

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA

SCUOLA DI MEDICINA

Dottorato di ricerca XXVII Ciclo in

“Chirurgia e Biotecnologie chirurgiche”

Coordinatore Prof. Lorenzo Dominioni



PERFUSIONE MECCANICA IPOTERMICA NEL TRAPIANTO DI RENE DA DONATORE
MARGINALE, FOLLOW UP A BREVE E LUNGO TERMINE

Relatore

Chiar.mo Prof. Giulio Carcano

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa Francesca Villa

Matricola: 703054

Anno accademico 2014-2015

INDICE

Introduzione	pag 2
Il donatore marginale	pag 3
Sistemi alternativi di conservazione dell' organo	pag 9
Materiali e metodi	pag 10
Risultati	pag 19
Follow-up	
Follow-up post operatorio	pag 23
Follow-up a breve e lungo termine	pag 25
Conclusione	pag 27
Bibliografia	pag 29

INTRODUZIONE

Il trapianto di rene rappresenta la terapia definitiva dell'insufficienza renale terminale.

Il trapianto d'organo prevede quattro fasi fondamentali costituite da: 1) prelievo d'organo da un donatore cadavere o vivente, 2) conservazione dell'organo, 3) preparazione dell'organo al banco 4) trapianto dell'organo in un ricevente.

Una volta eseguito il prelievo il *graft* viene generalmente conservato con una tecnica tradizionalmente denominata *static cold storage* (sCS). La conservazione dell'organo è necessaria per consentire il trasporto dell'organo dal sito di prelievo a quello di donazione, per permettere la preparazione del paziente ricevente, quasi mai disponibile al momento del prelievo. A tal fine il rene è immerso in una soluzione ricca di elettroliti e nutrienti alla temperatura di circa 4°C al fine di limitare i processi biochimici che porterebbero le cellule del graft all'apoptosi. L'organo così conservato viene successivamente preparato al banco, in sala operatoria, in ambiente sterile. In questa fase, vengono rimossi dall'organo tessuti accessori eventualmente prelevati assieme all'organo e si constata definitivamente l'adeguatezza dell'organo, dei vasi e dell'uretere. Eventualmente, qualora necessario, in questa fase si ricorre alla ricostruzione di strutture vascolari in modo da renderle idonee al trapianto o alla riparazione di strutture lesionate durante la fase del prelievo.

Con il trapianto, infine, le strutture vascolari vengono anastomizzate ai vasi del ricevente permettendo la riperfusione a caldo dell'organo che riprende le proprie attività biologiche. L'uretere del graft viene contestualmente anastomizzato alla vescica del ricevente.

IL DONATORE MARGINALE

Durante gli ultimi 15 anni si è registrato un numero sempre crescente di pazienti affetti da insufficienza renale terminale in attesa di trapianto. La discrepanza sempre più sostenuta tra il numero di organi da donatore cadavere e la necessità sempre più crescente di trapianto, impone l'utilizzo di donatori marginali e di donatori "a cuore fermo" o non heart-beating donors NHBD [1-2] Si definiscono donatori marginali in accordo con le linee guida OPTN (Organ Procurement Transplantation network) graft provenienti da donatori con più di 60 anni o con età compresa tra 50-59 anni che presentino almeno due delle seguenti condizioni: storia clinica di ipertensione, creatininemia > 1,5 mg/dL, causa di morte cerebrovascolare.[3-4]. I trapianti effettuati con organi prelevati da NHBD sono finalizzati all'incremento del pool dei donatori dal 20% al 30%.

L'idoneità del rene al trapianto, in considerazione della tendenza sempre più crescente di utilizzo di reni da donatori non ottimali, viene stabilita tramite differenti criteri: il Nyberg score **(1)** che valuta la storia anamnestica del donatore e il karpinsky score **(2)** che si basa sull'analisi microscopica del graft mediante biopsia; questi parametri vengono usualmente considerati validi ma non sufficientemente accurati da predire in modo assoluto il buon funzionamento del graft.

(1) Nyberg score (tab 1): analizza parametri legati al donatore quali l'età, la storia di ipertensione arteriosa la clearance della creatinina al momento del prelievo, l'affinità HLA, e la causa di morte, classificando i reni secondo un diverso grado di punteggio (**A** 0-9; **B** 10-19; **C** 20-29; **D** 30-39) identificando con "C" i reni marginali la cui prospettiva funzionale depone per una scelta chirurgica di doppio trapianto.[5].

(2) Karpinsky score (tab 2): analizza parametri istologici quali sclerosi glomerulare, atrofia tubulare, fibrosi interstiziale, aterosclerosi vascolare classificando i reni secondo un diverso grado di punteggio (0-4; 5-6; 7-12) come idonei al trapianto singolo, al doppio trapianto o non trapiantabili

L'accurata selezione dei donatori marginali, l'utilizzo del doppio trapianto e di una terapia immunosoppressiva non nefrotossica hanno prodotto risultati soddisfacenti in termini di sopravvivenza del trapianto e dei pazienti. Resta tuttavia l'evidenza che reni provenienti da donatori marginali siano ancora gravati da una percentuale di ripresa funzionale ritardata (delayed graft function: DGF) e mancata ripresa funzionale (primary non function : PNF) statisticamente significativa.

Nel trapianto di rene il danno da ischemia fredda e da ischemia riperfusione (IRI) rappresenta la causa più temibile di mancata o ritardata ripresa funzionale del graft. [6].

Si parla di danno da ischemia-riperfusione ad un tessuto quando la circolazione sanguigna torna al tessuto (riperfusione) dopo un periodo di ischemia, che può essere parziale o completa, reversibile o irreversibile. Essa può manifestarsi come un fenomeno localizzato o globalizzato interessando vari organi “danno remoto d’organo”.

L’assenza di ossigeno e nutrienti crea una condizione in cui il ripristino della circolazione ha come risultato l’infiammazione e lo stress ossidativo, con accumulo di metaboliti tossici da produzione intracellulare, che conducono ad apoptosi e necrosi. L’accumulo di metaboliti tossici e la successiva distribuzione nella circolazione, che si verificano durante la riperfusione, possono dare origine ad effetti locali o remoti sugli organi.

Diversi meccanismi sono coinvolti nel danno da ischemia e riperfusione:

- 1- **Perdita dell’omeostasi ionica:** durante la fase di ischemia, a causa della deplezione di ATP, si ha una progressiva riduzione della funzionalità della pompa Na^+/K^+ ATPasi; si ha, quindi, un accumulo intracellulare di sodio che porta al rigonfiamento osmotico della cellula. Per limitare questo fenomeno, il sodio intracellulare viene scambiato con il calcio extracellulare, microsomiale e mitocondriale. In conseguenza di ciò, viene limitato l’accumulo di osmoliti inorganici nel citosol, mentre si realizza un netto incremento del calcio citosolico
- 2- **Attivazione dell’enzima xantina ossidasi:** l’accumulo di calcio citosolico determina l’attivazione di numerosi enzimi calcio-dipendenti (fosfolipasi, proteasi, endonucleasi). Tra gli enzimi attivati vi è la calpaina, una proteasi responsabile dell’attivazione dell’enzima xantina-ossidasi (isoforma dell’enzima xantina-deidrogenasi). Quest’ultimo è responsabile dell’ossidazione della ipoxantina (prodotta dalla degradazione dell’adenosina a sua volta derivante dal catabolismo dell’ATP) ad acido urico, utilizzando come substrato l’ossigeno e liberando anione superossido, importante fonte di radicali liberi dell’ossigeno
- 3- **Produzione di nitroperossido:** il monossido d’azoto prodotto dalle cellule endoteliali in risposta all’ischemia si combina con l’anione superossido, formando il radicale nitroperossido. Quest’ultimo oltre ad essere un potente ossidante, è in grado di attivare direttamente l’enzima PARP- 1 determinando la polimerizzazione dei residui di NAD^+ diminuendo così le possibili fonti energetiche cellulari.

- 4- **Disfunzioni mitocondriali:** l'attivazione delle fosfolipasi e gli squilibri della concentrazione del calcio sono i principali responsabili della disfunzione a carico della catena di trasporto degli elettroni con conseguente instabilità mitocondriale. L' incremento di produzione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) e la ridotta sintesi di ATP favoriscono la formazione di pori di transizione di permeabilità mitocondriale con l'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi.

- 5- **Richiamo di cellule infiammatorie:** il danno ischemico porta all'attivazione delle cellule endoteliali, che reclutano in loco cellule infiammatorie circolanti, neutrofilo e monociti, attraverso l'espressione di cellule di adesione. La loro attivazione e il rilascio di grandi quantità di enzimi litici amplificano il processo infiammatorio che evolve verso una serie di complesse reazioni che includono l'accumulo in loco e l'attivazione di leucociti e proteine plasmatiche. Le citochine pro-infiammatorie e le chemochine vengono rilasciate in risposta al danno cellulare e all'infiammazione.

Tutti gli allograft sono soggetti alla degenerazione del danno da ischemia-riperfusion, durante il trapianto. IRI causa il danno endoteliale vascolare e gioca un ruolo determinante nella fisiopatologia del rene trapiantato.

IRI induce edema nelle cellule endoteliali dell'allograft, altera le connessioni intercellulari e l'attecchimento delle cellule endoteliali alla membrana basale. Le conseguenze funzionali di questa alterazione morfologica includono alterazioni sia vascolari determinando l'aumento dell'attecchimento leucocitario all'endotelio, sia extravascolari alterando i processi di coagulazione, provocando la perdita della fisiologica barriera endoteliale e aumentando l'edema interstiziale. Il danno durante IRI predispone al rigetto acuto o cronico. La perfusione è associata ad una disfunzione microcircolatoria che coinvolge, distintamente, l'attivazione del sistema umorale, cellulare molecolare (**tab 3**) e che svolge un ruolo determinante nel rigetto del graft.

In contrasto con l'ischemia-riperfusion calda, dopo ischemia fredda (conservazione) e trapianto (riperfusion) la popolazione delle cellule non parenchimali, includendo le cellule endoteliali micro vascolari, sono considerati i maggiori target per la manifestazione del danno o del fallimento del graft. Un numero considerevoli di studi ed esperimenti hanno rappresentato che la microcircolazione rappresenta il primo target di manifestazione associato alla disfunzione del graft nell'organo trapiantato. [7-8].

Questi aspetti possono essere di particolare importanza qualora si utilizzino graft di qualità non ottimale che possono avere una maggiore vulnerabilità al danno da IRI. [9].

La necessità, sempre più evidente, di utilizzo di reni marginali comporta inevitabilmente, sia la ricerca di nuove metodiche sempre più accurate per la selezione e la preservazione dell'organo da trapiantare sia la necessità di far fronte alle possibili complicanze chirurgiche legate alle caratteristiche morfologiche dell'organo trapiantato.

Tab 1 Nyberg score

VARIABLE	SCORE
Age,y	
<30	0
30-39	5
40-49	10
50-59	15
60-69	20
>70	25
History of hypertension	
none	0
yes;duration unknown	2
<5 y	2
6-10 y	3
>10 y	4
Creatinine clearance mL/min	
>100	0
75-99	2
50-74	3
<50	4
HLA mismatch, n° antigens	
0	0
1-2	1
3-4	2
5-6	3
Cause of death	
Non CVA	0
CVA	3
Total points, range	0-39

Tab 2 Karpinsky score

ISTOLOGICAL ASPECTS	SCORE
Glomerular score	0-3
Tubular score	0-3
Interstitial score	0-3
Vascular score	0-3

Tab 3 citochine coinvolte nel rigetto del graft

Citochine	Funzione nel rigetto dell'allograft
IL-1	Causa la formazione di neointima e la patogenesi nel rigetto cronico
IL-2	Coinvolto in tutti i tipi di rigetto dell'allograft
IL-4	Promuove il danno vasculopatico nel graft
IL-5	Media la vasculopatia nel trapianto
IL-15	Attiva la risposta autoimmune specifica CD8 T durante il rigetto acuto
IL-17	Stimola la risposta autoimmune
IFN-γ	Promuove il rigetto acuto dell'allograft renale
TNF-α	Partecipa alla patogenesi del rigetto acuto e cronico
VEGF	Influenza l'adesione e la migrazione dei leucociti sull'endotelio
MCP-1	Associato con il rigetto iper-acuto
ICAM-1 E VCAM-1	Promuove il reclutamento dei leucociti e linfociti nel danno da rigetto
PDGF	Media i meccanismi della proliferazione cellulare nel rigetto cronico
M-CSF	Promuove il reclutamento e la proliferazione dei macrofagi

SISTEMI ALTERNATIVI DI CONSERVAZIONE DELL'ORGANO:

L'adeguata preservazione del graft è importante per mantenere ed aumentare l'*outcome* del trapianto. Nell'ottica di quanto finora detto a proposito degli organi provenienti da donatori marginali, risulta tanto più importante una buona conservazione al fine di migliorarne l'aspettativa di sopravvivenza. Evidenze dimostrano che il danno cellulare occorrente durante la fase di conservazione determina quella lisi cellulare e conseguente liberazione di molecole ad azione antigenica del citosol che al momento della riperfusione dell'organo sono responsabili del danno mediato dal compartimento linfocitario dell'ospite.

Accanto alla consueta metodica di sCS, si è andata affermando una tecnica alternativa di preservazione rappresentata dalla perfusione meccanica con ipotermia (Hypotermic Perfusion Machine: HMP). La metodica , prevede l'impiego di una macchina progettata da Belzer negli anni Sessanta, che permette di perfondere in maniera continua il graft ricreando delle condizioni di flusso simili a quelle fisiologiche.

Anche se in letteratura è ampiamente documentata l'efficacia nel ridurre i danni legati all'ischemia, della conservazione del graft mediante perfusione meccanica, rispetto alla conservazione statica, rimangono ancora oscuri quali siano i meccanismi coinvolti. Può essere ipotizzata che la perfusione meccanica non solo fornisca nutrizione e faciliti l'eliminazione delle tossine dal graft ma inneschi inoltre, meccanismi di protezione che portino ad un aumento della risposta immunitaria innata.

MATERIALI E METODI

Il nostro studio si propone come obiettivo primario quello di verificare l'efficacia della macchina per la perfusione meccanica del graft (RM-3®, Water Medical System) nel minimizzare il danno da ischemia-riperfusion in termini di DGF e PNF rispetto alla metodica classica di “*static cold storage*” valutando e comparando l'espressione delle citochine pro-infiammatorie (TNF- α , IL-2, IL-1b) e della molecola di adesione (sICAM-1) nel liquido di perfusione proveniente dai due campioni di soluzione di perfusione.

Citochine

Le citochine svolgono un ruolo importante nell'attivazione leucocitaria.

Sono polipeptidi endogeni o glicoproteine con peso molecolare generalmente inferiore a 30 kDa generate da vari tipi di cellule, non solo appartenenti al sistema immunitario, in risposta a determinati stimoli.

Fungono da messaggeri intercellulari in grado di modificare l'espressione genica cellulare e di indurre nelle cellule bersaglio modificazioni concernenti la regolazione della crescita, della moltiplicazione e della differenziazione cellulare.

Possono avere sia un effetto agonista che antagonista nei confronti della sintesi e dell'azione di altre citochine inserendosi quindi in un meccanismo a cascata.

Si ritiene che le citochine abbiano un ruolo essenziale nella patogenesi dello shock e dell'insufficienza multiorgano in corso di sepsi.

- *Interleuchina 1 (IL-1)*

L'interleuchina-1 è costituita da due molecole biochimicamente distinte, ma strutturalmente collegate: IL-1 α e IL-1 β (17.5-kDa). Viene prodotta prevalentemente da fagociti mononucleati (monociti e macrofagi attivati) ma anche da neutrofili, cellule endoteliali, macrofagi tissutali e fibroblasti.

In seguito alla stimolazione cellulare i geni per l'IL-1 vengono trascritti e tradotti in due precursori polipeptidici dalle serin-proteasi in forme intracellulari attive di IL-1.

L'IL-1 media direttamente vari aspetti della risposta infiammatoria dell'ospite, tra cui la febbre, la sintesi di proteine epatiche di fase acuta, il rilascio di fattori di crescita e di altre citochine immunoregolatrici, la variazione della funzione e della permeabilità delle cellule

endoteliali. Svolge un'azione chemiotattica sui PMN e agisce come importante cofattore dell'attivazione linfocitaria poiché promuove la secrezione di IL-2 e interferone γ .

L'IL-1 è ritenuta responsabile della patogenesi di differenti situazioni morbose, specialmente alterazioni infiammatorie e autoimmuni.

- *Interleuchina 2 (IL-2)*

L'interleuchina 2 (IL-2) è una proteina prodotta dai linfociti T attivati.

Il legame tra l'antigene e il recettore delle cellule T (TCR) stimola la secrezione di IL-2 e l'espressione sullo stesso del suo recettore.

IL-2 agisce promuovendo la proliferazione e l'attivazione dei linfociti che presentano il recettore IL-2 di membrana, stimolando la crescita e l'attivazione delle cellule NK, favorendo la differenziazione dei linfociti B.

- *Fattore di necrosi tumorale (TNF- α)*

Il TNF è un fattore di necrosi tumorale prodotto dai macrofagi. Sono stati individuati due tipi di TNF: il TNF- α , prodotto da macrofagi attivati e il TNF- β , prodotto dai linfociti, in risposta a stimoli antigenici di diversa natura. Possiede un'azione citotossica sulle cellule neoplastiche, in parte diretta ed in parte attribuibile ad un effetto sulla vascolarizzazione della massa tumorale determinando necrosi emorragica. Il TNF agisce inoltre sui neutrofili promuovendo la loro degranolazione, potenziandone l'attività fagocitica e aumentando l'espressione delle molecole di adesione leucocitaria.

Integrine

Sono una famiglia di glicoproteina eterodimeriche trans membrana formate da due catene polipeptidiche α e β unite da legami non covalenti, espresse principalmente sui leucociti e la cui espressione è fortemente stimolata dai numerosi mediatori infiammatori. Ne troviamo 2 famiglie a seconda che il tipo di catena β sia β_1 o β_2 .

β_1 o *VLA (Very Late Antigen)* queste integrine sono note anche con le sigle CD49a-fCD29 a seconda del tipo di catena α (α_1 - α_6), il loro ligando principale è rappresentato dalle proteine della matrice extracellulare (collagene, laminina, fibronectina) e dall'endotelio legandosi a VCAM1 (Vascular Cell Adesion Molecule-1).

β_2 o *LFA (Leukocyte Function-associated Antigen)* queste integrine sono note anche con le sigle CD11a-cCD18 a seconda ancora una volta del tipo di catena α ($\alpha_L/\alpha_M/\alpha_X$). I ligandi delle tre

forme sono la frazione C3b del complemento, fibrinogeno e le ICAM 1,2,3 (glicoproteina espressa su leucociti, fibroblasti e cellule endoteliali).

Le integrine appartenenti al gruppo LFA sono selettive per l'adesione stabile del leucocita all'endotelio attivato. Mediano quindi l'interruzione del "rolling" leucocitario sull'endotelio sostenuto dalla spinta del flusso sanguigno, determinando un'adesione più stabile alla parete vasale con appiattimento della cellula e sua successiva fuoriuscita dal circolo.

Nell'ottica di massimizzare il numero e la vitalità degli organi trapiantabili è essenziale il processo di perfusione e conservazione dell'organo durante il periodo che precede il trapianto. Le modalità di perfusione comprendono la perfusione ipotermica a caduta denominata *static cold storage* (sCS) e la perfusione con macchina a pressione pulsatile con *Hypothermic Perfusion Machine* (HMP) di recente impiego nella chirurgia dei trapianti.

L'ipotermia viene tradizionalmente impiegata per il mantenimento dell'organo dal momento del prelievo al trapianto. Lo stoccaggio a freddo è senza dubbio la tecnica più semplice di preservazione dell'organo, la perfusione con soluzione fredda consente la rimozione dall'organo del sangue residuo e la riduzione rapida della temperatura, minimizzando il metabolismo cellulare e la richiesta di ossigeno. Di contro il metabolismo anaerobio induce sostanziale danno d'organo amplificando il danno da IRI dopo il trapianto. [10-11].

La perfusione meccanica mediante RM-3 permette di perfondere il rene in modo continuo e pulsatile, ciò consente il mantenimento di un metabolismo basale renale e la rimozione meccanica dei globuli rossi con la residua parte corpuscolata del sangue dalle arteriole renali e contestualmente permette la registrazione di parametri di flusso, validi come indicatori di danno d'organo e quindi possibili indici di trapiantabilità. [12].

Le soluzioni di perfusione sono formulate per contenere gli effetti dell'ipotermia e prolungare il periodo di anaerobiosi. La soluzione gold standard è considerata la University of Winsconsin solution (UW) contenente componenti addizionali a supporto del fabbisogno energetico (*adenosina*) e a protezione dal danno ischemico: inibitori della xantina-ossidasi, stabilizzatori lisosomiali e bloccanti dei canali del calcio (*allopurinolo, desametasone, magnesio e glutatione*) Contiene inoltre un fattore colloide che mantiene un'adeguata pressione idrostatica e previene il rigonfiamento cellulare (*lactobionato, amido di idrossietile e mannitolo*)

Nella macchina a perfusione in ipotermia la soluzione viene pompata nell'arteria del graft di continuo ad una temperatura compresa tra i 4°C e i 7°C. I parametri che vengono costantemente

valutati sono il flusso, la temperatura e le resistenze renali, il numero di pulsazioni al minuto, la pressione sistolica, diastolica e il valore intermedio, parametro sul quale può intervenire attivamente l'operatore per il raggiungimento di valore ottimale di 40 mmHg da mantenere tale per un tempo non inferiore alle sei ore.

Le indicazioni ottenute dal calcolo delle resistenze renali sono un parametro molto importante predittivo di danno renale, che può preludere ad un mancata ripresa funzionale dell'organo, se superiori a 0,6 mmHg a fine perfusione.

L'incremento delle resistenze vascolari periferiche renali durante la perfusione (IRR) è correlato ad un decremento della funzionalità post operatoria . Queste riflettono infatti la risposta costrittiva del letto vascolare renale all'insulto ischemico. Il meccanismo preciso alla base del fenomeno rimane poco chiaro [13]. Potrebbe essere il risultato dell'interazione di agenti vaso-costrittivi rilasciati localmente e del danno endoteliale, da cui deriva una riduzione del rilascio di ossido nitrico (NO), principale fattore vasodilatatore endogeno. La congestione degli eritrociti nei capillari aumenta in maniera addizionale alle resistenze e rappresenta un importante fattore nella disfunzione renale post ischemica [14-15] . Il raggiungimento di resistenze renali ottimali $0,4 < IR > 0,6$ viene considerato come criterio di trapiantabilità da diversi studi americani [16-17].

Da gennaio 2011 a dicembre 2013 sono stati perfusi con metodica meccanica mediante RM3,13 graft da donatore marginale, selezionato secondo gli score di riferimento (Karpinsky e Nyberg). Tale campione rappresenta il gruppo B del nostro studio.

Il campione di controllo è stato selezionato tra i graft perfusi con metodica standard di sCs, provenienti da donatori marginali con caratteristiche anagrafiche e cliniche sovrapponibili al campione in oggetto. Tale campione rappresenta il gruppo A del nostro studio.

In accordo con le linee guida del NITp (Nord Italia Transplant Program), la conservazione del graft è avvenuta per immersione in soluzione Celsior con ghiaccio sterile per un periodo medio di 8+/- 4 ore. Nei casi trattati con HMP, i graft sono stati perfusi in continuo con soluzione UW a 4°C per un periodo non inferiore alle 6 ore (11- 12 ore in quasi tutti i casi) ad una pressione media di 40 mmHg.

Per ogni graft perfuso con HMP sono stati valutati e registrati parametri di flusso, la pressione media di perfusione e le resistenze vascolari (**grafico 1-2-3**).

Come da protocollo, per la determinazione della concentrazione di citochine pro- infiammatorie e della molecola sICAM-1, nel liquido di perfusione del graft nei due campioni sono stati prelevati sterilmente:

- 5 cc di soluzione Celsior dall'apposito sacchetto per la conservazione del graft nel gruppo A e di soluzione UW dal box sterile di raccolta della soluzione di perfusione nel gruppo B.
- 5 cc di soluzione dalla vena renale del graft perfuso al momento del trapianto con la soluzione dedicata Celsior vs UW nel gruppo A e B Per ciascun campione prelevato.

il liquido è stato collocato in provette sterili quindi congelato gradualmente fino ad una temperatura di -80°C , al momento opportuno scongelato e analizzato con la collaborazione di uno Specialista dell'Istituto di Farmacologia Clinica e Sperimentale del Nostro Istituto.

Per ogni campione sono state analizzate le seguenti molecole:

- IL-1 β
- IL-2
- TNF- α
- ICAM-1

Per il dosaggio e l'analisi di tutti e quattro i markers sono stati utilizzati, appositi kit *ELISA* (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), ognuno specifico per ogni analita (**tab4**).

Tab 4 kit analisi

Analita	Denominazione kit	Ditta produttrice
TNF- α	Quantikine Human TNF- α	R&D System
IL-1 β	Quantikine Human IL-1 β /IL-1F2	R&D System
ICAM-1 solubile	Quantikine Human sICAM-1/CD54	R&D System
IL-2	Quantikine Human IL-2	R&D System

Il siero di ogni campione è stato caricato negli appositi pozzetti della piastra inclusa nei kit dedicati (96 pozzetti in tutto, di cui 16 riservati agli *standards*, aventi funzioni di taratura delle concentrazioni di analita).

Il fondo di ogni pozzetto viene rivestito da un anticorpo monoclonale specifico per la proteina in esame.

Al momento del caricamento del campione nel relativo pozzetto e successiva incubazione, la proteina in esame si lega all'anticorpo ed i siti di legame disponibili vengono saturati proporzionalmente alla quantità di proteina presente nel campione.

Dopo un tempo d'incubazione, specifico a seconda del kit, le piastre vengono sottoposte a ripetuti lavaggi allo scopo di eliminare l'eventuale proteina in eccesso non legata.

La fase successiva consiste nell'aggiunta di un anticorpo secondario policlonale coniugato ad un enzima.

Viene eseguito nuovamente un lavaggio per eliminare l'anticorpo secondario coniugato in eccesso.

Al termine della procedura, viene aggiunta una soluzione substrato, una sostanza cromogena che ossida l'enzima legato all'anticorpo secondario che darà alla soluzione una colorazione blu, tanto

più intensa quanto più è presente l'analita preso in esame; successivamente viene addizionata una soluzione (soluzione di stop) che blocca la reazione di ossidazione.

La fase finale è rappresentata dalla lettura della piastra allo spettrometro che rileva le variazioni di densità ottica, che confrontate alla curva standard permettono di ricavare il corrispondente valore di proteina per ogni campione.

Grafico 1 flusso di perfusione (valore medio 75 ml/min)

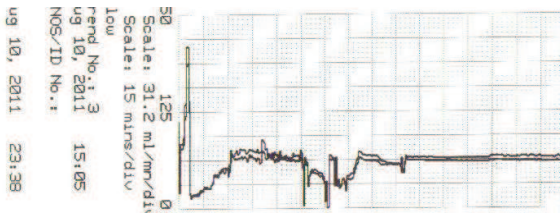


Grafico 2 pressione di perfusione (valore medio 40 mmHg)

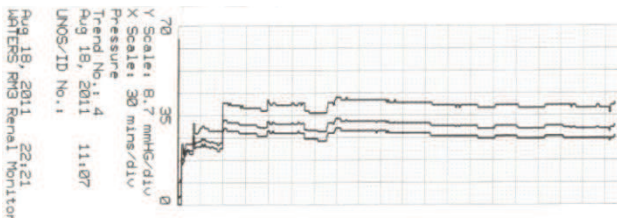
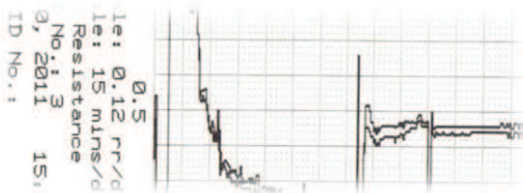


Grafico 3 resistenze parenchimali (valore medio 0,4)



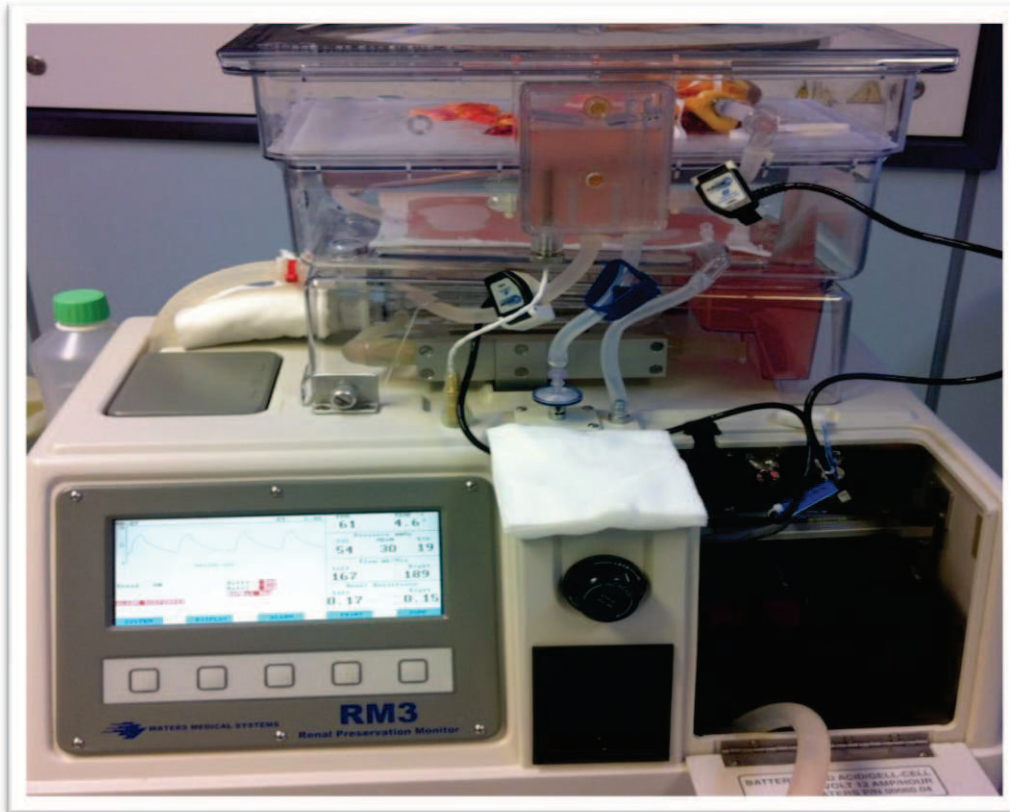


Figura 1 Hypotermic perfusion machine-RM3

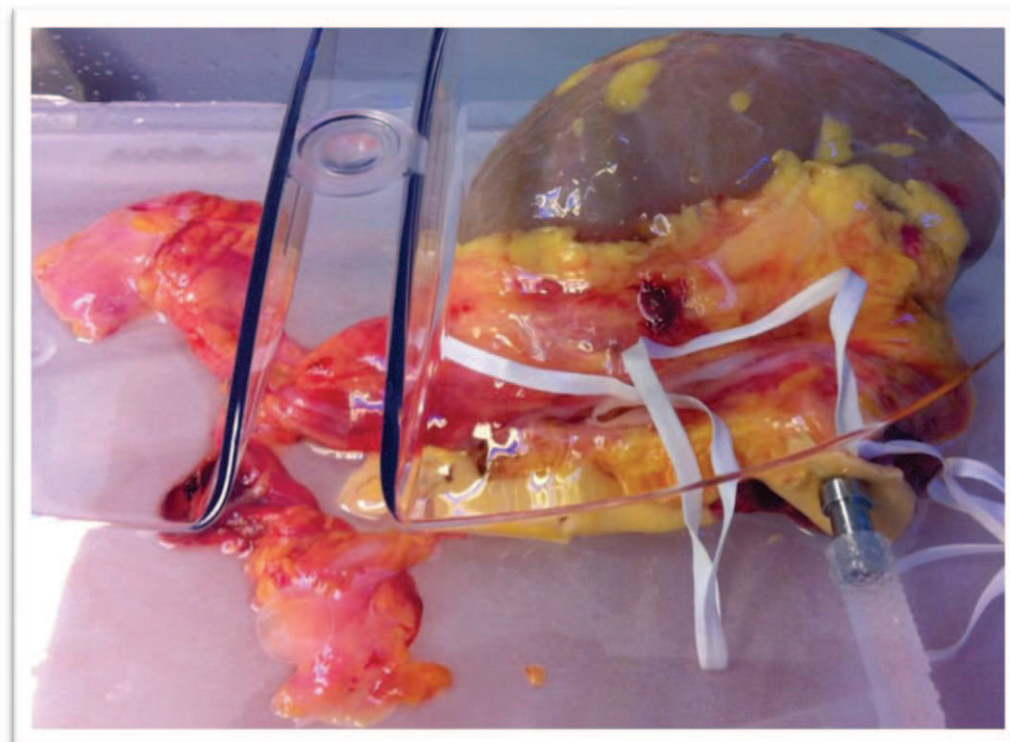


Figura 2 graft perfuso con RM3

RISULTATI

per ogni campione appartenente ai due gruppi di studio: gruppo A (13 graft renali perfusi con sCS) e gruppo B (13 graft renali perfusi con HMP) abbiamo analizzato l'espressione e la concentrazione di citochine pro infiammatorie nel liquido di conservazione e nel liquido di perfusione al momento del trapianto.

Abbiamo elaborato i dati e calcolato la media dei valori ottenuti per ogni citochina pro infiammatoria nei due gruppi di studio. **(Tab5)**

I campionamenti di TNF- α nel gruppo B non hanno mostrato risultati apprezzabili nelle variazioni tra liquido di perfusione e di conservazione.

I dati ottenuti dal nostro studio evidenziano i seguenti risultati:

tab 5

	HMP		sCS		p
	storage liquid	effluent	storage liquid	effluent	
TNF-a	<0.01	<0.01	1,89	2,26	0,004
IL-2	33,99	2,03	22,43	8,84	0,0001
IL-1b	10.00	<0.10	4,63	5.15	0,0001
sICAM-1	5,69	1,28	2,96	0,89	0,652

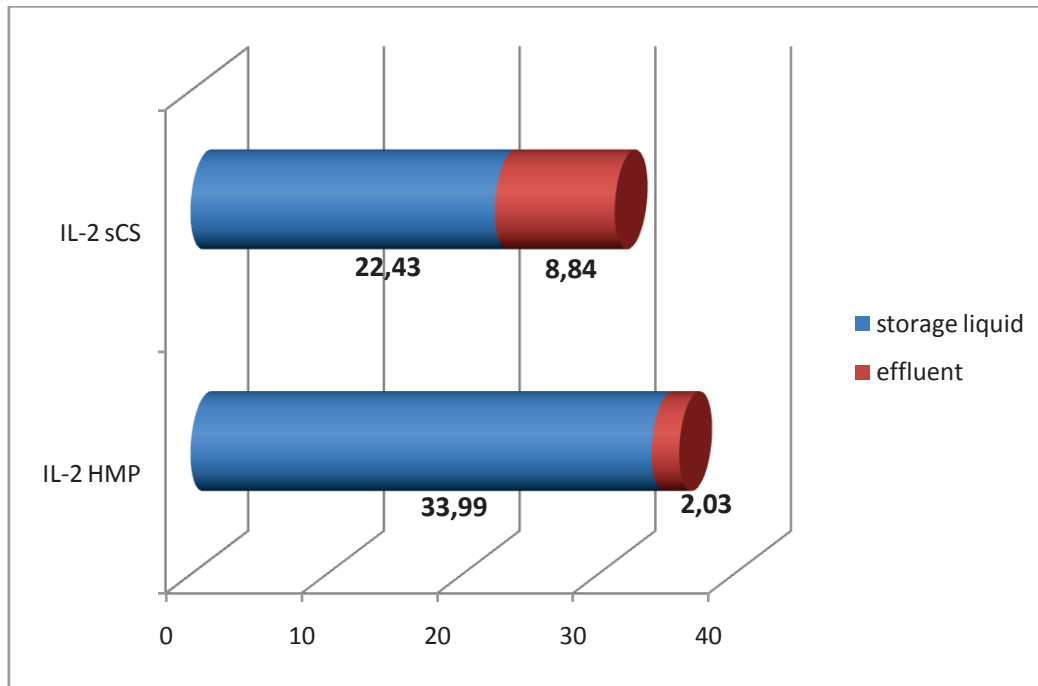


Grafico 1: il grafico evidenzia una riduzione statisticamente significativa della concentrazione di IL-2 nel liquido di perfusione del gruppo B. **P 0,0001**

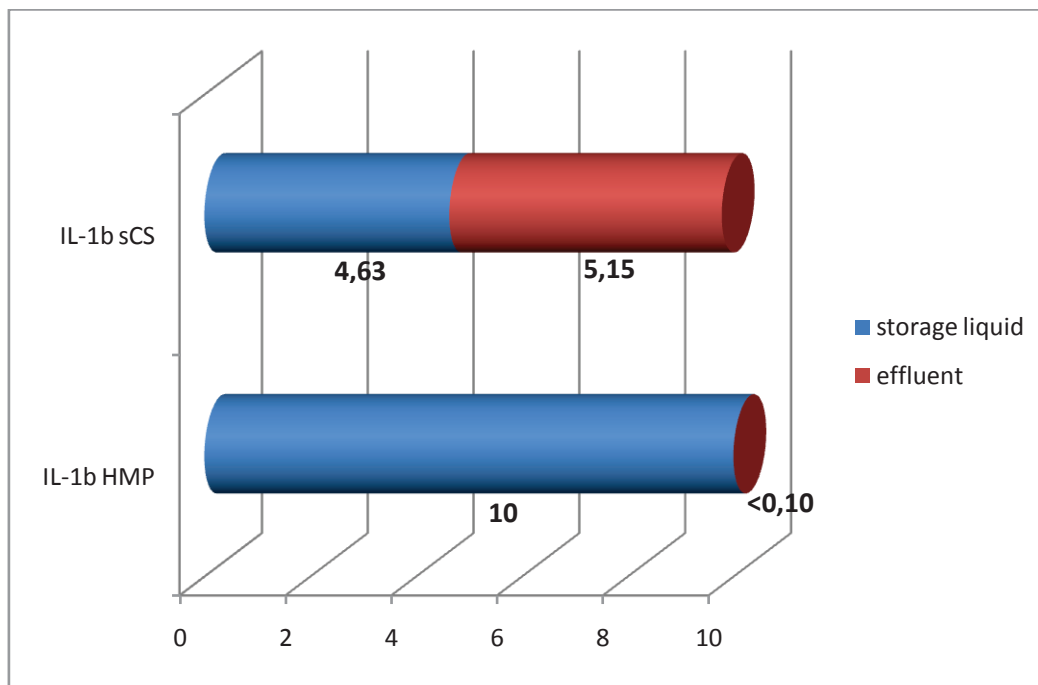


Grafico2: il grafico evidenzia una riduzione statisticamente significativa della concentrazione di IL-1β nel liquido di perfusione del gruppo B. **P 0,0001**

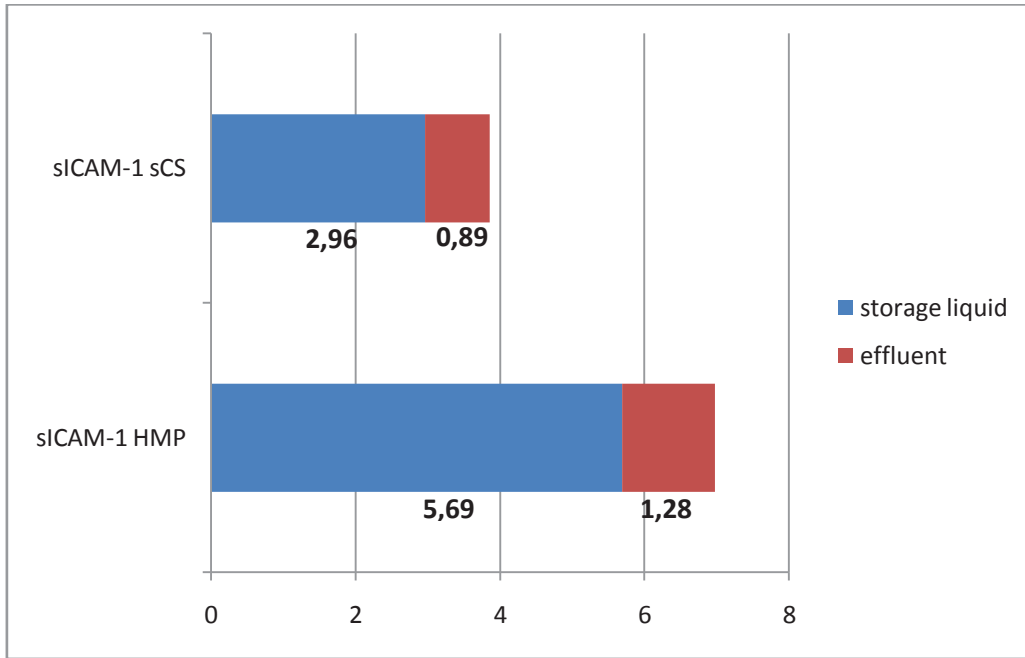


Grafico 3: il grafico evidenzia la riduzione di concentrazione della proteina sICAM-1 nel liquido di perfusione dei due gruppi (B>A). **P 0,652**

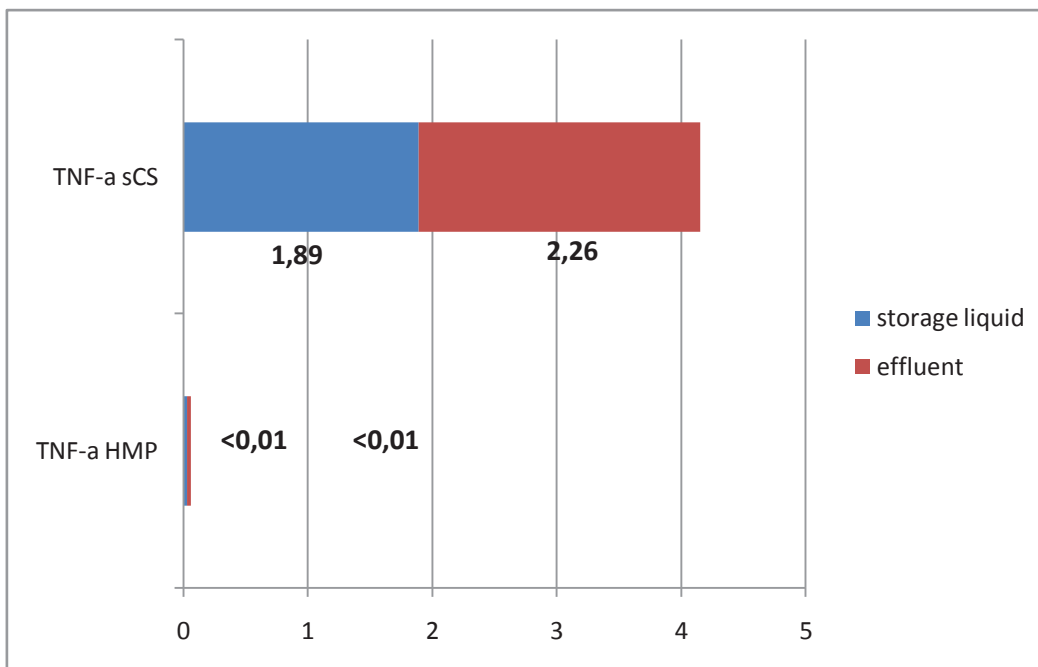


Grafico 4: non si sono evidenziate sostanziali modificazioni di concentrazione di TNF- α nel gruppo B si è, invece, evidenziato un aumento di concentrazione della proteina infiammatoria nel liquido di perfusione del gruppo A. **P 0,004**

FOLLOW-UP

Follow-up post operatorio

Tutti i pazienti sottoposti a trapianto renale sono stati ricoverati in un reparto dedicato sino al momento della dimissione.

La degenza media è stata di 14,3 giorni.

Il follow up post-operatorio è stato eseguito, da protocollo, con controlli ecografici color-doppler dell'organo trapiantato in I-III-VII giornata post operatoria, con controllo radiografico del torace nell'immediato post operatorio e in VII giornata o più frequentemente in caso di necessità clinica. Gli esami ematochimici sono stati eseguiti due volte al giorno per i primi 2 giorni poi una volta al giorno sino a completa stabilizzazione del paziente.

Il dosaggio dei farmaci immunosoppressori è stato eseguito secondo schema nefrologico e modificato in relazione alle condizioni cliniche e immunologiche di ogni singolo paziente.

Lo stent ureterale "doppio J" posizionato durante l'intervento chirurgico è stato rimosso, sotto guida scopica in settima giornata postoperatoria.

L'esame angio-TC è stato eseguito solo in caso di necessità per la diagnosi delle complicanze vascolari.

Le complicanze post-operatorie sono state prevalentemente mediche:

L'infezione delle vie urinarie è stata la complicanza più frequente (6 pazienti) in ogni caso è stata trattata, con successo, con terapia antibiotica mirata.

Un paziente ha sviluppato una mancata ripresa funzionale dell'organo (PNF), che ha richiesto l'espianto a 60 giorni e la ripresa del trattamento emodialitico.

Tre pazienti hanno sviluppato una ripresa funzionale ritardata dell'organo (DGF) che ha richiesto sedute emodialitiche aggiuntive.

Due pazienti hanno sviluppato un ematoma perirenale, ma in nessun caso è stato necessario un reintervento chirurgico. **(Tab 6)**

Tutti i pazienti sono stati dimessi in buone condizioni generali con graft funzionante.

Tab. 6

<i>Complicanze</i>	<i>Gruppo A (13 pz. sCS)</i>	<i>Gruppo B (13 pz.HMP)</i>	<i>% per gruppo A vs B</i>
IVU (infezione vie urinarie)	3 CASI	3 CASI	23 vs 23
PNF	1 CASO	/	7,7 vs 0
DGF	2 CASI (1dialisi)	1 CASO	15,4 vs 7,7
SEPSI	1CASO	/	7,7 vs 0
EMATOMA POST CH	1 CASI	1 CASI	7,7 vs 7,7

follow-up a breve e lungo termine

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a controllo clinico e laboratoristico mediante esami di funzionalità renale, quadro elettrolitico ed emocromo a 6 mesi, 12 mesi, 18 mesi e 24 mesi dalla dimissione.

Tutti i pazienti sono stati inoltre, sottoposti a controllo strumentale del graft mediante angio RMN a scadenza annuale.

Si sono verificati due casi di decesso nei 12 mesi successivi al trapianto; nel primo caso si è trattato di un paziente, appartenente al gruppo B, che è deceduto a distanza di 6 mesi dalla dimissione, con creatininemia pari a 2 mg/dL, per insufficienza respiratoria acuta a seguito di un processo flogistico, e nel secondo caso si è trattato di un paziente, appartenente al gruppo A, che è deceduto a distanza di 8 mesi dalla dimissione, con creatininemia pari a 7 mg/dL, per insufficienza cardiovascolare.

Tutti i dati raccolti inerenti agli esami eseguiti dai pazienti, sono stati collocati in un data base dedicato suddivisi secondo il gruppo di appartenenza al nostro studio: gruppo A e B.

Per ogni analita in oggetto è stato calcolato il valore medio in relazione al mese di esecuzione e al gruppo di appartenenza. (Tab 7-8-9)

Tab 7

<i>Creatininemia (g/dL)</i>	<i>Dimissione</i>	<i>6 mesi</i>	<i>12 mesi</i>	<i>18 mesi</i>	<i>24 mesi</i>
*Gruppo A	3,02	2,33	1,8	2,65	3,8
**Gruppo B	1,7	1,64	1,5	1,5	1,5

*Gruppo A:pazienti trapiantati con graft perfuso sCS - **Gruppo B:pazienti trapiantati con graft perfuso HPM

Tab 8

<i>Azotemia mg/dL</i>	<i>Dimissione</i>	<i>6 mesi</i>	<i>12 mesi</i>	<i>18 mesi</i>	<i>24 mesi</i>
*Gruppo A	75	67	61	71	65
**Gruppo B	83	73	65	73	65

*Gruppo A:pazienti trapiantati con graft perfuso sCS - **Gruppo B:pazienti trapiantati con graft perfuso HPM

Tab 9

<i>Emoglobina g/dL</i>	<i>Dimissione</i>	<i>6 mesi</i>	<i>12 mesi</i>	<i>18 mesi</i>	<i>24 mesi</i>
*Gruppo A	9,7	11,5	12,7	12,8	13
**Gruppo B	9,8	12,6	12,9	13,8	13,8

*Gruppo A: pazienti trapiantati con graft perfuso sCS - **Gruppo B: pazienti trapiantati con graft perfuso HPM

Non si sono dimostrate sostanziali differenze per quanto concerne i valori di emoglobina e di azotemia nei due campioni; significativa la costante riduzione del valore di creatininemia nel gruppo B rispetto al gruppo A. Il dato è suggestivo di un miglior funzionamento del graft dopo perfusione con HMP.

CONCLUSIONE

L'analisi dei risultati ottenuti nel nostro lavoro hanno permesso di raggiungere l'obiettivo primario dello studio in oggetto; si è potuto verificare l'efficacia della macchina per la perfusione meccanica del graft (RM3) nel minimizzare il danno da ischemia-riperfusion in termini di DGF e PNF rispetto alla metodica classica di static cold storage valutando e comparando l'espressione di citochine pro-infiammatorie nel liquido di perfusione dei graft conservati con metodica sCS rispetto alla metodica in studio HMP.

La titolazione delle citochine di fase acuta (TNF- α , IL-1 β , IL-2) e della molecola di adesione solubile sICAM-1 nei liquidi di perfusione ha dimostrato una riduzione statisticamente significativa di questi mediatori nei reni perfusi meccanicamente rispetto a quelli conservati con metodica standard.

Questo dato ha permesso di confermare quanto ampiamente descritto in letteratura [18-19] circa l'ipotesi che la perfusione meccanica non solo garantisce un migliore e costante "wash out" del graft da metaboliti tossici, garantendo nello stesso tempo un apporto di sostanze addizionali a supporto del fabbisogno energetico e a protezione dal danno ischemico, ma anche svolgesse un ruolo di protezione sul microcircolo[20-21]; la modalità di perfusione pulsatile e costante, simile a quella fisiologica, migliorerebbe le resistenze vascolari, il vasospasmo e limiterebbe il danno endoteliale con conseguente riduzione di espressione di molecole di adesione [22-23]. A tale proposito i dati raccolti hanno evidenziato una maggiore concentrazione delle citochine pro-infiammatorie nel liquido di conservazione dei graft perfusi con HMP rispetto a sCS per poi ridursi maggiormente in maniera statisticamente significativamente nel liquido di perfusione dei graft perfusi con HMP rispetto a sCS.

Durante la perfusione meccanica del graft è inoltre possibile valutare e registrare costantemente parametri di flusso quali la velocità e la pressione media di perfusione, la temperatura del perfusato e le resistenze vascolari renali. Le indicazioni ottenute dal calcolo delle resistenze renali sono un parametro predittivo di danno renale, che può preludere ad una mancata ripresa funzionale se superiori a 0,6 a fine perfusione [24-25].

Nella nostra casistica i dati registrati a fine perfusione hanno evidenziato per tutti i graft perfusi con RM3, valori di IR < 0,4 fatta eccezione per un caso; il valore registrato era: IR pari a 0,6; si è trattato del paziente che ha sviluppato nel periodo post operatorio DGF.

La possibilità di calcolare il valore delle resistenze vascolari renali al momento del trapianto rappresenta un valido criterio di trapiantabilità che conferisce alla macchina per la perfusione meccanica un valore aggiuntivo rispetto alla metodica standard.

Nel nostro centro, nel periodo preso in esame, sono stati perfusi con metodica HMP impiegando una macchina RM3 13 reni provenienti da donatore marginale. Per quanto la nostra esperienza sia inficiata dalla ridotta corte analizzata, è emerso come l'insorgenza di DGF nei reni marginali perfusi con HMP sia minore rispetto a quelli conservati con sCS.

In letteratura l'insorgenza di DGF nei reni marginali è descritta tra il 27% e il 33% ; nella nostra casistica si è verificato un solo caso di DGF nei reni perfusi con HMP, pari al 7,7% (vs 15,4% nei reni perfusi sCS) , mentre non si è riscontrata in nessun caso PNF (vs 7,7% nei reni perfusi sCS) , che in letteratura si attesta tra il 2% e il 5%;

L'andamento della creatininemia nei due gruppi di studio ha permesso di dimostrare come la perfusione meccanica favorisca una migliore vitalità del graft anche a lungo termine.

Alla luce dei risultati illustrati possiamo concludere affermando che la perfusione meccanica mediante RM3 rappresenta una valida alternativa alla metodica standard offrendo la capacità di ridurre il rischio di disfunzione d'organo in risposta al danno da ischemia-riperfusionem garantendo una buona vitalità del graft a lungo termine sebbene non abbia dimostrato una superiorità in termini di sopravvivenza del graft, di frequenza di rigetto e di mortalità.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Cumulative Data Eurotransplant Centers (ET, ONT), Jan 1,2002-Dec 31,2002.
- 2- Function and quality of kidneys after cold storage, machine perfusion, or retrograde oxygen persufflation: Results from a porcine autotransplantation model. Treckmann J, Nagelschmidt M, Minor T, et al. *Cryobiology*. 2009 Aug;59 (1):19-23
- 3- Association of lower costs of pulsatile machine perfusion in renal transplantation from expanded criteria donors. Buchanan PM, Lentine KL, Burroughs TE, et al. *Am J Transplant*. 2008 Nov;8(11):2391-2401
- 4- UNOS Policy 3.5.1 Definition of Expanded Criteria Donor and Standard Donor. Dec 4. 2007
- 5- Improved Scoring System to Assess Adult Donors For Cadaver Renal transplantation. Nyberg SL, Matas AJ, Kremers WK, et al. *American J. Transplant*. 2003 Jun; 3(6):715–721
- 6- Shahrul I.Ibrahim. Ischemia-Reperfusion Injury, Patricia D'Amore *Microvascular Reserch* pp.113 1107-11. Editor in Chef
- 7- Vladimir Savransky. Microvascular Responses to Organ Transplantation, Patricia D'Amore *Microvascular Reserch* pp.113 1107-11
- 8- Clinical Analysis of Perioperative Complement Activity during Ischemia/Reperfusion Injury following Renal Transplantation. Blogowski W, Dolegowska B, Salata D, et al. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012 Nov;7(11):1843-51
- 9- Machine Perfusion or Cold Storage in Deceased-Donor Kidney Transplantation. Ploeg J.et al.*N Engl J Med*. 2009;23:456-9
- 10- Hypothermic organ preservation by static storage methods: Current status and a view to the future. McAnulty JF. *Cryobiology* 2010 Jul;60(3 suppl):S13-9
- 11- Mechanism and prevention of cold storage-induced human renal tubular cell injury. Salahudeen AK, Huang H, Patel P, et al. *Transplantation*. 2008;70:1424
- 12- Pulsatile perfusion reduces the incidence of delayed graft function in expanded criteria donor kidney transplantation. Matsuoka L, Shah T, Aswad S, et al. *American J of Transplantation*. 2006; 6(6):1473-1478
- 13- Mesenchymal stromal cells in renal ischemia/reperfusion injury. de Vries DK, Schaapherder AF, Reinders ME. *Front Immunol*. 2012;3:162. Epub 2012 Jul 2

- 14- Tubular epithelial injury and inflammation after ischemia and reperfusion in human kidney transplantation. Snoeijs MG, van Bijnen A, Swennen E, et al. *Ann Surg.* 2011 Mar;253(3):598-604
- 15- Ischaemia-reperfusion injury in renal transplantation: the role of nitric oxide in an experimental rat model. Barakat N, Hussein AA, Abdel-Maboud M, et al. *BJU Int.* 2010 Oct;106(8):1230-6
- 16- Kidney preservation with University of Wisconsin and Celsior solution: a prospective multicenter randomized study. Faenza A, Catena F, Nardo B et al. *Transplantation.* 2001 Oct 15;72(7):1277-7
- 17- Impact of cold ischemia time on outcome of deceased kidney transplantation. Abbaszadeh S, Heidari F. *Iran J Kidney Dis.* 2012 Jul;6(4):229-31
- 18- Reno protective effect of pulsatile perfusion machine RM3: pathophysiological and kidney injury biomarker characterization in a preclinical model of autotransplanted. Codas R. *BJU int.* 2011;18:224-28
- 19- Pulsatile perfusion reduces the incidence of delayed graft function in expanded criteria donor kidney transplantation. Matsuoka L, Shah T, Aswad S, et al. *American J of Transplantation* 2006;6(6):1473-1478
- 20- Machine perfusion or cold storage in decrease-donor kidney transplantation. Moers C, Pirenne J, Paul A, et al. Machine Preservation Trial Study Group. *N Engl J Med.* 2012 Feb 23;366(8):770-1
- 21- Systematic review and meta-analysis of hypothermic machine perfusion versus static cold storage of kidney allografts on transplant outcomes. JM O'Callaghan, RD Morgan, SR Knight et al. *British J of Surg.* 2013;100(8):991-1001
- 22- Single centre experience of hypothermic machine perfusion of kidneys from extended criteria deceased heart-beating donors: a comparative study. Forde JC, Shields WP, Azhar M, et al. *Ir J Med Sci.* 2014 Dec 5
- 23- Metabolomic Analysis of perfusate during Hypothermic machine perfusion of human cadaveric kidneys. Guy AJ, Nath J, Cobbold M, et al. *Transplantation.* 2014 Sep 12
- 24- The Prognostic Value of Renal Resistance During Hypothermic Machine Perfusion of Deceased Donor Kidneys. Jochmans I, Moers C, Smits JM, et al. *Am J. Trasplant.* 2011 Oct;11(10):2214-20
- 25- Re: the prognostic value of renal resistance durin hypothermic machine perfusion of deceased donor kidneys. Goldfarb DA. *J Urol.* 2012 May;187(5):1768

