άμεση κυτταρική καταστροφή

Ένας αριθμός κυττάρων που εισέρχονται στο στάδιο της επαναιμάτωσης καταστρέφεται ύστερα από την έκθεση στα παραγόμενα ROI, τα οποία οξειδώνουν κάθε κυτταρικό συστατικό με το οποίο έρχονται σε επαφή[188, 238, 264]. Επιπλέον, όσα κύτταρα βρίσκονται σε μη αρδευσιμο ιστό θα καταστραφούν εξαιτίας μη ανατάξιμης κυτταρικής ανοξίας. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα εξοιδαίνονται και τελικά καταστρέφονται εξαιτίας της αναστολής λειτουργίας της κυτταρικής αντλίας  $Na^+/K^+$ , όπως έχει ήδη περιγραφεί.

### ii. Βλάβη ενδοθηλιακών κυττάρων ηπατικών κολποειδών

Κατά τη συντήρηση του ηπατικού μοσχεύματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών υφίστανται μορφολογικές και λειτουργικές βλάβες που αρχίζουν από την περίοδο της ψυχρής ισχαιμίας και ολοκληρώνονται κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης[24, 127, 136, 175, 179, 194, 265]. Οι μορφολογικές βλάβες έχουν επιβεβαιωθεί με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου[266]. Οι λειτουργικές βλάβες έχουν ανιχνευθεί με τη μέτρηση διαφόρων δεικτών επάρκειας των ενδοθηλιακών κυττάρων (CPK-BB στο υγρό έκπλυσης του μοσχεύματος[266], υαλουρονάνη στο αίμα του λήπτη[126, 131-133, 135, 137], κ.τ.λ.). Αξίζει να σημειωθεί πως το μέγεθος των προαναφερόμενων βλαβών είναι ανάλογο του χρόνου ψυχρής ισχαιμίας του ηπατικού μοσχεύματος[175, 185].

Η μορφολογική βλάβη καταλήγει σε αποστρωγγυλεμένα ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν αποχωριστεί από το τοίχωμα του ηπατικού κολποειδούς (Εικόνα Γ/Δ3.3). Συγκεκριμένα, φυσιολογικό εν-



**Εικόνα Γ/Δ3.3:** Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου που δεικνύει την τυπική βλάβη ψυχρής ισχαιμίας του ηπατικού μοσχεύματος. Διακρίνεται το αποπίπτον ηπατικό ενδοθηλιακό κύτταρο, το οποίο στερείται των φυσιολογικών κυτταροπλασματικών αποφύσεων του.

δοθήλιο θυριδωτού τύπου επικαλύπτει τις ηπατοκυτταρικές μικρολάχνες στην αρχή της ψυχρής ισχαιμίας. Με την πάροδο του χρόνου συντήρησης οι θυρίδες μεγενθύνονται λόγω κυτταρικής σύσπασης και το κολποειδές ενδοθήλιο αποκτά εικόνα δικτύου. Στη συνέχεια παρατηρείται περαιτέρω σμίκρυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων που συνοδεύεται από μικροαποκολλήσεις από το κολποειδές τοίχωμα. Τελικά, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μικρά και αποστρογγυλεμένα, αποπίπτουν από το κολποειδές τοίχωμα, απογυμνώνοντας τις ηπατοκυτταρικές μικρολάχνες και αποφράσσοντας την κυκλοφορία[179, 180]. Αν και πολλά από τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν είναι ακόμα νεκρά, όπως αποδεικνύεται με τη χρήση ειδικών χρώσεων, το ηπατικό μόσχευμα δεν είναι πια βιώσιμο. Επομένως, η βλάβη και όχι απαραίτητα ο θάνατος των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι ένας από τους λόγους εμφάνισης της πρωτοπαθούς δυσλειτουργίας του ηπατικού μοσχεύματος[175, 180, 185].

Η βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων εκλύεται εξαιτίας των αλλαγών που παρατηρούνται στον κυτταρικό τους σκελετό. Συγκεκριμένα, η σύσπαση του κυττοσκελετού σχετίζεται με τον αποπολυμερισμό της F- σε G-ακτίνη[267]. Για τον αποπολυμερισμό αυτό ευθύνονται η διαταραχή των υδροστατικών πιέσεων, το χαμηλό ενδοκυττάριο pH, τα χαμηλά επίπεδα ενδοκυττάρου ATP, οι κυττοκίνες και οι διαταραχές της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του  $Ca^{2+}$ [267, 268]. Επίσης, η σύσπαση του κυττοσκελετού σχετίζεται με την παραγωγή ROI, σύμφωνα με το μηχανισμό που έχει ήδη περιγραφεί.

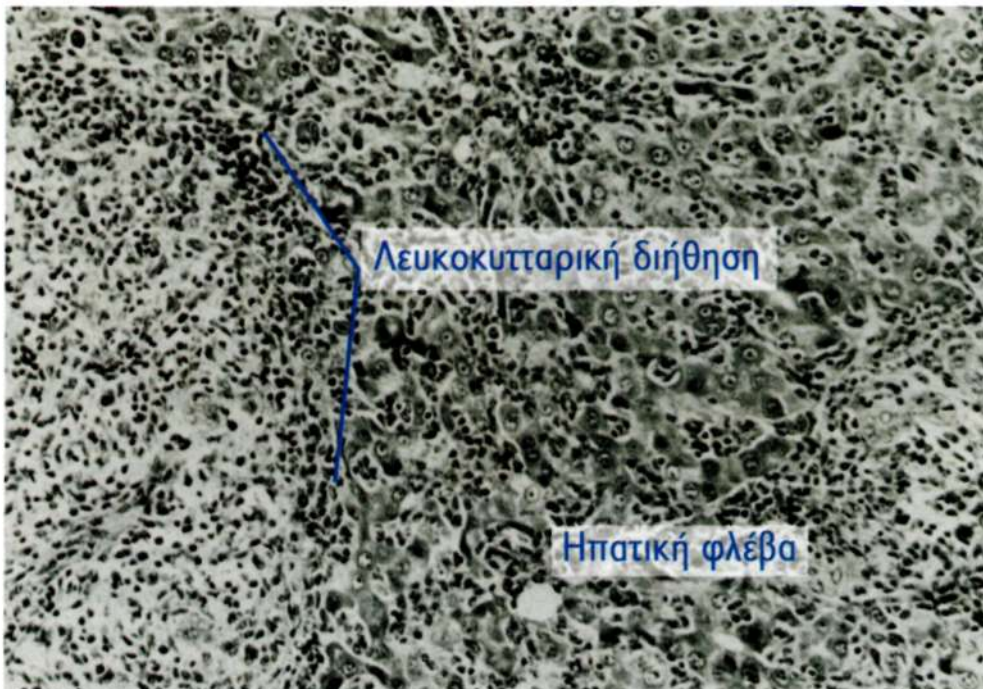
Άλλοι παράγοντες που συνεισφέρουν στην έκλυση της βλάβης των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι η διαταραχή της λειτουργικότητας της φιμπρονεκτίνης[269] και οι αλλοιώσεις των κυτταρικών συνδεσμών[270].

#### *Hi. Αύξηση προσκολλητικότητας λευκοκυττάρων*

Αμέσως μετά την επαναιμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος παρατηρείται προσκόλληση ουδετε-



ροφίλων στα κολποειδή του οργάνου[271] (Εικόνα Γ/Δ3.4). Το ποσοστό των ουδετερόφιλων του αίματος που συμμετέχει στο φαινόμενο αυτό είναι 10% για τα βιώσιμα και 40% για τα μη βιώσιμα μοσχεύματα[182]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού αυτού, των μετεγχειρητικών επιπέδων της ασπαργινικής αμινοτρανσφεράσης και του χρόνου προθρομβίνης[272].



**Εικόνα Γ/Δ3.4:** Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου που δεικνύει τη λευκοκυτταρική διήθηση που παρατηρείται στα ηπατικά μοσχεύματα τις πρώτες μετά την επαναιμάτωση.

Όσον αφορά στα λεμφοκύτταρα, 10 min μετά την επαναιμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος, αρχίζει η προσκόλληση τους στα κολποειδή του οργάνου. Το ποσοστό των κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων που συμμετέχει στο φαινόμενο είναι 40% για μοσχεύματα που διατηρήθηκαν 45 min σε UW και 80% για μοσχεύματα που διατηρήθηκαν 30 h στο ίδιο διάλυμα[271].

Το λευκοκύτταρα που προσκολλώνται στα ηπατικά κολποειδή τέσσερις ώρες μετά την επαναιμάτωση είναι κυρίως μονοπύρνα[268].

Η προσκόλληση των λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών γίνεται με τη βοήθεια υποδοχέων. Η παραγωγή ROI, όσον αφορά στις τέσσερις πρώτες ώρες μετά την επαναιμάτωση και η παραγωγή πρωτεασών, όσον αφορά στο ακόλουθο χρονικό διάστημα, ευθύνονται για την αυξημένη προσκολλητικότητα των λευκοκυττάρων[208]. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην έκλυ-

ση του φαινομένου αυτού διαδραματίζουν οι κυττοκίνες και ο PAF[206, 213].

Ο μηχανισμός προσκόλλησης των λευκοκυττάρων που ελέγχεται από τις ROI έχει ως βάση την ισχαιμία, η οποία οδηγεί στη συσσώρευση της υποξανθίνης από τον καταβολισμό του ATP. Επίσης, η ισχαιμία ευθύνεται και για τη μετατροπή της ξανθιναναγωγίας σε ξανθινοξειδάση[211,212, 216]. Η μετατροπή αυτή επιτυγχάνεται με τη μεταφορά  $e^-$  στο  $O_2$  που έχει ως συνέπεια την παραγωγή OFR. Κατά την επαναιμάτωση αυξάνεται η προσφορά του  $O_2$  στον ιστό και επομένως αυξάνεται η παραγωγή OFR[191] (Εικόνα Γ/Δ3.1). Οι OFR και το  $H_2O_2$ , με τη βοήθεια  $Fe^{3+}$ , παράγουν HFR. Οι HFR είναι εξαιρετικά τοξικές και οξειδώνουν κάθε συστατικό του κυττάρου με το οποίο θα έρθουν σε επαφή, παράγοντας έτσι τα διάφορα ROI. Τα ROI ενεργοποιούν τη φωσφατιδυλοχολίνη η οποία παράγει  $PI_2$  και PAF[213]. Η  $PI_2$  αφενός αυξάνει την ενδοθηλιακή συγκέντρωση των ICAM-1, VCAM-1, IL-1 και P-σελεκτινών (ELAM-1, CD62) και αφετέρου, μέσω της λιποξυγενάσης, αυξάνει τη συγκέντρωση των TNF, ιντεγκρινών (CD 11, CD 18), LRF και IL-1 των παρακείμενων στο ενδοθήλιο λευκοκυττάρων[174, 214, 215]. Οι σελεκτίνες μαζί με τον PAF είναι οι πρώτοι υποδοχείς που ανιχνεύονται στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά την επαναιμάτωση [214, 224]. Η πληθώρα των αλληλεπιδρώντων υποδοχέων οδηγεί στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων[174].

Η προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο των κολποειδών είναι βλαπτική για το μόσχευμα. Συγκεκριμένα, η συσσώρευση των λευκοκυττάρων προκαλεί ισχαιμικά έμφρακτα[209]. Επίσης, η παραγωγή υποχλωριώδους οξέος από τα φαγοκύτταρα είναι καταστρεπτική για τα συστατικά των κυττάρων[273]. Τέλος, η συγκέντρωση μεγάλου αριθμού λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο του μοσχεύματος οδηγεί σε αύξηση των ήδη εκκρινόμενων ενεργών ουσιών (ROI, PAF, κυττοκίνες, πρωτεάσες, κ.τ.λ.) και επομένως σε επίταση των βλαβών επαναιμάτωσης[174, 273].

#### ***iv. Αύξηση προσκολλητικότητας και συγκολλητικότητας αιμοπεταλίων***

Μετά την επαναιμάτωση του ήπατος παρατηρείται αύξηση της συγκολλητικότητας και της προσκολλητικότητας των αιμοπεταλίων. Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος συντήρησης του μοσχεύματος, τόσο εντονότερο γίνεται το προαναφερόμενο φαινόμενο[193]. Η συμπεριφορά αυτή των αιμοπεταλίων είναι ανεξάρτητη του ηπαρινισμού, γεγονός που αποδεικνύει ότι είναι άσχετη με την παρατηρούμενη υπερπηκτικότητα του αίματος μέσα στο μόσχευμα[193]. Επίσης, όταν τα αποθέματα γλυκογόνου του μοσχεύματος είναι μεγάλα, το ποσοστό της συγκολλητικότητας και της προσκολλητικότητας των αιμοπεταλίων ελαττώνεται[185].

Όπως συμβαίνει και με τα λευκοκύτταρα, η αύξηση της προσκολλητικότητας και της συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων οφείλεται στην αλλαγή της μορφολογίας των ενδοθηλιακών κυττάρων[174].

## v. *Αύξηση πηκτικής ικανότητας αίματος μέσα στο μόσχευμα*

Η αύξηση της πηκτικής ικανότητας του αίματος στις επαναιματωμένες περιοχές του ηπατικού μοσχεύματος είναι άσχετη με την ταυτόχρονη αύξηση της προσκολλητικότητας και συγκολλητικότητας των αιμοπεταλίων[184].

Η παρατηρούμενη υπερπηκτικότητα αποδίδεται σε ενεργά παράγωγα που εκκρίνονται από τα κύτταρα Kupffer, τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Συγκεκριμένα, κάτω από την επίδραση των TNF, IL-1, PAF και προσχηματισμένων αντισωμάτων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα του μοσχεύματος εκφράζουν επιφανειακά αντιγόνα προσκόλλησης και αυξάνουν την παραγωγή ινικής[207, 229].

Τα λευκοκύτταρα που προσκολλώνται στο επηρεασμένο ενδοθήλιο εκκρίνουν ηπαρίνωση, η οποία καταβολίζει την περικυτταρική θειική ηπαράνη. Η θειική ηπαράνη έχει αντιπηκτικές ιδιότητες επειδή εμποδίζει την προσκόλληση πρωτεϊνών και ερυθρών αιμοσφαιρίων, καθυλώνει τη δισμουτάση του  $H_2O_2$  στον περικυτταρικό χώρο και "εξομαλύνει" την πλούσια σε επιφανειακά αντιγόνα μεμβράνη του ενδοθηλιακού κυπάρου[274]. Επομένως, η απομάκρυνση αυτής της πρωτεογλυκάνης οδηγεί σε υπερπηκτικότητα.

Επίσης, η πηκτική ικανότητα του αίματος αυξάνεται από την καθρεψίνη B και την ελαστάση, οι οποίες παράγονται από τα κύτταρα του Kupffer και τα ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα αντίστοιχα. Οι πρωτεάσες αυτές εκλύονται τη στιγμή της επαναιμάτωσης και ενεργοποιούν τους πηκτικούς παράγοντες του πλάσματος[275].

Τέλος, η παρατηρούμενη υπερπηκτικότητα αποδίδεται στο γεγονός ότι η ανοξία αφενός επάγει τη σύνθεση ενός επιφανειακού παράγοντα X, αφετέρου μειώνει τη σύνθεση της θρομβομοντουλίνης[276]. Μάλιστα, η σύνθεση του παράγοντα X επιτείνεται από την ενδοκυτταρική οξείωση που αναπτύσσεται κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος[277].

# **Ε. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ ΗΠΑΤΙΚΟΥ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ - ΙΣΧΥΟΥΣΕΣ ΑΠΟΨΕΙΣ**

## **1. Ιστορική αναδρομή**

Η μεταμόσχευση ήπατος ενσωματώθηκε στην κλινική πράξη στις αρχές του 1980, μετά την ανακάλυψη της κυκλοσπορίνης[3]. Αρχικά, για τη συντήρηση των ηπατικών μοσχευμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι πρακτικές συντήρησης των νεφρικών μοσχευμάτων, δηλαδή η ψύξη, η έκπλυση με διάλυμα Eurocollins, η συντήρηση με διάλυμα Eurocollins και η απομάκρυνση του διαλύματος συντήρησης με διάλυμα RL[278]. Ο μέγιστος επιτρεπτός χρόνος ψυχρής ισχαιμίας που επιτυγχάνονταν με τη μέθοδο αυτή ήταν οι 10 h[8]. Το 1986 ανακαλύπτεται το διάλυμα UW, κατάλληλο για τη συντήρηση των παγκρεατικών μοσχευμάτων. Το 1988 το διάλυμα UW χρησιμοποιείται για τη έκπλυση και την ψύξη των ηπατικών μοσχευμάτων. Ο χρόνος ψυχρής ισχαιμίας που επιτεύχθηκε με τη χρήση του διαλύματος αυτού ήταν μεγαλύτερος από 24 h[8]. Το 1990, η χρήση συνεχούς μηχανικής έκπλυσης με ψυχρό διάλυμα UW επιτρέπει τη διατήρηση των ηπατικών μοσχευμάτων για 72 h. Ωστόσο σήμερα, η τεχνική συντήρησης με απλή ψύξη σε διάλυμα UW αποτελεί τη μέθοδο εκλογής για τη προστασία των ηπατικών μοσχευμάτων, εξαιτίας της ευκολίας, του χαμηλού κόστους και της αποτελεσματικότητας της [279].

## **2. Προσυντήρηση**

### **α. Επιλογή δότη**

Ένα ηπατικό μόσχευμα είναι δυνατό να υποστεί βλάβες πριν αφαιρεθεί από το σώμα του δότη. Συγκεκριμένα, κάποιοι από τους δότες κατανάλωναν μεγάλες ποσότητες αιθυλικής αλκοόλης, γεγονός που οδήγησε στη λιπώδη διήθηση του ήπατος τους[280]. Επίσης, είναι δυνατό να έχουν προκληθεί βλάβες στο ήπαρ του δότη εξαιτίας προϋπάρχουσας ασθένειας (π.χ. ιογενής ηπατίτιδα, φαρμακευτική ηπατίτιδα, κ.τ.λ.) ή τραυματισμού. Επιπλέον, οι διαταραχές της θυρεοειδικής ομοιοστασίας που παρατηρούνται μετά τον εγκεφαλικό θάνατο επηρεάζουν τον ηπατικό μεταβολισμό του δότη, μέσω απορρύθμισης της μιτοχονδριακής λειτουργίας[281]. Επιπρόσθετα, ο εγκεφαλικός θάνατος επιφέρει απορρύθμιση του υποθαλαμο-υποφυσιαίου άξονα, με αποτέλεσμα την ανεπάρκεια της ADH ορμόνης (όποιοι διαβήτης), την ανάπτυξη υπερωσμωτικού περιβάλλοντος και συνεπώς τη συρρίκνωση των κυττάρων του ηπατικού μοσχεύματος[282]. Τέλος, ένα ηπατικό μόσχευμα πριν αφαιρεθεί από το σώμα του δότη είναι δυνατό να υποβληθεί σε περιόδους θερμής ισχαιμίας, με όλες τις συνέπειες που αυτό συνεπάγεται. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας κακής οξυγόνωσης, είτε λόγω αναιμίας, είτε ως συνέπεια παρατεταμένων υποτασικών επεισοδίων του δότη[174].

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα, η επιλογή του δότη ήπατος οφείλει να γίνεται ύστερα από προσεκτική μελέτη του ατομικού του ιστορικού, των συμβάντων κατά την παραμονή του στη μονάδα εντατικής θεραπείας και του εγχειρητικού πρακτικού αφαίρεσης των οργάνων του. Τα στοιχεία αυτά συνεκτιμούνται με τις τελευταίες εργαστηριακές του εξετάσεις (π.χ. πλήρης βιοχημικός έλεγχος, πλήρης ιολογικός έλεγχος, κ.τ.λ.). Καθοριστικό ρόλο διαδραματίζει η βιοψία ήπατος, η οποία αποφαίνεται με βεβαιότητα για την κατάσταση του μοσχεύματος[280] (π.χ. λιπώδης διήθηση, συρρίκνωση ηπατικών κυττάρων, κ.τ.λ.). Με την τακτική αυτή αποκλείονται μοσχεύματα με αυξημένες πιθανότητες πρωτοπαθούς δυσλειτουργίας ή μη-λειτουργίας[174].

## β. Διατροφική κατάσταση δότη

Η διατήρηση υψηλών επιπέδων ATP σχετίζεται άμεσα με την ανθεκτικότητα των ηπατικών κυττάρων κατά τη συντήρηση του μοσχεύματος[185, 283]. Το απαιτούμενο ATP εξασφαλίζεται με την ενεργοποίηση του αναερόβιου γλυκολυτικού μεταβολισμού. Η γλυκόζη που τροφοδοτεί αυτόν το μεταβολικό δρόμο προέρχεται από το γλυκογόνο του ηπατικού μοσχεύματος. Κατά συνέπεια, η ανθεκτικότητα του οργάνου στη συντήρηση εξαρτάται από το αποθηκευμένο γλυκογόνο του[195]. Το γεγονός αυτό ισχύει για μεγάλες περιόδους συντήρησης και θερμής ισχαιμίας[185].

Τα χαμηλά επίπεδα ATP σχετίζονται με αδρανοποίηση των κυττάρων Kupffer. Συγκεκριμένα, έχει μετρηθεί περιορισμός της φαγοκυττάρωσης και της παραγωγής TNF- $\alpha$ [284]. Είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer διαδραματίζει βασικό ρόλο στην εμφάνιση βλαβών επαναιμάτωσης του μοσχεύματος[127, 181, 201-203]. Επομένως, η απουσία γλυκογόνου (χαμηλά επίπεδα ATP) οδηγεί σε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα του οργάνου στη συντήρηση[237] (αδρανοποίηση των κυττάρων Kupffer). Το γεγονός αυτό ισχύει για σύντομες περιόδους συντήρησης με μηδενική θερμή ισχαιμία[284].

Συμπερασματικά, τα ηπατικά μοσχεύματα που υφίστανται μεγάλες περιόδους συντήρησης και θερμής ισχαιμίας (συνήθεις κλινικές συνθήκες) πρέπει να έχουν αποθηκευμένη μεγάλη ποσότητα γλυκογόνου, για να επαναλειτουργήσουν ικανοποιητικά[185,283]. Αντίθετα, ηπατικά μοσχεύματα που υφίστανται σύντομες περιόδους συντήρησης και μηδενική θερμή ισχαιμία (συνήθεις πειραματικές συνθήκες) πρέπει να περιέχουν μικρή ποσότητα γλυκογόνου[284]. Η απαιτούμενη από την κλινική πράξη μεγάλες ποσότητες ηπατικού γλυκογόνου εξασφαλίζονται με την πλήρη θερμική και ποιοτική διατροφική κάλυψη του δότη κατά την παραμονή του στη μονάδα εντατικής θεραπείας[285].

## γ. Ειδική φαρμακευτική αγωγή δότη

### i. Γενικά

Εκτός από την γενική φαρμακευτική αγωγή που λαμβάνει κατά τη νοσηλεία του στη μονάδα εντα-

τικής θεραπείας (π.χ. ινότροπα φάρμακα, αντιβιοτικά, κ.τ.λ.), ο υποψήφιος δότης οργάνων μπορεί να λαμβάνει φαρμακευτικές ουσίες που πιθανότατα περιορίζουν το εύρος των βλαβών συντήρησης των οργάνων προς μεταμόσχευση. Στις ουσίες αυτές συμπεριλαμβάνονται λαζαροειδή, βιταμίνες, ανοσοσφαιρίνες και φάρμακα που περιορίζουν τη δράση των κυττάρων Kupffer.

## ii. *Λαζαροειδή*

Τα λαζαροειδή αποτελούν μία ομάδα αμινοστεροειδών (με 21 άτομα άνθρακα) τα οποία στερούνται στεροειδούς δράσης. Επιδεικνύουν κυτταροπροστατευτικές ιδιότητες[286].

Τα λαζαροειδή αποτελούν ισχυρούς αντιοξειδωτικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, έχει ήδη αναφερθεί ότι κατά τη διάρκεια της συντήρησης του ηπατικού μοσχεύματος παράγονται OFR και  $H_2O_2$ . Οι OFR και το  $H_2O_2$ , με τη βοήθεια  $Fe^{3+}$ , παράγουν HFR. Οι HFR είναι εξαιρετικά τοξικές και οξειδώνουν κάθε συστατικό του κυττάρου με το οποίο θα έρθουν σε επαφή, παράγοντας έτσι τα διάφορα ROI. Αυτές οι οξειδώσεις οδηγούν είτε στην αυξημένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης ή στην παραγωγή βλαπτικών ουσιών ή ακόμα και στη λύση του κυττάρου[238, 263, 264]. Τα λαζαροειδή εμποδίζουν την οξειδωτική διεργασία δεσμεύοντας το  $Fe^{3+}$ [287].

Επιπλέον, τα λαζαροειδή αναστέλουν την ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer[288], περιορίζουν την παραγωγή των κυτοκινών[289] και εμποδίζουν την απελευθέρωση των εικοσανοειδών[286].

Τα ισχυρότερα λαζαροειδή είναι το U-74389G, το U-74006F και το U-74500A[290]. Το U-74500A χορηγούμενο στο δότη σε δόση 5 mg/kg βάρους σώματος, 30 min πριν από την έναρξη ισχαιμίας των οργάνων, προάγει σημαντικά την άμεση λειτουργία του ηπατικού μοσχεύματος[290]. Μέχρι στιγμής, η υδρόφοβη φύση των λαζαροειδών περιορίζει την ευρεία εφαρμογή τους στην κλινική πράξη[290].

## iii. *Βιταμίνες*

Οι βιταμίνες C και E σε έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση δεσμεύοντας τις ROI που παράγονται κατά την επαναϊμάτωση του ηπατικού μοσχεύματος. Συγκεκριμένα, *ί.ν.* στάγδην χορήγηση στο δότη βιταμίνης C σε δόση 50 mg/kg βάρους σώματος, για τρεις ημέρες, πριν από την έναρξη ισχαιμίας των οργάνων, προάγει σημαντικά την άμεση λειτουργία του ηπατικού μοσχεύματος[219]. Το ίδιο ευεργετικό αποτέλεσμα έχει και η *ί.μ.* χορήγηση στο δότη βιταμίνης E σε δόση 300 mg/kg βάρους σώματος, για τρεις ημέρες, πριν από την έναρξη ισχαιμίας των οργάνων[218, 291].

## iv. *Ανοσοσφαιρίνες*

Η ανοσοσφαιρίνη G έχει ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση περιορίζοντας την ενεργοποίηση των κυτ-

τάρων Kupffer και αναστέλοντας την παραγωγή διαφόρων κυττοκινών (π.χ. TNF-α, IL-1, κ.τ.λ.). Για το λόγο αυτό, i.v. bolus χορήγηση στο δότη ανοσοσφαιρίνης G σε δόση 1000 mg/kg βάρους σώματος, 10 min πριν από την έναρξη ισχαιμίας των οργάνων, προάγει σημαντικά την άμεση λειτουργία του ηπατικού μοσχεύματος[292].

#### ν. Αναστολείς της δράσης των κυττάρων Kupffer.

Το χλωριούχο γαδολίνιο[293] και ο μεθυλοπαλμιτικός εστέρας[201] αναστέλουν την ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer, περιορίζοντας έτσι τις βλάβες συντήρησης του ηπατικού μοσχεύματος. Ειδικότερα, i.v. bolus χορήγηση στο δότη χλωριούχου γαδολίνιου σε δόση 10 mg/kg βάρους σώματος, για δύο ημέρες, πριν από την έναρξη ισχαιμίας των οργάνων, προάγει σημαντικά την πρωτοπαθή λειτουργία του μοσχεύματος[293]. Το ίδιο ευεργετικό αποτέλεσμα έχει και η i.v. bolus χορήγηση στο δότη μεθυλοπαλμιτικού εστέρα σε δόση 300 mg/kg βάρους σώματος, μία ημέρα πριν από την έναρξη ισχαιμίας των οργάνων[201].

### 3. Συντήρηση - Φάση ισχαιμίας

#### α. Εισαγωγή

Η βαθιά κατάψυξη και η συνεχής, μηχανική έκπλυση των ηπατικών μοσχευμάτων με οξυγονωμένα υγρά συντήρησης αποτελούν (θεωρητικά) τους μόνους ιδανικούς τρόπους μακράς διατήρησης των οργάνων (έως και αρκετούς μήνες). Ωστόσο, η θεωρία απέτυχε να εφαρμοστεί στην καθημερινή ιατρική πρακτική για λόγους επιστημονικούς και πρακτικούς[8]. Σήμερα, η συντήρηση των ηπατικών μοσχευμάτων επιτυγχάνεται με την ψυχρή (4 έως 0 °C) έκπλυσή τους και τη διατήρησή τους σε ειδικά εμπλουτισμένα υγρά[294-297].

#### β. Έκπλυση

Η συντήρηση του μοσχεύματος ξεκινά με την *in situ* έκπλυσή του από το αίμα. Για την έκπλυση έχουν χρησιμοποιηθεί διαλύματα τόσο χαμηλού (RL, Eurocollins) όσο και υψηλού (UW) ιξώδους. Θεωρητικά, τα λεπτόρρευστα διαλύματα εκπλένουν αποτελεσματικότερα τη μικροκυκλοφορία του μοσχεύματος. Πράγματι, το ήπαρ διαυγάζει ταχύτερα και ομοιογενέστερα όταν εκπλένεται με το λεπτόρρευστο Eurocollins, παρά με το παχύρρευστο UW. Ωστόσο, πειραματικές[298] και κλινικές[299] μελέτες που συγκρίνουν την λειτουργικότητα ηπατικών μοσχευμάτων με ίδιους χρόνους ισχαιμίας, συντηρημένα στο ίδιο διάλυμα (UW), αλλά εκπλυμένα με διαφορετικά διαλύματα (RL, Eurocollins, UW) απέδειξαν πως το UW υπερτερεί σαφώς ως διάλυμα έκπλυσης. Ο μηχανισμός δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Πάντως, η σύγχρονη κλινική πρακτική απαιτεί τη χρήση του UW ως διαλύματος τόσο έκπλυσης όσο και συντήρησης του ηπατικού μοσχεύματος[299].

## Ψύξη

Η ψύξη ελαττώνει το μεταβολικό ρυθμό και την ταχύτητα αυτόλυσης του κυττάρου. Τα περισσότερα ενζυμικά συστήματα των ομοιόθερμων ζώων περίπου υποδιπλασιάζουν την ενεργότητά τους για κάθε μείωση στη θερμοκρασία της τάξης των 10 °C. Με βάση την εξίσωση του Van't Hoff υπολογίζεται πως η μείωση της θερμοκρασίας από τους 37 στους 0 °C επιφέρει ελάττωση του μεταβολικού ρυθμού κατά 12 φορές[8]. Εφόσον το ηπατικό μόσχευμα ανέχεται 60 min θερμής ισχαιμίας[193], η μείωση της θερμοκρασίας στους 0 °C επιτρέπει την *ασφαλή* συντήρηση του οργάνου για 12h[8].

Η ψύξη του μοσχεύματος ξεκινά με την *in situ* έκπλυσή του από το αίμα. Συγκεκριμένα, η θερμοκρασία του διαλύματος που χρησιμοποιείται για την έκπλυση του οργάνου κυμαίνεται από 4 έως 0 °C. Στη συνέχεια, κατά τη μεταφορά του, το μόσχευμα διατηρείται σε υδατόλουτρο του οποίου η θερμοκρασία κυμαίνεται από 4 έως 0 °C. Ενώ η έναρξη της ψύξης (και επομένως της συντήρησης) συμπίπτει με την έναρξη της ισχαιμίας του οργάνου, ο τερματισμός της ψύξης και η επαναψύξη του μοσχεύματος δεν ταυτίζονται χρονικά. Στην πραγματικότητα, η επαναψύξη υστερεί από 45 έως και 75 min[174] (στις ανθρώπινες ηπατικές μεταμοσχεύσεις), χρόνος που απαιτείται για την πραγματοποίηση των πρώτων αγγειακών αναστομών. Βέβαια, το όργανο, μετά την απομάκρυσή του από το ψυχρό υδατόλουτρο και έως τη στιγμή της επαναψύξης, διατηρείται μέσα σε μικρή ποσότητα πάγου. Ωστόσο, ο χειρισμός αυτός δεν αποτρέπει πλήρως τη σταδιακή επαναθέρμανση του ισχαιμίου μοσχεύματος[174]. Η προαναφερόμενη επαναθέρμανση αποβαίνει καταστρεπτική για το ηπατικό μόσχευμα. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία του ισχαιμίου οργάνου, αίρεται η "προστασία" της ψύξης, δηλαδή ενεργοποιούνται τα ενζυμικά συστήματα, επιταχύνεται ο μεταβολισμός (αναερόβιος) και αυξάνονται οι ενεργειακές ανάγκες. Συγκεκριμένα, όσον αφορά στην ανθρώπινη ηπατική μεταμόσχευση, έχει μετρηθεί 30 % ελάττωση του μοσχευματικού γλυκογόνου κατά το χρόνο πραγματοποίησης των πρώτων αγγειακών αναστομών[300]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι ο παρατεταμένος χρόνος επαναθέρμανσης του ισχαιμίου οργάνου οδηγεί συχνότερα σε πρωτοπαθή δυσλειτουργία ή μη-λειτουργία του[301].

Τέλος, η ψύξη επιβραδύνει τις καταστρεπτικές επιδράσεις της ισχαιμίας στο ηπατικό μόσχευμα αλλά δεν τις αναστέλει. Για το λόγο αυτό πρέπει να ελαχιστοποιείται ο χρόνος ψυχρής ισχαιμίας του οργάνου. Επίσης, είναι πολύ σημαντικό να περιορίζεται ο χρόνος της σταδιακής επαναθέρμανσης του ισχαιμίου ηπατικού μοσχεύματος κατά την πραγματοποίηση των πρώτων αγγειακών αναστομών[237].

### δ. Εμπλουτισμός διαλυμάτων συντήρησης

#### i. Γενικά

Η χρήση κατάλληλων διαλυμάτων συντήρησης μπορεί να επιμηκύνει το χρόνο ψυχρής ισχαιμίας



του ηπατικού μοσχεύματος πέρα από τις 24 h[299]. Όπως καθορίστηκε από τους Belzer και Southhard, ένα διάλυμα συντήρησης θα πρέπει να ελαχιστοποιεί την έκταση των περιοχών του οργάνου που δεν θα αρδευθούν μετά την επαναιμάτωσή του (λόγω εξωκυττάριου οιδήματος ή λόγω λειτουργικού αγγειόσπασμου). Επίσης, οφείλει να περιορίζει τους εκλυτικούς παράγοντες των ισχαιμικών βλαβών (οξέωση, κατανάλωση ενδοκυττάριου ATP, αναστολή λειτουργίας κυτταρικής αντλίας  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), οι οποίοι οδηγούν σε κυτταρική καταστροφή. Τέλος, επιβάλλεται να περιορίζει τους εκλυτικούς παράγοντες των βλαβών επαναιμάτωσης (π.χ. ROI, κυττοκίνες, κ.τ.λ.), οι οποίοι επίσης οδηγούν σε κυτταρική καταστροφή, λειτουργική βλάβη των ενδοθηλιακών κολποειδών κυττάρων, αύξηση της προσκολλητικότητας των έμμορφων συστατικών του αίματος και αύξηση της ενδοηπατικής πηκτικότητας[8].

Οι ουσίες που περιέχονται στα διαλύματα έκπλυσης και συντήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων έχουν συγκεκριμένη σκοπιμότητα που αποβλέπει στον περιορισμό της καταστροφικής επίπτωσης της ισχαιμίας στο όργανο. Οι ουσίες αυτές αναφέρονται αναλυτικότερα η κάθε μία ξεχωριστά.

## ii. *Κολλοειδή*

Στην προσπάθεια βελτίωσης των συνθηκών συντήρησης των μοσχευμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί κολλοειδή διαλύματα υδροξυαιθυλικής κυτταρίνης (κυρίως), καθώς και διαλύματα μακρομοριακών δεξτρανών (λιγότερο).

Θεωρητικά, η χρήση κολλοειδών διαλυμάτων επιμηκύνει τη διάρκεια ασφαλούς συντήρησης των μοσχευμάτων. Η επιμήκυνση αυτή επιτυγχάνεται με τρεις μηχανισμούς.

Σχετικά με τον πρώτο μηχανισμό, τα κολλοειδή μακρομόρια είναι ωσμωονεργά, διαχέονται πολύ δύσκολα στον εξωκυττάριο χώρο και η κυτταρική απορρόφηση τους είναι μηδαμινή. Επομένως, η χρήση κολλοειδών διαλυμάτων συντήρησης έχει ως αποτέλεσμα την παραμονή ωσμωονεργών ουσιών στο αγγειακό δίκτυο του μοσχεύματος. Κατά συνέπεια, αποφεύγεται η μετακίνηση νερού προς τον εξωκυττάριο χώρο, αποτρέπεται το περιαγγειακό οίδημα και αναπτύσσονται συνθήκες καλύτερης επαναιμάτωσης[8] (Εικόνα Γ/Ε3.1). Όσον αφορά στο ηπατικό μόσχευμα, η προαναφερόμενη αλληλουχία γεγονότων παρατηρείται μόνο στην περίπτωση του εξωκυττάριου χώρου των πυλαίων τριάδων. Ο υπόλοιπος ηπατικός εξωκυττάριος χώρος είναι εύκολα προσπελάσιμος από μακρομοριακές ουσίες, εξαιτίας του θυριδωτού ενδοθηλίου των κολποδών τριχοειδών[174]. Σε αντίθεση με την αποτροπή της ανάπτυξης εξωκυττάριου οιδήματος η χρήση κολλοειδών διαλυμάτων συντήρησης δεν εμποδίζει την κυτταρική εξοίδηση[302]. Συμπερασματικά, ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων συντήρησης με μακρομοριακές ουσίες (κυρίως με υδροξυαιθυλική κυτταρίνη) αποτρέπει το εξωκυττάριο αλλά όχι και το κυτταρικό οίδημα[8, 302].

Σχετικά με το δεύτερο μηχανισμό, τα κολλοειδή μακρομόρια προάγουν τις ρεολογικές ιδιότητες του αίματος, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη αιματική έκπλυση του μοσχεύματος και



**Εικόνα Γ/Ε3.1:** Η παραμονή των κολλοειδών ωσμωνεργών ουσιών στο αγγειακό δίκτυο του ηπατικού μοσχεύματος αποτρέπει τη μετακίνηση του διαλύματος έκπλυσης προς τον εξωκυττάριο χώρο.

επομένως την ανάπτυξη καλύτερων συνθηκών επαναϊμάτωσης[303].

Τέλος, σχετικά με τον τρίτο μηχανισμό, τα κολλοειδή μακρομόρια ασκούν άμεση προστατευτική δράση στο ενδοθήλιο του μοσχεύματος, εμποδίζουν τις δομικές του παραμορφώσεις και επομένως οδηγούν σε καλύτερες συνθήκες επαναϊμάτωσης[179, 180].

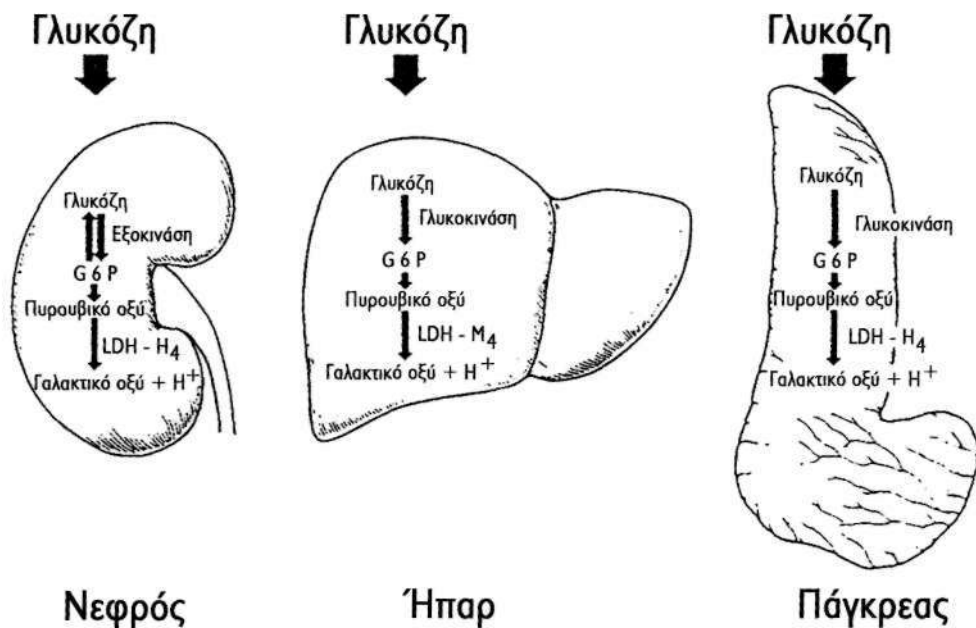
*iii. Μέσου μοριακού βάρους ωσμωνεργές ουσίες*

Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται 174, 296] η ραφφινόζη (594 D), το λακτοβιονικό ανιόν (358 D) και το κιτρικό ανιόν (192 D).

Οι προαναφερόμενες οργανικές ουσίες χρησιμοποιούνται (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό) για να αυξήσουν την ωσμωτική ισχύ των διαλυμάτων στήριξης.

Επίσης, δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη[8]. Επομένως, ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων στήριξης με αυτές τις ωσμωνεργές ουσίες αποτρέπει την ανάπτυξη κυτταρικού οιδήματος κατά την ισχαιμία του μοσχεύματος[8, 296]. Επιπλέον, το λακτοβιονικό ανιόν επιδεικνύει και κυττοπροστατευτικές ιδιότητες[8, 296].

Σε παλαιότερες συνθέσεις διαλυμάτων στήριξης, το ρόλο των μέσου μοριακού βάρους ωσμωνεργών ουσιών διαδραμάτιζαν η γλυκόζη και η μανιτόλη[304]. Όμως, οι συγκεκριμένες ουσίες είναι ακατάλληλες για εμπλουτισμό διαλυμάτων στήριξης ηπατικών μοσχευμάτων, επειδή προ-ολαμβάνονται και μεταβολίζονται ταχύτατα από τα ηπατοκύτταρα[305, 306] (Εικόνα Γ/Ε3.2). Για



**Εικόνα Γ/Ε3.2:** Σχηματική απεικόνιση του αναερόβιου μεταβολικού δρόμου της γλυκόζης σε διάφορα μοσχεύματα. Η γλυκοκινάση έχει 15πλάσια καταλυτική δραστηριότητα από την εξοκινάση. Η γαλακτική δεϋδρογενάση- $M_4$  (LDH- $M_4$ ), σε αντίθεση με το ισόενζυμο της  $-H_4$  (LDH- $H_4$ ), δεν αναστέλεται από το χαμηλό pH. Η συνύπαρξη γλυκοκινάσης και γαλακτικής δεϋδρογενάσης  $-N_4$  (LDH- $M_4$ ) συνεπάγεται μεγάλη απόδοση του αναερόβιου γλυκολυτικού δρόμου. Στα όργανα που παρατηρείται η συνύπαρξη αυτή (λ.χ. ήπαρ) αναπτύσσεται έντονη οξέωση.

το λόγο αυτό αντικαταστάθηκαν από τη ραφφινόζη, το λακτοβιονικό και το κιτρικό ανιόν. Μάλιστα, οι βελτιωμένες ιδιότητες των νεότερων διαλυμάτων συντήρησης αποδίδονται κυρίως στο λακτοβιονικό ανιόν[296, 307].

#### iv. Ινσουλίνη

Η ινσουλίνη προστίθεται στα διαλύματα συντήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων επειδή προάγει το μεταβολισμό της γλυκόζης. Με τον τρόπο αυτό αυξάνονται τα ενεργειακά αποθέματα των ηπατικών κυττάρων[307]. Θεωρητικά λοιπόν, ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων συντήρησης με ινσουλίνη βοηθά τα ηπατικά κύτταρα να αντιμετωπίσουν τις ενεργειακές απαιτήσεις της επαναιμάτωσης.

Ωστόσο, κάποιες πειραματικές μελέτες θεωρούν ότι η προσθήκη ινσουλίνης στα διαλύματα συντήρησης είναι βλαπτική για το ηπατικό μόσχευμα[296]. Είναι πιθανόν η επιπάχυνση του μεταβολισμού της γλυκόζης κάτω από αναερόβιες συνθήκες οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή γαλακτικού οξέος, σε πτώση του ενδοκυττάρου pH (< 7,1) και τελικά σε καταστροφή των ηπατικών κυττάρων[8].

v. *ATP-MgCl<sub>2</sub> και αδενোসίνη*

Η ισχαιμία οδηγεί σε ταχύτατη μείωση των αποθεμάτων του κυττάρου σε ATP και ADP εξαιτίας της ανικανότητας του δρόμου της αναερόβιας γλυκόλυσης να καλύψει τις ενεργειακές απαιτήσεις[8]. Με σκοπό την κάλυψη αυτών των ενεργειακών αναγκών, προστίθεται ATP-MgCl<sub>2</sub> στα διαλύματα συντήρησης. Η συμπλοκή του ATP με το MgCl<sub>2</sub> διευκολύνει την ενδομιτοχονδριακή χρήση του ATP, καθώς και την αύξηση του ενδοκυττάρου Mg<sup>2+</sup> [308] (απαραίτητο σε πολλούς ενεργειακούς μεταβολικούς δρόμους).

Η κάλυψη των ενεργειακών αναγκών κυττάρων κατά την ισχαιμία των ηπατικών μοσχευμάτων επιτυγχάνεται και με την προσθήκη αδενোসίνης στα διαλύματα συντήρησης τους. Συγκεκριμένα, η ουσία αυτή αποτελεί βασικό υπόστρωμα του μεταβολικού δρόμου επανασύνθεσης του ATP[309]. Επιπλέον, η αδενোসίνη αναστέλει τη δραστηριότητα των κυττάρων Kupffer[310], περιορίζει την παραγωγή ROI[311], ελαχιστοποιεί το φαινόμενο της αιμοπεταλιακής προσκολλητικότητας αιμοπεταλίων[312] και κατέχει αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες[174].

vi. *Αποκλειστές διαύλων Ca<sup>2+</sup> τύπου διυδροπυριδίνης*

Ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων συντήρησης με αποκλειστές διαύλων Ca<sup>2+</sup> τύπου διυδροπυριδίνης προάγει την επαναλειτουργία των ηπατικών μοσχευμάτων[139, 183, 192, 236, 310, 313]. Η νι-σολδιπίνη, η νικαρδιπίνη και η βεραπαμίλη είναι οι αποτελεσματικότεροι αποκλειστές. Η ευεργετική δράση των ουσιών αυτών οφείλεται στις αγγειοδιασταλτικές[310] και αντιοξειδωτικές[263] ιδιότητες τους. Συνεπώς, η χρήση τους οδηγεί σε βελτιωμένη επαναλειτουργία του οργάνου.

vii. *Γλουταθειόνη*

Η γλουταθειόνη συμμετέχει στην αδρανοποίηση πολλών κυτταροτοξικών ουσιών[314] (π.χ. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROI, κ.τ.λ.). Επιπλέον, η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της ουσίας αυτής μειώνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας[315]. Μάλιστα, όσο μεγαλύτερη είναι η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της αντιοξειδωτικής αυτής ουσίας, τόσο πολλαπλασιάζονται οι κυτταροπροστατευτικές της ιδιότητες[316]. Κατά συνέπεια, ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων συντήρησης με γλουταθειόνη μειώνει τις βλάβες του ηπατικού μοσχεύματος[296].

viii. *Αλλοπουρινόλη*

Η πρόληψη του σχηματισμού των ROI κατά την ισχαιμία του ηπατικού μοσχεύματος είναι προτιμότερη από τη δέσμευσή τους[317]. Για το λόγο αυτό τα διαλύματα συντήρησης εμπλουτίζονται με αλλοπουρινόλη. Η ουσία αυτή περιορίζει την παραγωγή ROI με την αναστολή της μετατροπής

του ενζύμου ξανθιναναγωγάση στο ένζυμο ξανθινοξειδάση[318]. Κατά συνέπεια, ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων συντήρησης με αλλοπουρινόλη μειώνει τις βλάβες του ηπατικού μοσχεύματος. Τα ευεργετικά αποτελέσματα του εμπλουτισμού αυτού είναι ακόμα εμφανέστερα σε καταστάσεις αυξημένου χρόνου θερμής ισχαιμίας, όταν δηλαδή η παραγωγή των ROI (κατά την ακόλουθη επαναιμιάτωση) είναι ακόμα μεγαλύτερη[319].

#### **ix. Αναστολείς της λευκοκυτταρικής προσκόλλησης**

Η προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο των κολποειδών είναι βλαπτική για το μόσχευμα, πραγματοποιείται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών και γίνεται με τη βοήθεια υποδοχών προσκόλλησης[174, 214, 215, 224]. Ανάμεσα στους υποδοχείς αυτούς συγκαταλέγονται ο ICAM-1, ο CD62 (P-σελεκτίνη), ο CD 11 (ιντεγκρίνη) και ο CD 18 (ιντεγκρίνη). Ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων συντήρησης με αντισώματα έναντι των προαναφερόμενων υποδοχών μειώνει τις βλάβες του ηπατικού μοσχεύματος[320],

#### **x. Προσταγλανδίνες**

Ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων συντήρησης με προσταγλανδίνες θεωρητικά προάγει την επαναλειτουργία του ηπατικού μοσχεύματος[9]. Συγκεκριμένα, μερικές προσταγλανδίνες (π.χ. PGE, PGI<sub>2</sub>, κ.τ.λ.) αναστέλουν την παραγωγή ROI. Επίσης, οι ουσίες αυτές ελαχιστοποιούν την παραγωγή κυττοκινών και λευκοτριενών[229, 242]. Επιπλέον, οι προσταγλανδίνες σταθεροποιούν τις κυτταρικές μεμβράνες[321]. Επιπρόσθετα, οι ουσίες αυτές περιορίζουν τη λευκοκυτταρική και την αιμοπεταλιακή προσκολλητικότητα[322]. Επίσης, οι PGE προκαλούν αγγειοδιαστολή[323]. Τέλος, οι προσταγλανδίνες προάγουν την ηπατική αναγέννηση[324].

#### **xi. Χλωροπρομαζίνη**

Ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων συντήρησης με χλωροπρομαζίνη προάγει την επαναλειτουργία του ηπατικού μοσχεύματος[325]. Συγκεκριμένα, η χλωροπρομαζίνη σταθεροποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες[326]. Επίσης, η ουσία αυτή, αναστέλοντας τη δράση της καλμοδουλίνης, αποτρέπει την ενδοθηλιακή βλάβη των ηπατικών κολποειδών[326]. Επιπλέον, η χλωροπρομαζίνη, περιορίζοντας τη δράση της PLA<sub>2</sub>, ελαχιστοποιεί τη λευκοκυτταρική προσκολλητικότητα[325, 326]. Τέλος, η ουσία αυτή, προκαλώντας αποκλεισμό των διαύλων Ca<sup>2+</sup>, επιφέρει αγγειοδιαστολή[326].

#### **xii. Γλυκίνη και ιστιδίνη**

Ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων συντήρησης με γλυκίνη[327] ή με ιστιδίνη[328] προάγει την επαναλειτουργία του ηπατικού μοσχεύματος. Η συγκεκριμένη δράση των δύο προαναφερόμενων αμινοξέων αποδίδεται στις κυτταροπροστατευτικές τους ιδιότητες[327] (σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών).

### **xiii. Δεξαμεθαζόνη**

Ο εμπλουτισμός των διαλυμάτων συντήρησης με δεξαμεθαζόνη προάγει την επαναλειτουργία του ηπατικού μοσχεύματος. Μάλιστα, η συγκεκριμένη ουσία θεωρείται από τους βασικότερους παράγοντες της αποτελεσματικότητας του διαλύματος UW[298]. Η δράση της δεξαμεθαζόνης αποδίδεται στις κυτταροπροστατευτικές της ιδιότητες[174] (σταθεροποίηση των κυτταρικών μεμβρανών).

## **ε. Σύσταση εμπορικών διαλυμάτων συντήρησης**

Τα εμπορικά διαλύματα συντήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων μοιράζονται ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά. Έχουν παρόμοιο pH, παρόμοια ωσμωτικότητα και η σύσταση τους θυμίζει τη σύσταση του ενδοκυττάριου υγρού. Τέσσερα (τουλάχιστον) διαλύματα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη συντήρηση ηπατικών μοσχευμάτων (Πίνακας Γ/Ε3.1). Το αποτελεσματικότερο από αυτά, το διάλυμα UW, προσφέρει έως 24 h δυνατότητα ψυχρής συντήρησης στο προς μεταμόσχευση ήπαρ[299].

## **4. Απομάκρυνση διαλύματος συντήρησης - Φάση επαναιμάτωσης**

### **α. Εισαγωγή**

Η απομάκρυνση του διαλύματος συντήρησης από το ηπατικό μόσχευμα λίγο πριν από την επαναιμάτωση του οργάνου είναι επιβεβλημένη. Πράγματι, τα διαλύματα συντήρησης είναι πλούσια σε  $K^+$  και πιθανή έκπλυσή τους στην κυκλοφορία του λήπτη θα επέφερε υπερκαλιαιμία και θανατηφόρο καρδιακή αρρυθμία. Επιπλέον, κινδύνους για την καρδιακή λειτουργία εγκυμονεί και η αδενοσίνη που περιέχεται στο διάλυμα UW[329].

Η απομάκρυνση των διαλυμάτων συντήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων γίνεται με τη χρήση ειδικών διαλυμάτων απομάκρυνσης. Ανακύπτουν τρία ερωτήματα που σχετίζονται με τη σύσταση, τη θερμοκρασία και την οξυγόνωση των διαλυμάτων απομάκρυνσης.

### **β. Σύσταση διαλυμάτων απομάκρυνσης**

#### **i. Διάλυμα RL**

Το πρώτο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως μέσο απομάκρυνσης του διαλύματος συντήρησης από το ηπατικό μόσχευμα ήταν το RL. Το συγκεκριμένο διάλυμα είναι κατάλληλο για την απομά-

Συστατικά	UW	Eurocollins	Perfadex	Marshall
Υδροξυαιθυλική κυτταρίνη (gr/lt)	50			
Ραφφινόζη (mmol/lt)	30			
Λακτοβιονικό (mmol/lt)	100			
Ινσουλίνη (IU/lt)	100			
Αδενοσίνη (mmol/lt)	5			
Γλουταθειόνη (mmol/lt)	3			
Αλλοπουρινόλη (mmol/lt)	1			
Δεξαμεθαζόνη (mg/lt)	8			
Πενικιλίνη (IU/lt))	40			
Mg <sup>2+</sup> (mmol/lt)	5		0.8	40
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mmol/lt)	25	57	0.8	
Na <sup>+</sup> (mmol/lt)	20	10	138	78
K <sup>+</sup> (mmol/lt)	140	115	6	84
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mmol/lt)	5		0.8	40
Γλυκόζη (mmol/lt)		139	8.8	
Cl <sup>-</sup> (mmol/lt)		15	142	
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		10		
Δεξτράνη 40 (gr/lt)			50	
Κιτρικό (mmol/lt)				54
Μανιτόλη (mmol/lt)				100
Ωσμωτικότητα (mOsm/lt)	320	320	320	300
pH	7,4	7,2	7,4	7,4
Βιβλιογραφία	8	278	302	296

**Πίνακας Γ/Ε3.1:** Σύσταση και χαρακτηριστικά διαλυμάτων συντήρησης ηπατικών μοσχεύματων.

κρυνση των καλιούχων διαλυμάτων συντήρησης επειδή η ιοντική σύσταση του είναι παρόμοια με το εξωκυττάριο υγρό[329] (Πίνακας Γ/Ε3.2).

Ωστόσο, η χαμηλή ωσμωτική πίεση και η μεγάλη περιεκτικότητα σε  $\text{Na}^+$  του RL εμπλέκονται στο μηχανισμό δημιουργίας κυτταρικού οιδήματος[310]. Η προσθήκη 4% αλβουμίνης προσέδωσε στο RL αποιδηματικές ιδιότητες και βελτίωσε την επαναλειτουργία των ηπατικών μοσχευμάτων[330].

Τέλος, η προσθήκη 200 mmol/l αδενοσίνης βελτίωσε ακόμα περισσότερο την αποτελεσματικότητα του RL, καθιστώντας το διάλυμα ικανότερο να ανταποκρίνεται στις αυξημένες ενεργειακές απαιτήσεις του ηπατικού μοσχεύματος κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης[331].

Συστατικά	Carolina	RL
Υδροξυαιθυλική κυτταρίνη (gr/l)	50	
Ινσουλίνη (IU/l)	100	
Αδενοσίνη (mmol/l)	1	
Γλουταθειόνη (mmol/l)	3	
Αλλοπουρινόλη (mmol/l)	1	
$\text{Mg}^{2+}$ (mmol/l)	1,2	
$\text{PO}_4^{3-}$ (mmol/l)	1	
$\text{Na}^+$ (mmol/l)	115	130
$\text{K}^+$ (mmol/l)	6	4
$\text{SO}_4^{2-}$ (mmol/l)	1,2	
Γλυκόζη (mmol/l)	10	
Φρουκτόζη (mmol/l)	10	
$\text{Cl}^-$ (mmol/l)	127,6	12
$\text{Ca}^{2+}$ (mmol/l)	1,3	3
Δεσφερριοξαμίνη (mmol/l)	1	
Νικαρδιπίνη (mmol/l)	2	
Γαλακτικό (mmol/l)		28
Ωσμωτικότητα (mOsm/l)	305	270
pH	6,5	7
Βιβλιογραφία	310	330

**Πίνακας Γ/Ε3.2:** Σύσταση και χαρακτηριστικά διαλυμάτων απομάκρυνσης.



## **ii. Διάλυμα ανοσοτροποποιημένων ερυθρών**

Στα άθικτα ερυθροκύτταρα εμπεριέχονται ισχυρότατα αντιοξειδωτικά συστήματα[332]. Επιπλέον, είναι δυνατό να παρασκευασθούν (με ανοσοτροποποίηση) ερυθροκύτταρα τα οποία φέρουν στην επιφάνεια τους αντισώματα έναντι του παράγοντα VIII[333] (ειδικό ενδοθηλιακό αντιγόνο). Τα ανοσοτροποποιημένα ερυθροκύτταρα φαγοκυτταρώνονται από το ενδοθήλιο του ηπατικού μοσχεύματος (ιδιαίτερα στη θερμοκρασία των 37 °C) και του "προσφέρουν" τα αντιοξειδωτικά τους συστήματα. Συγκεκριμένα, η χρήση ανοσοτροποποιημένων ερυθρών ως διάλυμα απομάκρυνσης επιφέρει σημαντική (>60%) μείωση των παραγόμενων ROI και, προστατεύοντας με αυτόν τον τρόπο ειδικά τα ενδοθηλιακά κύτταρα, προάγει την επαναλειτουργία του οργάνου[316].

## **iii. Διάλυμα Carolina**

Το διάλυμα απομάκρυνσης Carolina περιέχει ανόργανα συστατικά που ανιχνεύονται, σε παρόμοιες μάλιστα συγκεντρώσεις, στο αίμα. Επίσης, έχει πολλά κοινά συστατικά με το διάλυμα συντήρησης UW (Πίνακας Γ/Ε3.2). Στη σύσταση του συμπεριλαμβάνονται ωσμογενείς, αντιοξειδωτικές, αγγειοδιασταλτικές και άλλες (π.χ. αντιβιοτικά, στεροειδή, κ.τ.λ.) ουσίες. Δεδομένου ότι το ήπια όξινο pH περιορίζει την ισχαιμική ηπατοκυτταρική βλάβη, το διάλυμα απομάκρυνσης Carolina έχει pH ίσο με 6,5[310].

Σε πειραματικές μελέτες, η χρήση του διαλύματος Carolina στους 30 °C, για 5 min και με συνθήκες κορεσμού σε N<sub>2</sub> (95%) και CO<sub>2</sub> (5%) προάγει την επαναλειτουργία του ηπατικού μοσχεύματος[331].

Η δράση του διαλύματος Carolina αποδίδεται σε βελτίωση της μικροκυκλοφορίας, η οποία οδηγεί σε καλύτερη επαναϊμάτωσή του μοσχεύματος[301]. Πράγματι, η διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου και η ενδοηπατική αγγειοδιαστολή που παρατηρείται με τη χρήση του συγκεκριμένου διαλύματος απομάκρυνσης προάγει την επαναλειτουργία του ηπατικού μοσχεύματος[310]. Επιπλέον, η δράση του διαλύματος Carolina αποδίδεται σε περιορισμό της ενεργοποίησης των κυττάρων Kupffer[310].

## **γ. Θερμοκρασία διαλυμάτων απομάκρυνσης**

Το ηπατικό μόσχευμα που ισχαιμεί πρέπει να διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία 4 έως 0 °C. Απόκλιση από τις συνθήκες αυτές οδηγεί συχνότερα σε πρωτοπαθή δυσλειτουργία ή μη λειτουργία του[300, 301]. Ωστόσο, η ταχεία επαναθέρμανση του οργάνου ελάχιστα λεπτά πριν από την επαναϊμάτωσή του προάγει την επαναλειτουργία του. Η ευεργετική αυτή επαναθέρμανση έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση διαλυμάτων απομάκρυνσης σε διάφορες θερμοκρασίες[331, 334] (>10° C και < 37° C).

Η θετική επίδραση της ταχείας επαναθέρμανσης του ίσχειμου οργάνου στο αποτέλεσμα της ηπατικής μεταμόσχευσης οφείλεται στην επιφερόμενη αγγειοδιαστολή, η οποία βελτιώνει τη μικροκυκλοφορία και τελικά οδηγεί σε καλύτερη επαναϊμάτωση του μοσχεύματος[301, 334].

## δ. Οξυγόνωση διαλυμάτων απομάκρυνσης

Οι ROI αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους εκλυτικούς παράγοντες βλαβών του ηπατικού μοσχεύματος κατά την επαναϊμάτωση του[187, 202, 208, 209]. Για τη παραγωγή των ROI είναι απαραίτητη η προσφορά  $O_2$ [210]. Επομένως, αν δεν περιέχεται διαλυμένο  $O_2$  στο διάλυμα απομάκρυνσης, η παραγωγή ROI, κατά τη διάρκεια της επαναϊμάτωσης που ακολουθεί, θα είναι σημαντικά μειωμένη. Πράγματι, η χρήση διαλυμάτων απομάκρυνσης που δεν περιείχαν  $O_2$  οδήγησε σε μείωση των παραγόμενων ROI, σε βελτίωση της μικροκυκλοφορίας του μοσχεύματος, σε διατήρηση της μορφολογίας του ενδοθηλίου και τελικά σε προαγωγή της επαναλειτουργίας του οργάνου[310, 331].

## 5. Συνοπτική ισχύουσα προσέγγιση συντήρησης ηπατικών μοσχευμάτων

Αν και κάθε μεταμοσχευτικό κέντρο εφαρμόζει τα δικά του πρωτόκολλα, υπάρχουν ορισμένες απαραίσιτες αρχές συντήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων, οι οποίες έχουν γίνει καθολικά αποδεκτές[8, 299, 329].

Η όλη διαδικασία επιλογής αφορά σε εγκεφαλικά νεκρούς, οι οποίοι δεν υπέφεραν από κάποιο σοβαρό συστηματικό νόσημα. Δότες με καρκίνο απορρίπτονται. Αρχικά, λαμβάνεται ενδεδειγμένο ιστορικό του δότη, κυρίως όσον αφορά στην παραμονή του στη μονάδα εντατικής θεραπείας. Δότες με σημαντική καρδιαγγειακή αστάθεια απορρίπτονται. Στη συνέχεια, μελετώνται οι τελευταίες εργαστηριακές εξετάσεις. Δότες με τρανσαμινασαιμία, ουραιμία ή σοβαρές ηλεκτρολυτικές διαταραχές απορρίπτονται.

Η έκπλυση του ηπατικού μοσχεύματος γίνεται *in situ* με τη χρήση ψυχρού (4 έως 0 °C) διαλύματος UW. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής του, το όργανο περιβάλλεται από τριμμένο πάγο. Μετά την απομάκρυνση του από το σώμα του δότη, το μόσχευμα διατηρείται σε ψυχρό (4 έως 0 °C) λουτρό διαλύματος UW κατά την επιτραπέζια έκπλυση, τη μεταφορά, την επιτραπέζια προετοιμασία και τη λήψη βιοψίας. Μοσχεύματα με εκσεσημασμένη λιπώδη διήθηση απορρίπτονται.

Για τη διενέργεια των πρώτων αγγειακών αναστομών (δεν έχει ακόμα αποκατασταθεί η αιματική κυκλοφορία), όταν βρίσκεται μέσα στην περιτοναϊκή κοιλότητα του λήπτη, το ηπατικό μόσχευ-

μα περιβάλλεται από τριμμένο πάγο. Πριν από την επαναιμάτωση, το όργανο εκπλενεται από το διάλυμα UW με τη χρήση ψυχρού (4 έως 0 °C) διαλύματος 4% αλβουμίνης σε RL

Ο συνολικός χρόνος ψυχρής ισχαιμίας δεν πρέπει να ξεπερνά τις 24 h. Ωστόσο, γίνεται προσπάθεια να πραγματοποιείται η επαναιμάτωση του οργάνου σε χρόνο μικρότερο των 12 h, επειδή πέραν αυτού του χρονικού διαστήματος τα ποσοστά δυσλειτουργίας ή και μη λειτουργίας των μοσχευμάτων είναι σημαντικά αυξημένα[297]. Ο χρόνος θερμής ισχαιμίας πρέπει να είναι μηδενικός.

# ΣΤ. ΠΡΟΦΥΛΑΞΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΙΚΟΥ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ - ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

## I. Γενικά

Η υαλουρονάνη εντοπίζεται στον έξω χιτώνα όλων των αγγείων του ήπατος[β0]. Επιπλέον, το ηπατικό λόβιο δε διαθέτει βασική μεμβράνη. Επίσης, το εξωκυττάριο στρώμα του ηπατικού ιστού είναι εξαιρετικά αραιό και αποτελείται κυρίως από φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο. Επιπρόσθετα, το ενδοθήλιο των ηπατικών κολπιδίων είναι θυριδωτού τύπου. Η προαναφερόμενη αρχιτεκτονική διαμόρφωση καθιστά δυνατή την ταχεία μεταφορά μακρομορίων στο διαμεσοκυττάριο χώρο του ήπατος[335]. Ένα από τα μακρομόρια αυτά είναι η υαλουρονιδάση (μοριακό βάρος παρόμοιο με της αλβουμίνης), η οποία μπορεί να εισέρθει στον εξωκυττάριο χώρο του ήπατος και να αποδομήσει την εκεί υπάρχουσα υαλουρονάνη[21].

Η υαλουρονάνη εμφανίζει μη ιδανική ωσμωτική συμπεριφορά. Σε υψηλές συγκεντρώσεις, η ωσμωτική δύναμη που παρατηρείται σε διάλυμα υαλουρονάνης είναι ίση με αυτή που αναπτύσσεται σε διάλυμα αλβουμίνης με την ίδια συγκέντρωση[60]. Εκτός από την ανάπτυξη ωσμωτικών δυνάμεων, η υαλουρονάνη κατακρατά νερό και με διαφορετικό μηχανισμό. Όταν το μόριο του πολυσακχαρίτη έχει τη σφαιρική του διαμόρφωση, έχει την ικανότητα να συγκρατεί με μηχανικό τρόπο μεγάλες ποσότητες νερού-διαλύτη στο εσωτερικό του. Στη μέγιστη δυνατή συγκέντρωση που επιτρέπει τη σφαιρική διαμόρφωση (0,5 mg/ml) η υαλουρονάνη αποκτά τη μέγιστη δυνατή προσροφητικότητα νερού (1000 φορές τη μάζα της). Αυτό σημαίνει πως αν σε ένα lt νερού προσθέσουμε 0,5 gr υαλουρονάνης, τα 500 ml του διαλύτη θα "εγκλωβιστούν" από τον πολυσακχαρίτη[19, 51, 54]. Επιπλέον, όπως έχει προαναφερθεί, στον πρωτεϊνικό πυρήνα των υαλουρονανοσυγκολληπικών τύπου αγκρεκάνης ανιχνεύεται τμήμα πλούσιο σε θειική χονδροϊτίνη, το οποίο φέρει υψηλό αρνητικό φορτίο. Η υαλουρονάνη οργανώνει σε γειτονία μεγάλο αριθμό τέτοιων υαλουρονανοσυγκολληπικών. Η αλληλεπίδραση των αρνητικά φορτισμένων τμημάτων τους με τα μοριακά δίπολα του νερού οδηγεί σε υδατική κατακράτηση[90].

Με βάση τα προαναφερόμενα, όταν η ιστική υαλουρονάνη ενυδατώνεται (λ.χ. κατά τη διάρκεια της παραμονής των μοσχευμάτων στα διαλύματα συντήρησης), επεκτείνεται (Εικόνα Γ/ΣΤΙ.3), με αποτέλεσμα τη δημιουργία εξωκυτταρίου, περιαγγειακού οιδήματος[21, 24].

Από την άλλη πλευρά, τμήματα του ηπατικού μοσχεύματος καθίστανται κατά το στάδιο της ψυχρής ισχαιμίας μη αρδεύσιμα, εξαιτίας των επικείμενων (κατά την επαναιμάτωση) διαταραχών της μικροκυκλοφορίας. Ανάμεσα στις αιτίες που προκαλούν τις διαταραχές αυτές συγκαταλέγεται η ενυ-

δάτωση ουσιών του διαμεσοκυττάριου χώρου που συμπεριφέρονται σα γέλη[12, 13].

## 2. Προηγούμενες έρευνες

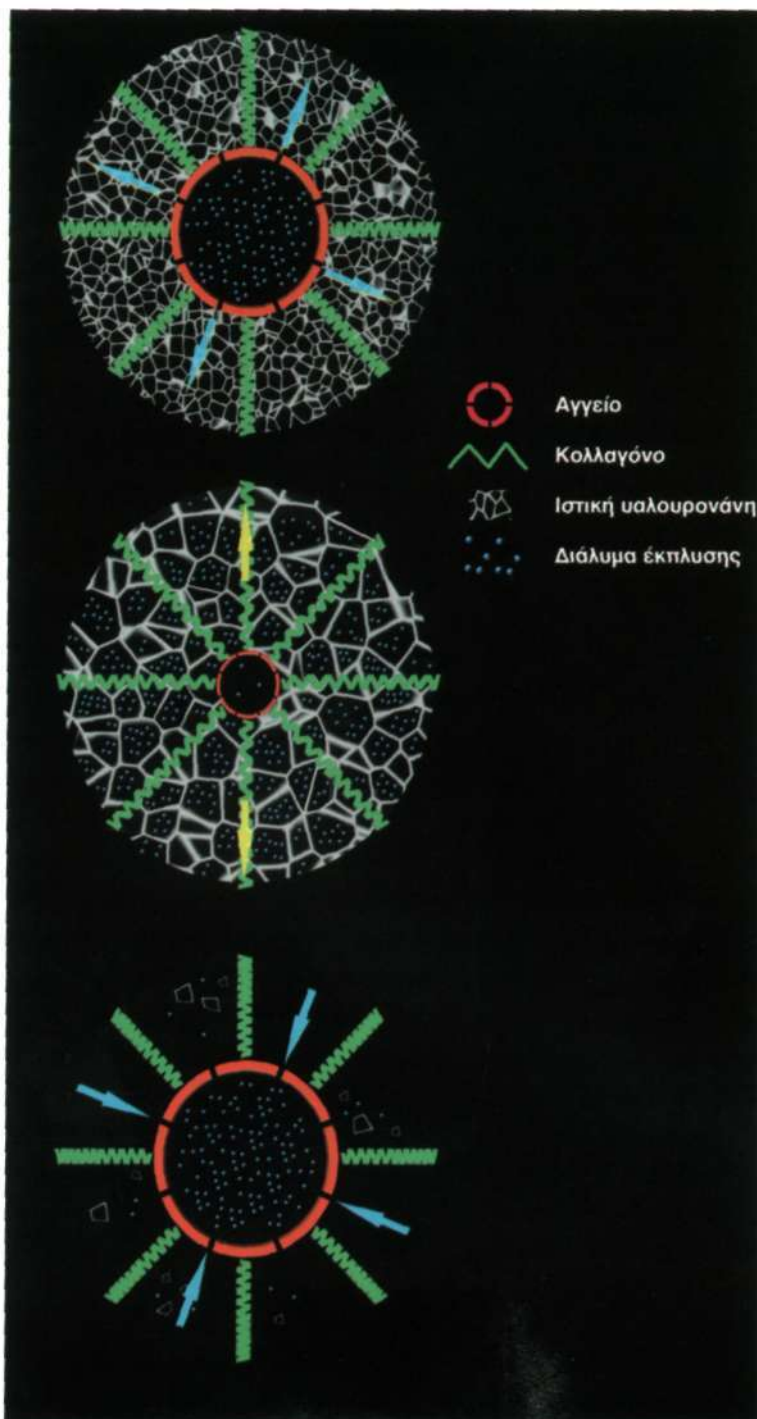
Υπάρχει θετική ή συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας της υαλουρονάνης και της βαρύτητας του οιδήματος που παρατηρείται σε διάφορες παθολογικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, σε όσες από τις πνευμονικές παθήσεις αναπτύσσεται διάμεση ίνωση με συνοδό οίδημα (π.χ. νόσος του Farmer, ARDS, σαρκοείδωση, κ.τ.λ.) ανιχνεύονται αυξημένα ποσά ιστικού πολυσακχαρίτη[68]. Επίσης, η δυσκαμψία και η δυσκινησία που παρατηρείται στο μυοκάρδιο ύστερα από έμφραγμα σχετίζεται με την ανάπτυξη διάμεσου οιδήματος. Στο μετεμφραγματικό καρδιακό ιστό ανιχνεύονται πολύ υψηλά ποσά υαλουρονάνης[99]. Επιπλέον, όσον αφορά στις παθήσεις του μυοσκελετικού (π.χ. αρθρίτιδες, τενοντίτιδες, μυϊκές κακώσεις, κ.τ.λ.), η ανάπτυξη διάμεσου οιδήματος συσχετίζεται θετικά με την ανίχνευση αυξημένου ιστικού πολυσακχαρίτη[100]. Τέλος, τόσο στο γενικευμένο (υποθυρεοειδισμό) όσο και στο τοπικό (υπερθυρεοειδισμό) μυξοίδημα ανιχνεύονται πολύ μεγάλες ποσότητες υαλουρονάνης στους οίδηματώδεις ιστούς[38].

Όσον αφορά στην απόρριψη των μοσχευμάτων, έχει παρατηρηθεί σταδιακή αύξηση της φλοιικής υαλουρονάνης των νεφρών που υφίστανται απόρριψη[86, 101]. Μάλιστα, υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της έντασης της απόρριψης, της ιστικής ποσότητας του πολυσακχαρίτη και του αναπτυσσόμενου διάμεσου οιδήματος. Παρόμοιο, υαλουρονοανοεξαρθώμενο, διάμεσο οίδημα παρουσιάζουν τα καρδιακά μοσχεύματα κατά την απόρριψη τους[102].

Όσον αφορά στον περιορισμό των βλαβών συντήρησης, έχει χρησιμοποιηθεί υαλουρονιδάση σε μελέτες συντήρησης καρδιακών μοσχευμάτων. Συγκεκριμένα, η προσθήκη υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης μείωσε την υαλουρονάνη του καρδιακού ιστού κατά 20%[21] και επέφερε σημαντική βελτίωση της μοσχευματικής λειτουργίας[336].

## 3. Καταβολισμός περικυτταρικής γέλης

Στην παρούσα μελέτη γίνεται η υπόθεση πως οι ουσίες του διαμεσοκυττάριου χώρου που συμπεριφέρονται σα γέλη[12, 13] και οι οποίες ευθύνονται για τις διαταραχές της μικροκυκλοφορίας του μοσχεύματος ταυτίζονται με την υαλουρονάνη. Έτσι, όταν ο ιστικός πολυσακχαρίτης ενυδατώνεται (λ.χ. κατά τη διάρκεια της παραμονής των μοσχευμάτων στα διαλύματα συντήρησης), επεκτείνεται (Εικόνα Γ/ΣΤ 1.1), με αποτέλεσμα τη δημιουργία εξωκυττάριου, περιαγγειακού οιδήματος[21, 24]. Αυτή η επέκταση παράγει έργο το οποίο αποθηκεύεται με τη μορφή δυναμικής ενέργειας στο συνυφασμένο με την υαλουρονάνη, διατεινόμενο δίκτυο κολλαγόνου[337-339]. Ο καταβολισμός του πολυσακχαρίτη με τη χρήση υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης του ηπατικού μοσχεύματος θα μπορούσε να οδηγήσει στην αφυδάτωση του εξωκυττάριου (περιαγγειακού) χώρου και στην επιστροφή του στην προοιδηματική αρχιτεκτονική διαμόρφωση. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ίνες



**Εικόνα Γ/ΣΤΙ.1:** Η ενυδάτωση της ιστικής υαλουρονάνης οδηγεί σε εξωκυττάριο οίδημα και παραμόρφωση του δικτύου κολλαγόνου (ανάπτυξη τάσεων). Τα αγγεία αποφράσσονται μηχανικά. Η αποδόμηση του πολυσακχαρίτη έχει ως αποτέλεσμα την εξωκυττάρια αφυδάτωση και την επαναφορά του δικτύου κολλαγόνου στην αρχική του διαμόρφωση. Η αγγειακή απόφραξη αίρεται.

του κολλαγόνου συσπώνται χρησιμοποιώντας την αποθηκευμένη δυναμική ενέργεια[90]. Φυσικά, η ελάττωση του περιαγγειακού οιδήματος συντήρησης του ηπατικού μοσχεύματος έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη επαναιμάτωση και επομένως τη βελτιωμένη λειτουργία του οργάνου.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



# A. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

## I. Πειραματόζωα

Αρσενικοί αρουραίοι ράτσας WAG/OlaHsd που ζύγιζαν περίπου 400 gr (HARLAN, Blackthorn, Bicester, UK) χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα πειράματα. Τα πειραματόζωα διατηρούνταν σε κλουβιά από plexiglass, επιστρωμένα με ροκανίδι και κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού, θερμοκρασίας και υγρασίας. Είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό και τροφή (Amylum, Θεσσαλονίκη) έως και 12 h πριν από την επέμβαση, κατά τις οποίες τους επιτρέπονταν μόνον η πόση. Τα πειράματα που περιγράφονται σε αυτή τη μελέτη διενεργήθηκαν με βάση προκαθορισμένες οδηγίες για την ορθή μεταχείριση των πειραματοζώων[157]. Το πρωτόκολλο είχε εγκριθεί από την Ethical Committee for laboratory animals of Uppsala και από την Κτηνιατρική Επιτροπή της Θεσσαλονίκης.

## 2. Πειραματικός σχεδιασμός

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 111 πειράματα. Διακρίνονται τρεις κατηγορίες πειραμάτων (Πίνακας E/A2.I). Στην ομάδα Α' ανήκουν τα πειράματα (συνολικά 18) που αφορούσαν στον καθορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης. Στην ομάδα Β' αντιστοιχούν τα πειράματα (συνολικά 70) που σχετίζονταν με την καθιέρωση της τεχνικής ενός απόμμου στην Ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος σε επίμους. Στην ομάδα Γ ανήκουν τα πειράματα (συνολικά 23) που αφορούσαν στη διερεύνηση της επίδρασης της υαλουρονιδάσης στη συντήρηση του ηπατικού μοσχεύματος.

Τα 18 πειράματα της ομάδας Α' αφορούσαν στον καθορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης. Συγκεκριμένα, 18 επίμους διαμοιράσθηκαν σε έξι ομάδες, από τρία πειραματόζωα σε κάθε ομάδα. Στα πειραματόζωα αυτά διενεργήθηκε λήψη ηπατικού μοσχεύματος. Στη συνέχεια, τα όργανα συντηρήθηκαν για 24 h σε ψυχρό (4 °C) διάλυμα UW εμπλουτισμένο με υαλουρονιδάση (υαλουρονιδάση, ορχεϊκή, βοός, τύπου I, # H-2001, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA). Οι συγκεντρώσεις της υαλουρονιδάσης ήταν 0, 36, 72, 144, 288 και 576 NFU/ml για τις ομάδες 1', 2', 3', 4', 5' και 6' αντίστοιχα. Μετά τις 24 h συντήρησης πραγματοποιούνταν ποσοτική και ποιοτική ανίχνευση της ιστικής υαλουρονάνης. Η συγκέντρωση της υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης της ομάδας 4' (144 NFU/ml) ήταν η χαμηλότερη δυνατή με την οποία επιτυγχάνονταν ποσοτική και ποιοτική εξάλειψη της ιστικής υαλουρονάνης. Για το λόγο αυτό, η προαναφερόμενη συγκέντρωση υαλουρονιδάσης θεωρήθηκε ως βέλτιστη. Σε όλες τις μεταμοσχεύσεις που ακολούθησαν, εφόσον απαιτούνταν προσθήκη υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης, το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε στη βέλτιστη συγκέντρωση του.

Πείραμα	Πειραματόζωα	Ανηπατική φάση (min)	Κατάληξη μεταμόσχευσης
A' 1	1		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 2	2		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 3	3		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 4	4		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 5	5		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 6	6		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 7	7		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 8	8		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 9	9		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 10	10		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 11	11		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 12	12		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 13	13		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 14	14		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 15	15		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 16	16		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 17	17		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
A' 18	18		Συντήρηση μοσχεύματος μόνο
<hr/>			
B' 1	19,20		Υποδιαφραγματικός αποκλεισμός
B' 2	21,22		Υποδιαφραγματικός αποκλεισμός
B' 3	23,24		Υποδιαφραγματικός αποκλεισμός
B' 4	25,26		Υποδιαφραγματικός αποκλεισμός
B' 5	27,28		Τεχνικό σφάλμα
B' 6	29,30		Τεχνικό σφάλμα
B' 7	31,32		Αιμορραγία Haller
B' 8	33,34		Υποδιαφραγματικός αποκλεισμός
B' 9	35,36		Πνευμονικό οίδημα
B' 10	37,38		Πνευμονικό οίδημα
B' 11	39,40		Πνευμονικό οίδημα
B' 12	41,42		Υφηπατική αιμορραγία (παρασκευή)
B' 13	43,44		Υφηπατική αιμορραγία (παρασκευή)
B' 14	45,46		Πνευμονικό οίδημα
B' 15	47,48		Ανασθηνία
B' 16	49,50		Υποδιαφραγματική αιμορραγία
B' 17	51,52		Αιμορραγία cuff
B' 18	53,54		Αιμορραγία cuff
B' 19	55,56		Cuff αιμορραγία

B' 20	57,58		Υποδιαφραγματική αιμορραγία
B' 21	59,60		Αιμορραγία cuff
B' 22	61,62		Τεχνικό σφάλμα
B' 23	63,64		Τεχνικό σφάλμα
B' 24	65,66		Τεχνικό σφάλμα
B' 25	67,68		Αιμορραγία cuff
B' 26	69,70		Αιμορραγία cuff
B' 27	71,72		Αιμορραγία cuff
B' 28	73,74		Υποδιαφραγματική εμβολή
B' 29	75,76		Υποδιαφραγματική εμβολή
B' 30	77,78		Υψηλατική αιμορραγία (αναστόμωση)
B' 31	79,80		Υψηλατική αιμορραγία (αναστόμωση)
B' 32	81,82		Αιμορραγία Haller
B' 33	83,84		Αιμορραγία cuff
B' 34	85,86		Αναισθησία
B' 35	87,88	16	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 10 ώρες
B' 36	89,90		Αιμορραγία Haller
B' 37	91,92		Διάχυτη αιμορραγία
B' 38	93,94		Υψηλατική αιμορραγία (αναστόμωση)
B' 39	95,96	21	Επιβίωση
B' 40	97,98		Αιμορραγία cuff
B' 41	99,100	19	Επιβίωση
B' 42	101,102	21	Επιβίωση
B' 43	103,104	16	Επιβίωση
B' 44	105,106	20	Επιβίωση
B' 45	107,108	19	Επιβίωση
B' 46	109,110		Αιμορραγία cuff
B' 47	111,112		Τεχνικό σφάλμα
B' 48	113,114		Τεχνικό σφάλμα
B' 49	115,116		Αιμορραγία cuff
B' 50	117,118		Υποδιαφραγματική αιμορραγία
B' 51	119,120		Αιμορραγία Haller
B' 52	121,122		Αιμορραγία cuff
B' 53	123,124		Πνευμονικό οίδημα
B' 54	125,126		Πνευμονικό οίδημα
B' 55	127,128		Αιμορραγία καθετήρα
B' 56	129,130	23	Επιβίωση
B' 57	131,132		Υποδιαφραγματικός αποκλεισμός
B' 58	133,134		Πνευμονικό οίδημα

B' 59	135,136	22	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 11 ώρες
B' 60	137,138		Αιμορραγία καθετήρα
B' 61	139,140		Αιμορραγία καθετήρα
B' 62	141,142	18	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 12 ώρες
B' 63	143,144		Αιμορραγία καθετήρα
B' 64	145,146		Αιμορραγία καθετήρα
B' 65	147,148	18	Επιβίωση
B' 66	149,150	20	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 13 ώρες
B' 67	151,152		Υποδιαφραγματική αιμορραγία
B' 68	153,154	19	Επιβίωση
B' 69	155,156		Αναισθησία
B' 70	157,158	21	Επιβίωση
Γα' 1	159,160	24	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 12 ώρες
Γα' 2	161,162	23	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 11 ώρες
Γα' 3	163,164	21	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 11 ώρες
Γα' 4	165,166	22	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 12 ώρες
Γα' 5	167,168	22	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 31 ώρες
Γα' 6	169,170	21	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 30 ώρες
Γα' 7	171,172	21	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 6 ώρες
Γα' 8	173,174	22	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 7 ώρες
Γα' 9	175,176	23	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 19 ώρες
Γα' 10	177,178	22	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 18 ώρες
Γβ1' 1	179,180	20	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 1 ώρα
Γβ1' 2	181,182	21	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 1 ώρα
Γβ2' 1	183,184	22	Επιβίωση
Γβ2' 2	185,186	21	Επιβίωση
Γβ1' 3	187,188	23	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 16 ώρες
Γβ1' 4	189,190	24	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 15 ώρες
Γβ1' 5	191,192	24	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 48 ώρες
Γβ1' 6	193,194	23	Πρωτοπαθής μη λειτουργία σε 49 ώρες
Γβ2' 3	195,196	21	Επιβίωση
Γβ2' 4	197,198	22	Επιβίωση

**Πίνακας Ε/Α2.1:** Πειραματικές ομάδες, στοιχεία πειραματοζώων, στοιχεία και κατάληξη μεταμοσχεύσεων

Τα 70 πειράματα της ομάδας Β<sup>1</sup> πραγματοποιήθηκαν για την καθιέρωση της τεχνικής ενός ατόμου. Τεχνικά επιτυχής χαρακτηρίστηκε κάθε τοποθέτηση μοσχεύματος στην οποία η ανηπατική φάση διήρκεσε λιγότερο από 26 min, το ήπαρ επαναιματώθηκε πλήρως, ελέγχθηκαν οι τυχούσες αιμορραγικές εστίες, η επέμβαση ολοκληρώθηκε απρόσκοπτα και το πειραματόζωο εισήλθε σε ομαλή μετεγχειρητική περίοδο. Όσοι λήπτες κατέληξαν από πρωτοπαθή μη λειτουργία του μοσχεύματος (έλευση θανάτου έως και την 48η μετεγχειρητική h) χαρακτηρίστηκαν τεχνικές επιτυχίες και νεκροτομήθηκαν, για να επαναβεβαιωθεί η απουσία τεχνικών σφαλμάτων. Όσοι λήπτες δεν κατέληξαν από πρωτοπαθή μη λειτουργία του μοσχεύματος και των οποίων η κλινική εκτίμηση ήταν φυσιολογική σύμφωνα με τα κριτήρια των Morton και Griffiths[340] απέκτησαν φυσιολογικό προσδόκιμο επιβίωσης και θανατώθηκαν με εξαγγείωση τη 14η μετεγχειρητική ημέρα με σκοπό την ιστολογική μελέτη των μοσχευμάτων.

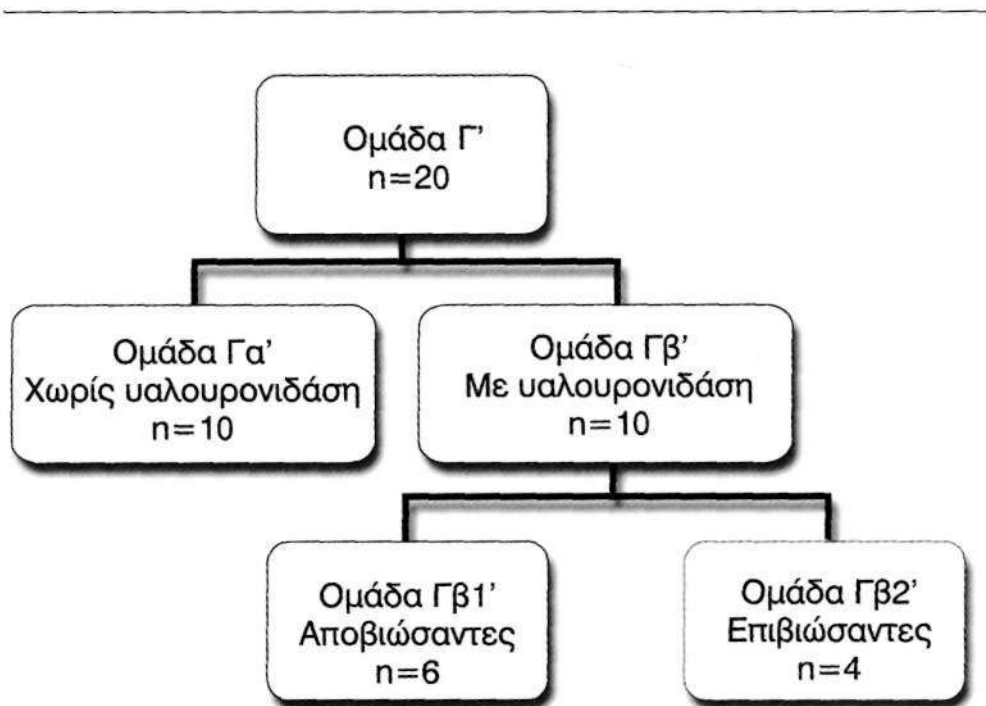
Τα 23 πειράματα της ομάδας Γ πραγματοποιήθηκαν μετά την καθιέρωση της τεχνικής ενός ατόμου. Τεχνικά επιτυχής χαρακτηρίστηκε κάθε τοποθέτηση μοσχεύματος στην οποία η ανηπατική φάση διήρκεσε λιγότερο από 26 min, το ήπαρ επαναιματώθηκε πλήρως, ελέγχθηκαν οι τυχούσες αιμορραγικές εστίες, η επέμβαση ολοκληρώθηκε απρόσκοπτα και το πειραματόζωο εισήλθε σε ομαλή μετεγχειρητική περίοδο. Όσοι λήπτες κατέληξαν από πρωτοπαθή μη λειτουργία του μοσχεύματος (έλευση θανάτου έως και την 48η μετεγχειρητική h) χαρακτηρίστηκαν τεχνικές επιτυχίες και νεκροτομήθηκαν, για να επαναβεβαιωθεί η απουσία τεχνικών σφαλμάτων. Όσοι λήπτες δεν κατέληξαν από πρωτοπαθή μη λειτουργία του μοσχεύματος και των οποίων η κλινική εκτίμηση ήταν φυσιολογική σύμφωνα με τα κριτήρια των Morton και Griffiths[340] απέκτησαν φυσιολογικό προσδόκιμο επιβίωσης και θανατώθηκαν με εξαγγείωση τη 14η μετεγχειρητική ημέρα.

Οι 3 από τις 23 μεταμοσχεύσεις της ομάδας Γ χαρακτηρίστηκαν ως τεχνικά ανεπιτυχείς. Οι υπόλοιπες 20 (Εικόνα Ε/Α2.1) διαμοιράσθηκαν στην ομάδα Γα' (χωρίς προσθήκη υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης,  $\eta = 10$ ) και στην ομάδα Γβ' (με προσθήκη βέλτιστης συγκέντρωσης υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης,  $\eta = 10$ ). Από τους δότες και των δύο ομάδων λαμβάνονταν αίμα (0,5 ml) που με τη φυγοκέντρησή του (2000  $g_{av}$ , 10 min, 4 °C) οδηγούσε στην παρασκευή ορού (0,25 ml). Τα ηπατικά μοσχεύματα της ομάδας Γα' συντηρούνταν για 24 h σε απλό, ψυχρό (4 °C) UW. Αντίθετα, τα ηπατικά μοσχεύματα της ομάδας Γβ' συντηρούνταν για 24 h σε ψυχρό (4 °C) UW, εμπλουπισμένο με υαλουρονιδάση στη βέλτιστη συγκέντρωση (144 NFU/ml). Όσα από τα πειραματόζωα της ομάδας Γβ' κατέληξαν εξαιτίας πρωτοπαθούς μη λειτουργίας του μοσχεύματος σχημάτισαν την ομάδα Γβ1'. Όσα από τα πειραματόζωα της ομάδας Γβ' απέκτησαν φυσιολογικό προσδόκιμο επιβίωσης σχημάτισαν την ομάδα Γβ2'.

Σε όλα τα πειράματα της ομάδας Γ, 24 h μετά τη συντήρηση και πριν την επαναιμάτωση του μοσχεύματος, λαμβάνονταν τμήμα του ήπατος για μονιμοποίηση (σειρά Ι ιστολογικών παρασκευασμάτων) και λυοφιλοποίηση. Επιπλέον, 10 min μετά την επαναιμάτωση του μοσχεύματος λαμβάνονταν αίμα (0,5 ml) που με τη φυγοκέντρησή του (2000  $g_{av}$ , 10 min, 4 °C) οδηγούσε στην πα-

ρασκευή ορού (0,25 ml). Αμέσως μετά την προαναφερόμενη φλεβοτομή, λαμβάνονταν τμήμα του ήπατος για μονιμοποίηση (σειρά II ιστολογικών παρασκευασμάτων). Τα μεταμοσχευμένα πειραματόζωα της ομάδας Γβ2' θανατώνονταν με εξαγγείωση τη 14η μετεγχειρητική ημέρα. Επιπλέον, λαμβάνονταν τμήμα του ήπατος για μονιμοποίηση (σειρά III ιστολογικών παρασκευασμάτων). Όλοι οι μονιμοποιημένοι ιστοί χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και μελέτη παραφρινοποιημένων τομών.

Το σύνολο του πειραματικού σχεδιασμού της παρούσας μελέτης απεικονίζεται περιληπτικά στον πίνακα Ε/Α2.2.



Εικόνα Ε/Α2.1:

Τεχνικά επιτυχή πειράματα ομάδας Γ.

### A. Ομάδα Α' (18 ηπατικές συντηρήσεις).

1. Ηπατεκτομή.
2. 24 h χρόνος ψυχρής ισχαιμίας με διαλύματα υαλουρονιδάσης που παραλλάσουν ως προς τη συγκέντρωσή της.
3. Ιστοτεμάχιο μοσχεύματος.
4. Λυοφιλοποίηση μοσχεύματος.

### B. Ομάδα Β' (70 μεταμοσχεύσεις).

1. Ηπατεκτομή.
2. Μηδενικός χρόνος ψυχρής ισχαιμίας.
3. Μεταμόσχευση.
4. Επιβίωση μοσχεύματος-λήπτη.
5. Θυσία επιβιώσαντος πειραματοζώου τη 14η μετεγχειρητική ημέρα.
6. Ιστοτεμάχιο λειτουργούντος μοσχεύματος.

### Γ. Ομάδα Γ' (20 μεταμοσχεύσεις).

1. Αιματολογικές εξετάσεις δότη.
2. Ηπατεκτομή.
3. 24 h ψυχρής ισχαιμίας σε διάλυμα συντήρησης χωρίς (ομάδα Γα',  $n=10$ ) και με (ομάδα Γβ',  $n=10$ ) υαλουρονιδάση.
4. Ιστοτεμάχιο μετά τις 24 h ψυχρής ισχαιμίας για χρώσεις (σειρά I).
5. Ιστοτεμάχιο μετά τις 24 h ψυχρής ισχαιμίας για λυοφιλοποίηση.
6. Μεταμόσχευση.
7. Ιστοτεμάχιο διεγχειρητικά, 10 min μετά την επαναιμάτωση, για χρώσεις (σειρά II).
8. Αιματολογικές εξετάσεις λήπτη διεγχειρητικά, 10 min μετά την επαναιμάτωση.
9. Επιβίωση μοσχεύματος-λήπτη.
10. Θυσία επιβιώσαντος πειραματοζώου τη 14η μετεγχειρητική ημέρα.
11. Ιστοτεμάχιο λειτουργούντος μοσχεύματος (σειρά III).

**Πίνακας Ε/Α2.2:** Πειραματικός σχεδιασμός

## B. ΜΕΘΟΔΟΙ

### I. Μεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους - Τεχνική ενός απόμου

#### α. Λήψη του μοσχεύματος

Ο δότης τοποθετούνταν μέσα σε κώδωνα αναισθησίας που περιείχε διαιθυλαιθέρα. Η διατήρηση της αναισθησίας επιτυγχάνονταν με μάσκα. Το πειραματόζωο ακινητοποιούνταν ατραυματικά στην εγχειρητική τράπεζα. Ακολουθούσε ενδομυϊκή έγχυση ατροπίνης, 1 μg/gr βάρους σώματος. Θώρακας και κοιλία διαβρέχονταν με αντισηπτικό διάλυμα και ξυρίζονταν. Κατόπιν διανοίγονταν η περιτοναϊκή κοιλότητα με εγκάρσια υποπλευρία τομή. Τα δύο κεντρικά κολοβώματα των αιμορραγούντων άνω επιγαστρικών αρτηριών μαζί με τους περιβάλλοντες ορθούς κοιλιακούς μύες συλλαμβάνονταν με λαβίδες τύπου mosquito. Οι λαβίδες τύπου mosquito ακινητοποιούνταν σε βάσεις πλαστελίνης, έτσι ώστε να δημιουργείται ευρύ εγχειρητικό πεδίο (Εικόνα Ε/Β2.1). Η αιμορ-

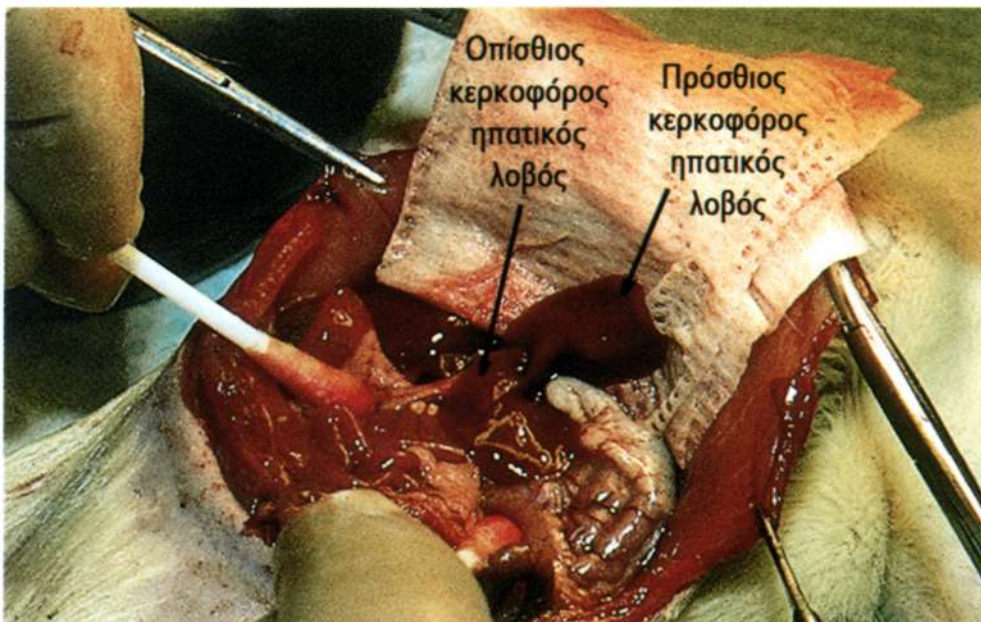


Εικόνα Ε/Β2.1: Ευρεία υποπλευρία εγχειρητική τομή.

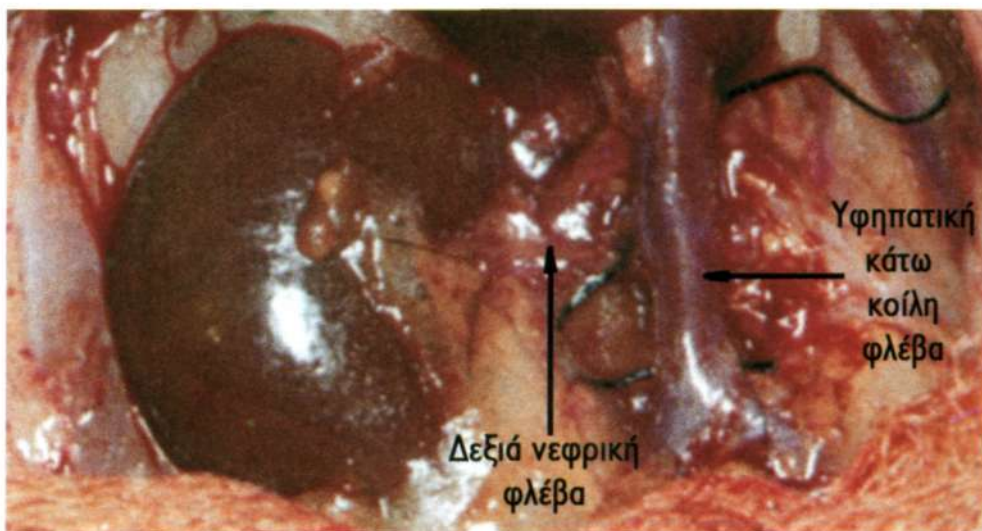
ραγία από άλλα μικρότερα αγγεία ελέγχονταν με παροδική σύνθλιψη τους. Κατά τη διάρκεια της επέμβασης η περιτοναϊκή κοιλότητα διαβρέχονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με θερμό (37 °C)



διάλυμα RL. Ακολουθούσε η διατομή του δρεπανοειδή, του αριστερού τρίγωνου και των διαλοβιακών συνδέσμων. Παρασκευάζονταν ο πρόσθιος και ο οπίσθιος κερκοφόρος ηπατικός λοβός (Εικόνα Ε/Β2.2).

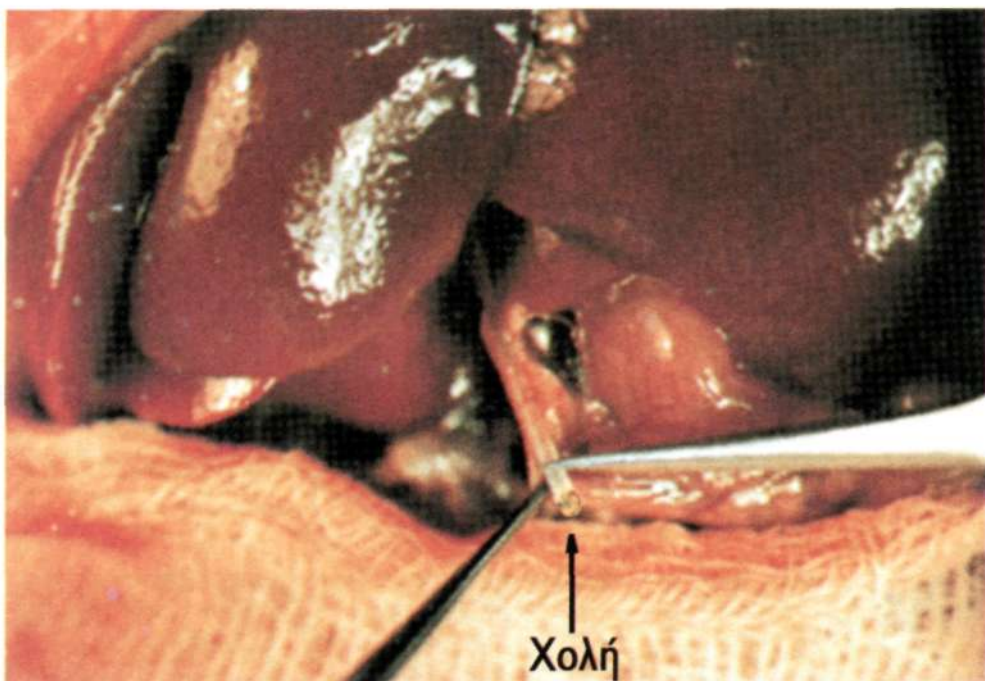


Εικόνα Ε/Β2.2: Παρασκευή πρόσθιου και οπίσθιου κερκοφόρου ηπατικού λοβού.



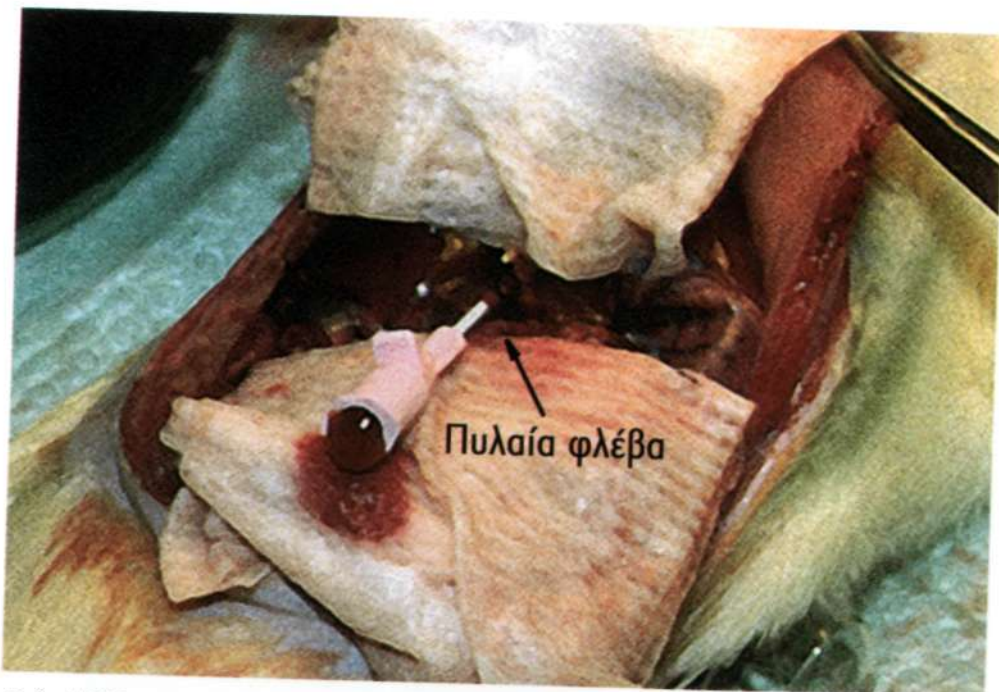
Εικόνα Ε/Β2.3: Παρασκευή υφηπατικής κάτω κοίλης φλέβας.

λης) με ράμμα πολυπροπυλενίου, 7-0. Κατόπιν τοποθετούνταν οδηγό ράμμα (μετάξι, 3-0) στην υφηπατική κάτω κοίλη, κάτω από το ύψος των νεφρικών φλεβών. Στη συνέχεια παρασκευάζονταν και απολινώνονταν κεντρικά η αριστερή διαφραγματική φλέβα. Ακολουθούσε η παρασκευή, η κεντρική απολίνωση, η περιφερική απολίνωση και η διατομή της στεφανιαίας φλέβας, ώστε να αποκαλυφθεί πλήρως η πυλαία τριάδα. Η ιδίως ηπατική αρτηρία παρασκευάζονταν και απολινώνονταν. Κατόπιν καθετηριάζονταν ο χοληδόχος πόρος με αγγειακό καθετήρα εύρους 24 G, ο οποίος ακινητοποιούνταν με περιβρογχισμό από ράμμα μεταξιού, 6-0. Η οδηγός βελόνη απομακρύνονταν και το μήκος του καθετήρα ρυθμιζονταν, έτσι ώστε να μην εισέρχεται στο δεξιό ή αριστερό ηπατικό πόρο. Ο επιτυχής καθετηριασμός οδηγούσε σε άμεση εκκροή χολής (Εικόνα Ε/Β2.4). Στη συνέχεια παρασκευάζονταν η πυλαία και η σπληνική. Οι δύο τελευταίες απολινώνονταν κεντρικά.

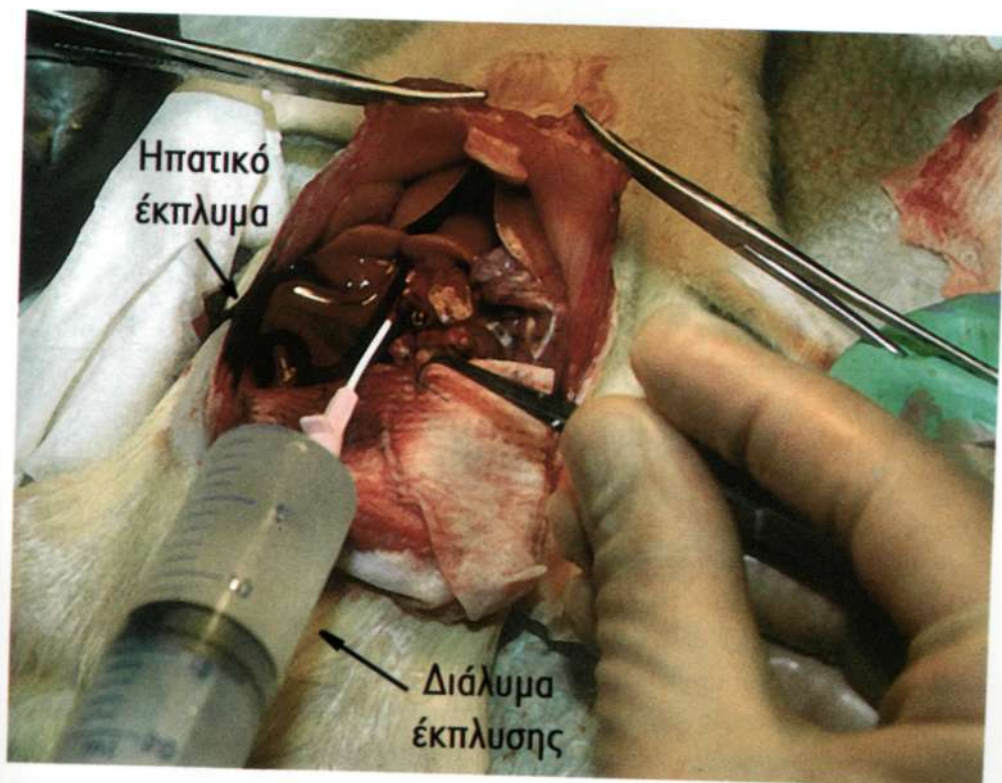


Εικόνα Ε/Β2.4: Καθετηριασμός χοληδόχου πόρου.

Ακολουθούσε ενδοφλέβια bolus έγχυση ηπαρίνης, 0.5 IU/gr βάρους σώματος, από την πείκη φλέβα. Μετά την αναμονή 3 min η πυλαία φλέβα καθετηριάζονταν (στο ύψος της άνω μεσεντερίου) με αγγειακό καθετήρα εύρους 20 G, ο οποίος ακινητοποιούνταν (σε δύο σημεία) με περιβρογχισμό από ράμμα μεταξιού, 6-0. Η οδηγός βελόνη απομακρύνονταν (Εικόνα Ε/Β2.5). Η υφηπατική κάτω κοίλη φλέβα διατέμνονταν κάτω από το οδηγό ράμμα. Ταυτόχρονα άρχισε η έγχυση (με σύριγγα, από τον πυλαίο καθετήρα) 10 ml ψυχρού (4 °C) διαλύματος UW, με ρυθμό 1 ml/min (Εικόνα Ε/Β2.6). Μια υγρή και ψυχρή γάζα τοποθετούνταν πάνω στο μόσχευμα μετά το τέλος της έκπλυσης, για το υπόλοιπο της επέμβασης. Η κεφαλή του πυλαίου καθετήρα απομακρύνονταν και το μήκος του ρυθμιζονταν στα 3 cm. Κατόπιν διανοίγονταν η θωρακική κοιλότητα, διατέμνονταν

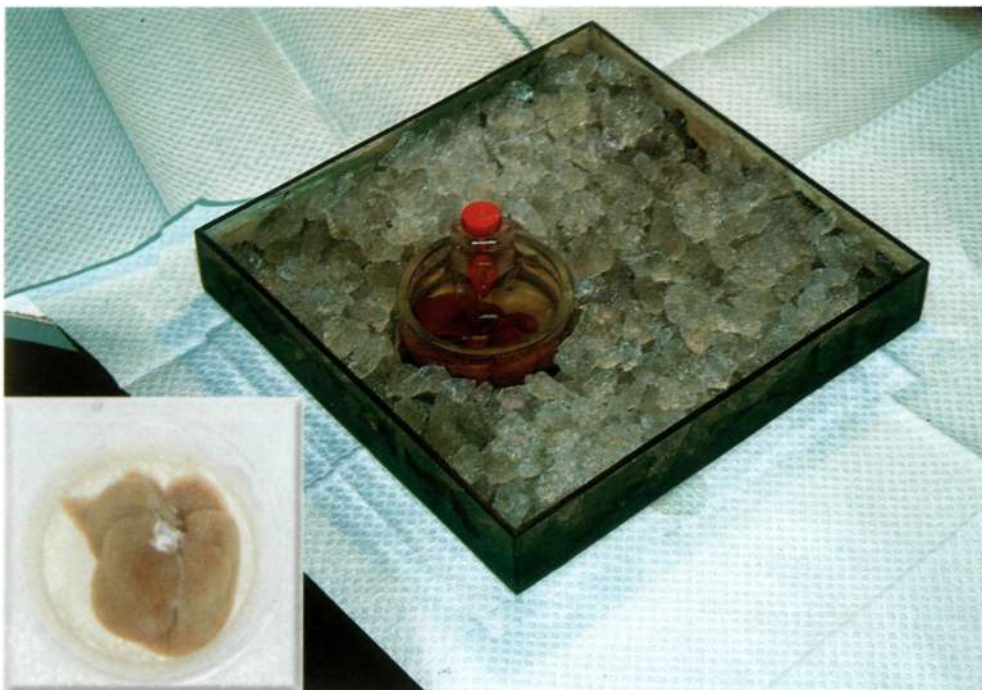


Εικόνα Ε/Β2.5: Καθετηριασμός πυλαίας φλέβας.



Εικόνα Ε/Β2.6: Έναρξη ηπατικής έκπλυσης.

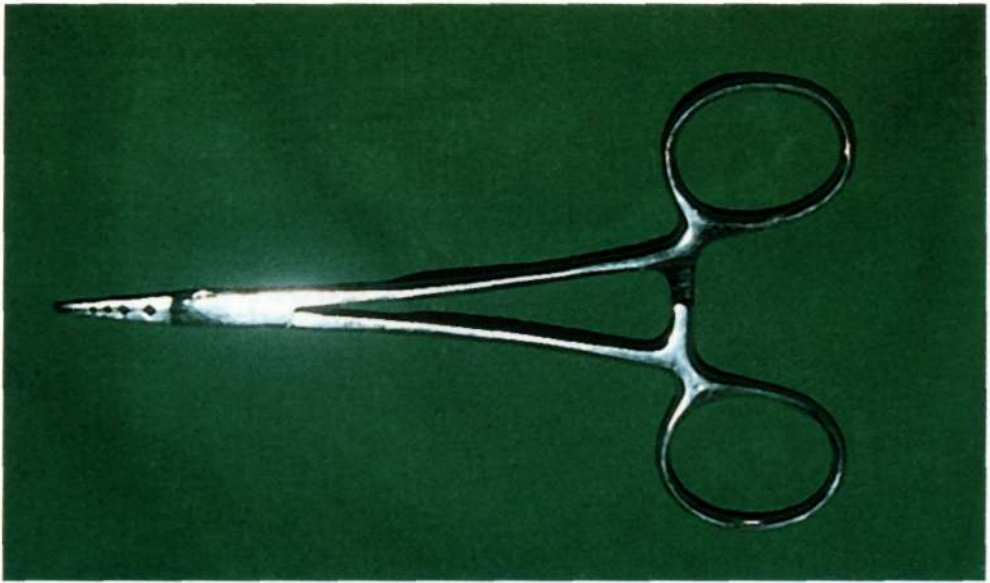
η υπερηπατική κάτω κοίλη φλέβα στο ύψος των καρδιακών κόλπων, έτσι ώστε το αγγείο να παρασκευασθεί (και ύστερα να ληφθεί) με τμήμα του διαφράγματος. Στη συνέχεια διατέμνονταν οι οπίσθιοι ηπατικοί σύνδεσμοι. Ακολουθούσε η διαίρεση της δεξιάς επινεφριδικής, της δεξιάς νεφρικής, της αριστερής διαφραγματικής και της στεφανιαίας φλέβας, προσέχοντας ώστε η κεντρική απολίνωση που είχε προηγουμένως τοποθετηθεί να παραμείνει στο μόσχευμα. Τέλος διατέμνονταν οι όποιες τελευταίες διασυνδέσεις του ήπατος με το σώμα του δότη και το μόσχευμα τοποθετούνταν σε λεκάνη με ψυχρό (0-1 °C) διάλυμα UW προς περαιτέρω επεξεργασία (Εικόνα Ε/Β2.7). Η λήψη του μοσχεύματος διαρκούσε περίπου 75 min.



Εικόνα Ε/Β2.7: Ηπατικό μόσχευμα.

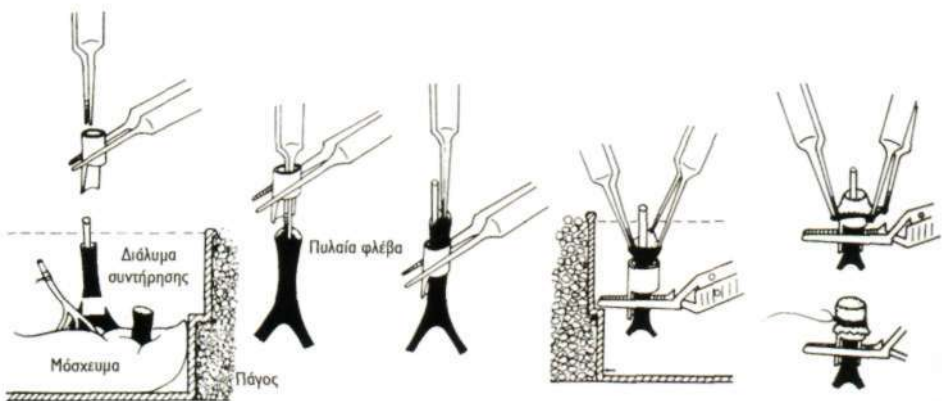
## β. Τοποθέτηση των cuff

Ο πυλαίος καθετήρας των 20 G προωθούνταν ώστε τα χείλη του αγγειακού στομίου να συμπέσουν. Κατόπιν η πυλαία φλέβα του μοσχεύματος διέρχονταν μέσα από τμήμα αγγειακού καθετήρα 16 G, μήκους 4 mm (πυλαίο cuff). Στην συνέχεια ο καθετήρας των 16 G επαναπροωθούνταν στην αρχική του θέση ώστε να προβάλλει ξανά από το στόμιο της πυλαίας. Το σύμπλεγμα του καθετήρα ενσφώνωσης των 20 G με την πυλαία φλέβα και το cuff της ακινητοποιούνταν με τη βοήθεια ειδικής λαβίδας τύπου mosquito (Εικόνα Ε/Β2.8) σε τέτοια θέση ώστε ο καθετήρας ενσφώνωσης να προβάλλει από την πυλαία, της οποίας το στόμιο βρίσκονταν το λιγότερο 4 mm πάνω από το άνω στόμιο του cuff της (Εικόνα Ε/Β2.9). Ακολουθούσε η εκτροπή της πυλαίας πάνω στο cuff της και



Εικόνα Ε/Β2.8: Λαβίδα τύπου mosquito, ειδική για τοποθέτηση cuff.

η ακινητοποίηση του με τη χρήση δύο βρόγχων από ράμμα πολυπροπυλενίου, 7-0. Το cuff της κάτω κοίλης φλέβας τοποθετούνταν με παρόμοιο τρόπο, χρησιμοποιώντας ως cuff τμήμα από αγγειακό καθετήρα 14 G, μήκους 6 mm. Ως καθετήρας ενσφίγνωσης χρησιμοποιούνταν αγγειακός καθετήρας 18 G. Η βατότητα του κοιλιακού cuff ελέγχονταν με την κατά μήκος διέλευση καθετήρα πολυαιθυλενίου, μεγέθους 10 cm, από την κάτω κοίλη φλέβα του μοσχεύματος (Εικόνα Ε/Β2.10).



Εικόνα Ε/Β2.9: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής τοποθέτησης του πυλαίου cuff.

Κατόπιν η υπερηπατική κάτω κοίλη φλέβα διατέμονταν αμέσως κάτω από το τμήμα του διαφράγματος που είχε παρασκευασθεί κατά τη λήψη του μοσχεύματος. Στη συνέχεια, στο νεοδημιουργη-

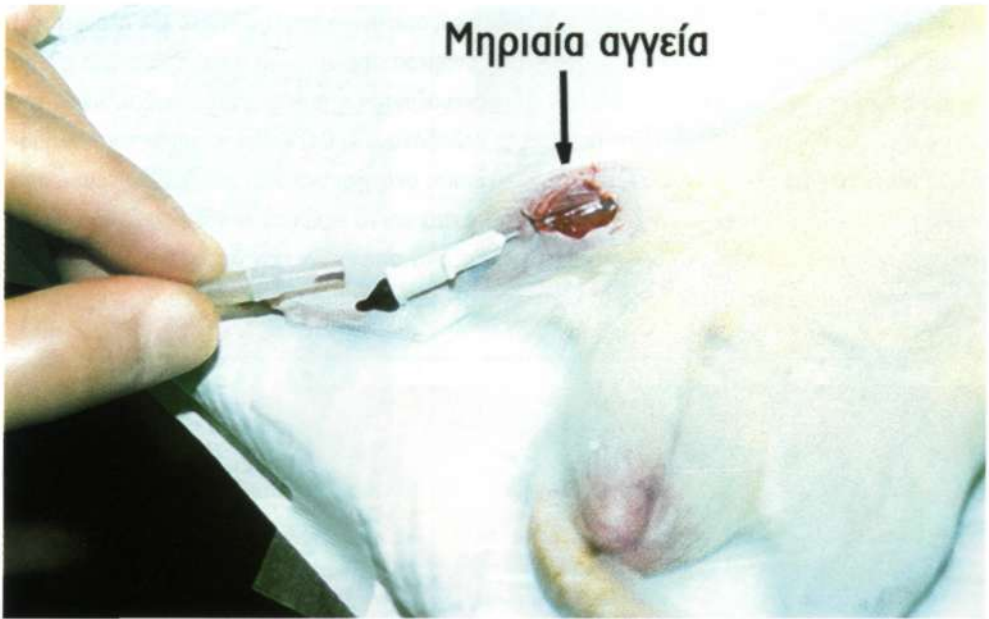
θένια αυλό της υπερηπατικής κάτω κοίλης τοποθετούνταν έκκεντρα, από έξω προς τα μέσα, δύο οδηγά ράμματα πολυπροπυλενίου, 7-0. Η τοποθέτηση των cuff διαρκούσε περίπου 30 min. Το όργανο παρέμενε στη λεκάνη με το ψυχρό (0-1 °C) διάλυμα UW (χωρίς ή με υαλουρονιδάση) για τις επόμενες 24 h. Τέλος, πριν από την τοποθέτηση του μοσχεύματος, απομακρύνονταν το διάλυμα UW, εγχέοντας (με σύριγγα και αγγειακό καθετήρα 20 G) 10 ml ψυχρού (4 °C) διαλύματος NaCl 0,9%.



Εικόνα Ε/Β2.10: Έλεγχος βατότητας του cuff της υπηπατικής κάτω κοίλης φλέβας με τη χρήση καθετήρα πολυαιθυλενίου.

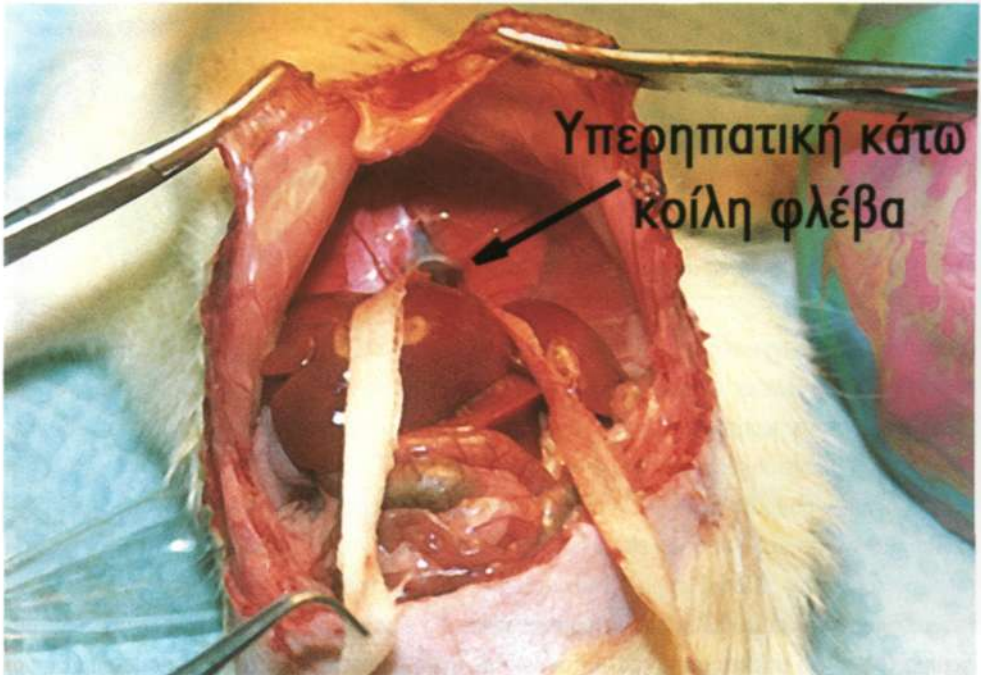
### γ. Τοποθέτηση του μοσχεύματος

Ο λήπτης τοποθετούνταν μέσα σε κώδωνα αναισθησίας που περιείχε διαιθυλαιθέρα. Η διατήρηση της αναισθησίας επιτυγχάνονταν με μάσκα της οποίας η ατμόσφαιρα εμπλουτιζόταν με  $O_2$ . Το πειραματόζωο ακινητοποιούνταν ατραυματικά στην χειρουργική τράπεζα. Ακολουθούσε ενδομυϊκή έγχυση ατροπίνης και βουπρενορφίνης, από 1 μg/gr βάρους σώματος. Ενδοφλέβια γραμμή για τη στάγδην χορήγηση περίπου 3 ml διαλύματος D5 εξασφαλιζόταν με την τοποθέτηση αγγειακού καθετήρα 26 G στη δεξιά (αποκεκαλυμμένη) μηριαία φλέβα (Εικόνα Ε/Β2.11). Η περιτοναϊκή κοιλότητα διανοίγονταν και το ήπαρ κινητοποιούνταν όπως στο δότη. Στη συνέχεια παρασκευάζονταν, απολινώνονταν (κεντρικά και περιφερικά) με ράμμα πολυπροπυλενίου, 7-0 και διατέμονταν ανάμεσα στις απολινώσεις η αριστερή διαφραγματική φλέβα και η οισοφαγική αρτηρία. Οδηγός φακαρόλα (υγρή) τοποθετούνταν στην υπερηπατική κάτω κοίλη φλέβα (Εικόνα Ε/Β2.12). Στη συνέχεια παρασκευάζονταν, απολινώνονταν (κεντρικά και περιφερικά) με ράμμα πολυπροπυλενίου,



**Εικόνα Ε/Β2.11:** Καθετηριασμός δεξιάς μηριαίας φλέβας.

7-0 και διατέμνονταν ανάμεσα στις απολινώσεις η δεξιά επιπεφριδική φλέβα. Ακολουθούσε η παρασκευή της υπερηπατικής κάτω κοίλης φλέβας έως το ύψος της δεξιάς νεφρικής και τοποθετούσαν



**Εικόνα Ε/Β2.12:** Τοποθέτηση οδηγού φακαρόλας στην υπερηπατική κάτω κοίλη φλέβα.

οδηγό ράμμα (μετάξι, 3-0). Κατόπιν παρασκευάζονταν, απολινώνονταν (κεντρικά και περιφερικά) με ράμμα πολυπροπυλενίου, 7-0 και διατέμονταν *ανάμεσα* στις απολινώσεις η στεφανιαία φλέβα και η ιδίως ηπατική αρτηρία. Στη συνέχεια παρασκευάζονταν η πυλαία φλέβα έως το ύψος της σπληνικής. Ακολουθούσε ο περιφερικός (από τη χοληδόχο λύκηθο) καθετηριασμός του χοληδόχου πόρου με αγγειακό καθετήρα εύρους 22 G, ο οποίος ακινητοποιούνταν με περιβρογχισμό από ράμμα μεταξιού, 6-0. Η οδηγός βελόνη απομακρύνονταν και το μήκος του καθετήρα ρυθμιζόνταν, έτσι ώστε να μην εισέρχεται στο δωδεκαδάκτυλο. Κατόπιν απολινώνονταν με το οδηγό της ράμμα η υπερηπατική κάτω κοίλη φλέβα, όσο το δυνατόν ψηλότερα (Εικόνα Ε/Β2.13). Στη συνέχεια απο-



**Εικόνα Ε/Β2.13:** Υψηλή απολίνωση της υπερηπατικής κάτω κοίλης φλέβας.

κλείονταν με μικροαγγειακή λαβίδα τύπου bulldog η πυλαία φλέβα, στο ύψος της σπληνικής. Όταν απομακρύνονταν τελείως το αίμα από το ήπαρ του λήπτη (περίπου σε 1 min), τοποθετούνταν λαβίδα Lewton στην υπερηπατική κάτω κοίλη φλέβα, κατά τέτοιο τρόπο ώστε ανάμεσα στα σκέλη της να συμπεριλαμβάνεται και μικρό τμήμα του διαφράγματος (Εικόνα Ε/Β2.14). Ακολουθούσε τοποθέτηση οδηγών ραμμάτων (μετάξι, 6-0) στο δεξιό και αριστερό πυλαίο φλεβικό κλάδο. Τα στοιχεία που συγκρατούσαν το ήπαρ στη θέση του διατέμονταν και το όργανο απομακρύνονταν από το σώμα του λήπτη. Οδηγό ράμμα (πολυπροπυλένιο, 7-0) τοποθετούνταν στο πρόσθιο τοίχωμα της υπερηπατικής κάτω κοίλης του πειραματόζωου. Το συντηρημένο σε ψυχρό διάλυμα UW μόσχευμα (βλ. λήψη μοσχεύματος) καλύπτονταν με υγρή και ψυχρή γάζα και τοποθετούνταν ορθοτοπικά στο σώμα του λήπτη (Εικόνα Ε/Β2.15). Αρχικά διενεργούνταν η αναστόμωση της υπε-



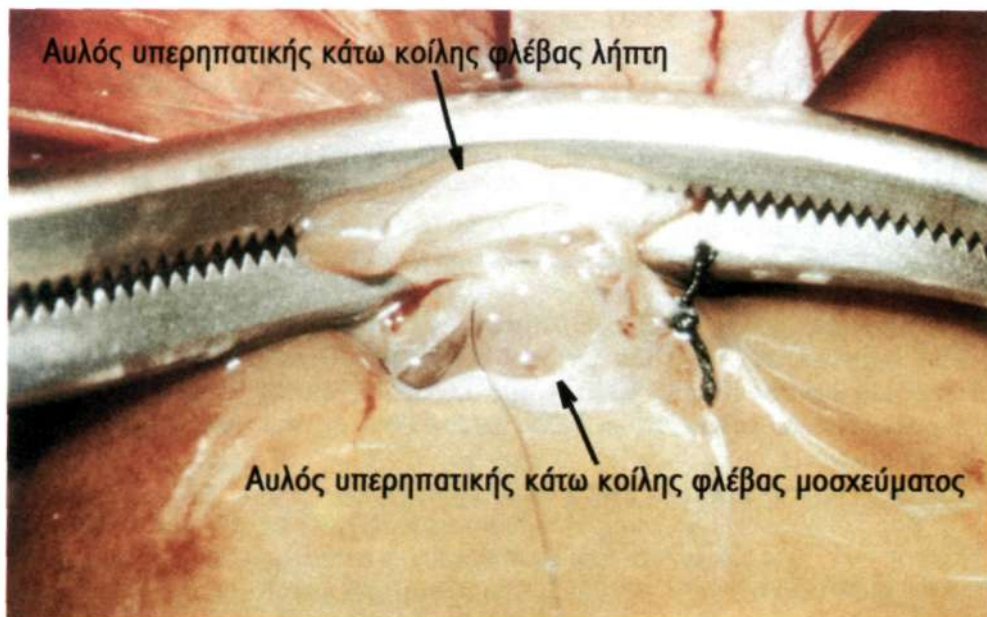


**Εικόνα E/B2.14:** Ορθός τρόπος αποκλεισμού της υπερηπατικής κάτω κοίλης φλέβας με τη χρήση λαβίδας τύπου Lewton.



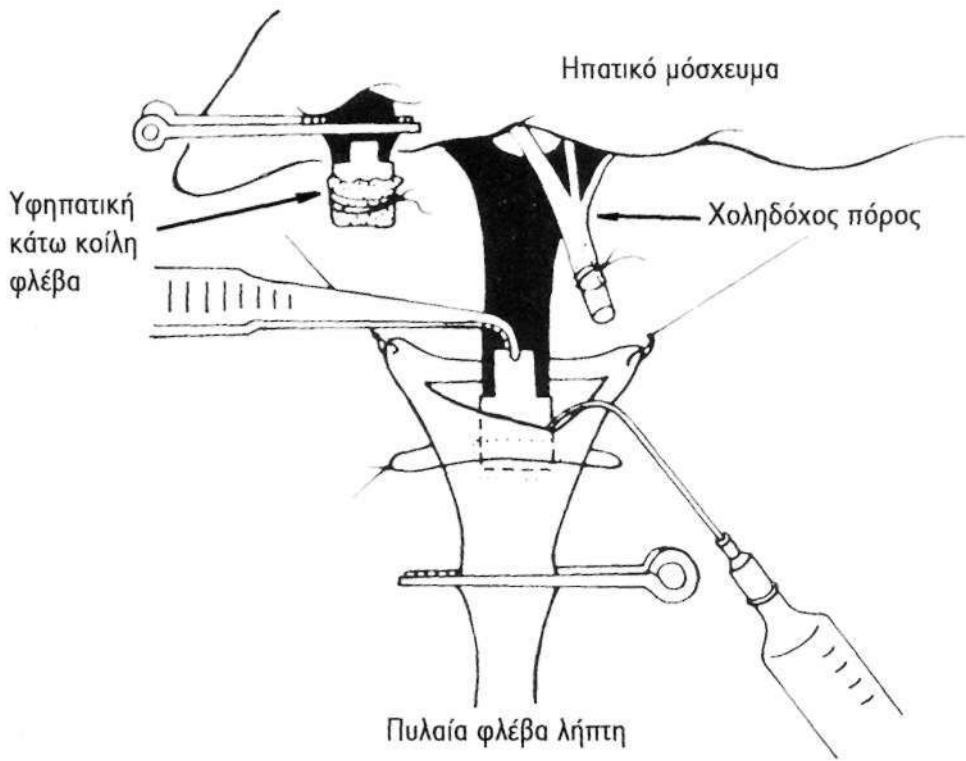
**Εικόνα E/B2.15:** Τοποθέτηση ηπατικού μοσχεύματος στην κοιλιακή κοιλότητα του λήπτη. Στο συγκεκριμένο πείραμα, αντί για τη λαβίδα τύπου Lewton, χρησιμοποιείται ειδικό bulldog.

ρηπατικής κάτω κοίλης φλέβας χρησιμοποιώντας τα δύο έκκεντρα οδηγά ράμματα που είχαν τοποθετηθεί στο μόσχευμα (συνεχής ραφή). Πρώτα αναστομώνονταν το οπίσθιο (από μέσα προς τα έξω) και ύστερα το πρόσθιο (από έξω προς τα μέσα) τοίχωμα του αγγείου (Εικόνα E/B2.16). Ακολουθούσε η αφαίρεση του καθετήρα πολυαιθυλενίου από την κάτω κοίλη φλέβα του μοσχεύ-



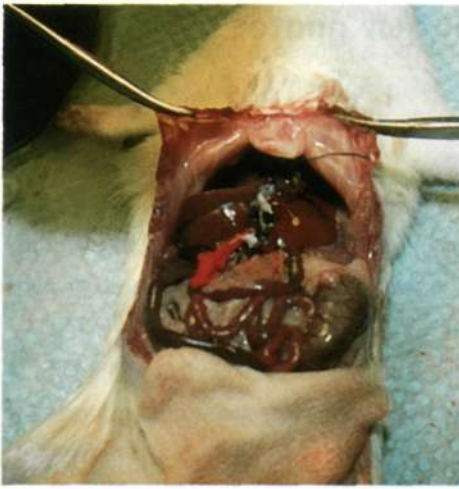
**Εικόνα E/B2.16:** Αναστομωση υπερηπατικής κάτω κοίλης φλέβας (οπίσθιο τοίχωμα).

ματος. Διαμέσου των οδηγών ραμμάτων ασκούσαν έλξη στους δύο πυλαίους κλάδους του λήπτη και στο σημείο του διχασμού τους διενεργούνταν τομή στο πρόσθιο πυλαίο τοίχωμα (Εικόνα Ε/Β2.17). Ο αυλός του αγγείου εκπλένονταν με θερμό (37 °C) διάλυμα NS. Κατόπιν, διαμέσου της



**Εικόνα Ε/Β2.17:** Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής αναστόμωσης της πυλαίας φλέβας.

προαναφερόμενης φλεβοτομής, τοποθετούνταν το πυλαίο cuff του μοσχεύματος στην πυλαία φλέβα του λήπτη και ακινητοποιούνταν με περιβρογχισμό από ράμμα μεταξιού, 6-0. Τα υπολείμματα της πυλαίας κεντρικότερα της αναστόμωσης απομακρύνονταν. Στη συνέχεια αποκλείονταν με μικροαγγειακή λαβίδα τύπου bulldog η υφηπατική κάτω κοίλη φλέβα του μοσχεύματος. Προς αποφυγή της εμβολής η περιτοναϊκή κοιλότητα πληρώνονταν με θερμό (37 °C) διάλυμα NS και ακολουθούσε η διάνοιξη της Lewton και της πυλαίας bulldog. Σταδιακά το ήπαρ ανακτούσε το χρώμα του (Εικόνα Ε/Β2.18), ενώ σύντομα άρχιζε η παραγωγή χολής. Η ανηπατική φάση διαρκούσε περίπου 22 min. Η αναστόμωση της υφηπατικής κάτω κοίλης φλέβας πραγματοποιούνταν με παρόμοιο τρόπο (Εικόνα Ε/Β2.19). Η αναστόμωση του χοληδόχου πόρου πραγματοποιούνταν με την ενσφήνωση του χοληδόχου καθετήρα του μοσχεύματος στον ελάχιστο μεγαλύτερο χοληδόχο καθετήρα του λήπτη (Εικόνα Ε/Β2.20). Αυτή η αναστόμωση εξασφαλιζονταν με επίδεση των δύο βρόγχων ακινητοποίησης των χοληδόχων καθετήρων μεταξύ τους και καλύπτονταν με μείζον επίπλουν. Κατόπιν εγχέονταν εν-

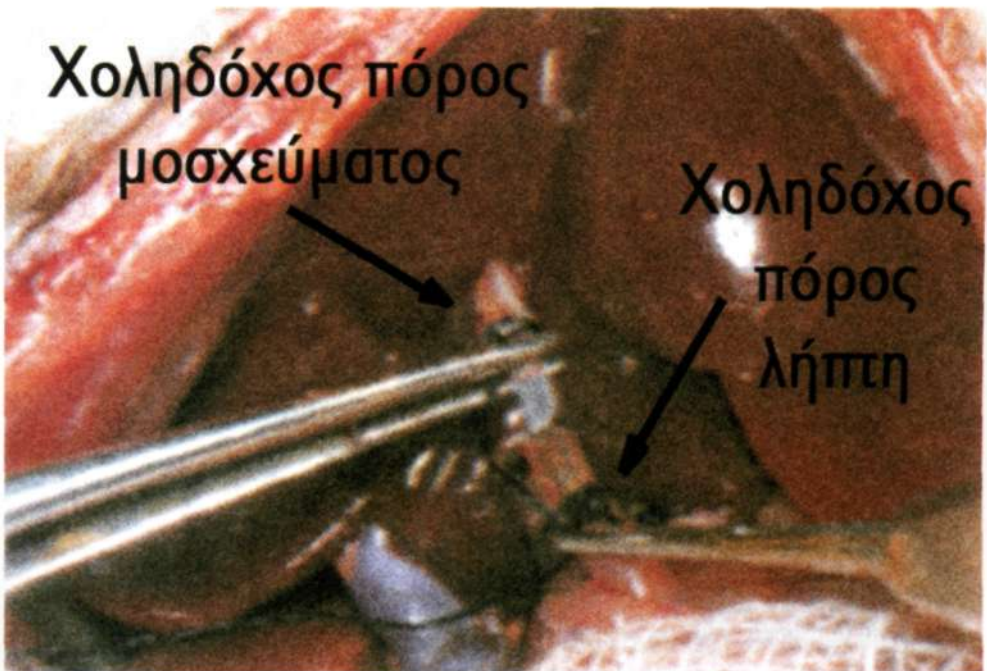


Εικόνα Ε/Β2.18: Επανομιάτωση μοσχεύματος.



Εικόνα Ε/Β2.19: Αναστόμωση υφηπατικής κάτω κοίλης φλέβας.

δοπεριτοναϊκά κεφουροξίμη, 50 μg/gr βάρους σώματος. Στη συνέχεια συρράπτονταν το μυϊκό τοίχωμα με ράμμα cat-gut, 3-0 και ακολουθούσε η συρραφή του δέρματος με ράμμα μεταξιού, 3-0. Η τοποθέτηση του μοσχεύματος διαρκούσε περίπου 135 min.



Εικόνα Ε/Β2.20: Αναστόμωση χοληδόχου πόρου.

## 2. Μονιμοποίηση ιστικών τεμαχίων ήπατος

### α. Διάλυμα μονιμοποίησης

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη μονιμοποίηση των ιστικών τεμαχίων από τα μοσχεύματα της ομάδας Γ (σειρά I: 20 τεμάχια, σειρά II: 20 τεμάχια, σειρά III: 4 τεμάχια) αποτελούνταν από 5% φορμόλη, 45% απόλυτο αλκοόλη (διάλυμα αλκοόλης 96%) και 50% ρυθμιστικό διάλυμα Krebs-Hanseleit, η σύσταση του οποίου είχε ως εξής: α) 6920 mg/lit NaCl, β) 354 mg/lit KCl, γ) 286 mg/lit CaCl<sub>2</sub>, δ) 162 mg/lit KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ε) 292 mg/lit MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O και στ) 2100 mg/lit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

### β. Εγκλεισμός σε παραφίνη - Τομές

Ο εγκλεισμός σε παραφίνη των μονιμοποιημένων ιστικών τεμαχίων από τα μοσχεύματα της ομάδας Γ ξεκινούσε με την τοποθέτηση τους σε ειδικές πλαστικές θήκες.

Κατόπιν, ακολουθούσε σταδιακή αφυδάτωση τους. Συγκεκριμένα, τα προς μελέτη τεμάχια εμβάπτιζονταν διαδοχικά σε: α) 50% αιθυλική αλκοόλη για μία h, β) 60% αιθυλική αλκοόλη για μία h, γ) 80% αιθυλική αλκοόλη για μία h, δ) 95% αιθυλική αλκοόλη για δύο h, ε) 100% αιθυλική αλκοόλη για τρεις h, στ) Ξυλόλη για δύο h και ζ) παραφίνη για δύο h.

Τα ιστικά τεμάχια μεταφέρονταν από τις πλαστικές σε ειδικές μεταλλικές θήκες γεμάτες με προθερμασμένη (υγροποιημένη) παραφίνη. Μετά τη στερεοποίηση της παραφίνης αφαιρούνταν οι μεταλλικές θήκες. Με τον τρόπο αυτό τα ιστικά τεμάχια εγκλείονταν σε κύβους παραφίνης.

Από τους προαναφερόμενους κύβους λαμβάνονταν, με τη βοήθεια μικροτόμου, ιστικές τομές πάχους 4 - 5 μm. Οι τομές αυτές σταθεροποιούνταν επάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες (απλές για τους ιστούς που θα χρωματίζονταν με αιματοξυλίνη-εωσίνη, φορτισμένες για τους ιστούς που θα χρωματίζονταν με ανοσοϊστοχημικά αντιδραστήρια).

## 3. Προσδιορισμός ιστικής υαλουρονάνης

### α. Ποιοτικός προσδιορισμός

Ο ποιοτικός προσδιορισμός της υαλουρονάνης αναφέρεται στο μικροσκοπικό εντοπισμό του πολυσακχαρίτη στις ιστικές τομές, με τη βοήθεια ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.

Ο προαναφερόμενος προσδιορισμός ξεκινούσε με την αποπαραφίνοποίηση και ενυδάτωση των

ιστικών τομών των μελετούμενων δειγμάτων από τα μοσχεύματα της ομάδας Γ (σειρά I: 20 δείγματα, σειρά II: 20 δείγματα, σειρά III: 4 δείγματα) σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία: α) 30 φορές εμβύθιση σε Ξυλόλη, β) 20 φορές εμβύθιση σε 100% αιθυλική αλκοόλη, γ) 10 φορές εμβύθιση σε 95% αιθυλική αλκοόλη, δ) 10 φορές εμβύθιση σε 80% αιθυλική αλκοόλη και ε) 10 φορές εμβύθιση σε διασπασταγμένο νερό.

Οι ιστικές τομές επωάζονταν με BSA 1% για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν εκπλένονταν με PBS για 5 min. Στη συνέχεια επωάζονταν (σε σκοτεινό θάλαμο) με  $H_2O_2$  3% για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου κατόπιν εκπλένονταν 3 φορές με PBS (1 φορά άμεσα, 2 φορές για 5 min). Έπειτα επωάζονταν με το διάλυμα συμπλόκου βιοτίνης με HABP (HABP, συνδεδεμένη με βιοτίνη, προσφέρθηκε ευγενώς από την κ. Είη Heldin, PhD, βιοχημικό, επίκουρη καθηγήτρια, BMC, Uppsala, Sweden) συγκέντρωσης 17  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PBS για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν εκπλένονταν με PBS για 10 min. Ακολουθούσε η επώαση σε αντιδραστήριο Vectastain ABC (Vectastain ABC elite kit, # PK-6100, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) για 60 min σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν εκπλένονταν με PBS για 15 min. Τέλος, οι ιστικές τομές επωάζονταν με το αντιδραστήριο Vector DAB (peroxidase substrate DAB kit, # SK-4100, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και εκπλένονταν με διασπασταγμένο νερό για 5 min.

Η διαδικασία ολοκληρώνονταν με την επικόλληση προστατευτικών τζαμιών επάνω στις ιστικές τομές χρησιμοποιώντας το διάλυμα Meyer.

Ο έλεγχος της ακρίβειας της τεχνικής επιτυγχάνονταν είτε με τη χρήση ιστικών τομών πλούσιων σε υαλουρονάνη (π.χ. νεφρικός φλοιός) είτε με την επώαση μερικών ιστικών τομών με κεκαθαρμένη υαλουρονιδάση (υαλουρονιδάση, κεκαθαρμένη, # H-1136, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA) για 240 min σε θερμοθάλαμο στους 37 °C (δεν εμφανίζονταν χρωματισμένες περιοχές στις συγκεκριμένες ιστικές τομές).

Με σκοπό τη βελτίωση της απεικόνισης της κυτταρικής μορφολογίας (για λόγους βελτίωσης των συνθηκών φωτογράφησης) ορισμένες ιστικές τομές χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη-εωσίνη.

## β. Ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της υαλουρονάνης στα προς μελέτη δείγματα (οπίσθια τμήματα κερκοφόρων λοβών 20 πειραματοζώων) ξεκινούσε με τη λυοφιλοποίηση τους.

Συγκεκριμένα, τα προαναφερόμενα δείγματα (ήδη αποθηκευμένα στους -20 °C) τοποθετούνταν σε γυάλινα φιαλίδια. Τα γυάλινα φιαλίδια καλύπτονταν με διάτρητο paraffilm και μεταφέρονταν στους -70 °C για 60 min. Κατόπιν, τα φιαλίδια τοποθετούνταν στο ειδικό μηχάνημα λυοφιλοποίησης

για 3 ημέρες.

Μετά την πάροδο των 3 ημερών προστίθονταν διάλυμα προνάσης (5 U/ml 0,05 M TRIS + 0,01 M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) σε κάθε φιαλίδιο (προνάση, τύπου XIV, # P-5147, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo, USA). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιούνταν 1 ml διαλύματος προνάσης για κάθε gr ξηρού βάρους του δείγματος. Ύστερα από έντονη ανακίνηση τους, τα φιαλίδια τοποθετούνταν σε θερμοθάλαμο στους 55 °C για 24 h.

Μετά την πάροδο των 24 h τα φιαλίδια ανακινούνταν *έντονα* και τοποθετούνταν σε θερμοθάλαμο στους 100 °C για 10 min. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση ( 15000  $g_{av}$ , 20 min) του περιεχομένου των φιαλιδίων (σε σωλήνες errendorf). Τέλος, συλλέγονταν η υπερκείμενη υγρή φάση και προσδιορίζονταν η συγκέντρωση υαλουρονάνης σε κάθε σωλήνα errendorf ξεχωριστά (διαδικασία όμοια με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης υαλουρονάνης στον ορό, βλ. επόμενο εδάφιο). Το ποσό του πολυσακχαρίτη που μετρούνταν με τη μέθοδο αυτή αντιστοιχούσε στην ποσότητα της ιστικής υαλουρονάνης για το κάθε δείγμα.

## 4. Μέτρηση δεικτών βιωσιμότητας μοσχεύματος

### α. Υαλουρονάνη ορού

Η μέτρηση της υαλουρονάνης του ορού πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού set αντιδραστηρίων (HYA kit, Kabi, Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Sweden) στο οποίο συμπεριλαμβάνονται: α) έξι προκαθορισμένα δείγματα υαλουρονάνης σε συγκεντρώσεις 0, 10, 25, 75, 200 και 500 ng/ml, β)  $^{125}\text{I}$ -HABP, γ) διάλυμα συμπλόκου υαλουρονάνης με σεφαρόζη, δ) διάλυμα κατακρίμμισης (ρητίνη προσρόφησης της σεφαρόζης) και ε) διάλυμα ανίχνευσης (απλή υδατοδιαλυτή χρωστική). Η διαδικασία της μέτρησης πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα ταυτόχρονα.

Οι ληφθέντες οροί από τα πειραματόζωα της ομάδας Γ' (20 δείγματα από τους δότες, 20 δείγματα από τους λήπτες) αποθηκεύονταν για διάφορο χρονικό διάστημα στους -20 °C. Η διαδικασία μέτρησης της υαλουρονάνης του ορού ξεκινούσε με την απομάκρυνση των δειγμάτων από την κατάψυξη και τη σταδιακή ρευστοποίηση τους σε συνθήκες δωματίου. Έπειτα, οι οροί ανακινούνταν έντονα με τη χρήση ειδικής συσκευής και φυγοκεντρούνταν (700  $g_{av}$ , 10 min).

Κάθε μέτρηση πραγματοποιούνταν από δύο φορές για λόγους αυξημένης ακρίβειας. Έτσι, σε δοκιμαστικούς σωλήνες ellerman τοποθετούνταν 2 X 50 μl από κάθε προκαθορισμένο δείγμα υαλουρονάνης (συνολικά 12 δοκιμαστικοί σωλήνες), 2 X 50 μl από ορό με γνωστή συγκέντρωση του πολυσακχαρίτη (συνολικά 2 δοκιμαστικοί σωλήνες) και 2 X 50 μl από τα προς μελέτη δείγματα (συνολικά 80 δοκιμαστικοί σωλήνες).

Στη συνέχεια παρασκευζόταν το αντιδραστήριο  $^{125}\text{I}$ -HABP σε συγκέντρωση 33  $\mu\text{l/ml}$  διαλύματος ανίχνευσης. Ακολουθούσε προσθήκη 100  $\mu\text{l}$  από το προαναφερόμενο αντιδραστήριο σε κάθε έναν από τους 94 δοκιμαστικούς σωλήνες *ellerman*. Ύστερα από αναμονή 60 *min* προστίθονταν 50  $\mu\text{l}$  από το (ανακινημένο καλά) διάλυμα συμπλόκου υαλουρονάνης με σεφαρόζη σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες. Μετά από 45 *min* ακολουθούσε η προσθήκη 1  $\text{ml}$  από το (ανακινημένο καλά) διάλυμα κατακρίμησης σε κάθε έναν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες και η φυγοκέντρωση (1400  $\text{g}_{\text{av}}$ , 10 *min*) και απότομη αναστροφή (με σκοπό το άδειασμα τους) των σωλήνων *ellerman*.

Οι άδειοι από διαλύματα σωλήνες *ellerman* τοποθετούνταν σε μετρητή  $\gamma$ -ακτινοβολίας. Οι κρούσεις από τους 14 πρώτους δοκιμαστικούς σωλήνες που αντιστοιχούσαν στα προκαθορισμένα δείγματα υαλουρονάνης χρησιμοποιούνταν στο σχεδιασμό (12 πρώτοι σωλήνες) και έλεγχο (2 επόμενοι σωλήνες) της καμπύλης αναφοράς. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς, οι κρούσεις από τους 80 τελευταίους δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι αντιστοιχούσαν στα προς μελέτη δείγματα, απέφεραν τον υπολογισμό της συγκέντρωσης υαλουρονάνης σε αυτά.

Τα δείγματα στα οποία η συγκέντρωση της υαλουρονάνης ήταν εκτός των ορίων της καμπύλης αναφοράς αραιώθηκαν με διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης υαλουρονάνης και υποβλήθηκαν σε επαναπροσδιορισμό της συγκέντρωσης του πολυσακχαρίτη.

## β. Άλλοι δείκτες βιωσιμότητας

Η μέτρηση των υπολοίπων δεικτών βιωσιμότητας στα προς μελέτη δείγματα πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ειδικού βιοχημικού αναλυτή μικροποσοτήτων ορού και των συνοδευτικών αυτού αντιδραστηρίων (*system reagent 500*, *Olympus Diagnostica, GmbH, Hamburg, Germany*). Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν η οξαλοξική αμινοτρανσφεράση, η πυροσταφυλική αμινοτρανσφεράση, η αλκαλική φωσφατάση, η ολική χολερυθρίνη, τα ολικά λευκώματα και η αλβουμίνη. Η διαδικασία της μέτρησης πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα ταυτόχρονα.

Οι ληφθέντες οροί από τα πειραματόζωα της ομάδας Γ' (20 δείγματα από τους δότες, 20 δείγματα από τους λήπτες) αποθηκεύονταν για διάφορο χρονικό διάστημα στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Η διαδικασία μέτρησης των δεικτών βιωσιμότητας του ηπατικού μοσχεύματος ξεκινούσε με την απομάκρυνση των δειγμάτων από την κατάψυξη και τη σταδιακή ρευστοποίησή τους σε συνθήκες δωματίου. Έπειτα, οι οροί ανακινούνταν έντονα με τη χρήση ειδικής συσκευής και φυγοκεντρούνταν (700  $\text{g}_{\text{av}}$ , 10 *min*).

Η μέτρηση κάθε δείκτη βιωσιμότητας απαιτούσε την κατανάλωση περίπου 20  $\mu\text{l}$  από το προς μελέτη δείγμα.

## 5. Στατιστική ανάλυση

Οι συγκρίσεις δεδομένων μεταξύ περισσότερων των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση διορθωμένης (Bonferroni's post hoc) δοκιμασίας ANOVA. Οι συγκρίσεις δεδομένων μεταξύ δύο ομάδων πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση της δοκιμασίας t-student, ύστερα από έλεγχο των διακυμάνσεων (Fisher's exact test). Η πιθανότητα στατιστικού λάθους καθορίστηκε σε λιγότερο από 5%. Η στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ηλεκτρονικού υπολογιστή και ειδικού λογισμικού στατιστικών αναλύσεων (λογισμικό, StatView, 4.01, Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA).



## Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Ι. Αξιοπιστία τεχνικής ενός ατόμου

Από τις 70 μεταμοσχεύσεις της ομάδας Β' 14 (20%) χαρακτηρίστηκαν τεχνικά επιτυχείς. Από τις 23 της ομάδας Γ' 20 (87%) χαρακτηρίστηκαν τεχνικά επιτυχείς (Πίνακας Ε/Α2.Ι). Μετρήθηκαν συνολικά 12 λόγοι τεχνικής αποτυχίας (Πίνακας Ε/Γ 1.1). Σε μερικές μεταμοσχεύσεις υπήρχαν περισσότερα του ενός εγχειρητικά σφάλματα. Στις περιπτώσεις αυτές ως αιτία θανάτου θεωρήθηκε το σημαντικότερο τεχνικό λάθος.

Επιπλοκές	Ομάδα Β' (70 λήπτες)	Ομάδα Γ' (23 λήπτες)
Αναισθησία	3	
Υποδιαφραγματικός αποκλεισμός	6	1
Πνευμονικό οίδημα	7	1
Υποδιαφραγματική εμβολή	2	
Υποδιαφραγματική αιμορραγία	5	
Αιμορραγία cuff	11	1
Υψηπατική αιμορραγία (παρασκευή)	2	
Υψηπατική αιμορραγία (αναστόμωση)	3	
Αιμορραγία Haller	4	
Αιμορραγία καθετήρα	5	
Διάχυτη αιμορραγία	1	
Άγνωστοι λόγοι	7	
<b>Σύνολο</b>	<b>56</b>	<b>3</b>

**Πίνακας Ε/Γ.Ι.:** Λόγοι τεχνικής αποτυχίας της ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος σε αρουραίους από ένα πειραματιστή.

Η μετεγχειρητική αιμορραγία ήταν ο συχνότερος λόγος τεχνικής αποτυχίας. Συχνότερα αιμορραγούσε η πυλαία αναστόμωση. Λιγότερο συχνές εστίες αιμορραγίας ήταν η υποδιαφραγματική αναστόμωση, η υψηπατική κάτω κοίλη (στην αναστόμωση και στους κλάδους της), ο καθετήρας ενυδάτωσης και ο τρίποδας Haller. Τέλος υπήρξε και μία περίπτωση αιμορραγίας στην οποία δεν αναγνωρίστηκε εστία. Όλοι οι λήπτες με διεγχειρητική αιμορραγία κατέληξαν μέσα στα πρώτα 60 min από την έναρξη της.

Η κακή ενυδάτωση του λήπτη ήταν ο δεύτερος πιο συχνός λόγος τεχνικής αποτυχίας. Η υπερυδάτωση οδηγούσε σε πνευμονικό οίδημα. Η αφυδάτωση οδηγούσε σε αδυναμία ανοχής του υποδιαφραγματικού αποκλεισμού κατά την ανηπατική φάση. Το πνευμονικό οίδημα συνδυάζονταν πάντα με καρδιακή ανακοπή και αιφνίδιο θάνατο. Η αδυναμία ανοχής του υποδιαφραγματικού αποκλεισμού οδηγούσε στη σταδιακή έκπτωση της αναπνευστικής λειτουργίας και τελικά στο θάνατο, 10 περίπου min μετά την τοποθέτηση της λαβίδας τύπου Lewton.

Αίτια τεχνικής αποτυχίας αποτέλεσαν επίσης οι εμβολή αέρα από την υποδιαφραγματική αναστόμωση και η υπερδοσολογία αναισθητικών παραγόντων (διαιθυλαιθέρα). Τέλος, σε μερικές περιπτώσεις οι λόγοι που οδήγησαν σε τεχνική αποτυχία δεν ήταν δυνατόν να καθοριστούν.

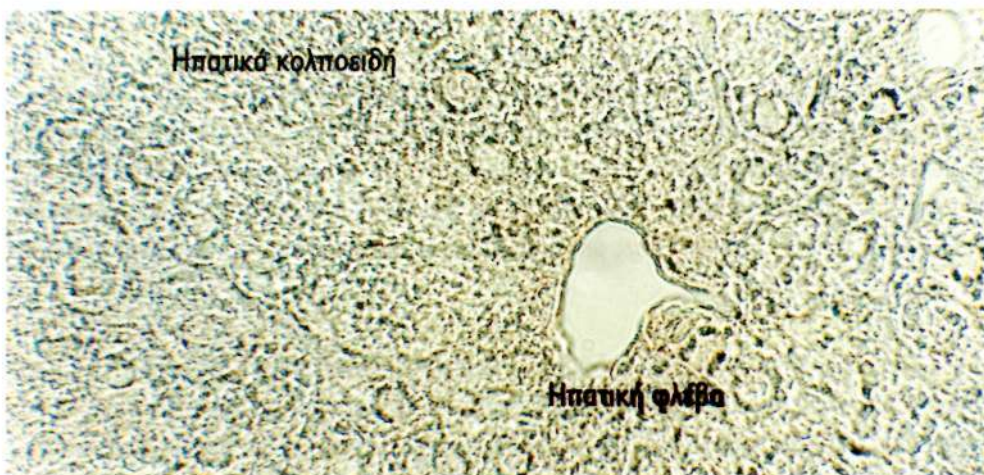
Ο μέσος χρόνος ανηπατικής φάσης ήταν  $19,6 (\pm 0,3)$  min για την ομάδα Β' και  $22,1 (\pm 0,5)$  min για την ομάδα Γ'. Ο μέσος χρόνος λήψης του μοσχεύματος, τοποθέτησης των cuff και τοποθέτησης του μοσχεύματος ήταν  $75 (\pm 8)$ ,  $30 (\pm 3)$ ,  $135 (\pm 14)$  min αντίστοιχα και στις τρεις ομάδες.

Στην ομάδα Β' τα μοσχεύματα συντηρούνταν σε απλό UW για τον ελάχιστο δυνατό χρόνο ψυχρής ισοχαιμίας. Με τις προαναφερόμενες συνθήκες, τα ευρήματα της οπτικής μικροσκοπικής τομών μοσχεύματος τη 14η μετεγχειρητική ημέρα ήταν παρόμοια με αυτά ενός φυσιολογικού ήπατος.

## 2. Συντήρηση μοσχεύματος με την προσθήκη υαλουρονιδάσης

### α. Βέλτιστη συγκέντρωση υαλουρονιδάσης

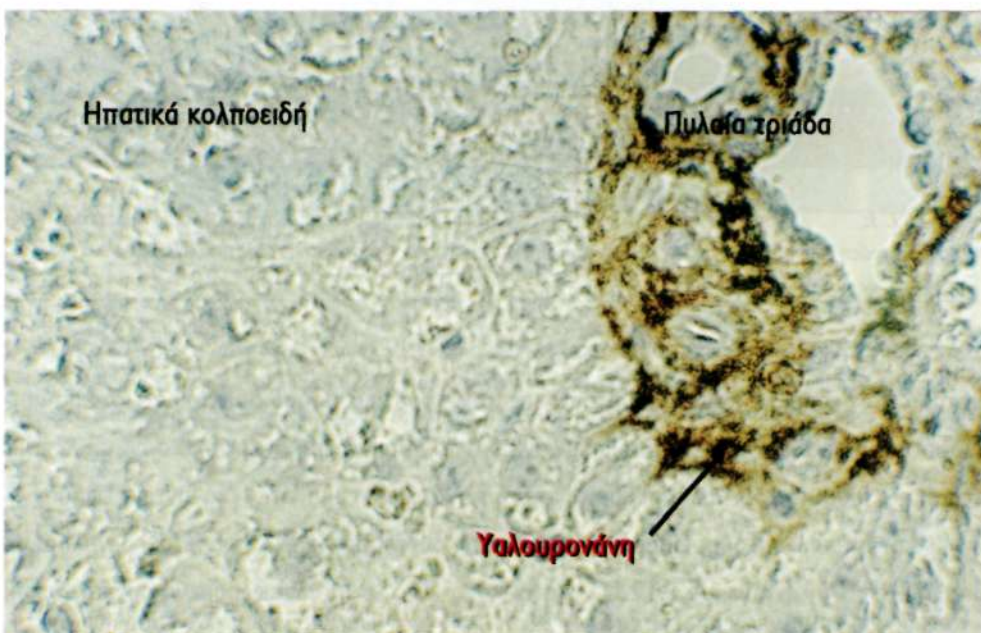
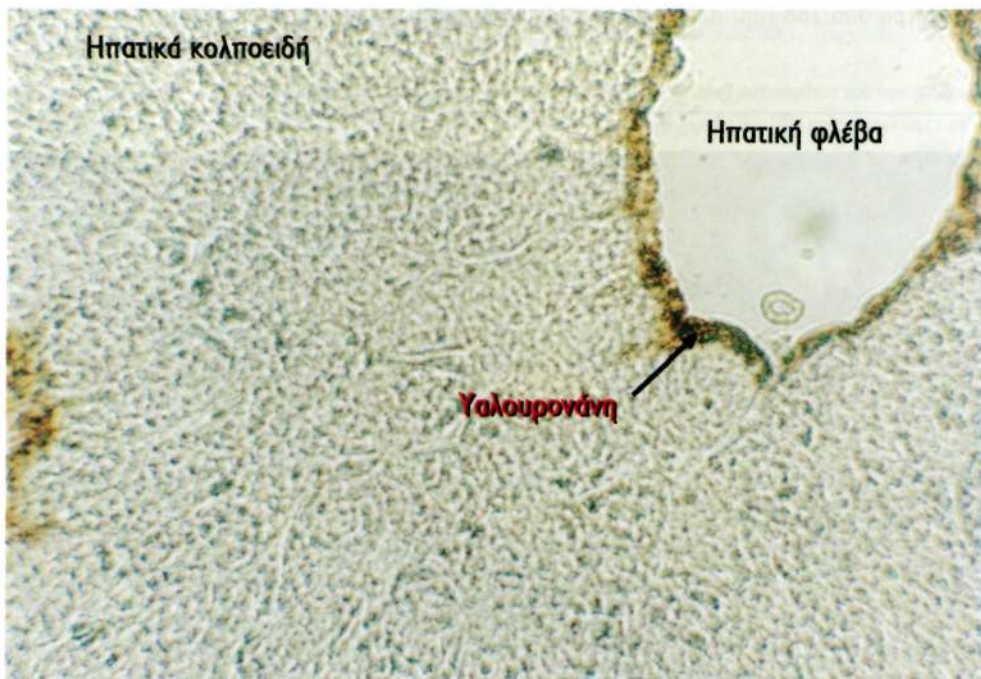
Ο ποιοτικός προσδιορισμός (ανοσοϊστοχημική χρώση) της υαλουρονάνης στα 18 πειράματα της ομάδας Α' αποκάλυψε ότι η χρήση υαλουρονιδάσης στο διάλυμα UW οδήγησε στην οπτική (μικροσκοπικά) εξάλειψη του ιστικού πολυσακχαρίτη για κάθε συγκέντρωση ενζύμου που δοκιμάστηκε στις συγκεκριμένες συνθήκες (24 h ψυχρή συντήρηση). Συγκεκριμένα, στους ιστούς που συντηρήθηκαν σε UW εμπλουτισμένο με υαλουρονιδάση σε συγκεντρώσεις 36, 72, 144 (Εικόνα Ε/Γ2.1), 288 και 576 NFU/ml δεν έγινε δυνατή η χρώση ιστικής υαλουρονάνης. Από την άλλη



**Εικόνα Ε/Γ2.1:** Ιστοτεμάχιο ηπατικού μοσχεύματος συντηρημένου σε UW εμπλουτισμένο με υαλουρονιδάση (144 NFU/ml). Αν και χρησιμοποιήθηκε η σχετική ειδική ανοσοϊστοχημική χρώση, δεν έγινε δυνατή η ανίχνευση υαλουρονάνης (απουσία καφέ χρωματισμού).

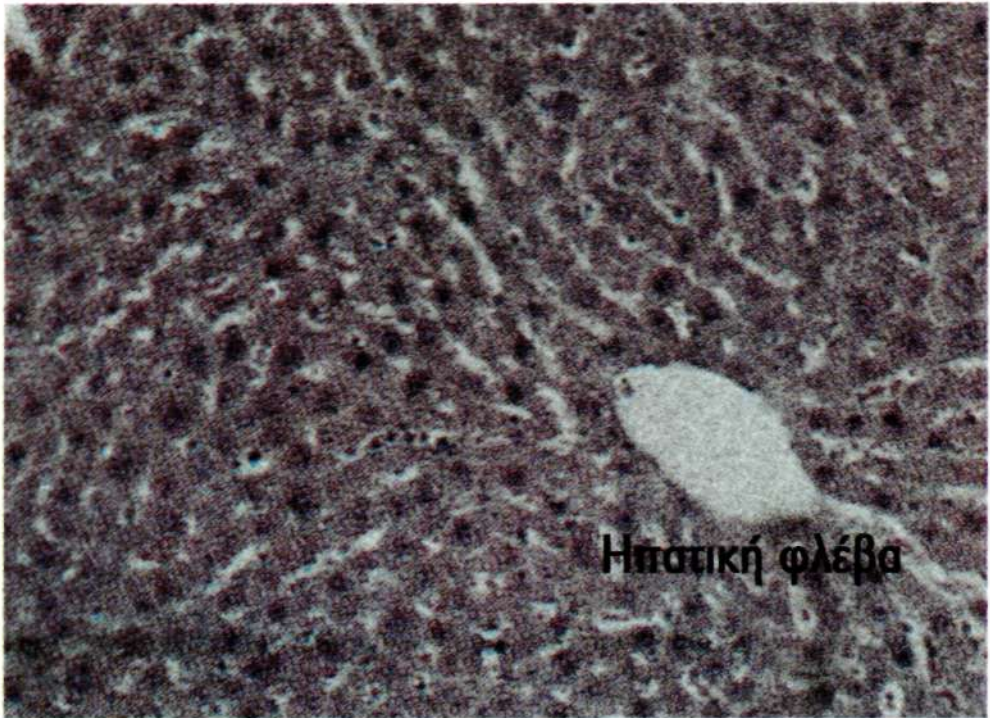
# T

πλευρά, στους ιστούς που συντηρήθηκαν με απλό UW (Εικόνα Ε/Γ2.2) ο πολυσακχαρίτης απεικονίζεται στα αναμενόμενα σημεία (περιαρτηριακά, περιφλεβικά και περιχολλαγγειακά).



**Εικόνα Ε/Γ2.2:** Ιστοτεμάχιο ηπατικού μοσχεύματος συντηρημένου σε απλό UW. Ο καφέ χρωματισμός δεικνύει την ύπαρξη υαλουρονάνης στις αναμενόμενες θέσεις.

Όσον αφορά στην ιστική μορφολογία, οι χρώσεις με αιματοξυλίνη-εωσίνη αποκάλυψαν διατήρηση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του ήπατος, εφόσον η συγκέντρωση της υαλουρονιδάσης ήταν μικρότερη από ή ίση με 288 NFU/ml (Εικόνα Ε/Γ2.3). Αν η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν μεγαλύτερη από 288 NFU/ml, τότε παρατηρούνταν αλλοίωση της ιστικής μορφολογίας του ήπατος.

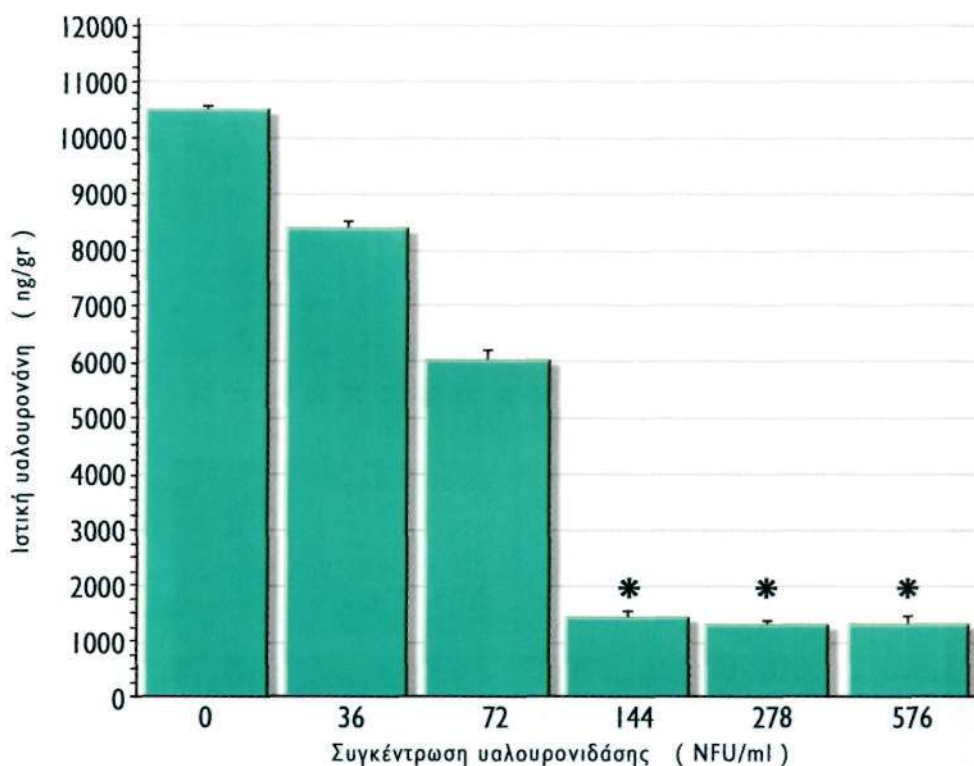


**Εικόνα Ε/Γ2. 3:** Ιστοτεμάχιο ηπατικού μοσχεύματος συντηρημένου σε UW εμπλουτισμένο με υαλουρονιδάση (144 NFU/ml). Η χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης δεικνύει τη διατήρηση της φυσιολογικής αρχιτεκτονικής του οργάνου.

Ωστόσο, τα δεδομένα που προκύπτουν από τον ποσοτικό προσδιορισμό της ιστικής υαλουρονάνης (Πίνακας Ε/Γ2.1) αποκάλυψαν πως, το χαμηλότερο στατιστικά σημαντικό επίπεδο ( $p < 0,0001$ ) του πολυσακχαρίτη στο ηπατικό μόσχευμα επιτυγχάνονταν, εφόσον η συγκέντρωση της υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης ήταν ίση με ή μεγαλύτερη από 144 NFU/ml (Γράφημα Ε/Γ2.1). Για το λόγο αυτό, η προαναφερόμενη συγκέντρωση υαλουρονιδάσης θεωρήθηκε ως βέλτιστη.

α/α	0 NFU/ml	36 NFU/ml	72 NFU/ml	144 NFU/ml	288 NFU/ml	576 NFU/ml
1	10331	8191	6360	1195	1290	1239
2	10652	8189	5920	1655	1210	1562
3	10433	8670	5840	1395	1430	1219

**Πίνακας Ε/Γ2.1:** Εναπομείνισσα ιστική υαλουρονάνη (σε ng/gr ξηρού βάρους ήπατος) μοσχευμάτων που συντηρήθηκαν με 0 (ομάδα 1'), 36 (ομάδα 2'), 72 (ομάδα 3'), 144 (ομάδα 4'), 288 (ομάδα 5'), και 576 (ομάδα 6'), NFU υαλουρονιδάσης / ml UW.



**Γράφημα Ε/Γ2.1:** Εναπομείνισσα ιστική υαλουρονάνη (σε ng/gr ξηρού βάρους ήπατος) σε μοσχεύματα που συντηρήθηκαν με 0 (ομάδα 1'), 36 (ομάδα 2'), 72 (ομάδα 3'), 144 (ομάδα 4'), 288 (ομάδα 5') και 576 (ομάδα 6') NFU υαλουρονιδάσης / ml UW. Δεικνύεται το τυπικό σφάλμα της στατιστικής επεξεργασίας. Ο αστερίσκος (\*) συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά από το αποτέλεσμα της ομάδας 1' ( $p < 0,0001$ ).

## β. Επιβίωση πειραματόζων

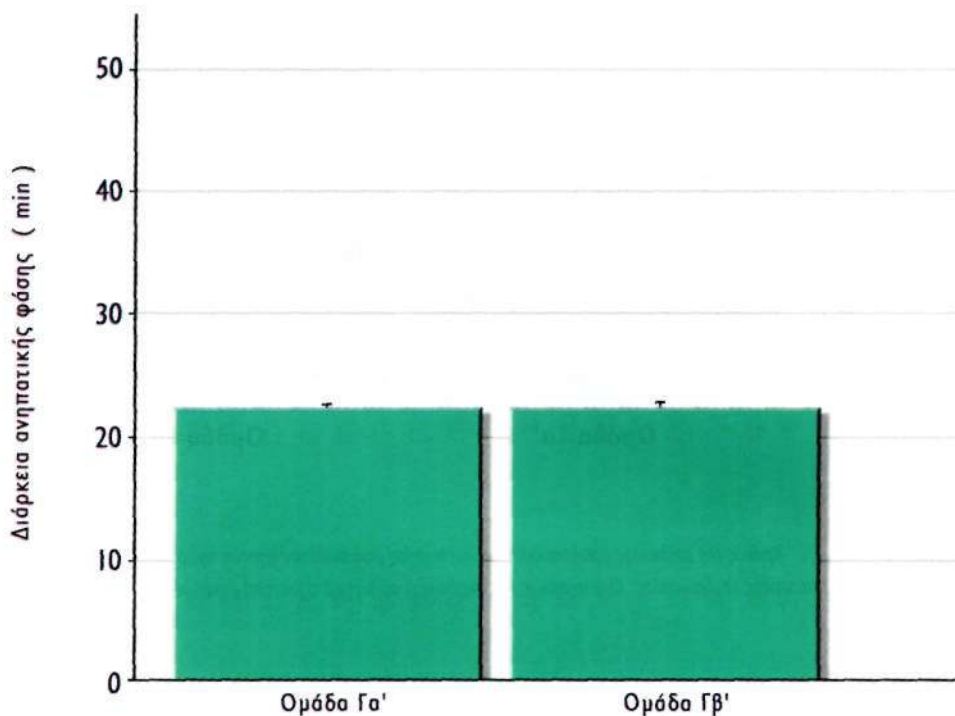
Στην ομάδα Γ' των πειραματόζων (Πίνακας Ε/Γ2.2) τα ηπατικά μοσχεύματα συντηρήθηκαν για 24 h σε UW εμπλουτισμένο είτε χωρίς (ομάδα Γα') είτε με (ομάδα Γβ') υαλουρονιδάση στη βέλτι-

Πείραμα	Βάρος δότη (gr)	Βάρος λήπτη (gr)	Διάρκεια ανηπατικής φάσης (min)	Επέλευση πρωτοπαθούς μη λειτουργίας (h)
Γα' 1	302	542	24	12
Γα' 2	312	552	23	11
Γα' 3	354	531	21	11
Γα' 4	351	521	22	12
Γα' 5	362	402	22	31
Γα' 6	352	412	21	30
Γα' 7	367	462	21	6
Γα' 8	377	452	22	7
Γα' 9	299	435	23	19
Γα' 10	289	445	22	18
Γβ1' 1	235	404	20	1
Γβ1' 2	245	394	21	1
Γβ1' 3	268	529	23	16
Γβ1' 4	258	519	24	15
Γβ1' 5	245	522	24	48
Γβ1' 6	255	532	23	49
Γβ2' 1	272	492	22	Επιβίωση
Γβ2' 2	262	502	21	Επιβίωση
Γβ2' 3	301	527	21	Επιβίωση
Γβ2' 4	311	517	22	Επιβίωση

**Πίνακας Ε/Γ2.2:** Διάρκεια ανηπατικής φάσης, επέλευση πρωτοπαθούς μη λειτουργίας μοσχεύματος και επιβίωση ληπτών της ομάδας Γ'.

στη συγκέντρωση της. Κανένα από τα πειραματόζωα της ομάδας Γα' ( $n=10$ ) δεν επιβίωσε. Αντίθετα, 4 (40%) από τα πειραματόζωα της ομάδας Γβ' ( $n=10$ ) επιβίωσαν (ομάδα Γβ2'), ενώ τα υπόλοιπα 6 απεβίωσαν (ομάδα Γβ1').

Η διάρκεια της ανηπατικής φάσης ήταν 22,1 min (Γράφημα Ε/Γ2.2). Τα πειραματόζωα της ομάδας Γα' με πρωτοπαθή μη λειτουργία ( $n=10$ ) κατέληξαν ύστερα από 15,7 h κατά μέσο όρο. Τα πειραματόζωα της ομάδας Γβ1' με πρωτοπαθή μη λειτουργία ( $n=6$ ) κατέληξαν ύστερα από 21,7 h (Γράφημα Ε/Γ2.3). Η διαφορά αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ( $p<0,0001$ ).

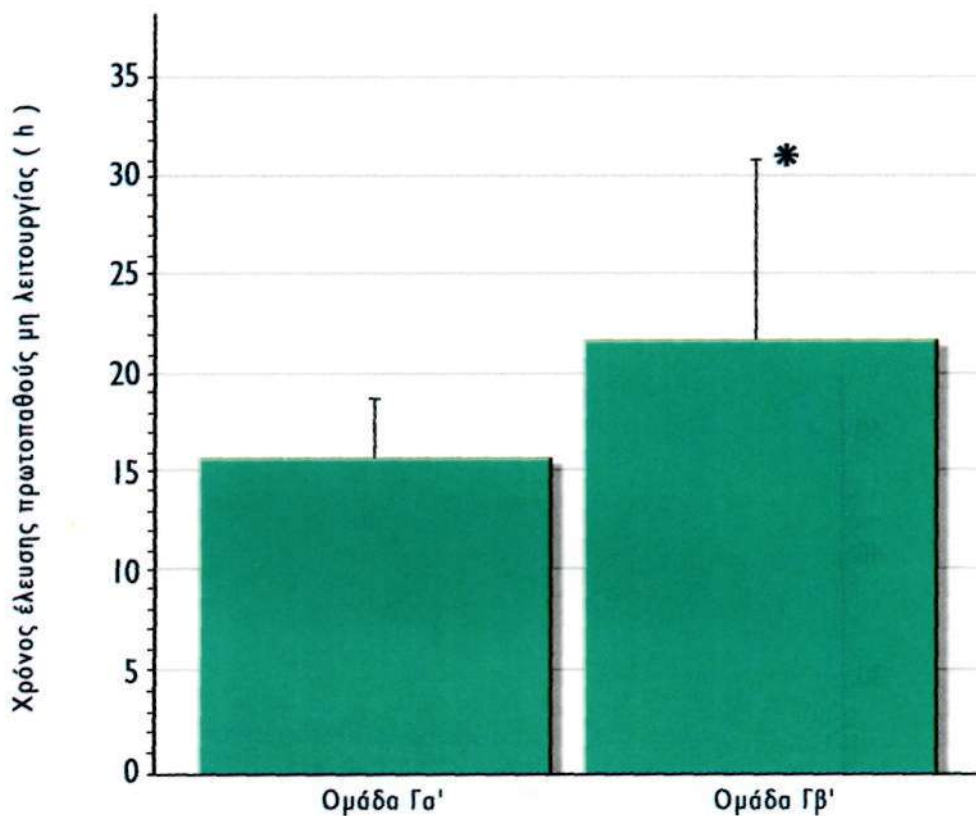


**Γράφημα Ε/Γ2.2:** Διάρκεια (min) ανηπατικής φάσης ληπτών της ομάδας Γ. Δεικνύεται το τυπικό σφάλμα της στατιστικής επεξεργασίας.

γ. Δείκτες βιωσιμότητας μοσχευμάτων

∴ **Υαλουρονάνη ορού**

Το επίπεδο της υαλουρονάνης στον ορό των δοτών της ομάδας Γ' ( $n=20$ ) ήταν 39,85 ng/ml κατά



**Γράφημα Ε/Γ2.3:** Χρόνος (h) επέλευσης πρωτοπαθούς μη λειτουργίας μοσχευμάτων ληπτών της ομάδας Γ. Δεικνύεται το τυπικό σφάλμα της στατιστικής επεξεργασίας. Ο αστερίσκος (\*) συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά.

μέσο όρο (Πίνακας Ε/Γ2.3, Γράφημα Ε/Γ2.4). Το επίπεδο της υαλουρονάνης στον ορό των ληπτών της ομάδας Γα' (η=10), 10 min μετά την επαναψάτωση, ήταν 477,32 ng/ml κατά μέσο όρο. Το επίπεδο αυτό διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από εκείνο των δοτών ( $p < 0,0001$ ). Το επίπεδο της υαλουρονάνης στον ορό των ληπτών της ομάδας Γβ1' (η=6), 10 min μετά την επαναϊμάτωση, ήταν 647,79 ng/ml κατά μέσο όρο. Το επίπεδο αυτό διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από εκείνο των δοτών ( $p < 0,0001$ ), καθώς και από εκείνο της ομάδα Γα' ( $p = 0,0235$ ). Τέλος, το επίπεδο της υαλουρονάνης στον ορό των ληπτών της ομάδας Γβ2' (η=4), 10 min μετά την επαναϊμάτωση, ήταν 243,09 ng/ml κατά μέσο όρο. Το επίπεδο αυτό διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από εκείνο των δοτών ( $p = 0,0116$ ), από εκείνο της ομάδας Γα' ( $p = 0,0074$ ), καθώς και από εκείνο της ομάδας Γβ1' ( $p < 0,0001$ ).



### ΔΟΤΕΣ

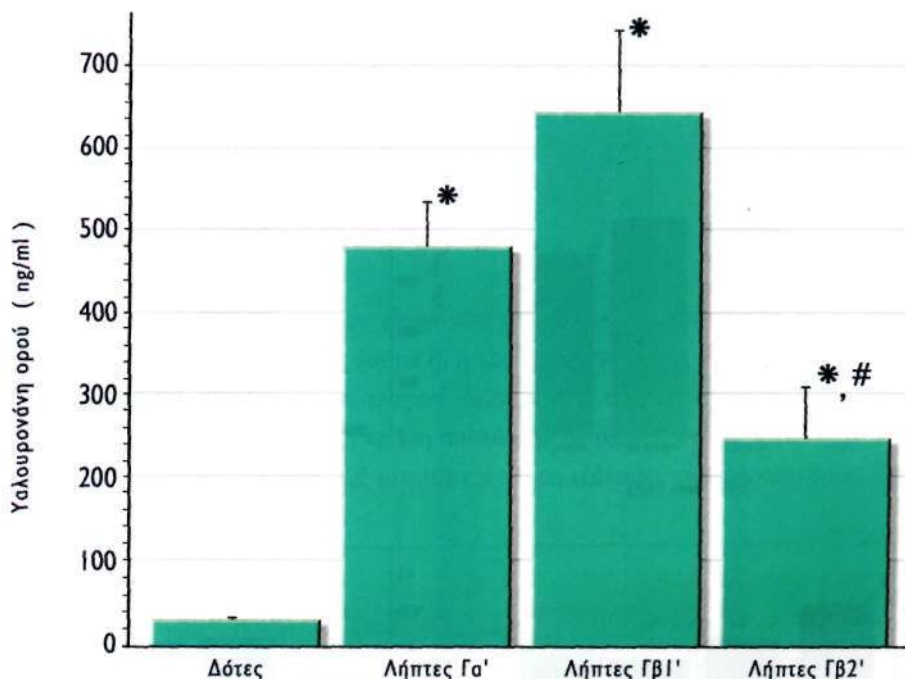
Πείραμα	Υαλουρονάνη (ng/ml)	SGOT (IU)	SGPT (IU)	Αλ. φωσφατάση (IU)	Ολ. χολερυθρίνη (mg/dl)	Ολ. λευκώματα (gr/dl)	Αλβουμίνη (gr/dl)
Γα' 1	38.35	76	36	174	0.3	6.4	3.5
Γα' 2	31.76	75	35	175	0.1	6.5	3.5
Γα' 3	31.83	73	35	176	0.1	6.4	3.4
Γα' 4	40.07	75	35	179	0.3	6.4	3.5
Γα' 5	45.82	76	34	174	0.3	6.5	3.5
Γα' 6	42.70	76	38	177	0.4	6.5	3.5
Γα' 7	36.21	74	38	176	0.3	6.5	3.5
Γα' 8	47.92	75	36	176	0.2	6.5	3.5
Γα' 9	47.68	72	35	171	0.2	6.3	3.4
Γα' 10	34.09	76	35	176	0.1	6.5	3.5
Γβ1' 1	28.86	79	36	173	0.1	6.5	3.5
Γβ1' 2	25.00	78	36	182	0.2	6.6	3.6
Γβ1' 3	37.84	79	35	180	0.5	6.6	3.5
Γβ1' 4	30.36	80	36	180	0.2	6.6	3.6
Γβ1' 5	44.45	78	36	177	0.3	6.5	3.6
Γβ1' 6	41.04	79	38	180	0.3	6.5	3.6
Γβ2' 1	47.65	77	38	179	0.4	6.5	3.5
Γβ2' 2	49.97	77	36	176	0.2	6.5	3.5
Γβ2' 3	51.85	79	38	182	0.4	6.5	3.6
Γβ2' 4	43.46	76	36	179	0.4	6.5	3.6

**Πίνακας Ε/Γ2.3α:** Δείκτες βιωσιμότητας ορού δοτών της ομάδας Γ'.

## ΛΗΠΤΕΣ

Πείραμα	Υαλουρονάνη (ng/ml)	SGOT (IU)	SGPT (IU)	Αλ. φωσφατάση (IU)	Ολ. καλερυθρίνη (mg/dl)	Ολ. λευκώματα (gr/dl)	Αλβουμίνη (gr/dl)
Γα' 1	713.05	461	349	177	0.2	5.1	2.7
Γα' 2	598.24	467	360	178	0.3	5.3	2.8
Γα' 3	456.63	1070	2420	190	0.4	5.3	2.9
Γα' 4	506.14	1040	2460	194	0.4	5.1	2.9
Γα' 5	382.95	374	272	172	0.3	4.2	2.3
Γα' 6	413.38	368	233	153	0.4	4.5	2.4
Γα' 7	627.19	1390	1010	156	0.4	4.6	2.4
Γα' 8	680.65	1460	1060	156	0.4	4.6	2.4
Γα' 9	804.73	1460	505	96	0.5	4.4	2.3
Γα' 10	795.38	1340	550	100	0.5	4.4	2.3
Γβ1' 1	277.74	610	448	181	0.2	4.6	2.2
Γβ1' 2	150.09	566	534	183	0.1	4.7	2.2
Γβ1' 3	738.37	458	231	110	0.2	3.7	1.8
Γβ1' 4	166.51	79	52	217	0.1	6.1	3.2
Γβ1' 5	850.64	455	213	108	0.2	3.7	1.9
Γβ1' 6	531.12	492	416	218	0.4	5.5	2.9
Γβ2' 1	209.00	321	252	111	0.2	4.3	2.2
Γβ2' 2	186.00	310	245	107	0.2	4.1	2.1
Γβ2' 3	417.30	528	341	124	0.4	4.6	2
Γβ2' 4	127.24	689	462	121	0.1	4.2	2.3

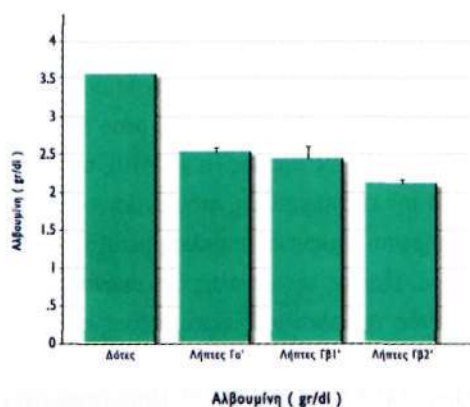
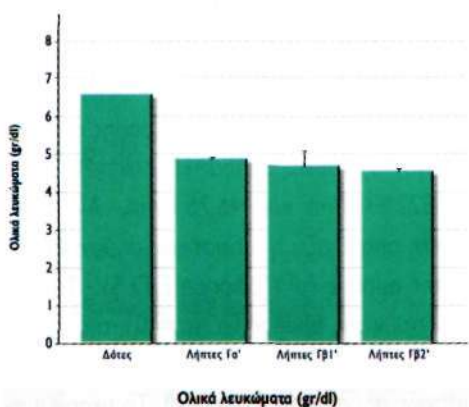
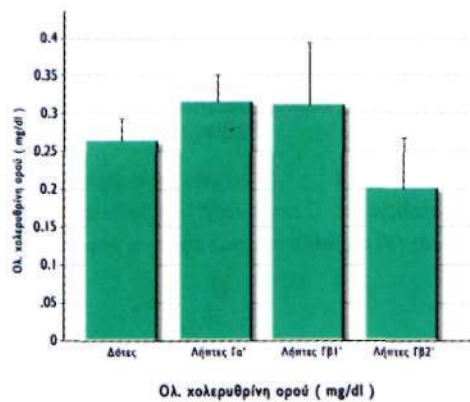
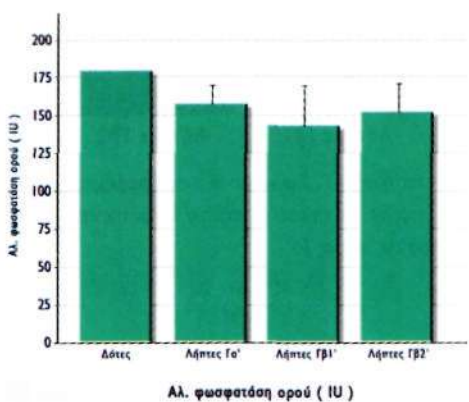
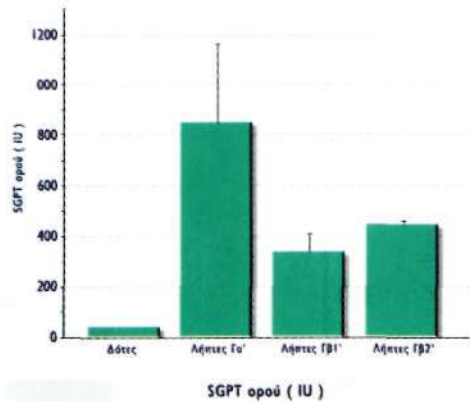
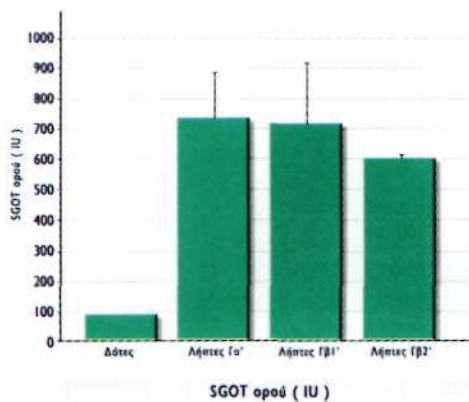
**Πίνακας Ε/Γ2.3β:** Δείκτες βιωσιμότητας ορού ληπτών της ομάδας Γ'.



**Γράφημα Ε/Γ2.4:** Υαλουρονάνη ορού (ng/ml) δοτών και ληπτών της ομάδας Γ. Δεικνύεται το τυπικό σφάλμα της στατιστικής επεξεργασίας. Ο αστερίσκος (\*) συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά από το αποτέλεσμα των δοτών της κατηγορίας Γ. Η δίεση (#) συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά από το αποτέλεσμα της ομάδας Γα'.

». Άλλοι δείκτες βιωσιμότητας

Το μέσο επίπεδο της οξαλοξικής αμινοτρανσφεράσης (Πίνακας Ε/Γ2.3, Γράφημα Ε/Γ2.5) στον ορό των ληπτών της ομάδας Γα' (η=10), της ομάδας Γβ1' (η=6) και της ομάδας Γβ2' (π=4), 10 min μετά την επαναιμάτωση, ήταν αντίστοιχα 726,1 U/ml, 714 U/ml και 528 U/ml (απουσία στατιστικώς σημαντικής διαφοράς). Το μέσο επίπεδο της πυροσαφυλικής αμινοτρανσφεράσης στον ορό των ληπτών της ομάδας Γα' (η= 10), της ομάδας Γβ1' (η=6) και της ομάδας Γβ2' (η=4), 10 min μετά την επαναιμάτωση, ήταν αντίστοιχα 866,1 U/ml, 327,83 U/ml και 446,25 U/ml.. Αν και παρατηρείται σημαντική απόκλιση μεταξύ των τιμών αυτών, απουσιάζει η στατιστικώς σημαντική διαφορά, εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης των τιμών της ομάδας Γα' (Γράφημα Ε/Γ2.5). Το μέσο επίπεδο της αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό των ληπτών της ομάδας Γα' (π =10), της ομάδας Γβ1' (η=6) και της ομάδας Γβ2' (π=4), 10 min μετά την επαναιμάτωση, ήταν αντίστοιχα 159,4 U/ml, 141,5 U/ml και 152,25 U/ml (απουσία στατιστικώς σημαντικής διαφοράς). Το μέσο επίπεδο της ολικής χολερυθρίνης στον ορό των ληπτών της ομάδας Γα' (η = 10), της ομάδας Γβ1' (η=6) και της ομάδας Γβ2' (η=4), 10 min μετά την επαναιμάτωση, ήταν αντίστοιχα 0,32 mg/dl, 0,32 mg/dl και 0,2 mg/dl (απουσία στατιστικώς σημαντικής διαφοράς). Το μέσο επίπεδο των λευκωμάτων στον ορό των ληπτών της ομάδας Γα' (η= 10), της ομάδας Γβ1' (η=6) και της ομάδας Γβ2' (η=4),

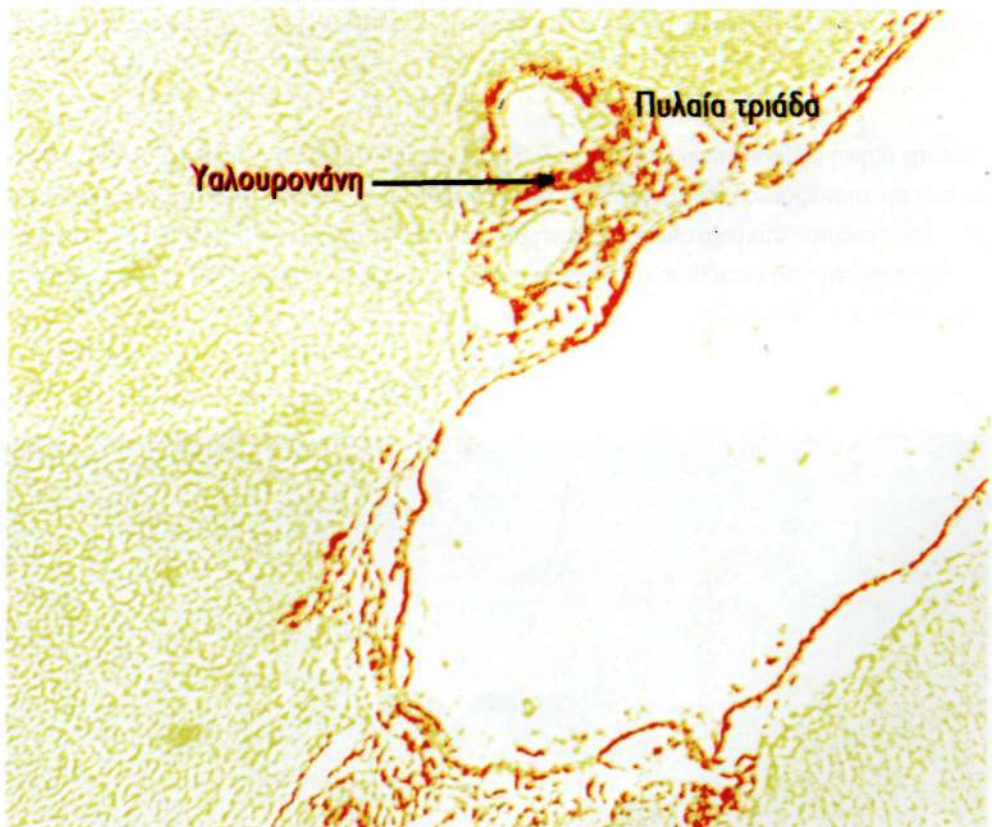


**Γράφημα Ε/Γ2.5:** Δείκτες βιωσιμότητας ορού δοτών και ληπτών της ομάδας Γ. Δεικνύεται το τυπικό σφάλμα της στατιστικής επεξεργασίας.

10 min μετά την επαναιμάτωση, ήταν αντίστοιχα 4,71 gr/dl, 4,63 gr/dl και 4,53 gr/dl (απουσία στατιστικώς σημαντικής διαφοράς). Τέλος, το μέσο επίπεδο της αλβουμίνης στον ορό των ληπτών της ομάδας Γα' (η=10), της ομάδας Γβ1' (η=6) και της ομάδας Γβ2' (η=4), 10 min μετά την επαναιμάτωση, ήταν αντίστοιχα 2,51 gr/dl, 2,4 gr/dl και 2,18 gr/dl (απουσία στατιστικώς σημαντικής διαφοράς).

## δ. Οπτική μικροσκόπηση - Χρώσεις

Κατά την οπτική μικροσκόπηση ιστικών τομών από όλα τα μοσχεύματα της ομάδας Γ (η=20), ύστερα από 24 h ψυχρής συντήρησης (σειρά Ι), η χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης ανέδειξε φυσιολογική αρχιτεκτονική, εκτός από μία ελαφριά διάταση των κεντρολοβιακών φλεβών (Εικόνα Ε/Γ2.3). Επιπλέον, η ανοσοϊστοχημική χρώση αποκάλυψε διατήρηση της υαλουρονάνης (Εικόνα Ε/Γ2.4) στα μοσχεύματα της ομάδας Γα' (η= 10) και πλήρη εξάλειψη του πολυσακχαρίτη (Εικόνα



**Εικόνα Ε/Γ2.4:** Ιστοτεμάχιο ηπατικού μοσχεύματος της ομάδας Γα' πριν την επαναιμάτωσή του (σειρά Ι). Ο καφέ χρωματισμός δεικνύει την ύπαρξη υαλουρονάνης στις αναμενόμενες θέσεις.

Ε/Γ2.5) στα μοσχεύματα της ομάδας Γβ' (n=10).



**Εικόνα Ε/Γ2.5:** Ιστοτεμάχιο ηπατικού μοσχεύματος της ομάδας Γβ' πριν την επαναιμάτωσή του (σειρά Ι). Αν και χρησιμοποιήθηκε η σχετική ειδική ανοσοϊστοχημική χρώση, δεν έγινε δυνατή η ανίχνευση υαλουρονάνης (απουσία καφέ χρωματισμού).

Κατά την οπτική μικροσκόπηση ιστικών τομών από όλα τα μοσχεύματα της ομάδας Γ (η=20), ύστερα από την επαναιμάτωσή τους (σειρά ΙΙ), η χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης ανέδειξε (χωρίς ιδιαίτερες αποκλίσεις ανάμεσα στα μοσχεύματα) διάταση των κολποειδών στη ζώνη Ι (Εικόνα Ε/Γ2.6), ερυθροκυταρική στάση, ήπια εναπόθεση εωσινόφιλης ουσίας και ελαφρά ηπατοκυτταρική ατροφία. Επιπλέον, η ανοσοϊστοχημική χρώση αποκάλυψε ευρήματα όμοια με αυτά της σειράς Ι.



**Εικόνα Ε/Γ2.6:** Ιστοτεμάχιο ηπατικού μοσχεύματος της ομάδας Γβ2' μετά την επαναιμάτωσή του (σειρά ΙΙ). Η χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης δεικνύει ήπια διάταση των κολποειδών, ερυθροκυταρική στάση και ήπια εναπόθεση εωσινόφιλης ουσίας.

Κατά την οπτική μικροσκόπηση ιστικών τομών από όλα τα μοσχεύματα της ομάδας Γβ2' (η=4), κατά τη 14η μετεγχειρητική ημέρα η χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης ανέδειξε φυσιολογική αρχιτεκτονική (Εικόνα Ε/Γ2.7). Επιπλέον, η ανοσοϊστοχημική χρώση αποκάλυψε την εμμένουσα απουσία ιστικής υαλουρονάνης.



**Εικόνα Ε/Γ2.7:** Ιστοτεμάχιο ηπατικού μοσχεύματος της ομάδας Γβ2', 14 ημέρες μετά την επέμβαση (σειρά III). Η χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης δεικνύει τη φυσιολογική αρχιτεκτονική του οργάνου.

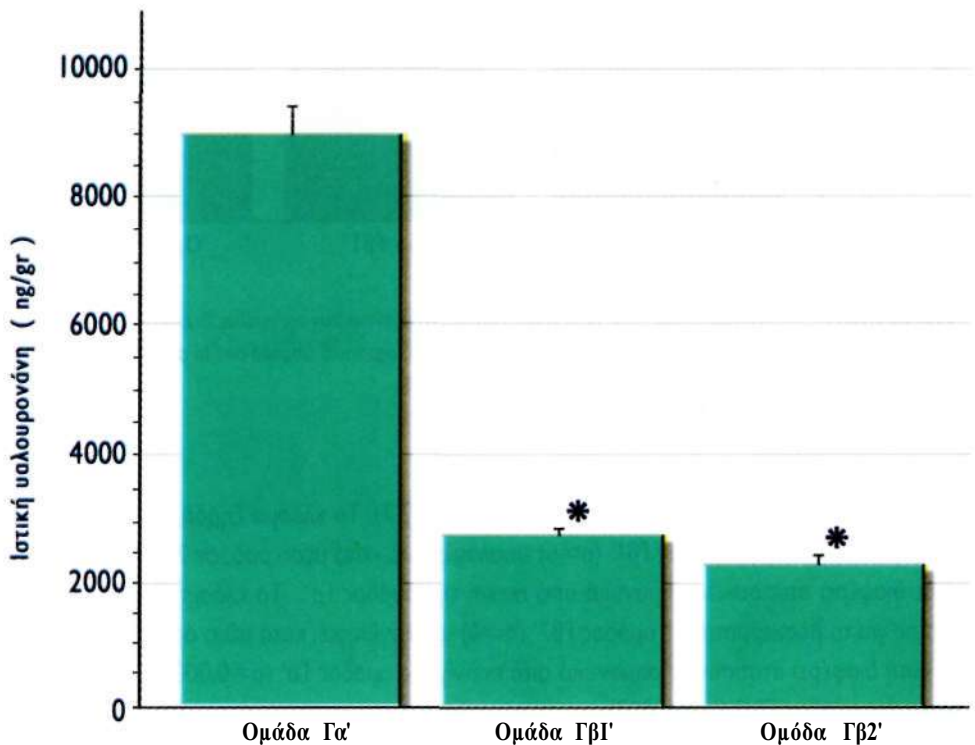
Πείραμα	Ιστική υαλουρονάνη (ng/gr)	Ξηρό βάρος τεμαχίου (gr)	Υγρό βάρος τεμαχίου (gr)	Ξηρό/Υγρό βάρος (%)
Γα' 1	10800	6.06	1.46	24.09
Γα' 2	6360	4.59	1.07	23.31
Γα' 3	8896	2.94	0.71	24.15
Γα' 4	7394	2.17	0.54	24.88
Γα' 5	9449	3.49	0.78	22.35
Γα' 6	8253	3.37	0.74	21.96
Γα' 7	10750	3.66	0.83	22.68
Γα' 8	8763	3.22	0.71	22.05
Γα' 9	7982	3.63	0.85	23.42
Γα' 10	10750	3.95	0.91	23.04
Γβ1' 1	2281	2.93	0.69	23.55
Γβ1' 2	2221	2.91	0.70	24.05
Γβ1' 3	2159	2.31	0.57	24.68
Γβ1' 4	2714	3.34	0.86	25.75
Γβ1' 5	2510	1.00	0.24	24.00
Γβ1' 6	2379	1.30	0.32	24.62
Γβ2' 1	2454	1.93	0.49	25.39
Γβ2' 2	2367	2.84	0.77	27.11
Γβ2' 3	1794	2.97	0.92	30.98
Γβ2' 4	2015	2.59	0.79	30.50

**Πίνακας Ε/Γ2.4:** Συγκέντρωση ιστικής υαλουρονάνης (ng/gr Ξηρού βάρους ήπατος), Ξηρό βάρος ήπατος (gr) υγρό βάρος ήπατος (gr) και ποσοστό Ξηρού προς υγρό βάρος ήπατος (%). Τα μεγέθη μετρήθηκαν σε ιστικά τεμάχια των μοσχευμάτων της ομάδας Γ.



## ε. Ποσοτική μέτρηση ιστικής υαλουρονάνης μοσχευμάτων

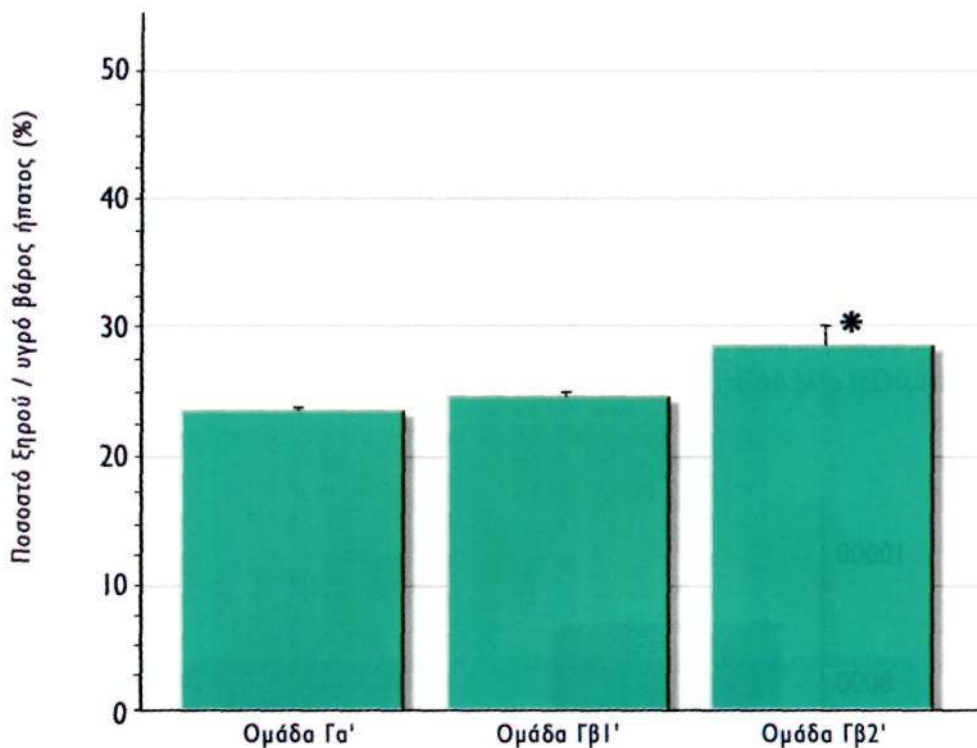
Η ιστική ποσότητα υαλουρονάνης για τα μοσχεύματα της ομάδας Γα' (η=10) υπολογίστηκε, κατά μέσο όρο, σε 8939,7 ng/gr (0,00896%) ξηρού βάρους ήπατος (Πίνακας Ε/Γ2.4, Γράφημα Ε/Γ2.6). Η ιστική ποσότητα του πολυσακχαρίτη για τα μοσχεύματα της ομάδας Γβ1' (η=6) υπολογίστηκε, κατά μέσο όρο, σε 2377,33 ng/gr (0,00238%) ξηρού βάρους ήπατος. Η τιμή αυτή διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από εκείνη της ομάδας Γα' ( $\rho=0,0264$ ). Η ιστική ποσότητα υαλουρονάνης για τα μοσχεύματα της ομάδας Γβ2' (η=4) υπολογίστηκε, κατά μέσο όρο, σε 2157,5 ng/gr (0,00218%) ξηρού βάρους ήπατος. Η τιμή αυτή διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από εκείνη της ομάδας Γα' ( $\rho=0,0425$ ) αλλά όχι από εκείνη της ομάδας Γβ1'.



**Γράφημα Ε/Γ2. 6:** Συγκέντρωση ιστικής υαλουρονάνης (ng/gr ξηρού βάρους ήπατος) μοσχευμάτων της ομάδας Γ. Δεικνύεται το τυπικό σφάλμα της στατιστικής επεξεργασίας. Ο αστερίσκος (\*) συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά από το αποτέλεσμα της ομάδας Γα' ( $\rho<0,005$ ).

## στ. Οίδημα μοσχευμάτων

Το κλάσμα ξηρό/υγρό βάρος ήπατος για τα μοσχεύματα της ομάδας Γα' (η= 10) υπολογίστηκε, κα-



**Γράφημα Ε/Γ2.7:** Ποσοστό Ξηρού προς υγρό βάρους ήπατος (%) μοσχευμάτων της ομάδας Γ. Δεικνύεται το τυπικό σφάλμα της στατιστικής επεξεργασίας. Ο αστερίσκος (\*) συμβολίζει στατιστικά σημαντική διαφορά από τα αποτελέσματα των ομάδων Γα' και Γβ1' ( $p < 0,005$ ).

τά μέσο όρο, σε 23,19% (Πίνακας Ε/Γ2.4, Γράφημα Ε/Γ2.7). Το κλάσμα ξηρό/υγρό βάρους ήπατος για τα μοσχεύματα της ομάδας Γβ1' ( $n=6$ ) υπολογίστηκε, κατά μέσο όρο, σε 24,44%. Η τιμή αυτή δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από εκείνη της ομάδας Γα'. Το κλάσμα ξηρό/υγρό βάρους ήπατος για τα μοσχεύματα της ομάδας Γβ2' ( $n=4$ ) υπολογίστηκε, κατά μέσο όρο, σε 28,5%. Η τιμή αυτή διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από εκείνη της ομάδας Γα' ( $p=0,0001$ ), καθώς και από εκείνη της ομάδας Γβ1' ( $p=0,0003$ ).

## **ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

## A. ΤΕΧΝΙΚΗ ΕΝΟΣ ΑΤΟΜΟΥ

Κοινό σημείο όλων των τεχνικών ορθοτοπικής ηπατικής μεταμόσχευσης σε αρουραίους[16, 164, 166, 167] αποτελεί η αναγκαιότητα δύο ατόμων για τη διενέργεια της επέμβασης. Οι δύο πειραματιστές που απαιτούνται αποτελούσε αιτία περιορισμού της ευρείας εφαρμογής της, ιδιαίτερα σε χώρες με ανεπάρκεια εξειδικευμένου προσωπικού, όπως η Ελλάδα. Για το λόγο αυτό η τεχνική τροποποιήθηκε ώστε η επέμβαση να μπορεί να πραγματοποιηθεί από ένα μόνο άτομο. Οι τροποποιήσεις σχετίζονται με την εγχειρητική τομή, τον καθετηριασμό της πυλαίας φλέβας του δότη, την τοποθέτηση των cuff, την αναστόμωση του χοληδόχου πόρου, την ενυδάτωση του λήπτη και την ακινητοποίηση των εργαλείων που χρησιμοποιούνται στο εγχειρητικό πεδίο.

Η προσπέλαση της περιτοναϊκής κοιλότητας γίνονταν με εγκάρσια, υποπλευρία εγχειρητική τομή, σε αντίθεση με τη συνήθη κάθετη στερνοθηβική τομή[16, 164, 166, 167]. Η εγκάρσια τομή προσφέρει ευκολότερη προσπέλαση στην οπίσθια επιφάνεια του ήπατος, σημείο εξαιρετικά δύσκολο στην παρασκευή, το οποίο απαιτεί την ύπαρξη βοηθού πειραματιστή. Μειονεκτήματα αυτής της τομής αποτελούν η αιμορραγία των άνω επιγαστρικών αγγείων (ελέγχεται με mosquito ή bulldog) και ο μετεγχειρητικός πόνος (ελέγχεται με τη χρήση οπιοειδών αναλγητικών). Επομένως, η εγκάρσια τομή πρέπει να προτιμάται μόνο όταν δεν υπάρχει δεύτερος πειραματιστής.

Ο καθετηριασμός της πυλαίας και η έκπλυση του ήπατος του δότη γίνονταν με τη χρήση αγγειακού καθετήρα, σε αντίθεση με τη συνήθη φλεβοτομή. Αυτή η μέθοδος προσφέρει λιγότερο αιματηρό χειρουργικό πεδίο και επιπλέον ο καθετήρας χρησιμοποιείται στην τοποθέτηση του πυλαίου cuff.

Η τοποθέτηση τόσο του πυλαίου, όσο και του κοιλικού cuff γίνονταν με τη χρήση ενδαγγειακού οδηγού καθετήρα και ειδικής λαβίδας τύπου mosquito, σε αντίθεση με τη συνήθη τεχνική των οδηγών ραμμάτων[16, 167]. Αυτή η μέθοδος αποκλείει τη συστολή της φλέβας, εξοικονομεί μήκος αγγείου (λόγω της απουσίας των οδηγών ραμμάτων) για την τοποθέτηση του cuff και επιπλέον είναι πραγματοποιήσιμη και επαναλήψιμη από ένα μόνο άτομο.

Η αναστόμωση του χοληδόχου πόρου γίνονταν με τη χρήση αλληλοεσφηνούμενων αγγειακών καθετήρων, σε αντίθεση με τη συνήθη τεχνική των χοληδοχοτομών[16, 167] ή της δωδεκαδακτυλικής εμφύτευσης[165, 166]. Αυτή η μέθοδος είναι ταχύτερη και λιγότερο τραυματική από την κλασσική.

Τέσσερα ερωτήματα σχετίζονται με την ενυδάτωση του λήπτη: α) τι είδους υγρό πρέπει να χορηγηθεί; β) πόσο πρέπει να χορηγηθεί; γ) πώς πρέπει να χορηγηθεί; και δ) από πού πρέπει να χορηγηθεί; Όσον αφορά στο πρώτο ερώτημα, με βάση την επικείμενη ηπατική μεταμόσχευση και την παροδική αναστολή της γλυκογονόλυσης και της νεογλυκογένεσης, χορηγήθηκε D5, σε αντί-

θέση με τα κολλοειδή που συνήθως χορηγούνται[16, 164, 166, 167]. Όσον αφορά στο δεύτερο ερώτημα, η ποσότητα κρυσταλλοειδούς σε σταδιακή ενδοφλέβια έγχυση που ανέχεται το πειραματόζωο, πριν καταλήξει από πνευμονικό οίδημα και χωρίς να έχει αιμορραγήσει, ανέρχεται σε 1 ml/100 gr βάρους σώματος. Όσον αφορά στο τρίτο ερώτημα, η στάγδην (μικροσταγόνες) έγχυση είναι η καλύτερα ανεκτή από το πειραματόζωο. Εξίσου καλά αποτελέσματα λαμβάνονται και με τις μικρές (0.25 ml), αλλεπάλληλες, bolus εγχύσεις. Τέλος, αναφορικά με το τέταρτο ερώτημα, από τις τρεις θέσεις αγγειακής προσέλασης που δοκιμάστηκαν (σφαγίτιδα, πείκη και μηριαία φλέβα), ασφαλέστερη για ομαλή χορήγηση και με τις λιγότερες επιπλοκές αποδείχθηκε εκείνη από τη μηριαία φλέβα. Να σημειωθεί ότι η ανεπαρκής ενυδάτωση του λήπτη οδηγεί σε αδυναμία ανοχής του υποδιαφραγματικού αποκλεισμού, που εκδηλώνεται με σταδιακή έκπτωση της καρδιοαναπνευστικής λειτουργίας και τελικά θάνατο.

Οι λαβίδες τύπου mosquito και γενικότερα όλα τα εργαλεία που απαιτούσαν συγκεκριμένη τοποθέτηση και σταθερότητα ακινητοποιούνταν σε βάσεις πλαστελίνης. Η χρήση της πλαστελίνης εκμηδένισε πρακτικά την αναγκαιότητα του δεύτερου πειραματιστή.

Το μοντέλο ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό χωρίς την αποκατάσταση της αρτηριακής παροχής του μοσχεύματος. Η έλλειψη αρτηριακής παροχής όχι μόνο δεν επηρεάζει τη λειτουργία του μεταμοσχευμένου ήπατος[14, 15], αλλά αποβαίνει και προς όφελος του[162]. Ωστόσο, δε συμφωνούν όλοι οι ερευνητές με την άποψη αυτή[341, 342]. Στην παρούσα εργασία η μη αποκατάσταση της αρτηριακής ροής δεν προκάλεσε κλινικά προβλήματα για την περίοδο επιβίωσης που μελετήθηκε. Δύο σημαντικές αλλά απώτερες (14 ημέρες μετά την επέμβαση[16]) επιπλοκές της ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος είναι η πνευμονίτιδα και η περιτονίτιδα. Με δεδομένη τη σύντομη μετεγχειρητική πορεία των πειραματοζώων της συγκεκριμένης μελέτης, οι επιπλοκές αυτές δεν παρατηρήθηκαν. Τέλος, τα ιστολογικά ευρήματα είναι παρόμοια με αυτά αντίστοιχων εργασιών που προηγήθηκαν[258, 343].

Συμπερασματικά, η πραγματοποίηση της ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος από ένα άτομο είναι εφικτή και δίνει συγκρίσιμα αποτελέσματα με την αντίστοιχη που απαιτεί δύο πειραματιστές (87% έναντι 83% τεχνικά επιτυχείς επεμβάσεις[16]). Η νέα αυτή προσέγγιση της καθιερωμένης τεχνικής επέτρεψε για πρώτη φορά την επιτυχή χρησιμοποίηση αρουραίων σε πειραματικά πρωτόκολλα ηπατικής μεταμόσχευσης στην Ελλάδα.

## B. ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΜΕ ΥΑΛΟΥΡΟΝΙΔΑΣΗ

Στην Ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους, η μετεγχειρητική επιβίωση ύστερα από μακρά (24 h) ψυχρή συντήρηση του μοσχεύματος σε UW ανέρχεται στο 100%, μόνον εφόσον ο ανηπατικός χρόνος είναι μικρότερος των 14 min. Αν ο ανηπατικός χρόνος είναι από 15 έως 19 min, τότε η μετεγχειρητική επιβίωση κατέρχεται στο 20%[313]. Αν μάλιστα ο ανηπατικός χρόνος υπερβεί τα 20 min, τότε η μετεγχειρητική επιβίωση είναι 0%[344]. Επιπλέον, αν η αρχική έκπλυση του ηπατικού μοσχεύματος διενεργηθεί με RL, ιδιαίτερα μάλιστα όταν αυτό είναι ψυχρό, τότε περιορίζονται οι προστατευτικές ιδιότητες του UW[298]. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις αυτές, οι πειραματικές συνθήκες οι οποίες περιγράφονται στην παρούσα μελέτη (δηλ. 24 h ψυχρής ισχαιμίας, 22 min ανηπατικός χρόνος, αρχική έκπλυση του μοσχεύματος με RL) θεωρούνται ασύμβατες με μετεγχειρητική επιβίωση. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε από τη μηδενική μετεγχειρητική επιβίωση των πειραματοζώων της ομάδας Γα', τα μοσχεύματα της οποίας συντηρήθηκαν για 24 h με ψυχρό, μη εμπλουτισμένο σε υαλουρονιδάση, UW.

Κατά τη συντήρηση του ήπατος καταστρέφεται ένα σημαντικό τμήμα του οργάνου. Η καταστροφή αυτή ευθύνεται για την πρωτοπαθή δυσλειτουργία του μοσχεύματος. Το μέγεθος του κατεστραμμένου τμήματος καθορίζει το αποτέλεσμα της επέμβασης και, αν είναι μεγάλο, οδηγεί σε πρωτοπαθή μη λειτουργία του μοσχεύματος. Κατά τη διαδικασία συντήρησης τα κύτταρα του ηπατικού ιστού καταστρέφονται είτε από μη ανατάξιμη κυτταρική ανοξία είτε από άμεση καταστροφή των κυτταρικών συστατικών. Η μη ανατάξιμη κυτταρική ανοξία παρατηρείται τόσο στη φάση της ισχαιμίας, όσο και στη φάση της επαναιμάτωσης. Η άμεση κυτταρική βλάβη παρατηρείται κυρίως στη φάση της επαναιμάτωσης.

Κατά το στάδιο της ψυχρής ισχαιμίας του ηπατικού μοσχεύματος τα λιγότερο ανθεκτικά κύτταρα εξοιδαίνονται και τελικά καταστρέφονται λόγω της ανοξίας. Από τα υπόλοιπα κύτταρα, όσα βρίσκονται σε αρδευσιμο ιστό θα μεταβούν στο στάδιο της επαναιμάτωσης, ενώ όσα βρίσκονται σε μη αρδευσιμο ιστό θα καταστραφούν εξαιτίας της μη ανατάξιμης κυτταρικής ανοξίας. Τμήματα του ηπατικού μοσχεύματος καθίστανται κατά το στάδιο της ψυχρής ισχαιμίας μη αρδευσιμα εξαιτίας διαταραχών της μικροκυκλοφορίας. Οι διαταραχές αυτές οφείλονται στην αδρανοποίηση πρωτεϊνών όπως οι ιντεγκρίνες, οι οποίες διατηρούν σε τάση το διαμεσοκυττάριο χώρο[177], στην απόφραξη από λιποσταγόνες που προέρχονται από κατεστραμένα ηπατοκύτταρα[178, 344] και στην ενυδάτωση ουσιών του διαμεσοκυττάριου χώρου που συμπεριφέρονται σα γέλη[12, 13].

Ένας αριθμός κυττάρων που εισέρχονται στο στάδιο της επαναιμάτωσης καταστρέφεται ύστερα από την έκθεση στα παραγώματά του ROI. Από τα υπόλοιπα κύτταρα, όσα βρίσκονται σε αρδευόμενο ιστό θα αποτελέσουν το λειτουργικό τμήμα του μοσχεύματος, ενώ όσα βρίσκονται σε μη αρδευόμενο ιστό θα καταστραφούν εξαιτίας της μη ανατάξιμης κυτταρικής ανοξίας. Τμήματα του ηπατικού μοσχεύματος καθίστανται κατά το στάδιο της επαναιμάτωσης μη αρδευόμενα εξαιτίας

διαταραχών της μικροκυκλοφορίας. Οι διαταραχές αυτές οφείλονται σε διαφορετικούς λόγους από εκείνους που ισχύουν κατά την ψυχρή ισχαιμία. Συγκεκριμένα, οφείλονται σε απόφραξη και σε αγγειόσπασμο. Η απόφραξη της μικροκυκλοφορίας σχετίζεται με τα αποπίπτοντα ενδοθηλιακά κύτταρα[179, 180, 182, 183], την αυξημένη προσκολλητικότητα των λευκοκυττάρων[271], την αυξημένη συγκολλητικότητα των αιμοπεταλίων[193] και την αυξημένη πηκτική ικανότητα του αίματος[184]. Ο αγγειόσπασμος σχετίζεται με την αλλαγή του σχήματος των ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, εκλύεται δε με τη διαμεσολάβηση των ROI[ 187, 202, 208, 209], των εικοσανοειδών[242], της ελάτωσης του NO και της αύξησης του ενδοπλασματικού  $Ca^{2+}$ [192].

Το ηπατικό λόβιο δε διαθέτει βασική μεμβράνη. Επιπλέον, το εξωκυττάριο στρώμα του ηπατικού ιστού είναι εξαιρετικά αραιό και αποτελείται κυρίως από φιμπρονεκτίνη και κολλαγόνο. Επιπρόσθετα, το ενδοθήλιο των ηπατικών κολποειδών είναι θυριδωτού τύπου. Η προαναφερόμενη αρχιτεκτονική διαμόρφωση καθιστά δυνατή την *ταχεία* μεταφορά μακρομορίων στο διαμεσοκυττάριο χώρο του ήπατος[335]. Ένα από τα μακρομόρια αυτά είναι η υαλουρονιδάση (μοριακό βάρος παρόμοιο με της αλβουμίνης), η οποία μπορεί να εισέρθει στον εξωκυττάριο χώρο του ήπατος και να αποδομήσει την εκεί υπάρχουσα υαλουρονάνη[21]. Η προαναφερόμενη διείσδυση του ενζύμου μπορεί να πραγματοποιηθεί και με άλλους μηχανισμούς. Το γεγονός αυτό έχει ήδη αποδειχθεί ότι ισχύει στον καρδιακό ιστό[336]. Η υαλουρονιδάση που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη σειρά των πειραμάτων έχει ουδέτερο pH βέλτιστης λειτουργίας[23]. Επιπλέον, η υαλουρονιδάση λειτουργεί καλύτερα σε θερμοκρασίες κοντά στους 37 °C. Οι συνθήκες συντήρησης των μοσχευμάτων σε αυτή τη σειρά των πειραμάτων ήταν το ουδέτερο pH, οι 4 °C και οι 24 h ψυχρής ισχαιμίας. Με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση (στη δράση της υαλουρονιδάσης) της διαφοράς των πραγματικών από τις βέλτιστες συνθήκες συντήρησης πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διάφορες συγκεντρώσεις του ενζύμου στο διάλυμα συντήρησης. Τελικά, δείχθηκε πως η υαλουρονιδάση σε συγκέντρωση 288 NFU/ml διαλύματος επιφέρει τη πλήρη αποδομή της ηπατικής υαλουρονάνης. Μάλιστα, στη συγκεκριμένη συγκέντρωση ενζύμου, ο ιστικός πολυσακχαρίτης είχε ήδη αποδομηθεί από την 6 h της ψυχρής ισχαιμίας. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για να ανιχνευθεί η ιστική υαλουρονάνη (και να μετρηθεί η δράση της υαλουρονιδάσης) ήταν μία ποσοτική και μία ποιοτική. Οι ποσοτική μέθοδος μετρά πολυσακχαρίτη με μοριακή αλυσίδα μακρύτερη των 10 δομικών μονάδων[31]. Οι ποιοτική μέθοδος ανιχνεύει σαφώς μεγαλύτερα μόρια πολυσακχαρίτη[38]. Επομένως, η ποσοτική μέθοδος είναι ακριβέστερη από την ποιοτική για τον προσδιορισμό της υαλουρονάνης.

Η ιστική υαλουρονάνη υπολογίστηκε ότι ανέρχεται στο 0,01% του ξηρού βάρους των ηπατικών μοσχευμάτων της ομάδας Γ' (συντήρηση χωρίς υαλουρονιδάση). Ο υπολογισμός αυτός συμπίπτει με αυτούς άλλων μελετών[20]. Επίσης, ο ιστικός πολυσακχαρίτης υπολογίστηκε ότι ανέρχεται στο 0,0025% του ξηρού βάρους των ηπατικών μοσχευμάτων της ομάδας Γβ' (συντήρηση με υαλουρονιδάση). Επομένως, η χρήση του ενζύμου οδήγησε σε μείωση της ιστικής υαλουρονάνης κατά 75%. Αύξηση της συγκέντρωσης της υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης δεν οδήγη-

σε σε περεταίρω μείωση του ιστικού πολυσακχαρίτη. Πιθανότατα, το υπολοιπόμενο 25%, περιβαλλόμενο σε μεγάλο βαθμό από τα υπόλοιπα συστατικά του εξωκυττάριου στρώματος, καθίσταται απροσπέλαστο για το ένζυμο. Επιπλέον, το υπολοιπόμενο 25%, δεν μπορεί να είναι ήδη καταβολισμένη (μικρομοριακή) υαλουρονάνη, η οποία μετράται από τις μεθόδους ανίχνευσης του πολυσακχαρίτη. Αυτό ισχύει γιατί η υαλουρονιδάση που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας μελέτης καταβολίζει τη υαλουρονάνη σε δι-, τετρα-, εξα- και οκτασακχαρίτες, το μοριακό μέγεθος των οποίων δεν επιτρέπει την ανίχνευση τους τόσο από τις ποσοτικές[31], όσο και από τις ποιοτικές[38] μεθόδους. Η απουσία στατιστικώς σημαντικής διαφοράς *ανάμεσα* στην ομάδα Γβ1' (αποβιώσαντες) και στην ομάδα Γβ2' (επιβιώσαντες) της ομάδας Γβ' (συνήρηση με υαλουρονιδάση) δηλώνει πως η ύπαρξη περιαγγειακής υαλουρονόνης δεν είναι ο μόνος παράγοντας που οδηγεί στην ανάπτυξη πρωτοπαθούς δυσλειτουργίας του ηπατικού μοσχεύματος.

Η υαλουρονιδάση χρησιμοποιήθηκε και σε μελέτες συντήρησης καρδιακών μοσχευμάτων[336]. Η ιστική υαλουρονάνη στον καρδιακό ιστό είναι 50 φορές περισσότερη από αυτή που υπάρχει στον ηπατικό ιστό[21]. Ο περιορισμένος χρόνος ανοχής του καρδιακού μοσχεύματος σε συνθήκες ψυχρής ισχαιμίας (4 h) πιθανότατα σχετίζεται με την υψηλή συγκέντρωση ιστικής υαλουρονόνης και επομένως με την ανάπτυξη εκτεταμένου εξωκυττάριου οιδήματος συντήρησης[336]. Συγκριτικό, όργανα με μικρότερη περιεκτικότητα σε υαλουρονάνη (π.χ. ήπαρ, νεφρός) ανέχονται μεγαλύτερους χρόνους ψυχρής ισχαιμίας[8, 20]. Η προσθήκη υαλουρονιδόσης στο διάλυμα συντήρησης του καρδιακού μοσχεύματος μειώνει την ιστική υαλουρονάνη κατά 20%[21]. Η μεγάλη διαφορά που παρατηρείται στη μείωση του πολυσακχαρίτη *ανάμεσα* στον ηπατικό (75%) και στον καρδιακό (20%) ιστό σχετίζεται με την ύπαρξη ενδοθηλίου θυριδωτού τύπου στον πρώτο και επομένως την ευχερέστερη είσοδο του ενζύμου στο εξωκυττάριο στρώμα του ήπατος. Η διαφορά αυτή δεν μπορεί να αποδοθεί σε διαφορετική ενζυμική δραστηριότητα. Αυτό ισχύει, γιατί, όπως και στην περίπτωση των ηπατικών μοσχευμάτων, αύξηση της συγκέντρωσης της υαλουρονιδόσης στο διάλυμα συντήρησης των καρδιακών μοσχευμάτων δεν οδήγησε σε περεταίρω μείωση της ιστικής υαλουρονόνης.

Το γεγονός ότι υπάρχει όριο στην αποτελεσματικότητα του ενζύμου να καταβολίζει τον ιστικό πολυσακχαρίτη (έστω και σε 67πλάσιες συγκεντρώσεις) έχει επιβεβαιωθεί και από μελέτες σε άλλους ιστούς (γραμμωτός μυς[13]).

Η ενεργότητα της υαλουρονιδόσης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας μελέτης ανέρχονταν σε 360 NFU/mg. Η ενεργότητα της χρωματογραφικά κεκαθαρισμένης, ίδιας προέλευσης υαλουρονιδόσης ανέρχεται σε 15000 NFU/mg. *Ανάμεσα* στις προσμίξεις της υαλουρονιδόσης που χρησιμοποιήθηκε συγκαταλλέγονται και μικροποσότητες άλλων δραστικών ενζύμων[145] (π.χ. κολλαγενάσες, θειικές χονδροϊτινάσες, κ.τ.λ.). Η ιστική υαλουρονάνη επεκτείνεται όταν ενυδατώνεται[21, 24] (εξωκυττάριο, περιαγγειακό οίδημα). Η επέκταση του πολυσακχαρίτη παράγει έργο το οποίο αποθηκεύεται με τη μορφή δυναμικής ενέργειας στο συσφασμένο με την υαλουρονάνη, διατεινόμενο δίκτυο κολλαγόνου[337-339]. Ο καταβολισμός της υαλουρονόνης επιτρέπει



την αφυδάτωση του διαμεσοκυτταρίου χώρου και την επιστροφή του στην προοιδηματική αρχιτεκτονική διαμόρφωση. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ίνες του κολλαγόνου συσπώνται χρησιμοποιώντας την αποθηκευμένη δυναμική ενέργεια[90]. Επομένως, η καταστροφή του κολλαγόνου δικτύου επιφέρει ιστολογική αποδιοργάνωση και φυσιολογική δυσλειτουργία. Η διαταραχή του κολλαγόνου δικτύου επέρχεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συνήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων, εξαιτίας της ταυτόχρονης αύξησης της συγκέντρωσης των προσμίξεων του ενζύμου. Στο φαινόμενο αυτό οφειλόνταν οι αλλοιώσεις της ιστικής μορφολογίας του ήπατος που παρατηρήθηκαν στα πειράματα της παρούσας μελέτης, όταν η συγκέντρωση της υαλουρονιδάσης ήταν μεγαλύτερη από 288 NFU/ml.

Ύστερα από τις 24 h ψυχρής ισχαιμίας, η περιεκτικότητα σε νερό των μοσχευμάτων της ομάδας Γβ2' (συνήρηση με υαλουρονιδάση, επιβίωσαντες) ήταν στατιστικώς μικρότερη από εκείνη των μοσχευμάτων της ομάδας Γβ1' (συνήρηση με υαλουρονιδάση, αποβίωσαντες) και της ομάδας Γα' (συνήρηση χωρίς υαλουρονιδάση). Επιπλέον, δεν υπήρχε στατιστικώς σημαντική διαφορά ανάμεσα στην αφυδάτωση των μοσχευμάτων της ομάδας Γβ1' και της ομάδας Γα'. Εφόσον η αποδομή της ιστικής υαλουρονάνης ήταν εξίσου αποτελεσματική στις ομάδες ΓβΓ και Γβ2', η αυξημένη κατακράτηση νερού από την ομάδα Γβ1' δε σχετίζεται με εξωκυττάριο οίδημα αλλά με οίδημα των ήδη κατεστραμμένων κυττάρων του ηπατικού ιστού (*οίδημα* κυτταρικού θανάτου). Αυτή η εκτεταμένη κυτταρική καταστροφή ευθύνεται και για την πρωτοπαθή μη λειτουργία των μοσχευμάτων που παρατηρείται στην ομάδα Γβ1' των πειραματοζώων. Τέλος, η πρωτοπαθής μη λειτουργία των ηπατικών μοσχευμάτων της ομάδας Γα' σχετίζεται με την ανάπτυξη εξωκυτταρίου και κυτταρικού (λόγω καταστροφής) οιδήματος.

Το βάρος των ηπατικών μοσχευμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν 14 gr κατά μέσο όρο. Η τιμή αυτή είναι σύμφωνη με τις τιμές υγρού βάρους ήπατος που έχουν δημοσιευθεί στο παρελθόν για αρουραίους βάρους 400 gr[345] (μέσο σωματικό βάρος των πειραματοζώων της παρούσας μελέτης). Αναφορικά με την ομάδα Γα', το ξηρό βάρος ήπατος υπολογίστηκε ότι ανέρχεται, κατά μέσο όρο, στο 23% του υγρού. Επίσης, το ποσό της ιστικής υαλουρονάνης ανέρχεται, κατά μέσο όρο, για τη μεν ομάδα Γα' στο 0,01% του ξηρού βάρους του ήπατος, για τη δε ομάδα β στο 0,0025% του ξηρού βάρους του οργάνου. Με απλό υπολογισμό προκύπτει ότι, στα πειράματα της παρούσας μελέτης, απομακρύνθηκαν, κατά μέσο όρο, 25000 ng υαλουρονάνης από κάθε ηπατικό μόσχευμα.

Τα πειραματοζώα της ομάδας Γα' και της ομάδας Γβ1' απεβίωσαν εξαιτίας πρωτοπαθούς μη λειτουργίας του μοσχεύματος, φαινόμενο που σχετίζεται με μη αναστρέψιμη βλάβη των παρεγχυματικών και των μη παρεγχυματικών κυττάρων του ήπατος. Επιπλέον, η υαλουρονάνη του ορού των πειραματοζώων της ομάδας Γα' είναι χαμηλότερη κατά 170 ng/ml (στατιστικώς σημαντική διαφορά) από εκείνη της ομάδας Γβ1', 10 min μετά την επαναϊμάτωση. Εφόσον έχει καταστραφεί ο καταβολικός μηχανισμός του πολυσακχαρίτη στο *αίμα* (ενδοθηλιακά κύτταρα των κολλοειδών) τόσο στην ομάδα Γα' όσο και στην ομάδα Γβ1', η προαναφερόμενη στατιστικώς σημαντική διαφορά

του επιπέδου υαλουρονάνης στον ορό οφείλεται στους παραγωγικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, είναι δυνατόν τμήμα της αποδομημένης ιστικής υαλουρονάνης στα ηπατικά μοσχεύματα της ομάδας Γβ1' να παραμένει στο διάλυμα έκπλυσης. Η ποσότητα αυτή του πολυσακχαρίτη εισέρχεται στην αιματική κυκλοφορία κατά την επαναιμάτωση. Ο μηχανισμός αυτός δεν υφίσταται στην περίπτωση της ομάδας Γα' (συντήρηση χωρίς υαλουρονιδάση). Ένα πειραματόζωο βάρους 400 gr διαθέτει 14 ml ορού[346]. Με απλό υπολογισμό προκύπτει ότι 10 min μετά την επαναιμάτωση ο ορός των πειραματοζώων της ομάδας Γβ1' περιέχει συνολικά 2500 ng υαλουρονάνης περισσότερα από τον ορό των πειραματοζώων της ομάδας Γα'. Συμπερασματικά, το 10% της ήδη αποδομημένης ιστικής υαλουρονάνης παραμένει στο διάλυμα έκπλυσης, για να εισέλθει τελικά στην αιματική κυκλοφορία του λήπτη μετά την επαναιμάτωση του μοσχεύματος.

Η υαλουρονάνη του ορού των πειραματοζώων της ομάδας Γβ2' (λειτουργούντα ενδοθηλιακά κύτταρα των κολποειδών) ανέρχεται, κατά μέσο όρο, σε 250 ng/ml, 10 min μετά την επαναιμάτωση. Γνωρίζοντας ότι η κατά την επαναιμάτωση φόρτιση του πολυσακχαρίτη υπολογίζεται σε 2500 ng (650 ng/ml), προκύπτει ότι ο άμεσος μετεγχειρητικός χρόνος ημίσειας ζωής της υαλουρονάνης στο αίμα των μεταμοσχευμένων αρουραίων βάρους 400 gr είναι 6 min. Σε φυσιολογικούς αρουραίους βάρους 400 gr η προαναφερόμενη φόρτιση των 2500 ng πολυσακχαρίτη (650 ng/ml) καθαίρεται από το αίμα σε 6 min, καθώς η φυσιολογική τιμή της υαλουρονάνης στον ορό είναι 40 ng/ml και ο κανονικός χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 15 λεπτό[79]. Η παρατηρούμενη μερική ανικανότητα των ενδοθηλιακών κολποειδών κυττάρων του ηπατικού μοσχεύματος να απομακρύνουν τον κυκλοφορούντα πολυσακχαρίτη έχει περιγραφεί και στο παρελθόν από μερικούς[24, 125, 137] αλλά όχι από όλους[129] τους ερευνητές που ασχολήθηκαν με το συγκεκριμένο αντικείμενο.

Η υαλουρονάνη του ορού μπορεί να θεωρηθεί πιο αξιόπιστος δείκτης βιωσιμότητας του ηπατικού μοσχεύματος από τους ήδη υπάρχοντες. Αυτό ισχύει γιατί η συγκέντρωση της στο αίμα του λήπτη μειώνεται ταχύτατα (χρόνος ημίσειας ζωής 6 min) ύστερα από μία επιτυχημένη ηπατική μεταμόσχευση. Αντίθετα, η οξαλοξική αμινοτρανσφεράση, η πυροσταφυλική αμινοτρανσφεράση, η αλκαλική φωσφατάση, η ολική χολερυθρίνη, τα λευκώματα και η αλβουμίνη παρουσιάζουν μεταβολές μετά την 1 η μετεγχειρητική ημέρα της επιτυχημένης ηπατικής μεταμόσχευσης[193].

Η υαλουρονάνη του ηπατικού ιστού εντοπίστηκε περιαρτηριακά, περιφλεβικά και περιχολαγγειακά. Η ύπαρξη του περιαγγειακού πολυσακχαρίτη βοηθά στην αγγείωση του ήπατος είτε κατά το εμβρυϊκό στάδιο (οργανογένεση[335]) είτε αργότερα (ηπατική αναγέννηση[67]). Η ύπαρξη της περιχολαγγειακής υαλουρονάνης σχετίζεται με την αφυδάτωση της χολής. Παρόμοιος μηχανισμός υδατικής επαναρρόφησης έχει περιγραφεί στα αθροιστικά σωληνάρια του νεφρού[23, 347]. Η απομάκρυνση της υαλουρονάνης του ηπατικού ιστού υπήρξε πολύ αποτελεσματική (75% του συνολικού ιστικού πολυσακχαρίτη) στα πειράματα της παρούσας μελέτης. Η ποσοτική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της υαλουρονάνης ήταν εξαιρετικά ευαίσθητη[31]. Το ίδιο ισχύει και για την ποιοτική μέθοδο[38]. Τα ηπατικά λιποαποθηκευτικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή όλων των γλυκοζαμινογλυκανών του ηπατικού ιστού[348]. Στην παρούσα μελέτη

δε διερευνήθηκε αν τα προαναφερόμενα κύτταρα ενεργοποιούνται σε δεύτερο χρόνο με σκοπό να ξανασηματίσουν την αποδομημένη υαλουρονάνη του ηπατικού μοσχεύματος. Θεωρητικά πάντως, ύστερα από κατάλληλη ενεργοποίηση[67, 349], τα ηπατικά λιποαποθηκευτικά κύτταρα είναι δυνατό να παράγουν (in vitro) τεράστιες ποσότητες του πολυσακχαρίτη (περίπου 650000 ηg την ημέρα). Τέλος, τα ευρήματα της οπτικής μικροσκόπησης (χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης) ιστικών τεμαχίων από λειπουργούντα και μη λειπουργούντα ηπατικά μοσχεύματα είναι σύστοιχα με αυτά προηγούμενων μελετών[343].

Η προσθήκη υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων προάγει σαφώς την επιβίωση στην Ορθοτοπική Ισομεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους. Η βελτίωση της λειτουργίας του μοσχεύματος οφείλεται στον περιορισμό του περιαγγειακού οιδήματος που αναπτύσσεται κατά την συντήρηση του ήπατος. Ωστόσο, πριν εφαρμοσθεί στην κλινική πράξη η προσθήκη του ενζύμου στο διάλυμα συντήρησης, πρέπει να απαντηθεί μία σειρά ερωτημάτων. Δε γνωρίζουμε αν η αποδόμηση της ιστικής υαλουρονάνης επιταχύνει (απώλεια μηχανικής προστασίας[35]) ή επιβραδύνει (προαγωγή του χειμερισμού[350, 351]) την απόρριψη του ηπατικού μοσχεύματος. Επίσης, δε γνωρίζουμε αν η χρήση κεκαθαρμένης υαλουρονιδάσης αποτρέπει τη διαταραχή της αρχιτεκτονικής του ηπατικού ιστού που παρατηρείται στις υψηλές ενζυμικές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, δε γνωρίζουμε αν ξανασηματίζεται η αποδομημένη υαλουρονάνη του ηπατικού μοσχεύματος, αν η χρήση υαλουρονιδάσης προάγει τη λειτουργία μοσχευμάτων που επιδεικνύουν υψηλά ποσοστά πρωτοπαθούς δυσλειτουργίας (λιπώδη ήπατα), αν ο καταβολισμός του περιχολαγγειακού πολυσακχαρίτη οδηγεί στην παραγωγή υδαρούς χολής και αν η υαλουρονιδάση είναι σε δεύτερο χρόνο επιβλαβής για το ηπατικό μόσχευμα. Πάντως, η μέθοδος συντήρησης του ήπατος που περιγράφεται στην παρούσα μελέτη θα επιτρέψει τον ευχερή πειραματισμό σχετικά με το εξωκυττάριο, περιαγγειακό οίδημα που αναπτύσσεται κατά την ισχαιμία και την επαναιμάτωση του οργάνου στην Ορθοτοπική Ισομεταμόσχευση σε αρουραίους.

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο αρουραίος θεωρείται το καλύτερο πειραματόζωο για τη μελέτη της ανοσολογίας των μεταμοσχεύσεων. Ωστόσο, η συγκεκριμένη επέμβαση είναι τεχνικό δύσκολη. Για το λόγο αυτό η Ορθοτοπική μεταμόσχευση ήπατος σε αρουραίους δεν αποτελεί ευρέως διαδεδομένο πειραματικό πρότοκολλο. Η χρήση των cuff στις αγγειακές και χολαγγειακές αναστομώσεις έλυσε ορισμένα από τα τεχνικά προβλήματα και βελτίωσε την καμπύλη επιβίωσης των ληπτών.

Στο εξωκυττάριο στρώμα του ήπατος η υαλουρονάνη εδράζεται περιαγγειακά και περιχολαγγειακά. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενυδάτωσης του διαμεσοκυττάρου χώρου. Η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κολποειδών κυττάρων και οι διαταραχές της μικροκυκλοφορίας ευθύνονται για την πρωτοπαθή μη λειτουργία των ηπατικών μοσχευμάτων. Με βάση τα προαναφερόμενα, γίνεται η υπόθεση πως η εξάλειψη του ιστικού πολυσακχαρίτη θα μειώσει το εξωκυττάριο οίδημα και επομένως θα βελτιώσει τη λειτουργία του οργάνου.

Στην παρούσα μελέτη περιγράφονται διάφορες μετατροπές της ισχύουσας τεχνικής της ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος σε αρουραίους. Σχετίζονται με την εγχειρητική τομή, τον καθετηριασμό της πυλαίας φλέβας, την τοποθέτηση των cuff, τη χολαγγειακή αναστόμωση, την ενυδάτωση του λήπτη και τη σταθεροποίηση των χειρουργικών εργαλείων. Για την καθιέρωση της τεχνικής πραγματοποιήθηκαν 70 μεταμοσχεύσεις.

Επιπλέον, 18 ήπατα συντηρήθηκαν σε UW εμπλουτισμένο με διάφορες συγκεντρώσεις υαλουρονιδάσης. Στα προαναφερόμενα μοσχεύματα πραγματοποιήθηκαν ποσοτικές και ποιοτικές μετρήσεις της ιστικής υαλουρονάνης. Ως ιδανική συγκέντρωση του ενζύμου καθορίστηκε η 144 NFU/ml. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκαν 20 μεταμοσχεύσεις ήπατος με ή χωρίς τη χρήση υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης. Καταγράφηκαν η επιβίωση των ληπτών, οι ποσοτικές και ποιοτικές μετρήσεις του ιστικού πολυσακχαρίτη και οι δείκτες βιωσιμότητας των μοσχευμάτων.

Η εφαρμογή των τεχνικών τροποποιήσεων οδήγησε στην πραγματοποίηση των ορθοτοπικών μεταμοσχεύσεων ήπατος στους αρουραίους από ένα, μόνο, πειραματιστή. Όσον αφορά στις 23 τελευταίες μεταμοσχεύσεις, 20 (87%) από αυτές θεωρήθηκαν τεχνικά επιτυχημένες. Ο μέσος επεμβατικός χρόνος ήταν 240 min. Συγκεκριμένα, η λήψη, η τοποθέτηση των cuff και η τοποθέτηση διαρκούσαν, κατά μέσο όρο, 75, 30 και 135 min αντίστοιχα. Η μέση διάρκεια της ανηπατικής φάσης ήταν 22 min.

Επιπλέον, η προσθήκη υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων οδήγησε στην εξάλειψη της ιστικής υαλουρονάνης. Συγκεκριμένα, απομακρύνονταν το 75% του ιστικού πολυσακχαρίτη, γεγονός που οδήγούσε σε αύξηση του ξηρού μοσχευματικού βάρους από 1,2 έως 5,3%. Κάτω από τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, η επιβίωση των ληπτών αυξήθηκε από

Ο σε 40%. Τα επίπεδα της υαλουρονάνης του ορού, 10 min μετά την επαναιμάτωση, προέβλεπαν την έναρξη πρωτοπαθούς μη λειτουργίας του μοσχεύματος. Οι άλλοι δείκτες βιωσιμότητας του οργάνου δεν ήταν εξίσου ευαίσθητοι. Οι ποιοτικές μέθοδοι ανίχνευσης της υαλουρονάνης απεκάλυπταν πλήρη απομάκρυνση του περιαγγειακού και περιχολαγγειακού πολυσακχαρίτη, κάθε φορά που προστίθονταν υαλουρονιδάση στο διάλυμα συντήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων.

Η πραγματοποίηση ορθοτοπικής μεταμόσχευσης ήπατος σε αρουραίους είναι εφικτή από ένα, μόνο, πειραματιστή, εφόσον ο τελευταίος διαθέτει ικανή εμπειρία. Αυτή η τεχνική προσέγγιση επέτρεψε την εφαρμογή της προαναφερόμενης επέμβασης σε ερευνητικά πρωτόκολλα για πρώτη φορά στην Ελλάδα.

Διερευνήθηκε η δυνατότητα εξάλειψης της περιαγγειακής υαλουρονάνης με τη χρήση υαλουρονιδάσης στο διάλυμα συντήρησης των ηπατικών μοσχευμάτων. Η απομάκρυνση του ιστικού πολυσακχαρίτη οδήγησε στη μείωση του εξωκυττάριου, περιαγγειακού οιδήματος συντήρησης, στη μείωση των διαταραχών της μικροκυκλοφορίας και επομένως στη βελτίωση της λειτουργίας του οργάνου.

# SUMMARY

Rat is considered to be the best laboratory animal for the study of organ transplantation related immunological topics. However, orthotopic rat liver transplantation is a technically difficult operation. This is the reason why this experimental procedure is not widely applied. Cuff usage in vascular and biliary anastomoses resolved some of the surgical problems and improved transplanted rat survival.

HYA, is located perivascularly and periductally in the ECM of liver. It plays an important role in regulating interstitial hydration. SEC impairment and liver microcirculatory disturbances are responsible for graft PNF after transplantation. It is assumed that liver tissue HYA elimination could lead to reduction of interstitial edema and therefore enhanced primary graft function.

Modifications of the orthotopic rat liver transplantation experimental procedure are described in the present study. They are related to the surgical incision used, to the catheterization of portal vein, to the cuff implantation technique, to the biliary anastomosis procedure, to the method of rat hydration during operation and finally to the way of holding still the surgical instruments. For the standardization of the new technical approach 70 orthotopic rat liver transplantations were performed.

Furthermore, 18 livers were preserved with UW enriched with HYADASE at various concentrations. Quantity and quality measurements were performed on the preserved grafts. Optimum HYADASE concentration was set to 144 NFU/ml. After that, 20 orthotopic rat liver transplantations were performed using UW  $\pm$  HYADASE. Animal survival rates, quantity and quality measurements and graft viability markers were recorded.

Application of the technical modifications led to an orthotopic rat liver transplantation experimental procedure that requires one technician only. As far as the last 23 operations are concerned, 20 (87%) of them were technically successful. The mean experiment duration was 240 min. Specifically, donor operation, cuff implantation and recipient operation lasted 75, 30 and 135 min respectively. The mean duration of unhepatic phase was 22 min.

Furthermore, liver tissue perivascular HYA was eliminated by the addition of HYADASE to the storage solution. Almost 75% of tissue HYA was removed, which led to an increase of graft dry weight, ranging from 12 to 5.3%. Under the experimental conditions used, animal survival was raised from 0 to 40%. HYA serum levels, 10 min after reperfusion, could predict the onset of PNF. Other serum graft viability markers did not show such early alterations. Liver tissue HYA stainings revealed that perivascular and periductal HYA elimination was successful whenever HYADASE was added to the storage solution.

Orthotopic rat liver transplantation performed by one researcher is not only possible but quite successful too, as long as the technician is experienced enough. This new approach of the old experimental procedure led to the successful use of rats in liver transplantation protocols for the first time in Hellas.

The possibility of eliminating perivascular HYA by preserving rat liver grafts with storage solution enriched with mammalian HYADASE was investigated. Removal of this ECM component led to the reduction of interstitial preservation reperfusion edema with subsequent attenuation of microcirculatory disturbances and therefore improved primary graft function.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## A. ΚΥΡΙΑ

1. Starzl TE, Demetris AJ, Van Thiel D. Liver transplantation (first of two parts). *N Engl J Med.* 1989; 321: 1014-1022.
2. Starzl TE, Demetris AJ, Van Thiel D. Liver transplantation (second of two parts). *N Engl J Med.* 1989; 321: 1092-1099.
3. National Institutes of Health, Consensus Development, Conference Statement: Liver transplantation / June 20 - 23. *Hepatology.* 1983; Suppl: S107-S110.
4. Kakizeo S, Yanaga K, Starzl TE, Demetris AJ. Evaluation of protocol before transplantation and after reperfusion biopsies from human orthotopic liver allografts: Considerations of preservation and early immunological injury. *Hepatology.* 1990; 11: 932-941.
5. Schlitt HJ, Nashan B, Ringe B, Bunzendahl H, Wittekind C, Wonigeit K, Pichlmayr R. Differentiation of liver graft dysfunction by transplant aspiration cytology. *Transplantation.* 1991; 51: 786-792.
6. Rao PN, Bronsther OR, Pinna AD, Snyder JT, Cowan S, Sankey S, Kramer D, et al. Hyaluronate levels in donor organ washout effluents: A simple and predictive parameter of graft viability. *Liver.* 1996; 16: 48-54.
7. Schutz E, Luy-Kaltelleiter M, Kaltelleiter M, Burdelski M, Ringe B, Armstrong VW, Oellensch M. The value of serial determination of MEGX and hyaluronic acid early after orthotopic liver transplantation. *Eur J Clin Invest.* 1996; 26: 907-916.
8. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988; 45: 673-676.
9. Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor BR, Blendis LM, et al. Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E1. *Transplantation.* 1989; 48: 447-453.
10. Todo S, Nevy J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA.* 1989; 261: 711-714.
11. Furukawa H, Todo S, Inventarza O, Wu YM, Scotti C, Day R, Starzl TE. Cold ischemia time vs outcome of human liver transplantation using UW solution. *Transplant Proc.* 1991; 23: 1550-1551.
12. Guyton AC, Granger HJ, Taylor AE. Interstitial fluid pressure. *Physiol Rev.* 1971; 51: 527-563.
13. Diana JN, Flemming B, Laughlin MH, Montag MJ. Effect of hyaluronidase on transcapillary fluid and solute exchange in the isolated dog hindlimb. Στο: Grayson J, Zingg W, eds. *Transport Mechanisms in Disease States, Vol 2.* Plenum, New York. 1976; 84-85.
14. Kamada N, Davies HFFS, Wight D, Culank L, Roser B. Liver transplantation in the rat: Biochemical and histological evidence of complete tolerance induction in non-rejector strains. *Transplantation.* 1983; 35: 304-311.
15. Kamada N, Sumimoto R, Kamada K. The value of hepatic artery reconstruction as a technique in rat liver transplantation. *Surgery.* 1992; 111: 195-200.
16. Kamada N, Calne RY. Orthotopic transplantation in the rat. *Transplantation.* 1979; 28: 47-50.
17. Laurent TC, Fraser JRE. Hyaluronan. *FASEB J.* 1992; 6: 2397-2404.
18. Sherman L, Sleeman J, Herrlich P, Ponta H. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 1994; 6: 726-733.
19. Shaw M, Schy A. Exclusion in hyaluronate gels. *Biophys J.* 1977; 17: 47-55.
20. Reed RK, Lijja K, Laurent TC. Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiol Scand.* 1988; 134: 405-411.
21. Sunnergren KP, Rovetto MJ. The effects of hyaluronidase on interstitial hydration, plasma protein exclusion, and microvascular permeability in the isolated perfused rat heart. *Microvasc Res.* 1985; 30: 286-297.
22. Kreil G. Hyaluronidases: A group of neglected enzymes. *Protein Sci.* 1995; 4: 1666-1669.
23. Frost GI, Csoka T, Stern R. The hyaluronidases: A chemical, biological and clinical overview. *Trends Glycosci Glucotec.* 1996; 8: 419-434.
24. Imamura H, Brauk A, Huet P-M. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology.* 1997; 25: 664-671.
25. Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem.* 1934; 107: 629-634.
26. Meyer K. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol Rev.* 1947; 27: 335-357.
27. Balazs EA, Laurent TC, Jeanloz RW. Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochem J.* 1985; 903.
28. Jeanloz RW. The nomenclature of mucopolysaccharides. *Arthr Rheum.* 1960; 3.
29. Muir H. The nature of the link between protein and carbohydrate of a chondroitin sulphate complex from hyaline cartilage. *Biochem J.* 1958; 69: 195-204.
30. Brimacombe JS, Webber JM. *Mucopolysaccharides.* Amsterdam, Elsevier. 1964.
31. Tengblad A. Quantitative analysis of hyaluronate in nanogram amounts. *Biochem J.* 1980; 185: 101-105.
32. Laurent UBG, Laurent TC. On the origin of hyaluronate in blood. *Biochem Int.* 1981; 2: 195-199.
33. Smedsrod B. Cellular events in the uptake and degradation of hyaluronan. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1991; 7: 265-278.
34. Laurent TC. Structure, function and turnover of the extracellular matrix. *Advances in Microcirculation.* 1987; 13: 15-34.
35. Laurent TC, Laurent UBG, Fraser JRE. Functions of hyaluronan. *Ann Rheum Dis.* 1995; 54: 429-432.
36. Laurent TC, Laurent UBG, Fraser JRE. Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann Med.* 1996; 28: 241-253.
37. Heldin P, Aspflund T, Teder P, Suzuki M, Vrochides D, Papanikolaou V, Persoff H. Regulation of hyaluronan synthesis and the interaction of hyaluronan with cells. *Acta Orthop Scand.* 1995; 66: S160-S162.
38. Fraser JRE. Hyaluronan. Στο: Comper WD, ed. *Extracellular Matrix, Vol 2,* Amsterdam, Overseas Publishers Association. 1996.
39. Dahl LB, Dahl IMS, Engstrom-Laurent A, Granath KA. Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis.* 1989; 44: 817-822.
40. Laurent TC, Gergely J. Studies on hyaluronic acid in the vitreous body. *J Biol Chem.* 1955; 216: 263-271.
41. Tengblad A, Laurent UBG, Lijja K, Cahill RNP, Engstrom-Laurent A, Fraser JRE, Hansson HE, et al. Concentration and relative molecular mass of hyaluronate in lymph and blood. *Biochem J.* 1986; 236: 521-525.



42. Holmes MWA, Bayliss MT, Muir H. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age related changes in content and size. *Biochem J.* 1988; 250: 435-441.
43. Fraser JRE, Laurent TC, Engstrom-Laurent A, Laurent UBG. Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1984; 11: 17-25.
44. Fraser JRE, Kimpton WG, Laurent TC, Cahill RNP, Vakakis N. Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue. *Biochem J.* 1988; 256: 153-158.
45. Balazs EA, Davies JV, Phillips GO, Young MD. Transient intermediates in the radiolysis of hyaluronic acid. *Rad Res.* 1967; 31: 243-252.
46. Prehm P. Identification and regulation of the eucaryotic hyaluronate synthase. *Σto: The Biology of Hyaluronan, Vol 143, Wiley, Chichester.* 1989; 21-40.
47. Yoneda M, Suzuki S, Kimata K. Hyaluronic acid associated with the surfaces of cultured fibroblasts is linked to a serum derived 85 kDa protein. *J Biol Chem.* 1990; 265: 5247-5257.
48. Scott JE. Chemical morphology of hyaluronan. *Σto: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London.* 1998; 7-15.
49. Fessler JH, Fessler LL. Electron microscopic visualization of the polysaccharide hyaluronic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1966; 56: 141-147.
50. Mikelsaar R-H, Scott JE. Molecular modelling of secondary and tertiary structures of hyaluronan, compared with electron microscopy and NMR data. Possible sheets and tubular structures in aqueous solution. *Glycoconj J.* 1994; 11: 56-71.
51. Laurent TC. Structure of hyaluronic acid. *Σto: Balazs EA, ed. Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Academic, London.* 1970; 703-732.
52. Cleland RL. Ionic polysaccharides: II. Comparison of polyelectrolyte behaviour of hyaluronate with that of carboxymethyl cellulose. *Biopolymers.* 1968; 6: 1519-1529.
53. Preston BP, Davis M, Ogston AG. The composition and physicochemical properties of hyaluronic acids prepared from ox synovial fluid and from a case of mesothelioma. *Biochem J.* 1965; 96: 449-474.
54. Morris ER, Cutler AN, Ross-Murphy SB, Rees D. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydr Polym.* 1981; 1: 5-21.
55. Cowman MK, Liu J, Li M, Hittner DM, Kim JS. Hyaluronan interactions: Self, water, ions. *Σto: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London.* 1998; 17-24.
56. Gibbs DA, Merrill EW, Smith KA, Balazs EA. The rheology of hyaluronic acid. *Biopolymers.* 1968; 6: 777-791.
57. Wik HB, Wik O. Rheology of hyaluronan. *Σto: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London.* 1998; 25-32.
58. Bothner H, Sundelof LO, Wik O. The effect of molecular weight, concentration and temperature on the viscoelastic properties of sodium hyaluronate. *Σto: Bothner H, ed. Rheological Studies of Sodium Hyaluronate in Pharmaceutical Preparations, Vol 79, Uppsala University, Uppsala.* 1991; 1113-1126.
59. Band PA. Hyaluronan derivatives: Chemistry and clinical applications. *Σto: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London.* 1998; 33-42.
60. Laurent TC, Ogston AG. The interactions between polysaccharides and other macromolecules: The osmotic pressure of mixtures of serum albumin and hyaluronic acid. *Biochem J.* 1963; 89: 249-253.
61. Comper WD. Physicochemical aspects of cartilage extracellular matrix. *Σto: Hall B, Newman S, eds. Cartilage: Molecular Aspects, CRC Press Inc., Boca Raton.* 1991; 59-96.
62. Ogston AG, Sherman TF. Effects of hyaluronic acid upon diffusion of solutes and flow of solvent. *J Physiol.* 1961; 156: 67-74.
63. Vaes G. Studies on bone enzymes. The activation and release of latent acid hydrolases and catalase in bone-tissue homogenates. *Biochem J.* 1965; 97: 393-402.
64. Hascall VC, Fulop C, Salustri A, Goodstone N, Calabro A, Hogg M, Tammi R, et al. Metabolism of hyaluronan. *Σto: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London.* 1998; 67-76.
65. Helden P. Structure and regulation of mammalian hyaluronan synthase. *Σto: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London.* 1998; 77-83.
66. Munaim SI, Klagsbrun M, Toole BP. Developmental changes in fibroblast growth factor in the chicken embryo limb bud. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 8091-8093.
67. Vrochides D, Papanikolaou Y, Perfoth H, Antoniadis AA, Helden P. Biosynthesis and degradation of hyaluronan by nonparenchymal liver cells during liver regeneration. *Hepatology.* 1996; 23: 1650-1655.
68. Hallgren R, Eklund A, Engstrom-Laurent A, Schmekel B. Hyaluronate in bronchoalveolar lavage fluid, a new marker in sarcoidosis reflecting pulmonary disease. *Br Med J.* 1985; 290: 1778-1781.
69. Toole BP, Biswas C, Gross J. Hyaluronate and invasiveness of the rabbit V2 carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76: 6299-6303.
70. Helden P, Laurent TC, Helden C-H. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J.* 1989; 258: 919-922.
71. Meyer FA, Yaron I, Yaron M. Synergistic, additive and antagonistic effects of interleukin-1b, tumor necrosis factor-α and interferon on prostaglandin E, hyaluronic acid and collagenase production by cultured synovial fibroblasts. *Arthr Rheum.* 1990; 33: 1518-1525.
72. Laurent TC, Fraser JRE. The properties and turnover of hyaluronan. *Σto: Evered D, Whelan J, eds. Functions of the Proteoglycans, Vol 124, Wiley, Chichester.* 1986; 9-29.
73. Knudson W, Biswas C, Toole BP. Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81: 6767-6771.
74. Helden P, Perfoth H. Synthesis and assembly of the hyaluronan-containing coats around normal human mesothelial cells. *Exp Cell Res.* 1993; 208: 422-429.
75. Fraser JRE, Laurent TC. Turnover and metabolism of hyaluronan. *Σto: The Biology of Hyaluronan, Vol 143, Wiley, Chichester.* 1989; 41-

76. Lebel L, Gabrielson J, Laurent TC, Gerdin B. Kinetics of circulating hyaluronan in humans.  $\Sigma$ to: Turnover of Circulating Hyaluronan, Uppsala University, Uppsala. 1989.
77. Fraser JRE, Brown TJ, Laurent TC. Catabolism of hyaluronan.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 85-92.
78. Smedsrod B, Pertoft H, Gustafson S, Laurent TC. Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochem J.* 1990; 266: 313-327.
79. Fraser JRE, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E. Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronan acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem J.* 1981; 200: 415-424.
80. Fraser JRE, Alcorn D, Laurent TC, Robinson AD, Ryan GB. Uptake of circulating hyaluronan acid by the rat liver: Cellular localization in situ. *Cell Tissue Res.* 1985; 242: 505-510.
81. Fosberg N, Gustafson S. Characterization and purification of the hyaluronan receptor on liver endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1078: 12-18.
82. Laurent UBG, Reed RK. Turnover of hyaluronan in the tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 1991; 7: 237-256.
83. Murata K, Yokohama Y. High hyaluronic acid and low dermatan sulphate contents in human pulmonary arteries compared to in the aorta. *Blood Vessels.* 1988; 25: 1-11.
84. Delpach B, Delpach A, Bruckner G, Girard N, Maingonnat C. Hyaluronan and hyaluronectin in the nervous system.  $\Sigma$ to: Evered D, Whelan J, eds. The Biology of Hyaluronan, Vol 143, Wiley, Chichester. 1989; 208-232.
85. Margolis RU, Margolis RK, Chang LB, Preti C. Glycosaminoglycans of brain during development. *Biochemistry.* 1975; 14: 85-88.
86. Wells AF, Larsson E, Tengblad A, Fellstrom B, Tufveson G, Klareskog L, Laurent TC. The localization of hyaluronan in normal and rejected human kidneys. *Transplantation.* 1990; 50: 240-243.
87. Toole BP. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladerins. *Curr Opin Cell Biol.* 1991; 2: 839-844.
88. Lin Z, Hou G, Harrison R, Turley EA. Hyaluronan receptors and the role of the B(X)<sub>2</sub>B recognition motif in signaling.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 135-139.
89. Day AJ, Parkar AA. The structure of the link module: A hyaluronan binding domain.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 141-147.
90. Heinegard D, Bjornsson S, Morgelin M, Sommarin Y. Hyaluronan binding matrix proteins.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 113-122.
91. Lesley J. Hyaluronan binding function of CD44.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 123-134.
92. Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate bearing cells. *Eur Mol Biol Org J.* 1991; 10: 343-348.
93. Turley EA. The role of a cell associated hyaluronan binding protein in fibroblast behaviour.  $\Sigma$ to: Evered D, Whelan J, eds. The Biology of Hyaluronan, Vol 143, Wiley, Chichester. 1989; 121-137.
94. Samuel SK, Hurta RA, Spearman MA, Wright JA, Turley EA, Greenberg AH. TGF- $\beta$ 1 stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. *J Cell Biol.* 1993; 123: 749-758.
95. Ogston AG, Phelps CF. The partition of solutes between buffer solutions and solutions containing hyaluronic acid. *Biochem J.* 1961; 78: 827-833.
96. Longas MA, Bhuyan DK, Bhuyan KC, Gutsch CM, Breitweiser KO. Dietary vitamin E reverses the effects of ultraviolet light irradiation on rat skin glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1156: 239-244.
97. Presti D, Scott JE. Hyaluronan-mediated protective effect against cell damage caused by enzymatically produced hydroxyl radicals is dependent on hyaluronan molecular mass. *Cell Biochem Func.* 1994; 12: 281-288.
98. Phillips GO. Degradation of hyaluronan systems by free radicals.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 93-111.
99. Waldenstrom A, Martinussen HJ, Gerdin B, Hallgren R. Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1991; 88: 1622-1628.
100. Wells AF, Klareskog L, Lindblad S, Laurent TC. Correlation between increased hyaluronan localized in arthritic synovium and the presence of proliferating cells. A role for macrophage derived factors. *Arthr Rheum.* 1992; 35: 391-396.
101. Hallgren R, Gerdin B, Tufveson G. Hyaluronan acid accumulation and redistribution in rejecting rat kidney graft; relationship to the transplantation edema. *J Exp Med.* 1990; 171: 2063-2076.
102. Hallgren R, Gerdin B, Tengblad A, Tufveson G. Accumulation of hyaluronan in myocardial interstitial tissue parallels development of transplantation edema in heart allografts in rats. *J Clin Invest.* 1990; 85: 668-673.
103. Toole BP. Hyaluronate turnover during chondrogenesis in the developing chick limb and axial skeleton. *Devel Biol.* 1972; 29: 321-329.
104. Brecht M, Mayer M, Schlosser E, Prehm P. Increased hyaluronan synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem J.* 1986; 239: 445-450.
105. Toole BP. Hyaluronate cell interactions and growth factor regulation of hyaluronate synthesis during limb development.  $\Sigma$ to: Evered D, Whelan J, eds. The Biology of Hyaluronan, Vol 143, Wiley, Chichester. 1989; 138-145.
106. Orkin RW, Knudson W, Toole BP. Loss of hyaluronate dependent coat during myoblast fusion. *Devel Biol.* 1985; 107: 527-530.
107. Balazs EA. The viscoelastic intercellular matrix and control of cell function by hyaluronan.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 185-204.
108. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis; an update. *N Engl J Med.* 1986; 314: 488-500.
109. Ross R. Connective tissue cells, cell proliferation and synthesis of extracellular matrix. A review. *Phil Trans Royal Soc London.* 1975; B271: 247-259.
110. Knudson W. Hyaluronan in malignancies.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its

- Derivatives, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 169-179.
111. Fraser JRE, Clarriss BJ. On the reactions of human synovial cells exposed to homologous leucocytes in vitro. *Clin Exp Immunol.* 1970; 6: 211-225.
  112. Toole BP, Goldberg RL, Chi-Rosso G, Underhill CB, Orkin RW. Hyaluronate-cell interactions.  $\Sigma$ to: Trelstad RL, ed. *The Role of Extracellular Matrix in Development*, Alan R. Liss Inc., New York. 1984; 43-66.
  113. West DC, Shaw DM. Tumor hyaluronan in relation to angiogenesis and metastasis.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 227-233.
  114. Hakanson L, Venge P. The molecular basis of the hyaluronic acid mediated stimulation of granulocyte function. *J Immunol.* 1987; 138: 4347-4352.
  115. Noble PW, McKee CM, Horton MR. Induction of inflammatory gene expression by low molecular weight hyaluronan fragments in macrophages.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 219-225.
  116. Clarriss BJ, Fraser JRE. On the pericellular zone of some mammalian cells in vitro. *Exp Cell Res.* 1968; 49: 181-193.
  117. Knudson W, Bartnik E, Knudson CB. Assembly of pericellular matrices by COS-7 cells transfected with lymphocyte homing genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 4003-4007.
  118. Toole BP. Hyaluronan-cell interactions in morphogenesis.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 155-160.
  119. Laurent TC. Hyaluronan as a clinical marker of pathological processes.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 305-313.
  120. Engstrom-Laurent A, Laurent TC. *Hyaluronan as a clinical marker.*  $\Sigma$ to: Lindh E, Thorell JI, eds. *Clinical Impact of Bone and Connective Tissue Markers*, Vol 1, Academic Press, Uppsala. 1989; 235-252.
  121. Engstrom-Laurent A, Loof L, Nyberg A, Schroder T. Increased serum levels of hyaluronate in liver disease. *Hepatology.* 1985; 5: 638-642.
  122. Engstrom-Laurent A. Changes in hyaluronan concentration in tissues and body fluids in disease states.  $\Sigma$ to: Evered D, Whelan J, eds. *The Biology of Hyaluronan*, Vol 143, Wiley, Chichester. 1989; 233-247.
  123. Asplund T, Heldin P. Hyaluronan receptors are expressed on human malignant mesothelioma cells but not on normal mesothelial cells. *Cancer Res.* 1994; 54: 4516-4523.
  124. Adams DH, Wang L, Hubscher SG, Neuberger JM. Hepatic endothelial cells: Targets in liver allograft rejection? *Transplantation.* 1989; 47: 479-482.
  125. Adams DH, Wang L, Neuberger JM. Serum hyaluronic acid following liver transplantation: Evidence of hepatic endothelial damage. *Transplant Proc.* 1989; 21: 2274.
  126. Pollard SG, Forbes MA, Metcalfe SM, Cooper EH, Calne RY. Hyaluronic acid in the assessment of liver graft function. *Transplant Proc.* 1990; 22: 2301-2302.
  127. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: Difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology.* 1992; 16: 454-461.
  128. Karayalcin K, Harrison JD, Attard A, Gunson BK, Jones S, Mayer D, Buckels JAC, et al. Can effluent hyaluronic acid or creatine kinase predict sinusoidal injury severity after cold ischemia? *Transplantation.* 1993; 56: 1336-1339.
  129. Michell ID, Abduluour I, Pzybylowski G, Bowkett J, Gleeson A, Hardy KJ, Jones RM. Donor hyaluronic acid and MEGX levels do not accurately predict posttransplant liver function. *Transplant Proc.* 1993; 25: 2888-2889.
  130. Rao PN, Bronsther OL, Pinna AD, Demetris AJ, Snyder JT, Fung J, Starzl TE. Prediction of early graft function by effluent levels of hyaluronic acid in clinical liver transplantation. *Transplant Proc.* 1993; 25: 2141-2142.
  131. Shimizu H, He W, Guo P, Dziadkowiec I, Miyazaki M, Falk RE. Serum hyaluronate in the assessment of liver endothelial cell function after orthotopic liver transplantation in the rat. *Hepatology.* 1994; 20: 1323-1329.
  132. Suehiro T, Boros P, Curtiss S, Mor E, Emre S, Sheiner P, Schwartz ME, et al. Perioperative hyaluronic acid levels in orthotopic liver transplant recipient. *Transplant Proc.* 1995; 27: 1261.
  133. Terajima H, Yagi T, Shirakata H, Shinohara H, Satoh S, Arima Y, Mashima S, et al. Assessment of hyaluronate clearance and endothelin production during extracorporeal xenogeneic pig liver perfusion. *Transplant Proc.* 1996; 28: 633-634.
  134. Van Gulik TM, Reinders ME, Van Wagenveld BA, Frederiks WM, Chamuleau RAFM, Endert E, Klopffer PJ. The use of hyaluronic acid uptake in the evaluation of reperfusion injury in cold stored rat livers. *Transplant Proc.* 1996; 28: 75-76.
  135. Nakajima Y, Kimura J, Isai H, Tamura M, Ito K, Kon H, Kamachi H, et al. Study of the changes of serum hyaluronic acid during porcine liver transplantation: Influence of warm ischemia. *Artif Organs.* 1996; 20: 1125-1129.
  136. Wang L, Zhao D, Suehiro T, Boros P, Miller CM. Assessment of damage and recovery of sinusoidal endothelial cell function by in vivo hyaluronic acid uptake in cold-preserved and transplanted rat livers. *Transplantation.* 1996; 62: 1217-1221.
  137. Soejima Y, Yanaga K, Wakiyama S, Nishizaki T, Yoshizumi T, Sugimachi K. Serum hyaluronic acid as a reliable parameter of allograft viability in porcine liver transplantation. *Hepatogastroenterology.* 1996; 43: 590-595.
  138. Reinders ME, Van Wagenveld BA, Van Gulik TM, Corssmit NPM, Frederiks WM, Chamuleau RAFM, Van Rooijen N, et al. No attenuation of ischemic and reperfusion injury in kupffer cell depleted, cold preserved rat livers. *Transplantation.* 1997; 63: 449-454.
  139. De Broin E, Urata K, Giroux L, Lepage R, Huet P-M. Effect of calcium antagonists on rat liver during extended cold preservation-reperfusion. *Transplantation.* 1997; 63: 1547-1554.
  140. Miller D, Stegmann R. Healon. A Guide to its Use in Ophthalmic Surgery, Wiley, New York. 1983.
  141. Laurent C. The action of hyaluronan on repair processes in the middle ear.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 283-289.
  142. Strachan RK, Smith P, Gardner DL. Hyaluronate in rheumatology and orthopaedics. Is there a role? *Ann Rheum Dis.* 1990; 49: 949-952.

143. Rydell NW, Butler J, Balazs EA. Hyaluronic acid in synovial fluid. VI. Effect of intra-articular injection of hyaluronic acid on the clinical symptoms of arthritis in track horses. *Acta Vet Scand.* 1970; 11: 139-155.
144. Balazs EA, Laurent TC. Round table discussion: New applications for hyaluronan.  $\Sigma$ to: Laurent TC, ed. *The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives*, Vol 72, Portland Press Ltd, London. 1998; 325-336.
145. Craimer JA, Bailey LC, Bailey CA, Miller RT. Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1200: 315-321.
146. Takagaki K, Nakamura T, Izumi J, Saitoh H, Endo M. Characterization of hydrolysis and transglycosylation by testicular hyaluronidase. *Biochemistry.* 1994; 33: 6503-6507.
147. Hotez P, Cappello M, Hawdon J, Beckers C, Sakanari J. Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: Possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *J Infect Dis.* 1994; 170: 918-926.
148. Lin B, Hollingshead SK, Coligan JE, Egan ML, Baker JR, Pritchard DG. Cloning and expression of the gene for group B streptococcal hyaluronate lyase. *J Biol Chem.* 1994; 269: 30113-30116.
149. Wolf RA, Chung L-Y, Muller JE, Kloner RA, Braunwald E. Intravenous bovine testicular hyaluronidase depolymerizes myocardial hyaluronic acid in dogs with coronary artery occlusion. *Circ Res.* 1981; 48: 88-95.
150. Primakoff P, Myles DG. A map of the guinea pig sperm surface constructed with monoclonal antibodies. *Devel Biol.* 1983; 98: 417-428.
151. Gmachl M, Kreil G. Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 3569-3573.
152. Gmachl M, Sagan S, Ketter S, Kreil G. The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity. *FEBS Lett.* 1993; 336: 545-548.
153. Lathrop WF, Carmichael EP, Myles DG, Primakoff P. cDNA cloning reveals the molecular structure of a sperm surface protein, PH-20, involved in sperm-egg adhesion and the wide distribution of its gene among mammals. *J Cell Biol.* 1990; 111: 2939-2949.
154. Lin Y, Mahan K, Lathrop WF, Myles DG, Primakoff P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol.* 1994; 125: 1157-1163.
155. Watanabe T, Kobori K, Miyashita K, Fujii K, Sakai H, Uchida M, Tanaka H. Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus Circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J Biol Chem.* 1993; 25: 18567-18572.
156. Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, Ruohonen L, Pettersson G, Knowles JKC, Teeri TT, et al. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma Reesei*. *Science.* 1994; 265: 524-528.
157. Dagnes-Hansen F. Laboratory animal genetics and genetic monitoring.  $\Sigma$ to: Svedsen P, Hau J, eds. *Handbook of Laboratory Animal Science*, Vol 1, CRC Press Inc., Boca Raton. 1994; 89-124.
158. Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery.* 1983; 93: 64-69.
159. Gassel HJ, Tellides G, Engemann R, Morris PJ. Cyclosporine A in orthotopic rat liver transplantation: Influence on MHC antigen expression and graft adaptation. *Transplant Proc.* 1988; 20: 1081-1090.
160. Slott PA, Liu MH, Travoloni N. Origin, pattern and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology.* 1990; 99: 466-477.
161. Gassel HJ, Steger U, Thiede A. Liver transplantation.  $\Sigma$ to: Timmerman W, Gassel HJ, Ulrichs K, Zhong R, Thiede A, eds. *Organ Transplantation in Rats and Mice*, Springer, Berlin. 1998; 123-131.
162. Isai H, Miyata M, Miyakawa A, Saito M, Uchino J, Marshall VC. Angiographic evidence of collateral rearterialization of the grafted liver in the rat. *Transplant Proc.* 1989; 21: 2463-2465.
163. Svensson G, Naredi P, Hafstrom L, Tufveson G. Quantitative measurements of collateral arterial blood flow in nonarterialized rat liver grafts. *Transpl Int.* 1994; 7: 136-139.
164. Lee S, Charters III AC, Chandler JG, Orloff MJ. A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 1973; 16: 664-669.
165. Lee S, Charters III AC, Orloff MJ. Simplified technic for orthotopic liver transplantation in the rat. *Am J Surg.* 1975; 130: 38-40.
166. Zimmerman FA, Butcher GW, Davis HS, Brons G, Kamada N, Turel O. Techniques for orthotopic liver transplantation in the rat and some studies of the immunologic responses to fully allogeneic liver grafts. *Transplant Proc.* 1979; 11: 571-577.
167. Miyata M, Fischer JH, Fuhs M, Isselhard W, Kasai Y. A simple method for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 1980; 30: 335-338.
168. Engemann R. Technique for orthotopic liver transplantation.  $\Sigma$ to: Thiede A, Deitz E, Engemann R, Hamelmann W, eds. *Microsurgical Models in Rats for Transplantation Research*, Springer, Berlin. 1985; 69-75.
169. Steffen R, Ferguson DM, Krom RAF. A new method for orthotopic rat liver transplantation with arterial cuff anastomosis to the recipient common hepatic artery. *Transplantation.* 1989; 48: 166-168.
170. Gao W, Lemasters JJ, Thurman RG. Development of a new model for hepatic rearterialization in rat orthotopic liver transplantation. *Transplantation.* 1993; 56: 19-24.
171. Hess F, Willemen A, Jerusalem C. Auxiliary liver transplantation in the rat: Influence of the condition of the recipient's liver on the fate of the graft. *Eur Surg Res.* 1977; 9: 270-279.
172. Hoch BV, Reingers J, Kroes ACM, VanKrieken JHJM, D. VW, Masclee MAAM, G. V-HL, et al. Temporary heterotopic auxiliary liver transplantation for fulminant hepatitis B. *J Hepatol.* 1995; 23: 109-118.
173. Lee S, Edington TS. Liver transplantation in the rat. *Surg Forum.* 1966; 17: 220-222.
174. Clavien PA, Harvey PRC, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation.* 1992; 53: 957-978.
175. Holloway CMB, Harvey PRC, Strasberg SM. Viability of sinusoidal lining cells in cold-preserved rat liver allografts. *Transplantation.* 1990; 49: 225-229.
176. Calmus Y, Cynober L, Dousset B, Lim SK, Soubrane O, Conti F, Houssin D, et al. Evidence for the detrimental role of proteolysis during liver preservation in humans. *Gastroenterology.* 1995; 108: 1510-1516.
177. Rubin K, Ahlen K, Reed RK. Dynamic interactions between cells and the extracellular matrix.  $\Sigma$ to: Reed RK, Rubin K, eds. *Connective Tissue*

- Biology, Vol 71, Portland Press Ltd, London. 1998; 17-25.
178. Teramoto K, Bowers JL, Khettry U, Palombo JD, Clouse ME. A rat fatty liver transplant model. *Transplantation*. 1993; 55: 737-741.
  179. McKeown CMB, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PRC, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: The critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation*. 1988; 46: 178-191.
  180. Momii S, Koga A. Time-related morphological changes in cold-stored rat livers. *Transplantation*. 1990; 50: 745-750.
  181. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: Effects of reperfusion. *Hepatology*. 1991; 13: 83-95.
  182. Takei Y, Marzi I, Gao W, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG. Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1991; 51: 959-965.
  183. Marzi I, Walcher F, Buhren V. Macrophage activation and leukocyte adhesion after liver transplantation. *Am J Physiol*. 1993; 265: G172-G177.
  184. Hamer JP, Malone P, Silver I. The pO<sub>2</sub> in venous valve pockets: Its possible bearing on thrombogenesis. *Br J Surg*. 1981; 68: 166-170.
  185. Morgan GR, Sanabria JR, Clavien PA. Correlation of donor nutritional status with sinusoidal lining cell viability and liver function in the rat. *Transplantation*. 1991; 51: 1176-1183.
  186. Himmelreich G, Muser M, Neuhaus P. Different aprotinin regimen applications influencing hemostatic changes in orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 1992; 53: 132-136.
  187. Thurman RG, Marzi I, Seitz G, Thies J, Lemasters JJ, Zimmerman FA. Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1988; 46: 502-506.
  188. Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG. Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat-an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation*. 1992; 54: 199-204.
  189. Marzi I, Kree J, Buhren V, Menger M, Trentz O. Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation. *Surgery*. 1992; 111: 90-97.
  190. Post S, Gorig M, Otto G. Prostanoid release in experimental liver transplantation. *Transplantation*. 1990; 49: 490-494.
  191. Taylor AE, Khimenko P, Moore TM. The endothelial barrier: What is its function? *Σto*: Reed RK, Rubin K, eds. *Connective Tissue Biology*, Vol 71, Portland Press Ltd, London. 1998; 241-252.
  192. Cheung T, Bonventre J, Malis C, Leaf A. Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med*. 1986; 314:
  193. lu S, Harvey PRC, Makowka L, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Markers of allograft viability in the rat. *Transplantation*. 1987; 44: 562-569.
  194. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology*. 1989; 10: 292-299.
  195. Woods HF, Krebs HA. Lactate production in the perfused rat liver. *Biochem J*. 1971; 125: 129-139.
  196. Currin RT, Gores GJ, Thurman RG, Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: Evidence for a pH paradox. *FASEB J*. 1991; 5: 207-210.
  197. Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, Ringe B, Lauchart W, Pichlmayer R. Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation. *Transplantation*. 1988; 45: 138-143.
  198. Sorrentino D, Van Ness K, Ribeiro I, Miller GM. Functional and morphological features of isolated hepatocytes preserved in UW solution. *Hepatology*. 1991; 14: 331-339.
  199. Lanir A, Jenkins RL, Caldwell C, Lee RGL, Khettry U, Clouse ME. Hepatic transplantation survival: Correlation with adenine nucleotide level in donor liver. *Hepatology*. 1988; 8: 471-475.
  200. Leaf A. Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume. *Biochem J*. 1956; 62: 241-251.
  201. Marzi I, Cowper K, Takei Y, Lindert K, Lemasters JJ, Thurman RG. Methyl palmitate prevents Kupffer cell activation and improves survival after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transpl Int*. 1991; 4: 215-220.
  202. Bremer C, Bradford BU, Hunt KJ, Knecht KT, Connor HD, Mason RP, Thurman RG. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1994; 267: G630-G636.
  203. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez F, Lopez F. Role of Kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion. *Circ Shock*. 1994; 42: 204-209.
  204. Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet P-M. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology*. 1995; 109: 189-197.
  205. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem*. 1990; 192: 245-261.
  206. Kubes P, Ibbotson G, Russel J, Wallace JL, Granger DN. Role of platelet activating factor in ischemia-reperfusion induced leukocyte adherence. *Am J Physiol*. 1990; 259: G300-G305.
  207. Hanahan DJ. Platelet activating factor: A biologically active phosphoglyceride. *Ann Rev Biochem*. 1986; 55: 483-509.
  208. Clavien PA, Sanabria JR, Cywes R, Levy GA, Harvey PRC, Strasberg SM. The mechanism of lymphocyte adherence in the reperfused rat liver allograft and its relation to the duration of cold ischemia. *Hepatology*. 1991; 14: 59-64.
  209. Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N. Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion. Evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology*. 1992; 15: 507-514.
  210. Babior BM, Peters WA. The O<sub>2</sub>-producing enzyme of human O<sub>2</sub>-neutrophils: Further properties. *J Biol Chem*. 1981; 256: 2321-2323.
  211. Marzi I, Zong Z, Zimmerman FA, Lemasters JJ, Thurman RG. Xanthine and hypoxanthine accumulation during storage may contribute to reperfusion injury following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc*. 1989; 21: 1319-1320.
  212. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand*. 1986; 548: 97-99.
  213. Lewis MS, Whately RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet activating factor by endothelium and induces endothelial cell dependent neutrophil adhesion. *J Clin Invest*. 1988; 82: 2045-2055.
  214. Albeda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J*. 1990; 4: 2880-2890.

215. Pruzanski W, Vadas P. Phospholipase A2: A mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today*. 1991; 12: 143-146.
216. Engerson TD, McKelvey DB, Boggio EB, Snyder SJ, Jones HP. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J Clin Invest*. 1987; 79: 1564-1570.
217. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspect of the structure, function and applications of superoxide dismutase. *Crit Rev Biochem*. 1987; 22: 111-180.
218. Giacoustidis D, Iliadis S, Kostopoulou E, Papageorgiou G, Kontos N, Giacoustidis E, Dimitriadou A. Administration of  $\alpha$ -tocopherol in total hepatic ischemia and reperfusion protects liver from lipid peroxidation. *Eur Surg Res*. 1998; 30: S117-S118.
219. Kontos N, Iliadis S, Koliakou N, Papageorgiou G, Giacoustidis D, Pantelidis K, Frangandreas G, et al. Rat liver ischemia and reperfusion injury: Vitamin C yes, but how much? *Eur Surg Res*. 1998; 98: S119.
220. Hoover RL, Robinson JM, Karnovsky MJ. Adhesion of polymorphonuclear leucocytes to endothelium enhances the efficiency of detoxification of oxygen free radicals. *Am J Pathol*. 1989; 126: 258-268.
221. Sies H, Summer H. Hydroperoxide metabolizing systems in the rat liver. *Eur J Biochem*. 1975; 57: 503-520.
222. Mason GR, Lin HC. The role of lysophosphatides in cell injury. *J Surg Res*. 1979; 27: 124-134.
223. Vadas P, Hay JB. The release of phospholipase A2 from aggregated and stimulated macrophages of sheep. *Life Sci*. 1980; 26: 1721-1729.
224. Zimmerman GA, McIntyre TM, Mehra M, Prescott SM. Endothelial cell associated platelet activating factor: A novel mechanism for signaling intracellular adhesion. *J Cell Biol*. 1990; 110: 529-540.
225. Kucey DS, Kubicki EI, Rotstein OD. Platelet activating factor primes endotoxin stimulated macrophage procoagulant activity. *J Surg Res*. 1991; 50: 436-441.
226. Camusi G, Tetta C, Bussoline F, Baglione C. Synthesis and release of PAF is inhibited by plasma  $\alpha$ 1-protease inhibitor or  $\alpha$ 1-antichymotrypsin and is stimulated by proteinase. *J Exp Med*. 1988; 168: 1293-1298.
227. Issekutz TB. Effects of six different cytokines on lymphocyte adherence to microvascular endothelium and in vivo lymphocyte migration in the rat. *J Immunol*. 1990; 144: 2140-2146.
228. Shalby MR, Aggarwal BB, Rinderknecht E. Activation of human polymorphonuclear neutrophil function by interferon and tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1985; 135: 2069-2074.
229. Nawroth PP, Stern DM. Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 1986; 163: 740-745.
230. Nawroth PP, Bank J, Handey D, Cassimeris J, Chers L, Stern DM. Tumor necrosis factor / cachectin interacts with endothelial cell receptor to induce release of interleukin 1. *J Exp Med*. 1986; 163: 1363-1375.
231. Meyer JD, Yurt RW, Duhane R. Tumor necrosis factor enhanced leukotriene generation and chemotaxis in human neutrophils. *Arch Surg*. 1988; 123: 1454-1458.
232. Thornton AJ, Ham J, Kunkel SL. Kupffer cell derived cytokines induce the synthesis of a leucocyte chemotactic peptide, interleukin-8, in human hepatoma and primary hepatocyte culture. *Hepatology*. 1991; 15: 1112-1122.
233. Hirano T, Shizuo A, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today*. 1990; 11: 443-449.
234. Matsushima K, Oppenheim JJ. Interleukin and MCAF: Novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF. *Cytokine*. 1989; 1: 2-13.
235. Cohen S. Increased endothelial expression of class II MCH molecules: A possible mechanism for antigen presentation. *Στ*: Cohen S, ed. *Lymphokines and the Immune Responses*, CRC Press Inc., Boca Raton. 1990; 9-39.
236. Takei Y, Marzi I, Kauffman C. Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker, nisoldipine. *Transplantation*. 1990; 50: 14-20.
237. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol*. 1996; 25: 774-780.
238. Sussman MS. Oxygen free radicals in reperfusion injury. *Meth Enzymol*. 1990; 186: 711-723.
239. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation. *Crit Care Med*. 1988; 16: 947-953.
240. Sakagami Y, Mizoguchi Y, Seki S, Kobayashi K, Morisawa S, Yamamoto S. Release of leukotrienes from rat kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 156: 217-221.
241. Rieder H, Ramadori G, Allman KH. Prostanoid release of cultured liver sinusoidal endothelial cells in response to endotoxin and tumor necrosis factor. *J Hepatol*. 1990; 11: 359-366.
242. Dahlen SE, Bjork J, Hedqvist P. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in post capillary venules: In vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981; 78: 3887-3891.
243. Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Sepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: Central role of the neutrophil. *Br J Surg*. 1991; 78: 651-655.
244. Xie QW, Nathan C. The high output nitric oxide pathway: Role and regulation. *J Leukoc Biol*. 1994; 56: 576-582.
245. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J*. 1994; 298: 249-258.
246. Sirsjo A, Soderkvist P, Sundkvist P, Carlsson M, Ost M, Gidlöf A. Different induction mechanisms of mRNA for inducible nitric oxide synthase in rat smooth muscle cells in culture and in aortic strips. *FASEB J*. 1994; 338: 191-196.
247. Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1993; 177: 1779-1784.
248. Perez-Mediavilla LA, Lopez-Zabalza MJ, Calonge M, Montuenga L, Lopez-Moratalla N, Santiago E. Inducible nitric oxide synthase in human lymphomononuclear cells activated by synthetic peptides derived from extracellular matrix proteins. *FASEB J*. 1995; 357: 121-124.
249. Schini VD, Durante W, Elizondo E, Scott-Burden T, Junquero DC, Schafer AI, Vanhoutte PM. The induction of nitric oxide synthase activity is inhibited by TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharm*. 1992; 216: 379-383.
250. Ignaro LJ. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharm*. 1991; 41: 485-490.
251. Geng YJ, Hansson GK, Holme E. Interferon and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1992; 71: 1268-1276.
252. Wood ER, Berger HJ, Sherman PA. Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene.

- Biochem Biophys Res Commun. 1993; 191: 767-774.
253. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988; 332: 411-415.
  254. Lerman A, Hildebrand FL, Aarhus LI, Burnett JC. Endothelin has actions at pathophysiological concentrations. *Circulation*. 1991; 83: 1808-1814.
  255. Okumura S, Kawano H, Matsunaga T. Possible role of endothelin-I in the hepatic microcirculation and liver damage in vivo. *Hepatology*. 1991; 14: 161-166.
  256. Serradeil-Le Gal C, Jouneaux C, Sanchez-Bueno A. Endothelin action in rat liver: Receptors, free  $Ca^{2+}$ , oscillations and activation of glycogenolysis. *J Clin Invest*. 1991; 87: 133-143.
  257. Triger DR. Endotoxemia in liver disease; time of reappraisal. *J Hepatol*. 1991; 12: 136-138.
  258. Gouw ASH, Houthoff HJ, Huitema S, Beelen JM, Gips CH, Poppema S. Expression of major histocompatibility complex antigens and replacement of donor cells by recipient ones in human liver grafts. *Transplantation*. 1987; 43: 291-296.
  259. Yokoyama I, Todo S, Miyata T. Endotoxemia, pulmonary complications and thrombocytopenia with clinical liver transplantation. *Transplant Proc*. 1989; 21: 3833-3841.
  260. Smedley LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA. Neutrophil mediated injury to endothelial cells: Enhancement by endotoxin and a role for neutrophil elastase. *J Clin Invest*. 1986; 77: 1233-1243.
  261. Thomas CE, Reed DJ. Current status of calcium in hepatocellular injury. *Hepatology*. 1989; 10: 375-384.
  262. Gores GJ, Nieminen AL, Fleishman KE, Dawson TL, Herman B, Lemasters JJ. Intracellular pH during chemical hypoxia in cultured rat hepatocytes. *J Clin Invest*. 1989; 83: 386-396.
  263. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postschemic tissue injury. *N Engl J Med*. 1985; 312: 159-163.
  264. Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *PSEBM*. 1995; 209: 104-111.
  265. Yokoi Y, Nakamura S, Muro H, Baba S. Functional abnormalities of sinusoidal endothelial cells in rats with acute liver rejection. *Transplantation*. 1994; 57: 27-31.
  266. Chazouilleres O, Vaubourdolle M, Legendre C. Biochemical and morphological assesment of sinusoidal damage in human liver graft. *Gastroenterology*. 1991; 100: A728.
  267. Shasby DM, Shasby SS, Sullivan JM, Peach JP. Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability. *Circ Res*. 1982; 51: 657-661.
  268. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev*. 1990; 70: 427-451.
  269. Martinez-Hernandez A, Martinez-Delgado F, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration: Localization of Collagen types I, III, IV, laminin and fibronectin. *Lab Invest*. 1991; 64: 157-166.
  270. Duffey ME, Hainau B, Ho S, Bentzel CJ. Regulation of epithelial tight junction permeability by cAMP. *Nature*. 1981; 294: 451-453.
  271. Clavien PA, Morgan GR, Sanabria JR, Petrunka C, Levy GA, Robert P, Harvey C, et al. Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver. *Transplantation*. 1991; 52: 412-417.
  272. Schwartz ME, Manzarbeitia C, Thung S, Miller CM. Interpretation of intraoperative liver biopsies is predictive of early hepatic allograft function. *Hepatology*. 1990; 12: 864-869.
  273. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *Am J Pathol*. 1989; 320: 365-376.
  274. Matzner Y, Barner M, Yaalom J, Ishai-Michaeli R, Fuks Z, Vlodosvsky I. Degradation of heparan sulfatein the subendothelial extracellular matrix by a readily released heparanase from human neutrophils. *J Clin Invest*. 1985; 76: 1306-1313.
  275. Riess H, Jochum M, Machleidt W, Himmelreich G, Slama R, Steffen R. Possible role of the phagocytic proteinases, cathepsin B and elastase in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc*. 1991; 23: 1947-1948.
  276. Falanga A, Alessio M, Donati M, Barubi T. A new procoagulant in leukemia. *Blood*. 1988; 71: 870-875.
  277. Ogawa S, Gerlach H, Esposito C, Pasagian-Macaulay A, Brett J, Stern DM. Hypoxia modulates the barrier and coagulant function of cultured bovine endothelium. *J Clin Invest*. 1990; 85: 1090-1098.
  278. Dreikorn K, Horsch R, Rohl L. 48- to 96- hour preservation of canine kidneys by initial perfusion and hypothermic storage using Euro-Collins solution. *Eur Urol*. 1980; 6: 221-227.
  279. Belzer FO, Southard JH. *Transplantation: Organ Preservation*. Στο: Sabiston DC, ed. *Textbook of Surgery*, Ed 14th, Harcourt Brace Jovanovich, Inc., Philadelphia. 1992; 418-422.
  280. D' Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW. The predictive value of donor liver biopsies on the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc*. 1991; 23: 1536-1537.
  281. Wartofsky L, Burman KD. Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: The "euthyroid sick syndrome". *Gen Endoc Rev*. 1982; 3: 164-217.
  282. Sazontseva IE, Kozlov EA, G. MY, Ermolenko AE, Afonin VV, Ilnitkiy VV. Hormonal response to brain death. *Transplant Proc*. 1991; 23: 2464-2467.
  283. Palombo JD, Pomposelli JJ, Hirschberg Y, Blackburn GL, Bistrian BR. Glycolytic support of adenine nucleotides in rat liver flush- preserved with UW or Collins' II. *Transplantation*. 1989; 48: 901-905.
  284. Sankari HN, Chong A, Foster P, Brown E, Shen J, Kimura R, Rayudu G, et al. Inactivation of kupffer cells after prolonged fasting improves viability of transplanted hepatic allografts. *Hepatology*. 1995; 22: 1236-1242.
  285. Palombo JD, Hirschberg Y, Pomposelli JJ, Blackburn GL, Zeisel SH, Bistrian BR. Decreased loss of adenosine triphosphate during hypothermic preservation in rats pretreated with glucose: Implications for organ donor management. *Gastroenterology*. 1988; 95: 1043-1049.
  286. Braughler JM, Chase RL, Neff GL. A new 21-aminosteroid antioxidant lacking glucocorticoid activity stimulates adrenocorticotropin secretion and blocks arachidonic acid release from mouse pituitary tumor (AtT-20) cells. *J Pharm Exp Ther*. 1988; 244: 423-427.
  287. Braughler JM, Pregenzer JF, Chase RL, Duncan LA, Jacobsen AJ, McCall JM. Novel 21 aminosteroid as potent inhibitors of iron-dependent

- lipid peroxidation. *J Biol Chem.* 1987; 262: 10438-10440.
288. Currin RT, Reinstein LJ, Lichtman RG, Thurman RG, Lemasters JJ. Inhibition of tumor necrosis factor release from cultured rat Kupffer cells by agents that reduce graft failure from storage injury. *Transplant Proc.* 1993; 25: 1631-1632.
  289. Shenkar R, Abraham E. Effects of treatment with 21-aminosteroid, U74389F, on pulmonary cytokine expression following hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med.* 1995; 23: 132-139.
  290. Ishizaki N, Zhu Y, Zhang S, Nemoto A, Kobayashi Y, Subbotin V, Starzl TE, et al. Comparison of various lazaroid compounds for protection against ischemic liver injury. *Transplantation.* 1997; 63: 202-208.
  291. Kontos N, Iliadis S, Papageorgiou G, Koliakou N, Giacoustidis D, Giacoustidis E, Papazoglou O. Lipid peroxidation after liver ischemia and reperfusion in rats: Antioxidant and protective effect of  $\alpha$ -tocopherol. *Eur Surg Res.* 1997; 29: 542-543.
  292. Giacoustidis D, Iliadis S, Kostopoulou E, Papageorgiou G, Kontos N, Brozou K, Spyridis C, et al. The effect of high doses intravenous immunoglobulin G in hepatic injury from ischemia and reperfusion. *Hepato-Gastroenterology.* 1998; 45: S137.
  293. Giacoustidis D, Iliadis S, Kostopoulou E, Papageorgiou G, Kontos N, Giacoustidis E, Dimitriadou A. Inhibition of Kupffer cells activation by GdCl<sub>2</sub> reduce lipid peroxidation and protects liver from reperfusion injury. *Eur Surg Res.* 1998; 30: S115-S116.
  294. Adam R, Settaf A, Fabiani B, Bonhomme L, Astarcioglu I, Lahlou NK, Bismuth H. Comparative evaluation of Euro-Collins, UW solution, and UW solution without hydroxyethyl starch on orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplant Proc.* 1990; 22: 499-502.
  295. Steffen R, Krom RAF, Ferguson DM, Ludwig J. Comparison of University of Wisconsin (UW) and Eurocollins (EC) preservation solutions in a rat liver transplant model. *Transpl Int.* 1990; 3: 133-136.
  296. Yu W, Coddington D, Bitter-Suermann H. Rat liver preservation: I. The components of UW solution that are essential to its success. *Transplantation.* 1990; 49: 1060-1066.
  297. Adam R, Bismuth H, Diamond T, Ducot B, Morino M, Astarcioglu I, Johann M, et al. Effect of extended cold ischemia with UW solution on graft function after liver transplantation. *Lancet.* 1992; 340: 1373-1376.
  298. Yu W, Coddington D, Bitter-Suermann H. Combining UW solution with Eurocollins solution or Ringer's lactate abrogates its protective effect. *Transpl Int.* 1990; 3: 238-240.
  299. Belzer FO. Clinical organ preservation with UW solution. *Transplantation.* 1989; 47: 1097-1098.
  300. Cywes R, Clavien PA, Sanabria JR, Greig PD, Harvey PRC, Strasberg SM. Glycogen content and metabolism in human liver allografts and its relation to transplant outcome. *Hepatology.* 1991; 14: 280-290.
  301. Cisneros C, Guillen F, Gomez R. Analysis of warm ischemia time for prediction of primary nonfunction of the hepatic graft. *Transplant Proc.* 1991; 23: 1976.
  302. Ar Rajab A, Ahren B, Sundberg R, Bengmark S. The function of a colloid in liver cold-storage preservation. *Transplantation.* 1991; 52: 34-38.
  303. Hitchcock CR, Kiser JC, Telander RL, Peterson TA. Effect of low molecular dextran on organ perfusion and sludging. *Surgery.* 1964; 56: 533-543.
  304. Collins GH, Bravo-Shugarman MB, Terasaki PI. Kidney preservation for transplantation. Initial perfusion and 30 hour ice storage. *Lancet.* 1969; 2: 1219-1222.
  305. Alpine G, Garrick RA, Jones MJ, Nures R, Tavoloni N. Water and nonelectrolyte permeability of isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol.* 1986; 251: O872-O877.
  306. Wahlberg JA, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology.* 1986; 23: 477-482.
  307. Jamieson NV, Lindell SL, Sundberg R, Southard JH, Belzer FO. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver. *Cryobiology.* 1988; 46: 512-517.
  308. Chaudry IH, Stephan RN, Dean RE, Clemens MG, Baue AE. Use of Magnesium-ATP following liver ischemia. *Magnesium.* 1988; 7: 68-77.
  309. Southard JH, Rice MJ, Belzer FO. Preservation of renal function by adenosine-stimulated ATP synthesis in hypothermally perfused dog kidneys. *Cryobiology.* 1985; 23: 161-242.
  310. Gao W, Takei Y, Marzi I, Lindert KA, Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, et al. Carolina rinse solution - a new strategy to increase survival time after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 1991; 52: 417-424.
  311. Cronstein BN, Rosenstein ED, Kramer SB, Weissman G, Hirschhorn R. Adenosine: Physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils, adenosine act via an A<sub>2</sub> receptor on human neutrophils. *J Immunol.* 1985; 135: 1366-1371.
  312. Lieberman GE, Lewis GP, Peters TJ. A membrane-bound enzyme in rabbit aorta capable of inhibiting adenosine-diphosphate induced platelet aggregation. *Lancet.* 1977; 2: 330-332.
  313. Urata K, Huet P-M. Portal vein clamping time (PVCT) is the major determinant of survival following prolonged cold ischemia preservation in rat orthotopic liver transplantation (OLT). *Gastroenterology.* 1996; 110: A1350.
  314. Freeman BA, Crapo JD. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982; 47: 412-426.
  315. Fuller BJ, Lunec J, Healing G, Simpkins S, Green CJ. Reduction of susceptibility to lipid peroxidation by desferoxamine in rabbit kidneys subjected to 24-hour cold ischemia and preservation. *Transplantation.* 1987; 43: 604-606.
  316. Rao PN, Walsh TR, Makowska L, Liu T, Demetris AJ, Rubin RS, Snyder JT, et al. Inhibition of free radical generation and improved survival by protection of the hepatic microvascular endothelium by targeted erythrocytes in orthotopic rat liver transplantation. *Transplantation.* 1990; 49: 1055-1059.
  317. Reilly PM, Schiller HJ, Buckley GB. Pharmacological approach to tissue injury mediated by free radicals and other oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991; 161: 488-503.
  318. Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH, Metz E, Rundles RW. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharm.* 1966; 15: 863-880.
  319. Αντωνιάδης ΑΑ. Φαρμακευτικά ουσία χρησιμοποιούμενα κατά την συντήρηση νεφρικών μοσχευμάτων. Στο: Συντήρησης δι' Απλής Ψύξεως Νεφρικών Μοσχευμάτων Εκτεθέντων εις Παρατεταμένη Θερμότητα Ισοαιμία. Διατριβή επί Υψηλής, Θεσσαλονίκη. 1975; 30-37.
  320. Gamble JR, Skinner MP, Berndt MC, Vadas MA. Prevention of activated neutrophil adhesion to endothelium by soluble adhesion protein



- GMP 140. Science. 1990; 249: 414-417.
321. Ramwell PW, Shaw JE. Biological significance of prostaglandins. *Rec Prog Horm Res.* 1970; 26: 139-187.
322. Gayle J, Hurley JV. The effects of prostacyclin on the adhesion of leucocytes to injured vascular endothelium. *J Pathol.* 1984; 142: 51-61.
323. Richardson PD, Withington PG. Liver blood flow. II. Effect of drugs and hormones on liver blood flow. *Gastroenterology.* 1981; 81: 356-375.
324. Miura Y, Fukui G. Prostaglandins as possible triggers for liver regeneration after partial hepatectomy: A review. *Cell Mol Biol.* 1979; 25: 179-184.
325. Tokunaga Y, Wicomb WN, Conception W, Nakazato P, Collins GH, Esquivel CO. Successful 20hr rat liver preservation with chlorpromazine in sodium lactobionate sucrose solution. *Surgery.* 1991; 110: 80-86.
326. London EJ, Jaiswal RK, Naukam RJ, Sastry BVR. Effects of calcium channel blocking agents on membrane microviscosity and calcium in the liver of carbon tetrachloride treated rat. *Biochem Pharm.* 1984; 33: 3553-3558.
327. Den Butter G, Marsh DC, Lindell SL, Southard JH, Belzer FO. Amino acids to suppress reperfusion injury after liver preservation. *Transplant Proc.* 1991; 23: 2378-2379.
328. Sumimoto R, Kamada N, Jamieson NV, Fukuda Y, Kiyohiko D. A comparison of new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and Eurocollins for rat liver preservation. *Transplantation.* 1991; 51: 589-594.
329. Belzer FO. Correct use of university of Wisconsin solution. *Lancet.* 1990; 2: 330-362.
330. Adam R, Astarcigloou I, Castaing D, Bismuth H. Ringer's lactate vs serum albumin as a flush solution for preserved liver grafts; Results of a prospective randomized study. *Transplant Proc.* 1991; 23: 2374-2375.
331. Bachmann S, Olesky I, Thurman RG, Lemasters JJ. Improved graft survival using warm carolina rinse solution after orthotopic rat liver transplantation. *Gastroenterology.* 1991; 100: A818.
332. Beutler E. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods.* 2nd ed. New York, Grune & Stratton. 1984: 300.
333. Huang A, Kennel SJ, Huang L. Interaction of immunoliposomes with target cells. *J Biol Chem.* 1983; 258: 14034-14036.
334. Xu HS, Wang DJ, Pace RC, Jones RS. Beneficial effects of prewarming the donor liver for rat liver transplantation. *Am J Surg.* 1992; 164: 164-168.
335. Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix: II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virchows Archiv A Pathol Anat Histopathol.* 1993; 423: 77-84.
336. Fischer JH, Jeschkeit S, Klein P. Adding a new principle to hypothermic storage preservation. Reduction of edema formation by hyaluronidase. *Transplantation.* 1994; 58: 748-753.
337. Darke A, Finer EG, Mourhouse R, Rees DA. Studies of hyaluronate solutions by nuclear magnetic relaxation measurements. Detection of covalently-defined, stiff segments within the flexible chains. *J Mol Biol.* 1975; 99: 477-486.
338. Comper WD, Laurent TC. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev.* 1978; 58: 255-315.
339. Sunnergren KP, Rovetto MJ. Microvascular permeability characteristics of the isolated perfused ischemic rat heart. *J Mol Cell Biol.* 1980; 12: 1011-1031.
340. Waynforth HB, Flecknell PA. *Anaesthesia and postoperative care.* 2nd ed. Experimental and Surgical Technique in the Rat, Academic Press Ltd, London. 1992; 341-358.
341. Howden B, Jablonski P, Grossman H, Marshall VC. The importance of the hepatic artery in rat liver transplantation. *Transplantation.* 1989; 47: 428-431.
342. Post S, Menger MD, Rentsch M, Gonzalez AP, Herfarth C, Messmer K. The impact of arterialization on hepatic microcirculation and leucocyte accumulation after liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 1992; 54: 789-794.
343. Kamada N. Surgical techniques for rat liver transplantation. 2nd ed. *Experimental Liver Transplantation*, CRC Press Inc., Boca Raton. 1988: 7-18.
344. Teramoto K, Bowers JL, Kruskal JB, Clouse ME. Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 1993; 56: 1076-1082.
345. Higgins GM, Anderson RM. *Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.* Arch Pathol. 1931; 12: 186-202.
346. Waynforth HB, Flecknell PA. *Vital statistics and miscellaneous information.* 2nd ed. Experimental and Surgical Technique in the Rat, Academic Press Ltd, London. 1992; 341-358.
347. Ginetzinsky AG. Of hyaluronidase in the reabsorption of water renal tubules. The mechanism of action of the antidiuretic hormone. *Nature.* 1958; 182: 1218-1219.
348. Schafer S, Zerbe O, Gressner AM. The synthesis of proteoglycans in fat-storing cells of rat liver. *Hepatology.* 1987; 7: 680-684.
349. Gressner AM, Haarmann R. Regulation of hyaluronate synthesis in rat liver fat storing cell cultures by kupffer cells. *J Hepatol.* 1988; 7: 310-318.
350. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Ildstad S, Ricordi C, Trucco M. Cell migration, chimerism, and graft acceptance. *Lancet.* 1992; 339: 1579-1582.
351. Lu L, Rudert WA, Qian S, McCaslin D, Fu F, Rao AS, Trucco M, et al. Growth of donor-derived dendritic cells from the bone marrow of murine liver allograft recipients in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1995; 182: 379-387.
352. Dahl LB, Kimpton WG, Cahill RNP, Brown TJ, Fraser JRE. The origin and fate of hyaluronan in amniotic fluid. *J Dev Physiol.* 1989; 12: 209-218.
353. Balazs EA, Denlinger JL. The vitreous. 2nd ed. Davson H, ed. *The Eye*, Vol 1A, Academic Press, London. 1989; 533-589.
354. Laurent TC, Lilja K, Brunnberg I, Engstrom-Laurent A, Laurent UGB, Lindqvist U. Urinary excretion of hyaluronan in man. *Scand J Clin Lab Invest.* 1987; 47: 793-799.
355. Rosenberg LC, Buckwalter JA. Cartilage proteoglycans. 2nd ed. Kluettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC, eds. *Articular Cartilage Biochemistry*, Raven Press, New York. 1986; 39-57.

356. Laurent UBG, Granath KA. The molecular weight of hyaluronate in the aqueous humour and vitreous body of rabbit and cattle eyes. *Exp Eye Res.* 1983; 36: 481-492.
357. Dahl LB, Dahl IMS, Borresen AL. The molecular weight of sodium hyaluronate in amniotic fluid. *Biochem Med Metab Biol.* 1986; 35: 219-226.
358. Maselli E, Talantin C, Gherardi G, Gaddi D. Use of Healon in the surgery of strabismus. *Implant Refractive Surgery.* 1988; 6: 98-99.
359. Laurent C, Hellstrom S, Stenfors LE. Hyaluronic acid reduces connective tissue formation in middle ears filled with absorbable gelatin sponge: An experimental study. *Am J Otolaryngol.* 1986; 7: 181-186.
360. Arnbjornsson EO. Sodium hyaluronate as an aid in microvascular surgery. *Microsurgery.* 1986; 7: 166-167.
361. Braunstein RE, Kazim M, Schubert HD. Endoscopy and biopsy of the orbit. *Ophthalm Plast Reconstr Surg.* 1995; 11: 269-272.
362. Balazs EA, Freeman MI, Kloti R, Meyer G, Regnault F, Sweeney DB. Hyaluronic acid and replacement of vitreous and aqueous humor. *Mod Probl Ophthalmol.* 1972; 10: 3-21.
363. Larsen NE, Pollack CT, Reiner K, Leshchiner E, Balazs EA. Hylan gel biomaterial: Dermal and immunologic compatibility. *J Biomed Mater Res.* 1993; 27: 1129-1134.
364. Stenberg A, Lackgren G. A new bioimplant for the endoscopic treatment of vesicoureteral reflux: Experimental and short term clinical results. *J Urol.* 1995; 154: 800-803.
365. Soon-Shiong P, Heintz R, Yao Z, Yao Q, Sanford P, Lanza PR, Meredith N. Glucose-insuline kinetics of the extravascular bioartificial pancreas. A study using microencapsulated rat islets. *Am Soc Artif Int Org J.* 1992; 38: 851-854.
366. Amiel D, Ishizue K, Billings E, Wiig M, Vande Berg J, Akeson WH. Hyaluronan in flexor tendon repair. *J Hand Surg.* 1989; 14A: 837-843.
367. Shushan A, Mor-Yosef S, Avgar A, Laufer N. Hyaluronic acid for preventing experimental postoperative intraperitoneal adhesions. *J Reprod Med.* 1994; 39: 398-402.
368. Ferns GAA, Konneh M, Rutherford C, Woolaghan E, Angaard EE. Hyaluronan inhibits neointimal macrophage influx after balloon-catheter induced injury in the cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis.* 1995; 114: 157-164.
369. Seckel BR, Jones D, Hekimian KJ, Wang KK, Chakalis DP, Costas PD. Hyaluronan through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res.* 1995; 40: 318-324.
370. Shimmura S, Ono M, Shinozaki K, Toda I, Takamura E, Mashima Y, Tsubota K. Sodium hyaluronate eyedrops in the treatment of dry eyes. *Br J Ophthalmol.* 1995; 79: 1007-1011.
371. Moore AR, Willoughby DA. Hyaluronan as a drug delivery system for diclofenac: A hypothesis for mode of action. *Int J Tissue React.* 1995; 17: 157-166.
372. Da Cruz I, Rakoczy P, Perricaudet M, Constable JJ. Dynamics of gene transfer to retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Visc Sci.* 1996; 37: 101-105.
373. Rydell NW. Decreased granulation tissue reaction after instalment of hyaluronic acid. *Acta Orthop Scand.* 1970; 41: 307-311.
374. Lees VC, Fan TPD, West DC. Angiogenesis in a delayed revascularisation model is accelerated by low molecular weight hyaluronan fragments. *Lab Invest.* 1995; 73: 259-266.
375. Afify AM, Stern M, Guntenhoner M, Stern R. Purification and characterization of human serum hyaluronidase. *Arch Biochem Biophys.* 1993; 305: 434-441.
376. Tu AT, Hendon RR. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp Biochem Physiol.* 1983; 76: 377-383.
377. Hynes WL, Ferrenti JJ. Sequence analysis and expression in *E. Coli* of the hyaluronidase gene of *Streptococcus Pyogenes* Bacteriophage H4489A. *Infect Immunol.* 1989; 57: 201-205.
378. Lee S, Edington TS. Heterotopic liver transplantation utilizing inbred rat strains. *Am J Pathol.* 1968; 52: 649-669.
379. Hess F, Jerustoph C, Van der Heyde MN. Advantages of auxiliary liver homotransplantation in rats. *Arch Surg.* 1972; 104: 76-80.
380. Houssin D. Spontaneous tolerance of liver allograft in the rat. *J Chir.* 1979; 116: 663-674.
381. Muller G. A simple technique for heterotopic auxiliary liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 1983; 36: 221-222.
382. Marni A, Ferrero ME. Heterotopic liver grafting in the rat: A simplified method using cuff techniques. *Transplantation.* 1985; 39: 329-330.
383. Marni A, Ferrero ME, Forti D, Gaja GF. Advantages of cuff techniques versus standard microsurgical techniques in heterotopic nonauxiliary liver transplantation in rats. *Transplant Proc.* 1987; 9: 3854-3858.
384. Lorente L, Arias J, Aller MA, Ispizua JI, Rodrigues J, Duran H. Heterotopic auxiliary liver transplantation with portal flow HPB. *Surgery.* 1990; 281-293.
385. Hong HQ, Asahara T, Ito H, Watanabe H, Kimura A, Urushihara T, Marubayashi S, et al. Study of portal arterialization with auxiliary liver transplantation. *Hirosh J Med Sci.* 1991; 40: 29-33.
386. Baranski AG, Barker AP, Sokal E, Havaux H, Saliez A, Lambotte L, De Ville de Goyet T. A new method for rat accessory hepatic transplantation. The cervical approach. *Transpl Int.* 1994; 7: 394-404.
387. Yu W, Wan X, Wright JR, Coddington D, Bitter-Suermann H. Heterotopic liver transplantation in rats: Effect of intrahepatic islet isografts and split portal blood flow on liver integrity after auxiliary liver isortransplantation. *Surgery.* 1994; 115: 108-117.

## B. ΜΗ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΗ ΜΕ ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

Alho, A. M. and C. B. Underhill (1989). "The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells." *Journal of Cell Biology* 108: 1557-1565.

- Allen, J. W., C. F. Shuler, et al. (1978). "Bromodeoxyuridine tablet methodology for in vivo studies of DNA synthesis." *Stomach Cell Genetics* 4(4): 393-405.
- Alston Smith, J., H. Pertoft, et al. (1992). "Endocytosis of hyaluronan in rat kupffer cells." *Biochemical Journal* 286: 519-526.
- Alves, V. A. F., L. C. C. Gayotto, et al. (1992). "Leptospiral antigens in the liver of experimentally infected guinea pig and their relation to the morphogenesis of liver damage." *Experimental and Toxicologic Pathology* 44(7): 425-434.
- Amsterdam, A. and J. D. Jamieson (1974). "Studies on dispersed pancreatic exocrine cells." *Journal of Cell Biology* 63: 1037-1056.
- Arai, K., T. Hai, et al. (1995). "Unique expression of adhesion molecules CD44+, L-selectin-, on intermediate TCR cells in the liver and the modulation of their adhesion by hyaluronic acid." *Immunology* 84: 64-71.
- Arenson, D. M., S. L. Friedman, et al. (1988). "Formation of extracellular matrix in normal rat liver: Lipocytes as a major source of proteoglycan." *Gastroenterology* 95(2): 441-447.
- Arita, S., T. Asano, et al. (1992). "Clinical study of hepatic disorders in renal transplant recipients with special reference to hepatitis C." *Transplantation Proceedings* 24(4): 1538-1540.
- Armenariz-Borunda, J., H. Katai, et al. (1993). "Transforming growth factor B gene expression is transiently enhanced at a critical stage during liver regeneration after CCl4 treatment." *Laboratory Investigation* 69(3): 283-294.
- Balabaud, C., K. A. Kron, et al. (1977). "The assessment of the bile salt-independent fraction of canalicular bile water in the rat." *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 89(2): 393-399.
- Bentsen, K. D., J. H. Henriksen, et al. (1986). "Circulating hyaluronate: Concentration in different vascular beds in man." *Clinical Science* 71: 161-165.
- Bissell, D. A., L. E. Hammaker, et al. (1973). "Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture." *Journal of Cell Biology* 59: 722-734.
- Blankensteijn, J. D. and O. T. Terpesta (1991). "Liver preservation: The past and the future." *Hepatology* 13: 1236-1246.
- Blomhoff, R., B. Smedsrod, et al. (1984). "Preparation of isolated liver endothelial cells and kupffer cells in high yield by means of an enterotoxin." *Experimental Cell Research* 150: 194-204.
- Bonney, R. J., J. E. Becker, et al. (1974). "Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis." *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 9(6): 399-413.
- Bonney, R. J., P. R. Walker, et al. (1973). "Isoenzyme patterns in parenchymal and non-parenchymal cells isolated from regenerating and regenerated rat liver." *Biochemical Journal* 136: 947-954.
- Bowers, B. A., G. D. Branum, et al. (1987). "Bile flow - an index of ischemic injury." *Journal of Surgical Research* 42: 565-569.
- Braun, L., J. E. Mead, et al. (1988). "Transforming growth factor beta mRNA increases during liver regeneration: A possible paracrine mechanism of growth regulation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 1539-1543.
- Breen, M., H. G. Weinstein, et al. (1970). "Microanalysis and characterization of acidic glycosaminoglycans in human tissues." *Analytical Biochemistry* 35: 146-159.
- Bucher, N. L. R. (1967). "Experimental aspects of hepatic regeneration." *New England Journal of Medicine* 277(14): 738-746.
- Burke, G. W., R. Alejandro, et al. (1994). "Combined kidney/pancreas transplantation in diabetes mellitus." *Journal of the Florida Medical Association* 81(5): 339-343.
- Butcher, G. W., J. R. Corvalan, et al. (1982). "Immune response genes controlling responsiveness to major transplantation antigens." *Journal of Experimental Medicine* 155: 303-320.
- Butcher, G. W. and J. C. Howard (1977). "A recombinant in the major histocompatibility complex of the rat." *Nature* 266: 362-364.
- Butcher, G. W. and J. C. Howard (1982). "Genetic control of transplant rejection." *Transplantation* 34(4): 161-166.
- Carlsson, R., E. Engvall, et al. (1981). "Laminin and fibronectin in cell adhesion: Enhanced adhesion of cells from regenerating liver to laminin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(4): 2403-2406.

- Carrel, A. and C. C. Guthrie (1905). "The transplantation of veins and organs." *American Medicine* 10(27): 1101-1102.
- Chanussot, F., D. Botta-Fridlund, et al. (1992). "Effects of cyclosporine and corticosteroids on bile secretion in the rat." *Transplantation* 54(2): 226-231.
- Cohen, A. M., C. Soderberg, et al. (1990). "Plasma clearance and tissue distribution of recombinant human platelet-derived growth factor (b-chain homodimer) in rats." *Journal of Surgical Research* 49(5): 447-452.
- De Grendele, H. C., P. Estess, et al. (1997). "Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site." *Science* 278: 672-675.
- Deaciuc, I. V., G. J. Bagby, et al. (1993). "Gram-negative bacterial lipopolysaccharide impairs hyaluronan clearance in vivo and its uptake by the isolated, perfused rat liver." *Transplantation* 55(1): 173-178.
- Deaciuc, I. V., G. J. Bagby, et al. (1993). "Hyaluronic acid uptake by the isolated, perfused rat liver: An index of hepatic sinusoidal endothelial cell function." *Hepatology* 17(2): 266-272.
- Dubernard, J. M., X. Martin, et al. (1994). "Technical aspects of pancreas transplantation." *Transplantation Proceedings* 26(2): 384-385.
- Ekman, M., M. Fjälling, et al. (1992). "IODIDA clearance rate: A method for measuring hepatocyte uptake function." *Transplantation Proceedings* 24(1): 387-388.
- Ellis, T. M., C. R. Berry, et al. (1982). "Immunological monitoring of renal allograft recipients using monoclonal antibodies to human T lymphocyte subpopulations." *Transplantation* 33(3): 317-319.
- Engemann, R., K. Ulrichs, et al. (1982). "Value of a physiological liver transplant model in rats: Induction of specific graft tolerance in a fully allogeneic strain combination." *Transplantation* 33(5): 566-568.
- Engstrom-Laurent, A., N. Feltelius, et al. (1985). "Raised serum hyaluronate in scleroderma: an effect of growth factor induced activation of connective tissue cells?" *Annals of Rheumatic Diseases* 44: 614-620.
- Engstrom-Laurent, A. and S. Hellstrom (1990). "The role of liver and kidneys in the removal of circulating hyaluronan: An experimental study in the rat." *Connective Tissue Research* 24: 219-224.
- Eriksson, S., J. R. E. Fraser, et al. (1983). "Endothelial cells are a site of uptake and degradation of hyaluronan in the liver." *Experimental Cell Research* 144: 223-228.
- Field, M. J., D. E. R. Sutherland, et al. (1989). "Experimental pancreatic preservation prior to islet isolation and transplantation." *Journal of Surgical Research* 46(5): 474-478.
- Fishback, F. C. (1929). "A morphologic study of regeneration of the liver after partial removal." *Archives of Pathology*: 955-977.
- Fisher, B., P. Szuch, et al. (1971). "A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration." *Science* 171: 575-577.
- Friedman, S. L. and M. J. P. Arthur (1989). "Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium." *Journal of Clinical Investigation* 84: 1780-1785.
- Friedman, S. L. and F. J. Roll (1987). "Isolation and culture of hepatic lipocytes, kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density centrifugation with stractan." *Analytical Biochemistry* 161: 207-218.
- Fujioka, H., A. Mizoe, et al. (1997). "Change in serum levels of endothelin-1 in porcine liver transplantation and efficacy of endothelin-1 antagonist to protect damage to liver grafts." *Transplantation Proceedings* 29: 869-870.
- Gaub, J. and J. Iversen (1984). "Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy." *Hepatology* 4(5): 902-904.
- Gmachl, M. and G. Kreil (1993). "Bee venom hyaluronidase is homologous to a membrane protein of mammalian sperm." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 3569-3573.
- Goresky, C. A. (1963). "A linear method for determining liver sinusoidal and extravascular volumes." *American Journal of Physiology* 204(4): 626-640.
- Granstein, R. D., T. J. Flotte, et al. (1990). "Interferons and collagen production." *Journal of Investigative Dermatology* 95(Suppl 6): S75-S80.
- Gratzner, H. G. (1982). "Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iodo-deoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication." *Science* 218: 474-475.

- Gray, D. W. R. (1994). "The development and current status of pancreas and islet transplantation." *Transplant Immunology* 2: 127-129.
- Grisham, J. W. (1962). "A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H." *Cancer Research* 22: 842-849.
- Grisham, J. W., G. F. Leong, et al. (1964). "Heterotopic partial aurotransplantation of rat liver: Technique and demonstration of structure and function of the graft." *Cancer Research* 24: 1474-1495.
- Gustafson, S., T. Björkman, et al. (1994). "Labelling of high molecular weight hyaluronan with 125I tyrosine: Studies in vitro and in vivo in the rat." *Glycoconjugate Journal* 11: 608-613.
- Hansen, B. A. and H. E. Poulsen (1986). "The capacity of urea-N synthesis as a quantitative measure of the liver mass in rats." *Journal of Hepatology* 2: 468-474.
- Harbrecht, B. G., M. Di Silvio, et al. (1994). "Tumor necrosis factor- $\alpha$  regulates in vivo nitric oxide synthesis and induces liver injury during endotoxemia." *Hepatology* 20(4): 1055-1060.
- Harihara, Y., K. Sanjo, et al. (1992). "A modified cuff technique for suprahepatic vena cava anastomosis in rat liver transplantation." *Transplantation* 53(3): 707-709.
- Harkness, R. D. (1957). "Regeneration of liver." *British Medical Bulletin* 13(2): 87-93.
- Harmon, W. J., D. M. Barrett, et al. (1996). "Transurethral enzymatic ablation of the prostate: Canine model." *Urology* 48(2): 229-233.
- Hart, D. N. J. and J. W. Fabre (1979). "Quantitative studies on the tissue distribution of Ia and SD antigens in the DA and Lewis rat strains." *Transplantation* 27(2): 110-119.
- Hart, D. N. J. and J. W. Fabre (1981). "Antibodies to liver-specific auto- and alloantigens after alloimmunization with liver tissue in the rat." *Transplantation* 31(3): 178-182.
- Hasuike, Y., N. Monden, et al. (1988). "A simple method for orthotopic liver transplantation with arterial reconstruction in rats." *Transplantation* 45(4): 830-832.
- Hayashi, M., Y. Tokunaga, et al. (1993). "The effects of cold preservation on steatotic graft viability in rat liver transplantation." *Transplantation* 56(2): 282-287.
- Hayek, D. H. and S. R. Tipton (1966). "Respiratory activity and maintenance of cell suspensions of rat liver." *Journal of Cell Biology* 29: 405-409.
- Heldin, C.-H. (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." *Cell* 80: 213-223
- Heldin, P., T. Asplund, et al. (1992). "Characterization of the molecular mechanism involved in the activation of hyaluronan synthetase by platelet-derived growth factor in human mesothelial cells." *Biochemical Journal* 283: 165-170.
- Heldin, P., M. De La Torre, et al. (1996). "Differential synthesis and binding of hyaluronan by human breast cancer cell lines: Relationship to hormone receptor status." *Oncology Reports* 3: 1011-1016.
- Heldin, P., H. Perotto, et al. (1991). "Differential expression of platelet-derived growth factor  $\alpha$ - and  $\beta$  receptors on fat-storing cells and endothelial cells of rat liver." *Experimental Cell Research* 193: 364-369.
- Holmberg, S. B., E. Forssell-Aronsson, et al. (1990). "Vascular clearance by the reticuloendothelial system - measurements using two different-sized albumin colloids." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 50: 865-871.
- Hopkins, H. A., H. A. Campbell, et al. (1973). "Thymidine kinase and deoxyribonucleic acid metabolism in growing and regenerating livers from rats on controlled feeding schedules." *Biochemical Journal* 136: 955-966.
- Howard, J. C. (1983) "The major histocompatibility complex of the rat: A partial review." *Metabolism* 32(7 (Suppl 1)): 541-550.
- Howard, R. B., A. K. Christensen, et al. (1967). "The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver." *Journal of Cell Biology* 35: 675-684.
- Howard, T. K., G. B. G. Klintmalm, et al. (1990). "The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient." *Transplantation* 49(1): 103-107.

- Howden, B. O., P. Jablonski, et al. (1990). "Liver preservation with UW solution: I. Evidence that hydroxyethyl starch is not essential." *Transplantation* 49(5): 869-872.
- Hughes, C. B., H. P. Grewal, et al. (1994). "Solid organ pancreas transplantation: A review of the current status and report of one institution's experience." *American Surgeon* 60(9): 669-673.
- Ishikawa, T., T. Yagi, et al. (1997). "Energy metabolism of the grafted liver and influence of preretrieval feeding process on swine orthotopic liver transplantation." *Transplantation Proceedings* 29: 397-399.
- Jindal, R. M., P. McShane, et al. (1994). "Isolation and purification of pancreatic islets by fluorescence activated islet sorter." *Transplantation Proceedings* 26(2): 653.
- Jindal, R. M., M. A. Tepper, et al. (1994). "Deoxyspergualin - A novel immunosuppressant." *Mount Sinai Journal of Medicine* 61(1): 51-56.
- Jirtle, R. L. and G. K. Michalopoulos (1982). "Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes." *Cancer Research* 42: 3000-3004.
- Johnsson, C., R. Hallgren, et al. (1993). "Recovery of hyaluronan during perfusion of small bowel transplantation reflects rejection." *Transplantation* 55(3): 477-479.
- Joy, M. B., K. S. Dodgson, et al. (1985). "The purification and some properties of pig liver hyaluronidase." *Biochimica et Biophysica Acta* 838: 257-263.
- Kamachi, H., Y. Nakajima, et al. (1996). "Study of liver function in a graft suffering from warm ischemia in porcine liver transplantation." *Transplantation Proceedings* 28(3): 1789-1791.
- Kamada, N., G. Brons, et al. (1980). "Fully allogeneic liver grafting in rats induces a state of systemic nonreactivity to donor transplantation antigens." *Transplantation* 29(5): 429-431.
- Kan, M., J. Huang, et al. (1989). "Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): A potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 7432-7436.
- Kan, M., G.-C. Yan, et al. (1992). "Receptor phenotype underlies differential response of hepatocytes and non-parenchymal cells to heparin-binding fibroblast growth factor type 1 (aFGF) and type 2 (bFGF)." *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 28A: 515-520.
- Kan, M., G. Zhang, et al. (1991). "Hepatocyte growth factor / Hepatopoietin A stimulates the growth of rat kidney proximal tubule epithelial cells (RPTE), rat nonparenchymal liver cells, human melanoma cells, mouse keratinocytes and stimulates anchorage-independent growth of SV-40 transformed RPTE." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 174(1): 331-337.
- Kasai, T., H. Moriwaki, et al. (1993). "The clearance rate of chylomicron retinyl ester from plasma can be used to distinguish rats with cirrhosis from those with portacaval shunt." *Hepatology* 17(1): 125-130.
- Kato, H. and T. Shimazu (1983). "Effect of autonomic denervation on DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy." *European Journal of Biochemistry* 134: 473-478.
- Kato, K., M. Matsuda, et al. (1994). "The immunostimulant OK-432 enhances liver regeneration after 90% hepatectomy in rats." *Hepatology* 19(5): 1241-1244.
- Kawasaki, S., M. Makuuchi, et al. (1992). "Liver regeneration in recipients and donors after transplantation." *Lancet* 339: 580-581.
- Kimmich, G. A. (1970). "Preparation and properties of mucosal epithelial cells isolated from small intestine of the chicken." *Biochemistry* 9(19): 3659-3668.
- Kishikawa, K., K. Yanaga, et al. (1996). "Tolerance of cirrhotic liver to cold ischemia: Ex vivo analysis in rats." *European Surgical Research* 28: 111-118.
- Knudson, C. B. and W. K. Knudson (1993). "Hyaluronan-binding proteins in development, tissue homeostasis and disease." *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 7: 1233-1241.
- Korner, T., J. Kropf, et al. (1996). "Serum laminin and hyaluronan in liver cirrhosis: Markers of progression with high prognostic value." *Journal of Hepatology* 25: 684-688.
- Kraehenbuhl, J. P. (1977). "Dispersed mammary gland epithelial cells." *Journal of Cell Biology* 72: 390-405.
- Kukan, M. (1997). "Hyaluronic acid elimination after cold storage of rat liver." *Gastroenterology* 112(5): 1775-1778.
- Larsen, J. L., W. C. Duckworth, et al. (1994). "Pancreas transplantation for type I diabetes mellitus." *Postgraduate Medicine* 96(3): 105-111.

- Laurent, T. C., J. R. E. Fraser, et al. (1986). "Binding of hyaluronate and chondroitin sulfate to liver endothelial cells." *Biochemical Journal* 234: 653-658.
- Laurent, U. B. G. and A. Tengblad (1980). "Determination of hyaluronate in biological samples by a specific radioassay technique." *Analytical Biochemistry* 109: 386-394.
- Leffert, H. L., K. S. Koch, et al. (1979). "Hormonal control of rat liver regeneration." *Gastroenterology* 78(6): 1470-1482.
- Li, X. K., A. F. M. Marin, et al. (1993). "Effect of protease inhibitor on ischemia / reperfusion injury of the rat liver." *Transplantation* 56(6): 1331-1336.
- Lindqvist, U., A. Engstrom-Laurent, et al. (1988). "The diurnal variation of serum hyaluronan in health and disease." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 48: 765-770.
- Lindqvist, U., T. Groth, et al. (1997). "Evaluation of various models of hyaluronan kinetics for assessment of liver function." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 57: 49-58.
- Lindqvist, U., T. Groth, et al. (1992). "A hyaluronan-loading test applied to patients with liver and joint diseases." *Clinica Chimica Acta* 210: 119-132.
- Liu, D., E. Pearlman, et al. (1996). "Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 7832-7837.
- London, N. J. M. and P. K. Donnelly (1994). "Techniques of pancreas and islet transplantation." *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 8(3): 517-532.
- Maher, J. J. (1993). "Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver." *Journal of Clinical Investigation* 91: 2244-2252.
- Makowka, L., R. D. Gordon, et al. (1987). "Analysis of donor criteria for the prediction of outcome in clinical liver transplantation." *Transplantation Proceedings* 14(19): 2378-2382.
- Martin, X., J. M. Dubernard, et al. (1994). "Pancreatic transplantation: Indications and results." *Bailliere's Clinical Gastroenterology* 8(3): 533-560.
- Marzi, I., J. Knee, et al. (1991). "Hepatic microcirculatory disturbances due to portal vein clamping in the orthotopic rat liver transplantation model." *Transplantation* 52(3): 432-436.
- Marzi, I., Y. Takei, et al. (1990). "Assesment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat." *Transplantation Proceedings* 22(4): 2004-2005.
- Marzi, I., Z. Zhong, et al. (1989). "Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation." *Transplantation* 48(3): 463-468.
- Masumoto, A. and N. Yamamoto (1991). "Sequestration of a hepatocyte growth factor in extracellular matrix in normal adult liver." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 174(1): 90-95.
- Matsumoto, K., T. Hisao, et al. (1993). "Heparin as an inducer of hepatocyte growth factor." *Journal of Biochemistry* 114(6): 820-826.
- Matsumoto, K. and T. Nakamura (1992). "Hepatocyte growth factor: Molecular structure, roles in liver regeneration and other biological functions." *Critical Reviews in Oncogenesis* 3(1, 2): 27-54.
- Matsumo, N., M. Uchiyama, et al. (1996). "Liver transplantation from non-heart-beating donors: Liver procurement without in situ portal flush." *Transplantation Proceedings* 28(1): 203-204.
- McCourt, P. A. G., B. Ek, et al. (1994). "Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan." *Journal of Cell Biology* 269(48): 30081-30084.
- McGary, C. T., J. Yannariello-Brown, et al. (1993). "Degradation and intracellular accumulation of a residualizing hyaluronan derivative by liver." *Hepatology* 18(6): 1465-1476.
- Mead, J. E. and N. Fausto (1989). "Transforming growth factor  $\alpha$  may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 1558-1562.
- Meyer, F. A. and A. Silberberg (1974). "In vitro study of the influence of some factors important for any physicochemical characterization of loose connective tissue in microcirculation." *Microvascular Research* 8: 263-273.
- Michalopoulos, G. K. (1990). "Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control." *Federation of American Societies for Experimental Biology*

- Michalopoulos, G. K., H. D. Canciulli, et al. (1982). "Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture." *Cancer Research* 42: 4673-4682.
- Montesano, R., S. Kumar, et al. (1996). "Synergistic effect of hyaluronan oligosaccharides and vascular endothelial growth factor on angiogenesis in vitro." *Laboratory Investigation* 75(2): 249-262.
- Montgomery, A., R. Kallen, et al. (1993). "Reperfusion of duodenum and pancreas following 24 hr of cold storage in Perfadex or UW solution." *Journal of Surgical Research* 55(6): 615-621.
- Muckenschnabel, I., G. Bernhardt, et al. (1996). "Hyaluronidase pretreatment produces selective melphalan enrichment in malignant melanoma implanted in nude mice." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 38(1): 88-94.
- Murata, K., Y. Ochiai, et al. (1985). "Polydispersity of acidic glycosaminoglycan components on human liver and the changes at different stages in liver cirrhosis." *Gastroenterology* 89(6): 1248-1257.
- Murawaki, Y., Y. Ikuta, et al. (1996). "Clinical significance of serum hyaluronan in patients with chronic viral liver disease." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 11: 459-465.
- Nagasue, N., H. Yukaya, et al. (1987). "Human liver regeneration after major hepatic resection." *Annals of Surgery* 206(1): 30-39.
- Nakagami, M., T. Morimoto, et al. (1996). "Difference in onset of warm ischemia and reperfusion injury between parenchymal and endothelial cells of the liver." *Journal of Surgical Research* 62(1): 118-124.
- Nakamura, T., S. Arai, et al. (1996). "Amelioration by Kupffer cell blockade in hepatic damage induced by cold preservation with subsequent plasma-supplemented perfusion." *Journal of Surgical Research* 62(2): 207-215.
- Nakatsukasa, H., R. P. Everts, et al. (1990). "Transforming growth factor- $\beta$ 1 and type I procollagen transcripts during regeneration and early fibrosis of rat liver." *Laboratory Investigation* 63(2): 171-180.
- Nanji, A. A., S. R. Tahan, et al. (1996). "Elevated plasma levels of hyaluronic acid indicate endothelial cell dysfunction in the initial stages of alcoholic liver disease in the rat." *Journal of Hepatology* 24: 368-374.
- Naredi, P., J. Mattson, et al. (1990). "Evaluation of blood flow measurements with microspheres and rubidium - an experimental study in rats." *International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental* 9: 423-437.
- Nyberg, A., U. Lindqvist, et al. (1992). "Serum hyaluronan and aminoterminal propeptide of type III procollagen in primary biliary cirrhosis: relation to clinical symptoms, liver histopathology and outcome." *Journal of Internal Medicine* 231: 485-491.
- Okamoto, E., A. Kyo, et al. (1984). "Prediction of the safe limits of hepatectomy by combined volumetric and functional measurements in patients with impaired hepatic function." *Surgery* 95(5): 586-591.
- Okanou, T., E. J. Burbige, et al. (1983). "The role of the Ito cell in perivascular and intralobular fibrosis in alcoholic hepatitis." *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 107: 459-463.
- Palombo, J. D., J. J. Pomposelli, et al. (1989). "Glycolytic support of adenine nucleotides in rat liver flush- preserved with UW or Collins' II." *Transplantation* 48(6): 901-905.
- Pare, A., R. Deulobeu, et al. (1996). "Serum hyaluronate reflects hepatic fibrogenesis in alcoholic liver disease and is useful as a marker of fibrosis." *Hepatology* 24(6): 1399-1403.
- Pertoft, H. and B. Smedsrod (1987). Separation and characterization of liver cells. *Cell Separation: Methods and Selected Applications*, T. G. Pretlow II and T. P. Pretlow. Orlando, Florida, Academic Press, Inc. 4: 1-24.
- Post, S., A. P. Gonzalez, et al. (1992). "Assesment of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat." *Hepatology* 16(3): 803-809.
- Post, S., P. Palma, et al. (1993). "Differential impact of Carolina rinse and university of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, kupffer cell activity and biliary excretion after liver transplantation." *Hepatology* 18(6): 1490-1497.
- Pruzanski, W., E. Stefanski, et al. (1990). "Sequential activation of TNF-phospholipase A2 axis following iv endotoxin challenge in human volunteers." *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 4: A1714.



- Pyke, D. A. (1993). "Pancreatic and islet transplantation for diabetes." *Clinical Endocrinology* 39: 399-400.
- Qian, S., J. J. Fung, et al. (1991). "Orthotopic liver transplantation in the mouse." *Transplantation* 52(3): 562-564.
- Rahmanian, M., H. Pertofto, et al. (1997). "Hyaluronan oligosaccharides induce tube formation of a brain endothelial cell line in vitro." *Experimental Cell Research* 237: 1-8.
- Ramadori, G., G. Zohrens, et al. (1991). "Serum hyaluronate and type III procollagen aminoterminal propeptide concentration in chronic liver disease activity." *European Journal of Clinical Investigation* 21: 323-330.
- Reinders, M. E., B. A. Van Wagenveld, et al. (1996). "Hyaluronic acid uptake in the assesment of sinusoidal endothelial cell damage after cold storage and normothermic reperfusion of rat livers." *Transplant International* 9: 446-453.
- Reinstein, L. J., S. N. Lichtman, et al. (1994). "Suppression of lipopolysaccharide-stimulated release of tumor necrosis factor by adenosine: Evidence for A2 on rat kupffer cells." *Hepatology* 19(6): 1445-1452.
- Remuzzi, G., P. Ruggenti, et al. (1994). "Pancreas and kidney/pancreas transplants: Experimental medicine or real improvement?" *Lancet* 343: 27-31.
- Rotolo, F. S., G. D. Brnum, et al. (1986). "Effect of cyclosporine on bile secretion in rats." *American Journal of Surgery* 151: 35-40.
- Ruoslahti, E. and Y. Yamaguchi (1991). "Proteoglycans as modulators of growth factor activities." *Cell* 64: 867-869.
- Russel, W. E., R. J. Coffey, et al. (1988). "Type b transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 5126-5130.
- Russel, W. E., J. A. McGowan, et al. (1984). "Biological properties of a hepatocyte growth factor from rat platelets." *Journal of Cellular Physiology* 119: 193-197.
- Salustri, A., M. Yanagishita, et al. (1992). "Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicle." *Developmental Biology* 151: 541-551.
- Sanchez-Urdazpal, L., G. J. Gores, et al. (1993). "Carolina rinse solution decreases liver injury during clinical liver transplantation." *Transplantation Proceedings* 25(1): 1574-1575.
- Sandler, S., A. Andersson, et al. (1997). "Assessment of insulin secretion in vitro from microencapsulated fetal porcine islet-like cell clusters and rat, mouse, and human pancreatic islets." *Transplantation* 63(12): 1712-1718.
- Sankari, H. N., A. Chong, et al. (1995). "Inactivation of kupffer cells after prolonged fasting improves viability of transplanted hepatic allografts." *Hepatology* 22: 1236-1242.
- Sarphie, T. G., N. B. D' Souza, et al. (1996). "Kupffer cell inactivation prevents lipopolysaccharide-induced structural changes in the rat liver sinusoid: An electron-microscopic study." *Hepatology* 23(4): 788-796.
- Sato, S., H. Ohgawara, et al. (1994). "Preparation and purification of newborn pig pancreatic islet-like clusters: Potential source for xenotransplantation by using a diffusion chamber." *Cell Transplantation* 3(Suppl 1): S15-S17.
- Savani, R. C. and E. A. Turley (1995). "The role of hyaluronan and its receptors in restenosis after balloon angioplasty: Development of a potential therapy." *International Journal of Tissue Reactions* 17(4): 141-151.
- Schmits, R., J. Filmus, et al. (1997). "CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity." *Blood* 90(6): 2217-2233.
- Schneiderman, J., M. Sawdey, et al. (1993). "Type I plasminogen activator inhibitor gene expression following partial hepatectomy." *American Journal of Pathology* 143(3): 753-762.
- Seglen, P. O. (1976). *Preparation of isolated rat liver cells. Methods in Cell Biology*. D. M. Prescott. New York, Academic Press. 13: 30-78.
- Seki, S., H. Sakaguchi, et al. (1991). "Detection of proliferating liver cells in various diseases by a monoclonal antibody against DNA polymerase- $\alpha$ : With special reference to the relationship between hepatocytes and sinusoidal cells." *Hepatology* 14(5): 781-788.
- Settff, A., A. D. Milton, et al. (1988). "Donor class I and class II major histocompatibility complex antigen expression following liver allografting in rejecting and nonrejecting rat strain combinations." *Transplantation* 46(1): 32-40.

- Shiota, G., T. C. Wang, et al. (1994). "Hepatocyte growth factor in transgenic mice: Effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression." *Hepatology* 19(4): 962-972.
- Shiraishi, M., M. E. Csete, et al. (1994). "Regeneration-induced accelerated rejection in reduced-size liver grafts." *Transplantation* 57(3): 336-340.
- Shyjan, A. M., P. Heldin, et al. (1996). "Functional cloning of the cDNA for a human hyaluronan synthase." *Journal of Biological Chemistry* 271(38): 23395-23399.
- Smedsrod, B., H. Pertoft, et al. (1984). "Studies in vitro on the uptake and degradation of sodium hyaluronate in rat liver endothelial cells." *Biochemical Journal* 223: 617-626.
- Snashall, P. D. (1977). "Mucopolysaccharide osmotic pressure in the measurement of interstitial pressure." *American Journal of Physiology* 232(6): H608-H616.
- Sollinger, H. W. (1994). "Current status of simultaneous pancreas-kidney transplantation." *Transplantation Proceedings* 26(2): 375-378.
- Sollinger, H. W. and S. R. Geffner (1994). "Pancreas transplantation." *Surgical Clinics of North America* 74(5): 1183-1195.
- Spicer, A. P., M. L. Augustine, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of a putative mouse hyaluronan synthase." *Journal of Biological Chemistry* 271(38): 23400-23406.
- Steinhoff, G., M. Behrend, et al. (1993). "Intercellular immune adhesion molecules in human liver transplants: Overview on expression patterns of leukocyte receptor and ligand molecules." *Hepatology* 18(2): 440-453.
- Suitters, A. J. and I. A. Lampert (1983). "The loss of IA+ langerhans' cells during graft-versus-host disease in rats." *Transplantation* 36(5): 540-546.
- Suitters, A. J. and I. A. Lampert (1984). "Class II antigen induction in the liver of rats with graft-versus host disease." *Transplantation* 38(2): 194-196.
- Sumimoto, R., N. V. Jamieson, et al. (1990). "Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution." *Transplantation* 50(4): 573-576.
- Sutherland, D. E. R. (1994). "Present status of pancreas transplantation alone in nonuremic diabetic patients." *Transplantation Proceedings* 26(2): 379-383.
- Sutherland, D. E. R. (1994). "State of the art in pancreas transplantation." *Transplantation Proceedings* 26(1): 316-320.
- Sutherland, D. E. R., A. Gruessner, et al. (1994). "International pancreas transplant registry report." *Transplantation Proceedings* 26(2): 407-411.
- Sutton, R., M. Peters, et al. (1986). "Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase." *Transplantation* 42(6): 689-691.
- Suzuki, M., T. Asplund, et al. (1995). "Stimulation of hyaluronan biosynthesis by platelet derived growth factor-BB and transforming growth factor-β1 involves activation of protein kinase C." *Biochemical Journal* 307: 817-821.
- Szabo, G. and S. Magyar (1958). "Of hyaluronidase on capillary permeability, lymph flow and passage of dye-labelled protein from plasma to lymph." *Nature* 182(4632): 377-379.
- Tanaka, N., H. Yamamoto, et al. (1993). "Regulation of liver regeneration by interleukin-2 and its inhibitors: cyclosporine A and FK 506." *International Journal of Immunopharmacology* 15(2): 211-218.
- Tanaka, Y., K. M. Mak, et al. (1990). "Immunohistochemical detection of proliferating lipocytes in regenerating rat liver." *Journal of Pathology* 160: 129-134.
- Taylor, R. J., J. S. Bynon, et al. (1994). "Kidney/Pancreas transplantation: A review of the current status." *Urologic Clinics of North America* 21(2): 343-354.
- Teder, P. and P. Heldin (1997). "Mechanism of impaired local hyaluronan turnover in bleomycin-induced lung injury in rat." *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 17: 376-385.
- Tibell, A., R. Linder, et al. (1990). "Long-term glucose control after pancreatic transplantation." *Transplantation Proceedings* 22(2): 645-646.
- Todo, S., Y. Zhu, et al. (1997). "Attenuation of ischemic liver injury by augmentation of endogenous adenosine." *Transplantation* 63(2): 217-223.
- Toole, B. P. (1991). "Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins." *Current Opinion in Cell Biology* 2: 839-844.
- Tsubouchi, H., E. Gohda, et al. (1993). The role of HGF-SF in animal and human hepatic physiology and pathology. *Hepatocyte Growth Factor - Scatter*

- Factor (HGF-SF) and the c-met Receptor. I. D. Goldberg, Basel, Birkhauser Verlag: 251-273.
- Tsutsumi, M., A. Takada, et al. (1987). "Characterization of desmin-positive rat liver sinusoidal cells." *Hepatology* 7(2): 277-284.
- Vale, W., G. Grant, et al. (1972). "Culture of enzymatically dispersed anterior pituitary cells: Functional validation of a method." *Endocrinology* 91(2): 562-572.
- Van Thiel, D., J. S. Gavaler, et al. (1987). "Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor." *Gastroenterology* 93(6): 1414-1419.
- Vitale, M., R. Rizzoli, et al. (1991). "Characterization and cell cycle kinetics of hepatocytes during rat liver regeneration: in vivo BrdUrd incorporation analysed by flow cytometry and electron microscopy." *Cell Proliferation* 24: 331-338.
- Vonen, B., J. Florholmen, et al. (1987). "A methodological study of discontinuous Percoll-gradient separation of pancreatic islets from rats." *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 47: 415-420.
- Wagle, S. R. (1974). "Studies on the differential response to glucagon concentration on gluconeogenesis in isolated hepatocytes containing high and low glycogen." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 59(4): 1366-1372.
- Waltenberger, J., K. Usuki, et al. (1992). "Platelet-derived endothelial cell growth factor: Pharmacokinetics, organ distribution and degradation after intravenous administration in rats." *Federation of European Biochemical Societies Letters* 313(2): 129-132.
- Warnock, G. L., W. Ellis, et al. (1988). "Studies of the isolation and viability of human islets of Langerhans." *Transplantation* 45(5): 957-963.
- Webber, E. M., M. J. FitzGerald, et al. (1993). "Transforming growth factor- $\alpha$  expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor- $\alpha$  and hepatocyte growth factor." *Hepatology* 18(6): 1422-1431.
- Wewer, U. M., E. Engvall, et al. (1992). "Laminin A, B1, B2, S and M subunits in the postnatal rat liver development and after partial hepatectomy." *Laboratory Investigation* 66(3): 378-389.
- Wiederhielm, C. A. and L. L. Black (1976). "Osmotic interaction of plasma proteins with interstitial macromolecules." *American Journal of Physiology* 231(2): 638-641.
- Yagi, T., H. Terajima, et al. (1996). "Discordant effects of xenogeneic pig liver perfusion on function of sinusoidal endothelial cells and parenchymal cells." *Transplantation Proceedings* 28(3): 1402-1403.
- Yamanaka, N., O. Eizo, et al. (1984). "A multiple regression equation for prediction of posthepatectomy liver failure." *Annals of Surgery* 200(5): 658-663.
- Yamanaka, N., E. Okamoto, et al. (1993). "Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function." *Hepatology* 18(1): 79-85.
- Yannariello-Brown, J., B. Zhou, et al. (1996). "A novel ligand blot assay detects different hyaluronan binding proteins in rat liver hepatocytes and sinusoidal endothelial cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 218(1): 314-319.
- Yannariello-Brown, J., B. Zhou, et al. (1997). "Identification of a 175 kDa protein as the ligand-binding of the rat liver sinusoidal endothelial cell hyaluronan receptor." *Glycobiology* 7(1): 15-21.