

Received: 2003.07.16

Accepted: 2003.10.17

Published: 2004.02.05

## Patofizjologia uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego w przeszczepianiu nerek

### Patophysiology of ischemia-reperfusion injury in renal transplantation

**Maria Boratyńska, Dorota Kamińska, Oktawia Mazanowska**

Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Akademii Medycznej we Wrocławiu

#### Streszczenie

Uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne powstaje po przywróceniu, czasowo przerwane, krążenia krwi w tkance lub narządzie. Podczas niedokrwienia może dojść do śmierci komórek i nieodwracalnego uszkodzenia tkanek, a to zależy od ciężkości i czasu trwania zaburzeń przepływu. Reperfuzyja i reoksygenacja paradoksalnie nasilają uszkodzenia niedokrwienne. Uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne jest procesem zapalnym, w którym występują charakterystyczne zmiany w komórkach, zmiany biochemiczne i zaburzenia mikrokrążenia, prowadzące do klinicznie jawnej dysfunkcji narządu. Uszkodzenie ischemiczno-reperfuzyjne w transplantacji może się przyczyniać do opóźnienia podjęcia funkcji przez przeszczepiony narząd, a nawet jej braku. Wpływa tak na wczesne funkcjonowanie przeszczepionej nerki, jak i pogarsza jej długotrwałe przeżycie. Głównymi przyczynami prowadzącymi do uszkodzenia tkanek w czasie ischemii i reperfuzyji są: generacja wolnych rodników tlenowych przez oksydazę ksantynową, zwiększone "jednoelektronowe" przeciekanie mitochondrialnego łańcucha elektronowego, uwolnienie jonów żelaza, zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu wskutek wzmocnienia metabolizmu kwasu arachidonowego, zwiększenie wytwarzania tlenu azotu i w konsekwencji nadtlenoazotynu, aktywacja neutrofilów, indukcja odpowiedzi immunologicznej.

#### Słowa kluczowe:

**uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne • przeszczepianie nerek**

#### Summary

Ischemia-reperfusion injury is a serious complication of organ transplantation. Renal ischemic and reperfusion injury is a multifactorial process that leads to organ damage and primary graft dysfunction and is a significant factor in kidney allograft destruction. In addition, several clinical studies report an apparent synergy between the initial injuries of ischemia-reperfusion and acute rejection. Initial non-specific injury leads to the establishment of a cytokine/adhesion molecule cascade and contributes to the development of chronic transplant failure. Reactive oxygen species generated during the reperfusion of an ischemic kidney, as well as mitochondrial defect, are essentially involved in postischemic microvascular injury. Ischemia-reperfusion injury is also an acute inflammatory process intimately involving leukocytes. In this review, we summarize the current data on the mechanisms of ischemia-reperfusion injury during renal transplantation.

#### Key words:

**ischemia-reperfusion injury • renal transplantation**

#### Full\_text PDF:

[http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_58/4824.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/4824.pdf)

#### Word count:

5845

#### Tables:

-

#### Figures:

-

#### References:

80

#### Adres Autorki:

Dr hab. Maria Boratyńska, Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej AM, 50-417 Wrocław, ul. Traugutta 57/59, Poland. E-mail: borat@iitd.pan.wroc.pl

## WSTĘP

Uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne powstaje po przywróceniu, czasowo przerwano, krążenia krwi w tkance lub narządzie. Podczas niedokrwienia może dojść do śmierci komórek i nieodwracalnego uszkodzenia tkanek, a to zależy od ciężkości i czasu trwania zaburzeń przepływu. Reperfuzja i reoksygenacja paradoksalnie nasilają uszkodzenia niedokrwienne. W chwili reperfuzyj generowane są duże ilości reaktywnych form tlenu (RT) i komórki są intensywnie niszczone. Proces ten trwa do kilku godzin po reperfuzyj. Zjawisko to po raz pierwszy opisali Bukley i Hutchins w 1977 r. Autorzy przedstawili występowanie martwicy mięśnia sercowego po skutecznej rewaskularyzacji po wykonaniu by-passu [28].

Uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne jest procesem zapalnym, w którym występują charakterystyczne zmiany w komórkach, zmiany biochemiczne i zaburzenia mikrokrążenia, prowadzące do klinicznie jawnej dysfunkcji narządu. Najczęściej spotyka się je w zawale mięśnia sercowego, w niedokrwinnym udarze mózgu, w zamknięciu naczyń krwionośnych kończyn dolnych, trzewi oraz w transplantacji narządów unaczynionych. Uszkodzenie ischemiczno-reperfuzyjne w transplantacji może się przyczyniać do opóźnienia podjęcia czynności przeszczepionego narządu, a nawet jej braku. Wpływa tak na wczesne funkcjonowanie przeszczepionej nerki, jak i pogarsza jej długotrwałe przeżycie. Jest silniejszym czynnikiem rokowniczym niż dobór w zakresie antygenów zgodności tkankowej [5, 47, 50, 71]. Ischemia-reperfuzyja może spowodować zmiany także w odległych narządach, które nie były dotknięte zaburzeniami ukrwienia. Opisano niekardiogeny obrzęk płuc lub zmiany w płucach, które są obecnie opisywane jako ARDS (adult respiratory distress syndrom), w następstwie ischemii-reperfuzyj kończyn dolnych lub jelita. Uszkodzenia odległych narządów mogą być wynikiem uwalniania czynników aktywujących neutrofile, a w niedokrwieniu jelita dodatkowo translokacji bakterii z przewodu pokarmowego [15, 59].

Głównymi przyczynami prowadzącymi do uszkodzenia tkanek w czasie ischemii i reperfuzyj są:

- generacja wolnych rodników tlenowych przez oksydazę ksantynową,
- zwiększone "jednoelektronowe" przeciekanie mitochondrialnego łańcucha elektronowego,
- uwolnienie jonów żelaza,
- aktywacja neutrofilów,
- zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu wskutek wzmocnienia metabolizmu kwasu arachidonowego,
- zwiększenie wytwarzania tlenku azotu i w konsekwencji nadtlenoazotynu [3].

## ROLA WOLNYCH RODNIKÓW TLENYCH W USZKODZENIU NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNYM

Podstawowym mechanizmem zapoczątkowującym uszkodzenie ischemiczno-reperfuzyjne jest generacja wolnych rodników tlenowych.

Koncepcja, że rodniki tlenowe tworzą ogniwo pomiędzy uszkodzeniem reperfuzyjnym i zapaleniem została wprowadzona przez Grangera i Mc Corda na początku lat osiemdziesiątych XX w. [19]. W okresie niedokrwienia masywnie zużywany jest komórkowy ATP, a jego metabolity - adenozyina, inozyina i hipoksantyna, gromadzą się w niedokrwionej tkance. Hipoksantyna stanowi substrat do działania enzymów: dehydrogenazy (w prawidłowo utlenowanej tkance) i oksydazy ksantynowej (w niedokrwieniu). Dehydrogenaza ksantynowa jest enzymem katalizującym utlenianie substratów przez NAD<sup>+</sup>, co prowadzi do powstania NADPH i nie generuje reaktywnych form tlenu. Podczas niedokrwienia następuje nagromadzenie mleczanów, obniżenie pH, co w konsekwencji prowadzi do niedoboru energetycznego, nieprawidłowości w funkcjonowaniu pompy sodowo-potasowej. Dochodzi do gromadzenia wody i w komórce, i w jej organellach. Wzrost stężenia potasu wewnątrz-komórkowego powoduje otwarcie kanałów jonowych i zwiększa napływ jonów Ca<sup>2+</sup> do cytosolu, co z kolei aktywuje proteazy, które powodują prze-kształcenie dehydrogenazy w oksydazę ksantynową [63, 46]. Zatem niedotlenienie powoduje zarówno wytwarzanie oksydazy ksantynowej, jak i jej substratów. Kiedy w okresie reperfuzyj dostarczony zostaje tlen cząsteczkowy, oksydaza ksantynowa powoduje przekształcenie hipoksantyny do ksantyny z towarzyszącym uwalnianiem dużej ilości O<sub>2</sub>- (anionorodnika ponad-tlenkowego) za pośrednictwem redukcji molekularnego tlenu (przekazuje elektrony na tlen zamiast na NAD<sup>+</sup>). Anionorodnik ponadtlenkowy zapoczątkowuje powstanie bardziej toksycznych rodników (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - nadtlenek wodoru, OH<sup>-</sup> - rodnik wodorotlenowy) na drodze enzymatycznej z udziałem metali z grup przejściowych. Obecność zwiększonej ilości reaktywnych form tlenu w tkankach nerek w okresie okołoperacyjnym wykazano stosując metodę pomiaru stężenia dialdehydu malonowego (MDA), katalazy, SOD lub elektronowego rezonansu paramagnetycznego [1, 11, 25, 54, 80]. Oksydaza ksantynowa jest głównie umiejscowiona w komórkach śródbłonna, stąd też podstawowym źródłem generacji rodników tlenowych w okresie ischemii i reperfuzyj jest śródbłonek ściany naczyniowej. Konwersja dehydrogenazy ksantynowej nie jest jednak konieczna do wytwarzania wolnych rodników tlenowych w czasie reperfuzyj [79]. Wybuch tlenowy zapoczątkowuje złożoną serię biochemicznych zmian, między innymi tworzenie utlenionych lipidów, w tym

PAF oraz zmian w mikrokrążeniu, które rekrutują neutrofile do reperfundowanego narządu [80]. Na uszkodzenia związane z działaniem wolnych rodników szczególnie podatne są komórki nabłonka cewek proksymalnych [8]. Nerka ma zmniejszoną obronę antyoksydacyjną z powodu obniżenia stężenia zredukowanego glutationu (GSH), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i wit. E w okresie niedokrwienia [20]. Identyfikacja genetycznych różnic wrażliwości na uszkodzenie spowodowane przez reaktywne formy tlenu, takich jak polimorfizm genów dla SOD i transferazy glutationowej u biorców przeszczepu nerki może określić ryzyko wystąpienia uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego, a za tym opóźnionego funkcjo-nowania przeszczepu [53]. Białka szoku termicznego (heat shock proteins - HSP), do których należy oksygenaza hemu 1 (HO-1), są syntetyzowane w odpowiedzi na różne czynniki uszkadzające komórki, w tym zapalenie i reperfuzję. Działanie układu enzymatycznego HO-1 polega na degradacji hemu z uwolnieniem biliwerdyny, CO i Fe<sup>2+</sup>, które są szybko chelatowane przez ferrytynę i wzmagają jej syntezę. Działa to antyoksydacyjnie, podtrzymując mikrokrążenie (tlenek węgla jest czynnikiem naczyniorozszerzającym), modulując cykl komórkowy (przeciwdziałając apoptozie) i przeciwwzpalny [33].

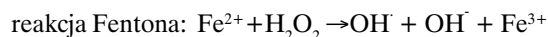
#### **ZWIĘKSZONE "JEDNOELEKTRONOWE" PRZECIEKANIE MITOCHONDRIALNEGO ŁAŃCUCHA ELEKTRONOWEGO**

Mitochondria są głównym miejscem zużycia tlenu w komórce i wytwarzania energii zgmagazynowanej w ATP. W cyklu Krebsa acetylokoenzym A jest utleniany do dwutlenku węgla i wody. Jednocześnie powstają zredukowane postaci koenzymów dehydrogenaz katalizujących poszczególne etapy tego cyklu - zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy FADH<sub>2</sub> i zredukowany dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy NADH. Przekazują one następnie elektrony do łańcucha oddechowego. Zwiększona przepuszczalność błon komórkowych w czasie niedokrwienia powoduje napływ jonów Ca<sup>2+</sup> z przestrzeni pozakomórkowej do mitochondriów i zależny od Ca<sup>2+</sup> wzrost przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej. Prowadzi to do utraty potencjału błonowego z następowym osłabieniem reakcji fosforylacji oksydatywnej, a zatem wytwarzania ATP. Zachodzi specyficzne zahamowanie łańcucha przenoszenia elektronów pomiędzy dehydrogenazą NADH i koenzymem Q10 (ubichinonem). Zahamowanie to jest związane ze wzrostem wytwarzania H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub><sup>-</sup> [18, 29, 58, 64, 72].

#### **UWOLNIENIE JONÓW ŻELAZA**

W badaniach wykazano, że komórki śródbłonka zawierają znaczne ilości wolnych jonów żelaza. W czasie

niedokrwienia wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe obniżenie pH może powodować konformacyjne zmiany w miejscach wiążących żelazo i jego uwalnianie. Powoduje to wzrost jonów Fe<sup>2+</sup> dostępnych dla reakcji Fentona czyli powstawania rodnika wodorotlenowego (OH<sup>•</sup>) w reakcji nadtlenu wodoru z jonem Fe<sup>2+</sup>. Jony żelaza katalizują też inną reakcję generującą reaktywne formy tlenu – reakcję Habera-Weissa, w której rodnik wodorotlenowy powstaje w wyniku bezpośredniej reakcji pomiędzy anionorodnikiem ponadtlenkowym i nadtlakiem wodoru [80]:



#### **UDZIAŁ GRANULOCYTÓW OBOJĘTNOCHŁONNYCH W POWSTAWANIU USZKODZENIA NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNEGO**

Pierwotnymi efektorowymi komórkami uszkodzenia ischemiczno-reperfuzyjnego są granulocyty obojętnochłonne. Nagromadzenie aktywowanych neutrofilów w postischemicznych tkankach jest zmienną cechą odpowiedzi zapalnej wtórnej do niedokrwienia i reperfuzji [78]. Deplecja granulocytów i zapobieganie adhezji neutrofilów w doświadczeniach na modelach zwierzęcych zmniejszyły wydatnie uszkodzenie tkanek.

Neutrofile mogą indukować uszkodzenie mikronaczyń przez wiele mechanizmów. Jako część układu odpornościowego stanowią pierwszą linię obrony przeciw stymulatorom zapalnym, ale w warunkach patologicznych mogą powodować samodestrukcyjny proces zapalny. Uszkodzenie zapalne mediowane przez neutrofile zależy od uwalniania rodników tlenowych, enzymów proteolitycznych i białek bakteriobójczych. Enzymy proteolityczne degradują macierz pozakomórkową prowadząc do wzrostu przepuszczalności naczyń.

Neutrofile są kierowane do reperfundowanej tkanki wzdłuż gradientu stężeń czynników chemotaktycznych i są zatrzymywane w miejscu zapalenia w wyniku przylegania do śródbłonka naczyń. Proces ten jest wielostopniowy i zależy od stanu aktywacji granulocytów i śródbłonka, ekspresji cząsteczek adhezyjnych, cytokin, czynników krzepnięcia i stymulacji syntezy czynników chemotaktycznych (leukotrieny, PAF, MPC-1, IL-8). Rozpoczyna się od aktywacji selektyń E i P na powierzchni śródbłonka. Selektyna P pojawia się na powierzchni komórek śródbłonka już w kilkadziesiąt sekund po aktywacji tych komórek. Jej ekspresja jest indukowana przez rodniki tlenowe, a także przez IL-1, TNF-alfa i C5a. Ponadto, duże ilości selektyny P pochodzącej z aktywowanych płytek krwi stwierdzano

w kapilarach przeszczepionej nerki [34]. Siły hemodynamiczne powodują ruch leukocytów w stronę ściany naczyń, dochodzi wówczas do utworzenia pierwszych wiązań pomiędzy selektynami na śródbłonku żyłek pozawłoso-watych i ich ligandami glikoproteinowymi i glikolipidowymi na leukocytach. Wiązanie to charakteryzuje się dużym powinowactwem ale i bardzo szybką dysocjacją. Leukocyty pchane siłą prądu krwi przesuwały się reagując z kolejną selektyną (tzw. toczenie się limfocytów po śródbłonku) [9].

O istotnej roli selektyn świadczy to, że podanie rozpuszczalnego liganda sialyl-Lewis X, który wiąże wszystkie trzy selektyny: E, P, L, efektywnie redukuje uszkodzenie reperfuzyjne [4, 45, 68]. Podawanie 5 mg rozpuszczalnego liganda dla P-selektyny (SPSGL), wiążącego P- i E-selektyny, w czasie perfuzji niedokrwionej nerki oraz dożylnie 50  $\mu$ g w trzy godziny po reperfuzji powodowało brak wzrostu ekspresji selektyny E, hamowanie tworzenia się nacieków limfocytarnych w nerce oraz syntezy cytokin z nim związanych, a także ekspresji cząsteczek MHC klasy II [69]. Zastosowanie SPSGL przed zabiegiem przeszczepienia nerki redukowało zaburzenia krwi w kapilarach oraz chroniło cewki przed uszkodzeniem [16]. W czasie adhezji selektyny przekazują sygnał aktywacji wewnątrzkomórkowej leukocytom, powodując wzrost stężenia wapnia w cytosolu, nasilając wybuch oksydacyjny, co prowadzi do zmiany konformacji powierzchniowych integryn, które nabywają zdolności silnego wiązania się ze swoimi ligandami na śródbłonku. Leukocyty mają receptory dla chemokin (IL-8), których aktywacja także zwiększa ekspresję i powinowactwo integryn. Aktywowane integryny (LFA-1, VLA-4), reagują z ich ligandami (ICAM-1, VCAM-1) powodując bardziej ścisłe połączenia leukocytów z komórkami śródbłonka (zjawisko zatrzymania) [4, 66]. Ekspresja integryny LFA-1 na neutrofilach może być indukowana przez oksydanty, jak i przez C5a, LTB<sub>4</sub>, MPC-1 i PAF. Zwiększenie ekspresji ICAM-1 również może zależeć zarówno od rodników tlenowych, jak i cytokin uwalnianych podczas reperfuzji. Adhezja aktywuje leukocyty i powoduje, że uwalniają one enzymy proteolityczne, rodniki tlenowe, które uszkadzają śródbłonek. Wzrost ekspresji VLA-4 i reakcja z VCAM-1 oraz homologiczna reakcja pomiędzy cząsteczkami PECAM sprzyja wynaczynieniu i diapedezie neutrofilów między komórkami śródbłonka [4]. Wykazano, że wzrost ekspresji cząstek adhezyjnych w okresie ischemii-reperfuzji jest niezależny od aktywacji układu immunologicznego gospodarza oraz nie jest hamowany przez cyklosporynę [12, 13]. Również VLA-1 do VLA-6, dla których receptory znajdują się na fibroblastach tkanki śródmiąższowej i na białkach macierzy pozakomórkowej, sprzyjają przechodzeniu leukocytów przez ścianę naczyń [75].

#### ZJAWISKO PONIEDOKRWIENNEGO BRAKU PRZEPŁYWU KRWI (NO-REFLOW)

Obrzęk komórek śródbłonka, zaburzenie wytwarzania czynników wazoaktywnych i obturacja kapilar pełnią ważną rolę w rozwoju poniedokrwiennego braku przepływu krwi (no-reflow). Zaburzenie w regionalnym przepływie krwi jest jednym z najważniejszych czynników odpowiedzialnych za opóźnienie funkcji przeszczepu na skutek uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego. Ważną rolę odgrywa endotelina 1 (ET-1), uwalniana pod wpływem hipoksji, a także pod wpływem produktów peroksydacji lipidów, takich jak leukotrieny, TxA<sub>2</sub> i PAF, które mogą nie tylko wpływać na napięcie ściany naczyniowej, ale i adhezję leukocytów. W czasie niedokrwienia obserwowano wzrost ilości endoteliny 1, szczególnie w obrębie śródbłonka kapilar okołocewkowych [76], a zablokowanie jej funkcji poprzez podanie przeciwciał przeciwko endotelinie 1 lub jej receptorowi działało ochronnie [6, 22, 40]. Wiele skutków działania endoteliny 1 może być zahamowane przez tlenek azotu (NO), syntetyzowany konstytutywnie bądź po stymulacji. Obniża on ekspresję endoteliny 1 i jej aktywność oraz działa relaksująco na naczynia, co może wywierać ochronny wpływ na niedokrwiony narząd [30, 55, 62]. Jednak makrofagowa oksydaza tlenu azotu wytwarza duże ilości nadtlenoazotynu o silnych własnościach utleniających. Może on powodować zahamowanie syntezy DNA lub enzymów łańcucha oddechowego. Jego synteza znacznie wzrasta w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym [43, 61]. W zjawisku zmniejszenia przepływu krwi ważną rolę pełnią rodniki tlenowe. W doświadczeniu wykazano, że zahamowanie oksydazy ksantynowej zapobiegało zjawisku no-reflow. Neutrofile aktywowane rodnikami tlenowymi lub mediatorami zapalnymi, uwalnianymi pod wpływem rodników tlenowych (np. IL-8) adherują do śródbłonka naczyń, przyczyniając się do uszkodzenia powtórnego przepływu. Drugim czynnikiem przyczyniającym się do tego zjawiska może być aktywacja płytek pod wpływem rodników tlenowych i ich agregacja w wyniku działania PAF i TxA<sub>2</sub>, powstałych podczas reperfuzji za pośrednictwem mechanizmu mediowanego przez rodniki tlenowe. Wykazano także, że rodniki tlenowe stymulowały *in vitro* komórki mezangium do wydzielania endoteliny [76]. Niedobór NO, który może być wiązany przez O<sub>2</sub>- oraz zmniejszone wytwarzanie PGI<sub>2</sub> w wyniku uszkodzenia śródbłonka przez rodniki tlenowe zwiększają aktywację płytek krwi [38]. Jednym z mechanizmów chroniących nerkę przed zaburzeniami krążenia krwi wywołanymi niedotlenieniem wydaje się zwiększona synteza receptora naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF). Wykazuje on aktywność promującą angiogenezę,

zwiększającą przepuszczalność naczyń. VEGF jest też czynnikiem chemotaktycznym dla monocytów. Wykazano, że w niedokrwionej nerce dochodzi do redystrybucji VEGF do części podstawno-bocznej komórek cewkowych oraz do wzrostu ekspresji receptora 2 dla VEGF. Może to stanowić część mechanizmu chroniącego przepływ krwi w kapilarach niedokrwionych tkanek [31, 32].

#### **CZYNNIKI CHEMOTAKTYCZNE W USZKODZENIU NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNYM**

Zależność między wytwarzaniem rodników tlenowych a chemotaksją jest zjawiskiem znanym od lat osiemdziesiątych XX w., ale ciągle są poznawane nowe mediatory tego procesu. Rodniki tlenowe indukują peroksydację błon lipidowych, powodując zaburzenie homeostazy wewnątrzkomórkowego wapnia i aktywację fosfolipazy  $A_2$ , enzymu błon komórkowych, który katalizuje tworzenie kwasu arachidonowego i lizofosfolipidów z fosfolipidów błon komórkowych. Kwas arachidonowy może być następnie metabolizowany przez lipooksygenazę lub cyklooksygenazę, dostarczając  $LTB_4$  i  $TxA_2$ . Lizofosfolipidy mogą być przekształcone w PAF [42]. Wszystkie trzy są chemoatraktantami dla neutrofilów i ich agonistami. Powodują uwalnianie przez neutrofile rodników tlenowych i proteaz, a także zwiększają ekspresję beta 2 integryn. W czasie ischemii-reperfuzyji aktywowana jest kaskada białek dopełniacza, zarówno drogą klasyczną jak i alternatywną [52]. Składowe układu dopełniacza, szczególnie C3a i C5a, wykazują silne działania chemotaktyczne. Na chemotaksję neutrofilów wywierają wpływ różne chemokiny, zwłaszcza IL-8. Ekspresja genu dla IL-8 jest zależna od generacji rodników tlenowych. Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF-kappa B aktywujący regiony promotorowe dla wielu genów, których produkty uczestniczą w regulacji immunologicznej występuje w cytoplazmie w nieczynnym kompleksie z inhibitorem. W czasie niedokrwienia inhibitor jest odszczepiany i NF-kappa B aktywuje ekspresję wielu prozapalnych cytokin, m.in.: IL-1, IL-6, TNF-alfa [17, 44, 48]. Podawanie liposomów zawierających oligonukleotydy blokujące ekspresję NF-kappa B zmniejszało nacieki monocytarne, ekspresję VCAM-1 i uszkodzenie nerki w modelu zwierzęcym [74].

#### **INDUKCJA ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ W CZASIE USZKODZENIA NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNEGO**

W czasie niedokrwienia i reperfuzyji dochodzi do znacznego i krótkotrwałego wzrostu ekspresji antygenów MHC klasy I oraz późnego, ale dłużej trwającego wzrostu ekspresji MHC klasy II. Jest to jedno

ze zjawisk wiążących uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne z wystąpieniem odpowiedzi immunologicznej [60]. Wzmożenie ekspresji P- i E-selektyny na powierzchni śródbłonna przeszczepu powoduje rekrutację komórek immunokompetentnych z krążenia do przeszczepionego narządu [39, 56]. Integryny, a szczególnie LFA-1 i VLA-4, biorą udział nie tylko w przyleganiu leukocytów do śródbłonna, ale także w przekazywaniu sygnału do aktywacji limfocytów T. Integryna LFA-1 (CD11a/CD18) łącząca się z międzykomórkowymi cząsteczkami adhezyjnymi (ICAM-1,2) oraz cząsteczki należące do rodziny bardzo późnych antygenów (VLA) wiążące fibronektynę, pełnią rolę w pierwotnej niezależnej od antygeny adhezji limfocytów Th do komórek prezentujących antygen (APC) i przekazują limfocytowi sygnał wzmacniający aktywację. Nasiloną ekspresją integryn w czasie ischemii-reperfuzyji, a co za tym idzie wzmocniony sygnał kostymulujący, powoduje aktywację limfocytów i wydzielanie mediatorów odpowiedzi zapalnej. Prowadzi to do przewlekłego stanu zapalnego w obrębie przeszczepionego narządu powodującego wystąpienie reakcji odrzuceniowej [35, 41, 70, 73]. Zahamowanie sygnału kostymulującego przekazywanego przez układ tzw. molekuł pomocniczych B7/CD28 przez podawanie CTLA4Ig w modelu zwierzęcym powodowało zmniejszenie uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego [68]. Wykazano również, że deplecja limfocytów T znacznie zmniejsza nasilenie uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego u szczurów [77]. W ostatnio opublikowanych badaniach Kirk i współpracownicy wykazali w biopsjach nerek pobranych po 60 min reperfuzyji wzrost ekspresji RNA dla czynników chemotaktycznych (IL-8, m-CSF) i prozapalnych (IL-6, IL-10, TNF-alfa). W większości przypadków nie stwierdzono zwiększenia ekspresji mRNA dla czynników związanych z aktywacją limfocytów T. Potwierdza to wiodącą rolę granulocytów, makrofagów i komórek prezentujących antygen w patogenezie uszkodzenia poreperfuzyjnego [24].

#### **ROLA APOPTOZY W USZKODZENIU NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNYM**

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki jest powodowana przez wiele czynników uszkadzających, nieosiągających natężenia wystarczającego do wytworzenia martwicy. W czasie ischemii-reperfuzyji w nerce dotyczy głównie komórek cewek dystalnych. Wykazano, że natężenie wskaźników apoptozy było znacznie wyższe w nerkach pobieranych od dawców zmarłych niż od dawców żyjących [7]. Nasilenie apoptozy przed wszczepieniem nerki było wyższe niż w biopsjach pobieranych od chorych z natychmias-

towym funkcjonowaniem nerki po przeszczepie, a nawet niż w czasie wczesnego ostrego odrzucania [49]. Obserwacje prowadzone na modelu zwierzęcym dostarczyły dowodów, że wzbudzenie apoptozy w komórkach cewkowych jest związane z okresem reperfuzji, a sam okres niedokrwienia indukuje głównie ich martwicę [57]. Apoptozę w komórkach nerkowych pobudzają czynniki indukowane w czasie ischemii-reperfuzji, należą do nich: wolne rodniki, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , składowa C5b dopełniacza, angiotensyna II [27]. W czasie reperfuzji stwierdzono wzrost syntezy kinaz białkowych aktywowanych stresem (SAPK/JNK) biorących udział w apoptozie [9, 26, 51]. NF-kappa B, który ulega translokacji i aktywacji w komórkach cewek nerkowych w czasie niedokrwienia indukuje ich apoptozę, co może prowadzić do zaniku cewek nerkowych, a następnie przewlekłej dysfunkcji przeszczepionej nerki [48]. Limfocyty T cytotoksyczne niszczą bezpośrednio śródbłonek naczyńowy poprzez wzbudzenie apoptozy za pośrednictwem interakcji Fas/Fas ligand oraz perforyny i granzymu [37].

Dane doświadczalne wskazują, że nasilenie apoptozy w niedokrwionych i reperfundowanych narządach zależy od stanu równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antyzapalnymi. Wśród tych ostatnich należy przede wszystkim wymienić IL-10, której podawanie lub stosowanie leków zwiększających jej syntezę może zahamować nie tylko uszkodzenie tkanek mediowane przez neutrofile i apoptozę, lecz też zmniejszać immunogenność tkanek poprzez zahamowanie ekspresji cząsteczek MHC klasy I i II [10].

#### WPLYW USZKODZENIA NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNEGO NA ROZWÓJ PRZEWLEKŁEJ DYSFUNKCJI PRZESZCZEPIONEJ NERKI

Uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne może się przyczyniać do rozwoju miażdżycy i przewlekłej dysfunkcji przeszczepionej nerki. Spośród wielu mechanizmów działania wolnych rodników, które mogą się przyczynić do progresji przewlekłego odrzucania nerki należy wymienić:

- bezpośrednie toksyczne działanie na mezangium i komórki śródbłonna,
- działanie mitogenne na komórki mięśni gładkich i mezangium poprzez aktywację drogi sygnałów obejmującej receptory dla PDGF i kinazę tyrozynową c-src,
- aktywację i wiązanie DNA czynnika transkrypcyjnego NF-kappa B, który może indukować transkrypcję prozapalnych cytokin (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ),
- stymulację adhezji leukocytów do śródbłonna poprzez aktywację beta 2 integryn CD11/CD18, a także ICAM-1 i selektyny P,
- wzrost ekspresji chemokin (IL-8, MPC-1),
- aktywację antygenów HLA klasy II,
- stymulację syntezy tromboksanu i PAF, a zmniejszenie wytwarzania prostacykliny,
- zwiększone uwalnianie endoteliny I i reniny,
- wzrost syntezy kolagenu w fibroblastach,
- zaburzenie interakcji komórek z macierzą pozakomórkową poprzez wpływ wolnych rodników na integryny,
- generację utlenionych lipidów [2, 14, 21, 23, 36, 46, 65].

Jak wynika ze złożonego mechanizmu patogenetycznego uszkodzenia ischemiczno-reperfuzyjnego teoretycznie istnieje wiele miejsc, w których można próbować modulować odpowiedź zapalną. Intensywne prace badawcze prowadzone w celu lepszego poznania mechanizmów zjawisk patologicznych leżących u podstaw uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego z pewnością przyczynią się do poprawy jakości przeszczepianego narządu, a to na pewno poprawi wskaźniki przeżycia alop przeszczepu nerki.

#### PIŚMIENNICTWO

- [1] Akbulut G., Serteser M., Polat C., Köken T., Aktepe F., Yilmaz S., Gökçe Ç., Gökçe Ö.: Changes in tissue-oxidative stress markers in an experimental model of laparoscopic donor nephrectomy. *Transplantation* 2002, 74, 1768-1772.
- [2] Azuma H., Nadeau K., Takada M., Tilney N.L.: Initial ischemia/reperfusion injury influences late functional and structural changes in the kidney. *Transplant. Proc.* 1997, 29, 1528-1529.
- [3] Bartosz G.: *Medycyna pisana na nowo*. W: Druga twarz tkłenu. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1995, 218-221.
- [4] Beekhuizen H., Van De Gevel J.S.: Endothelial cell adhesion molecules in inflammation and postischemic reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 1998, 30, 4251-4256.
- [5] Boratyńska M., Szepietowski T., Szewczyk Z.: Acute rejection and delayed graft function-risk factors of graft loss. *Ann. Transplant.* 1996, 1, 19-22.
- [6] Braun C., Vetter S., Conzelmann T., Schaub M., Kirchengast M., Van Der Woude F.J., Rohmeiss P.: Improved recovery following posttransplant acute renal failure in rat renal isografts with an oral endothelin-A receptor antagonist. *Exp. Nephrol.* 2000, 8, 283-290.

- [7] Burns A. T., Davies D.R., McLaren A. J., Cerundolo L., Morris P.J., Fuggle S.V.: Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation* 1998, 66, 872-876.
- [8] Chien C-T., Lee P-H., Ma M-C., Lai M-K., Hsu S-M.: De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000, 12, 973-982.
- [9] Daemen M.A.R.C., De Vries B., Buurman W.A.: Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 2002, 73, 1693-1700.
- [10] Daemen M.A.R.C., van de Ven M.V.C.M., Heineman E., Buurman W.A.: Involvement of endogenous interleukin-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$  in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 1999, 67, 792-800.
- [11] Davenport A., Hopton M., Bolton C.: Measurement of malondialdehyde as a marker of oxygen free radical production during renal allograft transplantation and the effect on early graft function. *Clin. Transplant.* 1995, 9, 171-175.
- [12] Dragun D., Hoff U., Park J.K., Qun Y., Schneider W., Luft F.C., Haller H.: Ischemia-reperfusion injury in renal transplantation is independent of the immunologic background. *Kidney Int.* 2000, 58, 2166-2177.
- [13] Dragun D., Hoff U., Park J-K., Schneider W., Luft F.C., Haller H.: Prolonged cold preservation augments vascular injury independent of renal transplant immunogenicity and function. *Kidney Int.* 2001, 60, 1173-1181.
- [14] Fellström B., Aküyrek L.M., Backman U., Larsson E., Melin A.J., Zezina L.: Postischemic reperfusion injury and allograft arteriosclerosis. *Transplant. Proc.* 1998, 30, 4279-4280.
- [15] Fuller B. J.: Ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Transplantation* 2000, 69, 327-328.
- [16] Fuller T.F., Sattler B., Binder L., Vetterlein F., Ringe B., Lorf T.: Reduction of severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney grafts by a soluble P-selectin glycoprotein ligand. *Transplantation* 2001, 72, 216-222.
- [17] Funaki H., Shimizu K., Harada S.I., Tsuyama H., Fushida S., Tani T., Miwa K.: Essential role for nuclear factor  $\kappa$ B in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver. *Transplantation* 2002, 74, 551-556.
- [18] Gnaiger E., Rieger G., Stadlmann S., Amberger A., Eberl T., Margreiter R.: Mitochondrial defect in endothelial cold ischemia/reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 1999, 31, 994-995.
- [19] Granger D.N., Rutigliano G., McCord J.M.: Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981, 81, 22-29.
- [20] Grinyo J.M.: Reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 1997, 29, 59-62.
- [21] Grinyo J.M.: Role of ischemia-reperfusion injury in development of chronic renal allograft damage. *Transplant. Proc.* 2001, 33, 3741-3742.
- [22] Hammad F.T., Davis G., Zhang X-Y., Wheatley A.M.: Endothelin ETA and ETB receptor antagonism during cold preservation in renal transplantation. *Transplantation* 2001, 71, 619-627.
- [23] Herrero-Fresneda L., Torras J., Lloberas N., Riera M., Cruzado J.M., Condom E., Merlos M., Alsina J., Grinyo J.M.: Cold ischemia in the absence of alloreactivity induces chronic transplant nephropathy through a process mediated by the platelet-activating factor. *Transplantation* 2000, 70, 1624-1631.
- [24] Hoffmann S.C., Kampen R.L., Amur S., Sharaf M. A., Kleiner D.E., Hunter K., Hale D.A., Mannon R.B., Blair P.J., Kirk A.D.: Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002, 74, 916-923.
- [25] Hower R., Minor T., Schneeberger H., Theodorakis J., Rembold S., Hoffmann G.O., Fraunberger P., Iselhard W., Land W.: Assessment of oxygen radicals during kidney transplantation-effect of radical scavenger. *Transpl. Int.* 1996, 9 (Suppl. 1) S479-482.
- [26] Hughes J.: Life and death in the kidney: prospects for future therapy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001, 16, 879-882.
- [27] Hughes J.: Apoptosis in tubulointerstitial renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15 (Suppl. 6) 55-57.
- [28] Hutchins G.M., Bulkley B.H.: Correlation of myocardial contraction band necrosis and vascular patency. A study of coronary artery bypass graft anastomoses at branch points. *Lab. Invest.* 1977, 36, 642-648.
- [29] Jassem W., Fuggle S.V., Rela M., Koo D.D.H., Heaton N.D.: The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2002, 73, 493-499.
- [30] Jerkić M., Varagić J., Jovović D., Radujković-Kuburović G., Nastić-Mirić D., Adanja-Grujić G., Marković-Lipković J., Dimitrijević J., Miloradović Z., Vojvodić S.B.: L-arginine reduces tubular cell injury in acute post-ischaemic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1999, 14, 1398-1407.
- [31] Kanellis J., Mudge S.J., Fraser S., Katerelos M., Power D.A.: Redistribution of cytoplasmic VEGF to the basolateral aspect of renal tubular cells in ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 2000, 57, 2445-2456.
- [32] Kanellis J., Paizis K., Cox A.J., Stacker S.A., Gilbert R.E., Cooper M.E., Power D.A.: Renal ischemia-reperfusion increases endothelial VEGFR-2 without increasing VEGF or VEGFR-1 expression. *Kidney Int.* 2002, 61, 1969-1706.
- [33] Katori M., Busuttil R.W., Kupiec-Weglinski J.W.: Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002, 74, 905-912.
- [34] Koo D.D.H., Welsh K.I., Roake J.A., Morris P.J., Fuggle S.V.: Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation. *Am. J. Pathol.* 1998, 153, 557-566.
- [35] Kouwenhoven E.A., De Bruin R.W.F., Bajema I.M., Marquet R.L., Ijzermans J.N.M.: Cold ischemia augments allogeneic-mediated injury in rat kidney allografts. *Kidney Int.* 2001, 59, 1142-1148.
- [36] Kouwenhoven E.A., De Bruin R.W.F., Heemann U., Marquet R.L., Ijzermans J.N.M.: Does cold ischemia induce chronic kidney transplant dysfunction? *Transplant. Proc.* 1999, 31, 988-989.
- [37] Krupnick A.S., Kreisel D., Popma S. H., Balsara K.R., Szeto W.Y., Krasinskas A.M., Riha M., Wells A.D., Turka L.A., Rosengard B.R.: Mechanism of T cell-mediated endothelial apoptosis. *Transplantation* 2002, 74, 871-876.
- [38] Kurokawa T., Takagi H.: Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 1999, 31, 1775-1776.
- [39] Kusaka M., Zandi-Nejad K., Kato S., Beato F., Nagano H., Shaw G.D., Tilney N.L.: Exploitation of the continuum between early ischemia/reperfusion injury and host alloresponsiveness: indefinite kidney allograft survival by treatment with a soluble P-selectin ligand and low-dose cyclosporine in combination. *Transplantation* 1999, 67, 1255-1261.
- [40] Lameire N., Vanholder R.: Pathophysiologic features and prevention of human and experimental acute tubular necrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001, 12, S20-S32.
- [41] Land W.: Postischemic reperfusion injury and cytokines. *Transplant. Proc.* 1998, 30, 4237-4238.
- [42] Lloberas N., Torras J., Herrero-Fresneda L., Cruzado J.M., Riera M., Hurtado I., Grinyo J.M.: Postischemic renal oxidative stress induces inflammatory response through PAF and oxidized phospholipids. Prevention by antioxidant treatment. *FASEB J.* 2002, 16, 908-910.
- [43] Lui S-L., Zhang X-H., Zhu W., Lo C-Y., Chan T-M., Fung P., Lai K-N.: Demonstration of nitric oxide generation during renal ischemia reperfusion injury using paramagnetic resonance spectroscopy. *Transplant. Proc.* 1999, 31, 1020-1021.
- [44] Mantovani A., Garlanda C., Introna M., Vecchi A.: Regulation of endothelial cell function by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Transplant. Proc.* 1998, 30, 4239-4243.
- [45] Massberg S., Messmer K.: Nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 1998, 30, 4217-4223.
- [46] McCord J. M.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 1985, 312, 159-163.
- [47] McLaren A.J., Jassem W., Gray D.W., Fuggle S.V., Welsh K.I., Morris P.J.: Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation. *Clin. Transplant.* 1999, 13, 266-272.

- [48] Meldrum K.K., Hile K., Meldrum D.R., Crone J.A., Gearhart J.P., Burnet A.L.: Simulated ischemia reduces renal tubular cell apoptosis through a nuclear factor-kappaB dependent mechanism. *J. Urol.* 2002, 168, 248-252.
- [49] Oberbauer R., Rohrmoser M., Regele H., Mühlbacher F., Mayer G.: Apoptosis of tubular epithelial cells in donor kidney biopsies predicts early renal allograft function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999, 10, 2006-2013.
- [50] Ojo A.O., Wolfe R.A., Held P.J., Port F.K., Schmouder R.L.: Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997, 63, 968-974.
- [51] Onishi I., Shimizu K., Hashimoto T., Miwa K.: JNK activation and apoptosis during ischemia-reperfusion. *Transplant. Proc.* 1999, 31, 1077-1079.
- [52] Park P., Haas M., Cunningham P.N., Alexander J.J., Bao L., Guthridge J.M., Kraus D.M., Holers V.M., Quigg R.J.: Inhibiting the complement system does not reduce injury in renal ischemia reperfusion. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001, 12, 1383-1390.
- [53] Peter S.D.S., Imber C.J., Jones D.C., Fuggle S.V., Watson C.J., Friend P.J., Marshall S.E.: Genetic determinants of delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation* 2002, 74, 809-813.
- [54] Pincemail J., Defraigne J.O., Franssen C., Bonnet P., Deby-Dupont G., Pirenne J., Deby C., Lamy M., Limet M., Meurisse M.: Evidence for free radical formation during human kidney transplantation. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, 15, 343-348.
- [55] Rhoden E.L., Lucas M.L., Pereira-Lima L., Rhoden C.R., Souto C.A.: Effects of L-arginine on the kidney levels of malondialdehyde in rats submitted to renal ischaemia-reperfusion. *BJU Int.* 2001, 88, 273-277.
- [56] Richer J.P., Gibelin H., Planet M., Bardou A., Ben Amor I., Germonville T., Caritez J.C., Carretier M., Eugene M., Hauet T.: Ischemia-reperfusion injury is associated with inflammatory cell infiltration: evaluation in a pig kidney autotransplant model. *Transplant. Proc.* 2000, 32, 482-483.
- [57] Salahudeen A.K., Joshi M., Jenkins J.K.: Apoptosis versus necrosis during cold storage and rewarming of human renal tubular cells. *Transplantation* 2001, 72, 798-804.
- [58] Sammut I.A., Burton K., Balogun E., Sarathchandra P., Brooks K.J., Bates T.E., Green C.J.: Time-dependent impairment of mitochondrial function after storage and transplantation of rabbit kidneys. *Transplantation* 2000, 69, 1265-1275.
- [59] Serteser M., Koken T., Kahraman A., Yilmaz K., Akbulut G., Dilek O.N.: Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Surg. Res.* 2002, 107, 234-240.
- [60] Shackleton C.R.: Upregulation of major histocompatibility complex-expression under ischemic conditions in experimental models. *Transplant. Proc.* 1998, 30, 4264-4266.
- [61] Sheridan A.M., Bonventre J.V.: Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr. Opin. Nephrol. Hypert.* 2000, 9, 427-434.
- [62] Shoskes D.A., Xie Y., Gonzales-Cadavid N.F.: Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat: implications for renal transplantation. *Transplantation* 1997, 63, 495-500.
- [63] Shoskes D., Halloran P.F.: Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J. Urol.* 1996, 155, 1831-1840.
- [64] Stadlmann S., Rieger G., Amberger A., Kuznetsov A.V., Margreiter R., Gnaiger E.: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress versus cold ischemia-reperfusion: mitochondrial respiratory defects in cultured human endothelial cells. *Transplantation* 2002, 74, 1800-1803.
- [65] Szabo A., Heemann U.: Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. *Transplant. Proc.* 1998, 30, 4281-4284.
- [66] Tajra L.C., Martin X., Margonari J., Blanc-Brunat N., Ishibashi M., Vivier G., Steghens J.P., Kawashima H., Miyasaka M., Dubernard J.M., Revillard J.P.: Antibody-induced modulation of the leukocyte CD11b integrin prevents mild but not major renal ischaemic injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 1556-1561.
- [67] Takada M., Chandraker A., Nadeau K.C., Sayegh M.H., Tilney N.L.: The role of B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 1997, 100, 1199-1203.
- [68] Takada M., Nadeau K.C., Shaw G.D., Marquette K.A., Tilney N.L.: The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. *J. Clin. Invest.* 1997, 99, 2682-2690.
- [69] Takada M., Nadeau K.C., Shaw G.D., Tilney N.L.: Early cellular and molecular changes in ischemia/reperfusion injury: inhibition by a selectin antagonist, P-selectin glycoprotein ligand-1. *Transplant. Proc.* 1997, 29, 1324-1325.
- [70] Tilney N.L., Paz D., Ames J., Gasser M., Laskowski I., Hancock W.W.: Ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 2001, 33, 843-844.
- [71] Troppmann C., Gillingham K.J., Benedetti E., Almond P.S., Gruessner R.W., Najarian J.S., Matas A.J.: Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation* 1995, 59, 962-968.
- [72] Turrens J.F., Beconi M., Barilla J., Chavez U.B., McCord J.M.: Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free Radic. Res. Commun.* 1991, 12-13 Pt 2, 681-689.
- [73] Van Seventer G.A., Semnani R.T., Palmer E.M., McRae B.L., van Seventer J.M.: Integrins and T helper cell activation. *Transplant. Proc.* 1998, 30, 4270-4274.
- [74] Vos I.H., Govers R., Grone H.J., Schurink M., De Weger R.A., Goldschmeding R., Rabelink T.J.: NFkB decoy oligodeoxynucleotides reduce monocyte infiltration in renal allograft. *FASEB J.* 2000, 14, 815-822.
- [75] Weber C., Springer T.A.: Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J. Immunol.* 1998, 161, 6825-6834.
- [76] Wilhelm S.M., Simonson M.S., Robinson A.V., Stowe N.T., Schulak J.A.: Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion. *Kidney Int.* 1999, 55, 1011-1018.
- [77] Yokota N., Daniels F., Crosson J., Rabb H.: Protective effect of T cell depletion in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2002, 74, 759-763.
- [78] Ysebaert D.K., De Greef K.E., Vercauteren S.R., Ghielli M., Verpooten G.A., Eyskens E.J., De Broe M.E.: Identification and kinetics of leukocytes after severe ischemia/reperfusion renal injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 1562-1574.
- [79] Zhang Z., Blake D.R., Stevens C.R., Kanczler J.M., Winyard P.G., Symons M.C., Benboubetra M., Harrison R.: A reappraisal of xanthine dehydrogenase and oxidase in hypoxic reperfusion injury: the role of NADPH as an electron donor. *Free Radic. Res.* 1998, 28, 151-164.
- [80] Zweier J.L.: Free radicals generation in human endothelial cells exposed to anoxia and reoxygenation. *Transplant. Proc.* 1998, 30, 4228-4232.