

- KK, Korpi ER, Hietala J, Scheinin H. Subanesthetic ketamine does not affect 11C-flumazenil binding in humans. *Anesth Analg* 2005;101:722–775.
- IV Salmi, E, Laitio RM, Aalto S, Maksimow AT, Långsjö JW, Kaisti KK, Aantaa R, Oikonen V, Metsähonkala L, Nägren K, Parkkola R, Scheinin H. Xenon does not affect  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors in humans. *Anesth Analg* 2007;106:129–134.
- Viitteet**
1. Meyer H. Welche eigenschaft der anästhetica bedingt ihre narkotische wirkung? *Arch Exp Pathol Pharmacol* (Naunyn – Schmiedeberg's) 1899;42:109–118.
  2. Overton E. Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemein Pharmakologie (Gustav Fischer, Jena, 1901).
  3. Franks NP, Lieb WR. Do general anesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 1984;310:599–601.
  4. Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:709–720.
  5. Franks NP, Lieb WR. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 1994;367:607–614.
  6. Franks NP. General anesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:370–386.
  7. Bloom F, Iversen LL. Localizing [3H]GABA in the nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature* 1971;229:628–630.
  8. Young AB, Chu D. Distribution of GABAA and GABAB receptors in mammalian brain: potential targets for drug development. *Drug Dev Res* 1990;21:161–167.
  9. Korpi ER, Gründer G, Lüddens H. Drug interactions at GABAA receptors. *Prog Neurobiol* 2002;67:113–159.
  10. Möhler H. GABAA receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* 2006;326:505–516.
  11. Sanna E, Mascia MP, Klein RL, ym. Actions of the general anesthetic propofol on recombinant human GABAA receptors: influence on receptor subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274:353–360.
  12. Thompson S-A, Wafford K. Mechanism of action of general anesthetics - new information from molecular pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1:73–83.
  13. Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, ym. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABAA and glycine receptors. *Nature* 1997;389:385–389.
  14. Jenkins A, Greenblatt EP, Faulkner HJ, ym. Evidence for a common binding cavity for three general anesthetics within GABAA receptor. *J Neurosci* 2001;21:RC136.
  15. Miller LG, Greenblatt DJ, Barnhill JG, ym. 'GABA shift' in vivo: enhancement of benzodiazepine binding in vivo by modulation of endogenous GABA. *Eur J Pharmacol* 1988;148:123–30.
  16. Bazhenov M, Timofeev I, Steriade M, Sejnowski TJ. Self-sustained rhythmic activity in the reticular nucleus mediated by depolarizing GABAA receptor potentials. *Nat Neurosci* 1999;2:168–174.
  17. Sugiyama K, Muteki T, Shimoji K. Halothane-induced hyperpolarization and depression of postsynaptic potentials of guinea pig thalamic neurons in vitro. *Brain Res* 1992;576:97–103.

*Elina Salmi*

Erikoistuva lääkäri, LT

Korva-, nenä- ja kurkkutautien klinikka

Turun yliopistollinen keskussairaala

elina.salmi[a]utu.fi

# Ischemia-reperfusion injury in human liver transplantation

## – mechanisms and effects on graft function

Minna Ilmakunnas

Helsingin yliopisto 20.12.2008

Vastaväittäjä dosentti Styrbjörn Friman, Sahlgrenska Universitetssjukhuset, Göteborg, Ruotsi

**M**aksansiirto on vakiintunut hoitomuoto sekä akuutissa maksan vajaatoiminnassa että kroonisissa maksasairauksissa. Maksansiirron pitkäaikaistulokset ovat erinomaisia; Suomessa 95 prosenttia potilaista selviytyy ensimmäisen siirron jälkeisen vuoden, ja vielä kymmenen vuoden kuluttua siirrosta potilaista 72 prosenttia on elossa. Siirteen varhainen toiminta, immunosuppressioon liittyvät ongelmat ja siirtoon johtaneen maksasairauden uusiminen

ovat tärkeimpiä pitkäaikaisennusteeseen vaikuttavia tekijöitä. Vaikka valtaosa siirteistä toimii siirron jälkeen ongelmitta, kansainvälisissä aineistoissa jopa 15–30 prosenttia siirteistä toimii huonosti (primary graft dysfunction, PDF) tai menetetään kokonaan (primary graft non-function, PNF)<sup>1</sup>. PDF määritellään yleisesti transaminaasina >1500 U/l kolmen vuorokauden kuluessa siirrosta, kun taas PNF:ssä kehitty maksanekroosi, ja potilas kuolee ilman uusintasiirtoa viikon ku-

luessa maksan vajaatoimintaan ja siitä johtuvaan monielinvaurioon. Tärkeimpiä siirteen varhaiseen toimintaan vaikuttavia tekijöitä ovat ”marginaalinen” elintenluovuttaja (epävakaa hemodynaamiikka, elektrolyyttihäiriöt, ym.), maksan rasvaisuus, kylmäiskemia-aika, ja iskemia-reperfuusio-vaurio<sup>2,3</sup>.

Maksakudos sietää kylmäiskemiaa varsin hyvin 12 tunnin ajan<sup>2</sup>, ja varsinaisen kudosaivurion aiheuttaakin verenkierron palauttaminen siirteeseen, reperfuusio. Reperfuusiovauriolle on ominaista voimakas sekä paikallinen että systeeminen tulehdusvaste. Kylmäiskemian aikana aktivoituneet Kupfferin solut tuottavat mm. sytokiineja, happiradikaaleja ja muita tulehdusvälittäjäaineita, jotka aktivoivat endoteelisoluja ja valkosoluja, sekä lisäävät endoteelin läpäisevyyttä<sup>4</sup>. Reperfuusiossa maksaan kertyy nopeasti aktivoituneita neutrofiileja, jotka aiheuttavat kudostuhhoa tuottamalla happiradikaaleja ja proteolyttisiä entsyymejä<sup>5</sup>. Toisaalta verenkierron palauttaminen hapenpuutteesta kärsineeseen kudokseen johtaa paikalliseen hyttymisjärjestelmän aktivaatioon, ja fibriinin ja trombosyyttien kertymiseen sinusoideihin<sup>6</sup>. Sinusoideja tukkivat myös kudokseen pyrkivät, endoteelia pitkin rullaavat neutrofiilit. Mekaanisten tukosten lisäksi sinusoideissa vallitsee reperfuusion jälkeen liiallinen vasokonstriktio<sup>7</sup>. Nämä tekijät yhdessä aiheuttavat mikroverenkierron häiriöitä, ”no-reflow” iskemiaa, ja siten etenevää kudosaivuriota.

Maksansiirrossa siirre kärsii ensisijaisesti kylmäiskemiasta, joka vaikuttaa non-parenkymaalisoluihin<sup>8</sup>. Maksan iskemia-reperfuusiovauriota on kuitenkin tutkittu lähinnä koe-eläimillä malleissa, joissa on käytetty hepatosyyttejä vaurioittavaa lämmintä iskemiaa (normotermia). Toisaalta kliinisissä tutkimuksissa iskemia-reperfuusiovaurio määritellään yleensä PDF-kriteerit täyttävän transaminaasipäästön mukaan, eikä solutason mekanismeja ole juurikaan tutkittu. Tämän väitöstutkimuksen tarkoituksena olikin selvittää iskemia-reperfuusiovaurioon liittyviä solutason tapahtumia kliinisessä maksansiirrossa, ja niiden vaikutusta siirteen toimintaan ja siirron pitkäaikaisennusteeseen. Lisäksi tutkittiin tulehdusvastetta aivokuolleella elintenluovuttajalla, ja sen vaikutusta siirteen toimintaan.

## Osatyöt

Tämän väitöskirjan osatöihin osallistui yhteensä 70 aikuista maksansiirtopotilasta siirron indika-

tiosta riippumatta. Osatyössä I otettiin tutkimusnäytteitä myös 30 elintenluovuttajalta. Tutkimuksissa pyrittiin selvittämään erityisesti reperfuusion aikana siirteessä tapahtuvia muutoksia, ja verinäytteitä otettiin samanaikaisesti portti- ja maksalaskimosta useissa reperfuusion vaiheissa (siirteen huuhtelun aikana, porttilaskimon avaamisen jälkeen, maksavaltimon avaamisen jälkeen). Näytteistä tutkittiin sekä solusitoisia (fagosyyttien CD11b ja L-selektiini) että liukoisia tulehdusmerkkiaineita (sytokiinit TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, HMGB1 ja liukoinen ICAM-1). Lisäksi määritettiin luonnollisten antikoagulanttien proteiini C:n ja aktivoituneen proteiini C:n (APC) pitoisuudet. Maksasiirteen toimintaa arvioitiin päivittäin rutiininomaisesti otetuilla maksa-arvoilla ensimmäisen siirron jälkeisen viikon ajan. Lisäksi selvitettiin komplikaatiot ensimmäisen siirron jälkeisen vuoden aikana.

Osatyössä I tutkittiin tulehdusvastetta 30 elintenluovuttajalla maksan irrotuksen aikana, ja tulehdusvasteen vaikutusta siirteen välittömään toimintaan vastaanottajalla. Tässä osatyössä havaittiin, että ne maksat, joista vapautui verenkiertoon IL-8:aa irrotuksen aikana, toimivat huomattavasti siirron jälkeen. Luovuttajan tulehdusvaste näytti vaurioittavan erityisesti sappiteitä, mikä ilmeni kohonneina bilirubiini- ja AFOS-pitoisuuksina vasta useamman päivän kuluttua siirrosta.

Osatyössä II kuvattiin 10 potilaalla proteiini C:n ja APC:n kinetiikka maksansiirron aikana ja siirron jälkeen. Maksan vajaatoimintaa sairastavilla potilailla on matalista proteiini C-pitoisuuksista huolimatta normaalia korkeammat APC-tasot. Proteiini C-pitoisuudet normalisoituvat muutamassa päivässä onnistuneen maksansiirron jälkeen. Reperfuusion aikana maksaan jäi huomattavia määriä proteiini C:tä, mutta siitä huolimatta APC:ta ei vapautunut maksasta.

Osatyössä III tutkittiin 50 potilaalla, onko maksasiirteen proteiini C:n ja/tai APC:n kulutuksella reperfuusion aikana mahdollisia anti-inflammatorisia vaikutuksia. Lisäksi pyrittiin selvittämään, onko reperfuusiovauriolla vaikutusta siirteen varhaiseen toimintaan kliinisessä maksansiirrossa. Tämä tutkimus vahvisti osatyön II löydöksiä. Reperfuusion aikana maksa kulutti huomattavia määriä proteiini C:tä ilman samanaikaisesti havaittavaa aktivaatiota APC:ksi. Samaan aikaan maksaan jäi kiinni aktivoituneita fagosyyttejä. Niissä maksoissa, jotka kuluttivat eniten proteiini C:tä, fagosyyttiaktivaatio oli vähäisin.

Osatyössä IV kuvattiin 20 potilaalla HMGB1:n kinetiikka maksansiirron aikana. Edelleen pyrit-

tiin selvittämään reperfuusioaurion vaikutusta siirteen toimintaan. Tässä osatyössä havaittiin, että kliinisessä maksansiirrosta HMGB1 on ensisijaisesti hepatosyyttivaurion merkkiaine, joka vapautuu maksasta reperfuusion aikana. Sitä ei havaittu lainkaan vastaanottajan verenkierron ennen reperfuusiota. HMGB1:n vapautuminen maksasta oli yhteydessä korkeisiin ALAT-pitoisuuksiin välittömästi siirron jälkeen, ja oli voimakkaampaa rasvaisissa maksoissa.

## Johtopäätökset

Tämän väitöstutkimuksen perusteella tulehdusvaste maksassa käynnistyy jo elintenluovuttajassa ennen varsinaista iskemia-reperfuusioauriota. Erityisesti sappitiet näyttävät kärsivän vauriota. Vaikka tässä tutkimuksessa ei pystytty osoittamaan luovuttajan tulehdusvasteen ja sappitieaurion vaikutusta pitkäaikaisennusteeseen, sappitieauriot johtavat tyypillisesti siirteen menettämiseen pitkän ajan kuluessa<sup>9</sup>. Huomionarvoista on, että tulehdusvaste ja siihen liittyvä sappitieaurio ilmeni myös maksoissa, joiden luovuttajilla ei ollut yhtäkään tunnettua riskitekijää varhaisvaiheen huonolle toiminnalle. Tulevaisuudessa luovuttajan tulehdusvasteen rajoittaminen esimerkiksi kortisonihoidolla saattaa parantaa siirteen varhaista toimintaa.

Reperfuusio aiheutti voimakkaan paikallisen tulehdusvasteen maksassa jo varsin lyhyen kylmäiskemian (näissä tutkimuksissa mediaani noin 5 h) jälkeen. Yllättäen voimakas paikallinen fagosyyttiaktivaatio reperfuusion aikana ei vaikuttanut siirteen toimintaan, toisin kuin kokeellisissa maksan iskemia-reperfuusioauriomalleissa. Kuitenkin tämän tutkimuksen perusteella tulehdusvastetta siirteessä voitaisiin todennäköisesti rajoittaa käyttämällä hyväksi proteiini C/APC:n fagosyyttiaktivaation eston kautta välittyviä anti-inflammatorisia vaikutuksia<sup>10</sup>.

HMGB1:tä on pidetty tulehdusreaktion myöhäisvaiheessa toimivana sytokiinina<sup>11</sup>. Tämän tutkimuksen mukaan maksansiirrosta HMGB1 on ensisijaisesti varhain reperfuusion aikana vapautuva hepatosyyttivaurion merkkiaine. Reperfuusion jälkeen pitkäikäinen HMGB1:n vapautuminen maksasta ennusti transaminaasipäästöä siirron jälkeen. Jatkossa voidaankin mahdollisesti jo siirron aikana tunnistaa ne vastaanottajat, joille kehittyy PDF. Näin mahdolliset hoitointerventiot voidaan kohdistaa riskipotilaisiin.

Tulevaisuudessa siirteen varhaiseen toimintaan vaikuttavien tekijöiden, erityisesti maksan tulehdusvasteen hallinta saattaa parantaa maksansiirron ennustetta entisestään. □

### Väitöskirja ja osatyöt

Minna Ilmakunnas. Ischemia-reperfusion injury in human liver transplantation. Mechanisms and effects on graft function. <http://ethesis.helsinki.fi>

- I Ilmakunnas M, Höckerstedt K, Mäkisalo H, Siitonen S, Repo H, Pesonen EJ. Hepatic IL-8 release during graft procurement is associated with impaired graft function after human liver transplantation. Clin Transplant, in press.
- II Ilmakunnas M, Petäjä J, Höckerstedt K, Mäkisalo H, Fernandez JA, Griffin JH, Jansson S-E, Repo H, Pesonen EJ. Activation of protein C during reperfusion in clinical liver transplantation. Transplantation 2003;75: 467–472.
- III Ilmakunnas M, Pesonen EJ, Höckerstedt K, Mäkisalo H, Fernandez JA, Griffin JH, Repo H, Siitonen S, Petäjä J. Graft protein C entrapment is associated with reduced phagocyte activation during reperfusion in human liver transplantation. Crit Care Med 2006;34:426–32.
- IV Ilmakunnas M, Tukiainen EM, Rouhiainen A, Rauvala H, Arola J, Nordin A, Mäkisalo H, Höckerstedt K, Isoniemi H. HMGB1 as a marker of hepatocellular injury in human liver transplantation. Liver Transpl 2008;14:1517–1525.

### Viitteet

1. Mehrabi A, Fonouni H, Müller SA, Schmidt J. Current concepts in transplant surgery: liver transplantation today. Langenbecks Arch Surg 2008;393:245–260.
2. Briceno J, Marchal T, Padillo J, ym. Influence of marginal donors on liver preservation injury. Transplantation 2002;74:522–526.
3. Cuende N, Miranda B, Canon JF, ym. Donor characteristics associated with liver graft survival. Transplantation 2005;79:1445–1452.
4. Wanner GA, Ertel W, Müller P, ym. Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. Shock 1996;5:34–40.
5. Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. Liver Int 2006;26:912–919.
6. Kakizoe S, Yanaga K, Starzl TE, Demetris J. Evaluation of protocol before transplantation and reperfusion biopsies from human orthotopic liver allografts: Considerations of preservation and early immunological injury. Hepatology 1990;11:932–941.
7. Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, ym. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. Shock 1997;8:80–85.
8. McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, ym. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. Transplantation 1988;46:178–191.
9. Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, ym. Diagnostic features and clinical outcome of ischemic-type biliary complications after liver transplantation. Hepatology 1993;17:605–609.
10. Schoots IG, Levi M, van Vliet AK, ym. I/R Inhibition of coagulation and inflammation by activated protein C or antithrombin reduces intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. Crit Care Med 2004;32:1375–1383.
11. Wang H, Bloom O, Zhang M, ym. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science 1999;285:248–251.

Minna Ilmakunnas  
sairaalalääkäri  
HYKS ATEK  
[minna.ilmakunnas\[a\]hus.fi](mailto:minna.ilmakunnas[a]hus.fi)