



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E
SPERIMENTALI
INDIRIZZO EPATOLOGIA E CHIRURGIA EPATOBILIARE E
TRAPIANTOLOGICA
CICLO XXVI

**SVILUPPO DI BIOMARKERS PER LA DETERMINAZIONE E LA
VALUTAZIONE PROGNOSTICA DELLA RIPRESA FUNZIONALE EPATICA
POST TRAPIANTO, NEL FEGATO MARGINALE E NEL NON HEART
BEATING DONOR.**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Angelo Gatta

Supervisore : Ch.mo Prof. Umberto Cillo

Dottorando : Pasquale Bonsignore

Indice

1. Riassunto	1
- Presupposti dello studio	1
- Scopo dello studio	1
- Materiali e Metodi	2
- Risultati	2
- Conclusioni	3
2. Abstract	4
- Background	4
- Purpose 4	
- Matherial and Methods	5
- Result	5
- Conclusion	6
3. Introduzione	7
• La carenza di donatori: il concetto di marginalità	9
- Età del donatore	11
- Steatosi epatica	11
- Tempo di ischemia	15
- Epatite B	16
- Neoplasie	17
- Split	19
- LDLT	20
• Non Heart Beating Donors – NHBD	23
- Le categorie di NHBD	25
- NHBD controllati e non controllati	26
- NHBD non controllati	26
- NHBD controllati	27
- Definizione di NHBD e NHBDp	
28	
- Strategie per la preservazione dei graft di NHBD	30
• Il danno da ischemia-riperfusione	32
- Meccanismi cellulari del danno epatico da ischemia-riperfusione	32

- Cellule non parenchimali	32
- Cellule parenchimali	36
- Cellule T e Polimorfonucleati	38
- Radicali liberi dell'Ossigeno	40
- Sistema dell'Eme-Ossigenasi	42
- Il fenomeno del "pH paradosso"	43
- Alterazione della microcircolazione	44
• Preservazione d'organo	45
- Cold Storage	45
- Machine perfusion	48
4. Scopo dello Studio	61
5. Materiali e metodi	62
- Scelta dell'animale da esperimento	62
- Studio anatomico	62
- Premedicazione, gestione anestesiologicala e preparazione dell'animale	65
- Cannulazione della Vena Giugulare Esterna e dell'Arteria Carotide	66
- Induzione dell'arresto cardiaco e prelievo del fegato	67
- Gruppi di studio	69
- Machine perfusion	69
- Cold storage	71
- Rewarming	72
- Valutazione del danno epatico	72
- Esami di laboratorio	72
- Valutazione isto-patologica	73
6. Analisi statistica	77
7. Risultati	78
8. Discussione	81
9. Conclusioni e prospettive future	93
10. Iconografia	95
11. Grafici e tabelle	101
12. Bibliografia	104

1. RIASSUNTO

Premesse generali

Nell'ambito del trapianto di fegato, uno dei problemi più importanti non ancora risolti è la grande discrepanza tra la richiesta di organi e la risorsa di donazioni. Il ricorso ai così detti organi "marginali", come quelli dei donatori a cuore non battente e con steatosi maggiore del 60%, potrebbe consentire di ampliare in maniera sensibile il *pool* degli organi disponibili per trapianto. L'impiego di questi fegati però è associato ad un'alta frequenza di Primary Dysfunction postoperatoria a causa del danno che si sviluppa nel corso della preservazione in Cold Storage, nel contesto del processo di ischemia-riperfusion in ipotermia estrema (4°C). Si apre un'area di interesse di ricerca verso l'utilizzo di metodiche alternative nella conservazione del graft epatico come la Machine Perfusion, in grado di ridurre questo tipo di insulti e di consentire il dosaggio di biomarkers in grado di predire l'entità del danno da ischemia-riperfusion e la qualità della ripresa funzionale del graft dopo trapianto.

Le grandi potenzialità di questo sistema nell'ambito della preservazione d'organo e i numerosi lavori in letteratura ci hanno spinto ad approfondire questa tematica.

Scopo dello studio

L'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di realizzare un modello sperimentale di Machine Perfusion per la preservazione di fegati prelevati da

donatore a cuore non battente, come valida alternativa alla preservazione tradizionale in Cold storage a 4°C.

Ulteriore scopo del nostro progetto è stato quello di identificare eventuali biomarcatori in grado di predire l'entità del danno da ischemia-riperfusion e la qualità della ripresa funzionale del graft dopo trapianto di fegato da donatore a cuore non battente.

Materiali e metodi

Per questi esperimenti abbiamo utilizzato 10 maiali Landrace di circa 20 Kg ai quali abbiamo praticato, 60 minuti dopo l'arresto cardiaco, un'epatectomia totale, prelevando così il fegato. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi di 5 ciascuno: nel primo gruppo (Gruppo A) il fegato prelevato è stato perfuso in MP (Machine perfusion) per sei ore con soluzione di Celsior a 20°C. Nel secondo gruppo (Gruppo B) il fegato prelevato nei 5 animali è stato conservato per 6 ore in CS (Cold storage). In tutti i gruppi di studio il periodo di preservazione è stato seguito da un periodo di rewarming inteso come riperfusion dell'organo con sangue autologo in normotermia (37°) per due ore per valutare la risposta alla riperfusion. Durante tutte le otto ore dell'esperimento sono stati raccolti campioni ematici e istologici.

Risultati

Dal punto di vista biochimico (AST, ALT, LDH) e istologico (necrosi e congestione) la preservazione mediante perfusione a 20°C si è dimostrata superiore rispetto al Cold Storage.

Il dosaggio di AST, ALT, Acido lattico ed LDH si è dimostrato essere un parametro attendibile per la valutazione del danno d'organo e della ripresa funzionale del graft epatico. Il dosaggio di citochine quali IL1, IL6, TNf alfa non ha mostrato alcuna significatività.

Conclusioni

Queste evidenze sperimentali mettono in rilievo l'efficacia di una preservazione con macchina a perfusione continua a 20°C sul grande animale. Sia dal punto di vista biochimico che istologico, infatti, abbiamo osservato che la Machine Perfusion in moderata ipotermia è di beneficio nella preservazione del graft ed offre il notevole vantaggio di poter testare, durante la perfusione, biomarcatori che possono predire l'eventuale ripresa funzione dell'organo, prima dell'esecuzione del trapianto, al fine di ridurre l'incidenza di *disfunction* del graft post trapianto.

2. ABSTRACT

Background

One of the most crucial issues in liver transplantation is the gap between the increasing number of patients waiting for a transplant and the shortage of available grafts. This limitation has led many liver transplant units to include for surgery organs defined as “marginal” or “sub-optimal” due to hepatic steatosis or sourcing from non-heart-beating donors (NHBD). In turn, the marginality of these organ donors is proportional to a high incidence of liver dysfunction after transplantation due mainly to more severe ischemia-reperfusion injury events. The use of new methods of preservation of hepatic grafts like Machine Perfusion becomes necessary, especially for its ability to reduce the damage of ischaemia-reperfusion in hypothermia.

This opens an interest towards the use of alternative methods in preserving hepatic graft as Machine Perfusion, able to reduce this type of insults and allow the dosage of biomarkers that can predict the extent of damage ischemia-reperfusion injury and the quality of functional recovery of the graft after transplantation.

The great potential of this system in the context of organ preservation and the numerous studies in the literature led us to investigate this issue.

Purpose

The aim of our work was to carry out an experimental model of Machine Perfusion (MP) for the preservation of livers procured from non heart-beating

donor, as a viable alternative to the traditional Cold storage (CS) at 4°C. A further aim of our project was to identify biomarkers that can be used as predictors of postoperative graft damage.

Material and methods

We used 10 Landrace pigs of about 20 kg to which we performed, 60 minutes after cardiac arrest, total hepatectomy, thus harvesting the liver. The animals were divided into two groups: in the first group (Group A) 5 livers was preserved for 6 hours in MP at 20° C. In the second group (Group B) 5 livers was stored for 6 hours in CS. In all study groups the period of preservation was followed by reperfusion in normothermic MP (37 °) with whole oxygenated blood previously collected from the donor animal for 2 hours to assess the response to reperfusion. During the experiment blood samples and histological specimens were collected.

Results

Graft preservation by Machin perfusion at 20°C is superior compared to the Cold Storage, both from biochemical (AST, ALT, LDH, lactate) and histological standpoint (necrosis and congestion).

The dose of AST, ALT, LDH and lactate has proven be a reliable parameter for the assessment of organ damage and functional recovery of the graft liver. The dosage of cytokines such as IL1, IL6, TNF alpha showed no significance.

Conclusion

These experimental evidences highlight the effectiveness of a preservation with continuous perfusion at 20° C on a large animal model. Both from biochemical that histological standpoint, we have observed that Machine Perfusion in moderate hypothermia is beneficial in the preservation of the graft and offers the considerable advantage of being able to test, during perfusion, biomarkers that can predict hepatic graft recovery, before transplant, in order to reduce the incidence of post-transplant graft dysfunction.

3. INTRODUZIONE

Il trapianto d'organo è diventato attualmente una realtà ben codificata e standardizzata grazie alle acquisizioni e ai miglioramenti in questo campo, sia nell'ambito della tecnica chirurgica che della terapia anti-rigetto; a conferma di tale evoluzione sono i nuovi centri attrezzati per i trapianti e i dati epidemiologici che dimostrano, in termini di sopravvivenza, l'efficacia del trapianto come reale possibilità terapeutica e non come disperato approccio al paziente.

Nella fattispecie il primo trapianto di fegato fu eseguito con successo e seguito da lunga sopravvivenza (13 mesi) nel 1967 ad opera di T.E.Starzl; oggi, anche se costituisce una realtà terapeutica universalmente accettata, essa rappresenta un ambito ancora complesso della chirurgia.

I ragguardevoli risultati attuali sono stati ottenuti nel tempo grazie al perfezionamento degli aspetti tecnici dell'atto operatorio che hanno permesso di contenere l'incidenza delle complicanze chirurgiche post trapianto, ma anche ai progressi nel campo dell'immunosoppressione, del prelievo e della conservazione dell'organo da trapiantare e nella gestione intra e peri-operatoria del paziente.

Tale progresso ha permesso di ottenere ottimi risultati non solo nell'ambito della sopravvivenza ma anche della qualità di vita dei trapiantati.

Ciò nonostante, se il trapianto costituisce un valido trattamento per tutti i pazienti che presentino una condizione clinica di grave insufficienza epatica e

con una prognosi *quoad vitam* inferiore 1-2 anni, tuttavia presenta ancora dei limiti.

Tali difficoltà sono in parte da imputare a fattori di ordine economico, medico-legale e organizzativo che però, pur nel loro spessore, stanno lentamente riducendosi; viceversa l'ostacolo più grande e per certi aspetti drammatico è ascrivibile alla scarsa disponibilità di organi da trapiantare rispetto alle reali necessità, determinando quindi una discrepanza tra risorse e bisogni.

Questo limite è stato affrontato con soluzioni tecniche messe a punto recentemente come lo "split-liver" (la divisione in-situ o ex-situ del fegato del donatore in due porzioni, secondo i criteri dell'anatomia chirurgica), ed il "living related liver transplant".

Ciò non è comunque sufficiente per un aumento significativo del numero degli organi trapiantabili che invece potrebbe esserci con l'impiego dei così detti donatori "marginali", che per motivi di età o per condizioni non ideali da un punto di vista sistemico e/o d'organo, mettano in discussione la reale idoneità del donatore. All'interno di questo gruppo una porzione consistente è costituita dagli organi di donatori a cuore non battente (che potrebbero rappresentare il 4-10% degli organi potenzialmente impiegabili per trapianto) e dagli organi con steatosi moderata-severa (13-26%) che per la loro suscettibilità alla preservazione, a causa delle basse temperature e dell'ischemia prolungata seguita da riperfusion, trovano scarso utilizzo nella consueta pratica trapiantologica. Una delle possibili soluzioni per l'impiego degli organi appartenenti a questi ultimi due gruppi potrebbe essere rappresentata dalla Machine Perfusion. Tale sistema sperimentale, che si basa sulla perfusione

continua del fegato prelevato con una soluzione ossigenata biologica o non, sembra in grado di “resuscitare” da una parte gli organi sottoposti a una fase prolungata di ischemia calda (donatori a cuore non battente) e dall’altra di ridurre il danno da conservazione del graft steatosico. Contemporaneamente essa può portare vantaggi alla tempistica del programma di trapianto, dato che a livello sperimentale è stato dimostrato che il fegato può essere preservato per un lasso di tempo maggiore rispetto alla metodica classica del Cold Storage, consentendo di avere più tempo per trasportare il graft dalla sede del prelievo alla sala del trapianto, per ottenere il miglior *match* donatore-ricevente, nonchè di dosare nel liquido di perfusione biomarcatori in grado di predire l’entità del danno d’organo e la ripresa funzionale del graft.

Sulla base di questi dati sperimentali il nostro interesse si è indirizzato verso lo studio approfondito di tale promettente sistema di preservazione servendoci dei risultati ottenuti da esperimenti condotti sul grande animale.

LA CARENZA DI DONATORI: IL CONCETTO DI MARGINALITÀ

Il gap esistente tra il numero di organi effettivamente disponibili ed il numero di pazienti in lista di attesa per trapianto di fegato ha continuato ad ampliarsi nell’ultima decade, con un conseguente aumento del tempo individuale di attesa in lista e della mortalità dei pazienti in lista di attesa prima del trapianto.

La cronica carenza di organi ha portato molti centri trapianto a perseguire diverse strategie per incrementare il pool di donatori attraverso l'introduzione del trapianto da donatore vivente, o nuove tecniche chirurgiche come lo split-liver ed infine ad utilizzare organi che si pensava fossero associati con un alto rischio di primary non function o initial poor function, un tempo definiti "marginali" o subottimali e che ora vengono definiti come extended criteria donors (ECD).

Nel corso degli anni il concetto di ECD ha subito notevoli evoluzioni e molti clinici sono concordi nella definizione di ECD per quanto riguarda organi che possono portare ad un rischio potenziale per il ricevente in termini di compromissione della funzionalità epatica o di trasmissione di patologie da parte del donatore.

Allo stato attuale la letteratura scientifica internazionale è concorde sulle seguenti caratteristiche di un extended criteria donors: età superiore a 65 anni; degenza in terapia intensiva e assistenza ventilatoria per più di sette giorni; Body Mass Index > 30; presenza di macrosteatosi alla biopsia epatica superiore al 40%; ipernatriemia (picco di Na sierico > 165 mmol/l); instabilità emodinamica: ipotensione prolungata (pressione sistolica < 60 mm Hg per più di due ore), somministrazione di dopamina > 10 µg/kg/min per più di 6 ore per mantenere la pressione sanguigna, necessità di due farmaci inotropi per sostenere la pressione sanguigna del donatore per più di 6 ore; tempo di ischemia fredda > 12ore; AST-ALT > 3 volte la norma; Bilirubinemia totale > 3 mg/dl; sierologia positiva per epatite virale di tipo B (positività per HbsAg e/o HbcAb) o epatite C (positività per Ab anti HCV), sepsi con emocolture

positive, meningite, storia di neoplasia extraepatica, precedente abuso di alcool o droghe; organi prelevati da NHBD.

- *Età del donatore*

L'età del donatore è una variabile non tecnica e non modificabile che ha un impatto significativo sulla funzionalità epatica precoce post-trapianto. L'età avanzata influenza la capacità rigenerativa e peggiora la severità della ricorrenza dell'epatite C post-trapianto.

L'età media dei donatori è costantemente in aumento nel corso degli ultimi anni. Secondo dati dell'UNOS il numero di donatori di età superiore a 65 anni è aumentato di 14 volte nel corso degli anni 2000. Nello stesso periodo dati dell'ELTR hanno riportato un incremento della percentuale di donatori > 60 anni dal 2% al 20%, con un raddoppio della mediana dell'età del donatore da 25 a 50 anni.

Non esiste un limite assoluto di età del donatore per il trapianto di fegato. Diversi studi hanno dimostrato eccellenti risultati in termini di graft survival con l'utilizzo di organi ottantenni, in assenza di ulteriori fattori di rischio.

È fortemente raccomandato non allocare donatori anziani a riceventi affetti da epatite C.

- *Steatosi epatica*

Il termine steatosi è usato per descrivere l'anomalo accumulo di trigliceridi all'interno delle cellule parenchimali epatiche (maggiore del 5%). La

degenerazione grassa si osserva spesso nel fegato perché è l'organo principalmente coinvolto nel metabolismo lipidico.

La steatosi può essere classificata in due categorie a seconda della grandezza dei vacuoli contenuti negli epatociti. 1. Steatosi macrovescicolare, la più comune nell'uomo; il vacuolo occupa la maggior parte del citoplasma della cellule e spinge il nucleo in periferia, schiacciandolo. In assenza di altre lesioni è una situazione benigna. Le cause più frequenti sono: abuso di alcool, diabete, obesità e alcune dislipidemie. 2. Steatosi microvescicolare, in cui il 90% dei vacuoli osservati sono più piccoli del nucleo degli epatociti, è associata solitamente a situazioni quali la degenerazione grassa acuta della gravidanza e la sindrome di Reye. Cause più rare sono l'intossicazione da tetracicline, acido valproico, stati di basso flusso, prolungata nutrizione parenterale totale.

Per quanto riguarda la patogenesi della steatosi, un eccessivo accumulo di trigliceridi all'interno del fegato può derivare da difetti in uno qualsiasi dei passaggi nella sequenza di eventi che vanno dall'arrivo di acidi grassi all'uscita della lipoproteina dall'epatocita.

Non ci sono stime precisissime sulla prevalenza di tale alterazione nella popolazione generale; nel donatore di fegato questa è stata valutata tra il 13-26%. Purtroppo la presenza di degenerazione grassa nel fegato prelevato si associa ad un'elevata incidenza di PNF dopo preservazione a freddo. Secondo Ploeg et Al questa raggiunge l'80% negli organi con steatosi maggiore di 60%. La steatosi moderata (tra 30-60%) dovrebbe essere considerata un fattore di rischio importante per perdita del graft e il fegato dovrebbe essere trapiantato solo se altri fattori di rischio, come tempo di conservazione prolungato e scarsa

salute del ricevente, non fossero presenti. Ciò sembrerebbe invece non valere per gli organi con steatosi di tipo microvescicolare che per quanto riguarda l'incidenza di PNF non dimostrano differenze con i fegati normali.

Bisogna dunque chiarire il perché di un comportamento tale in un organo che nel paziente affetto da steatosi non dà quasi mai segni di compromissione. La spiegazione è da ricercare in una ridotta resistenza alla preservazione fredda e all'insulto dovuto all'ischemia-riperfusione. Hayash et Al hanno dimostrato la possibilità di trapiantare fegati steatosici senza alcun problema, da donatori viventi. In questo tipo di procedura trapiantologica il tempo d'ischemia fredda viene ridotta al minimo, tanto è che l'intervento di prelievo e quello d'impianto si svolgono quasi contemporaneamente. I meccanismi fisiopatologici alla base di questa maggior sensibilità dell'organo grasso al danno ischemico non sono tuttora completamente chiari. Per meglio comprendere la mancata ripresa funzionale del fegato steatosico dopo preservazione a freddo protratta sono stati proposti una serie di meccanismi elencati qui di seguito.

1. La solidificazione dei trigliceridi durante il Cold Storage causa una rottura degli epatociti contenenti i grassi al momento della riperfusione. Ciò risulta nel rilascio di globuli di grasso nella microcircolazione con alterazione dell'architettura sinusoidale, emorragia focale e necrosi epatocellulare.

2. Nel fegato grasso si determina una correlazione inversa tra grado di steatosi e flusso sanguigno sinusoidale. Questo sembra dovuto alla compressione dei sinusoidi, operata dagli epatociti ingrossati, e porta ad una distorsione del lume vascolare, aumento delle resistenze e conduce ad una relativa ischemia degli epatociti che divengono ancora più sensibili alle situazioni di anossia.

3. L'incremento nell'attivazione delle cellule di Kupffer può essere causato probabilmente da un aumento del loro numero stesso nei fegati grassi. Queste, una volta attivate, possono produrre molti tipi di sostanze che giocano un ruolo determinante nelle alterazioni della microcircolazione e nel danno da riperfusione.

4. Gli acidi grassi liberi nei mitocondri degli epatociti causano l'inibizione del trasporto di elettroni nella catena respiratoria, riducendo dunque la produzione di ATP. Questo alterato metabolismo energetico delle cellule potrebbe essere considerato un possibile meccanismo di sensibilizzazione del fegato grasso nel determinismo del danno da ischemia riperfusione.

5. La lisi cellulare e il rilascio di acidi grassi liberi e trigliceridi attiva le fosfolipasi e la perossidazione lipidica, con conseguente produzione di radicali liberi dell'ossigeno che sono fonte di danno.

Riuscire a ridurre la sensibilità delle cellule steatosiche all'insulto da preservazione-riperfusione permetterebbe di aumentare in maniera sensibile il *pool* di organi effettivamente trapiantabili. Gli studi condotti in questa direzione sono numerosi e tra le varie proposte c'è anche quella della Machine Perfusion normotermica che, consentendo l'apporto di ossigeno e nutrienti ed evitando il danno da ischemia-riperfusione e freddo, dovrebbe riuscire a conservare il graft senza determinare nessun tipo di lesione in esso e così ridurre l'incidenza di PNF nei pazienti trapiantati con tali organi. Inoltre, il continuo controllo della funzionalità epatica, che è permesso da tale tecnica di preservazione, sarebbe di aiuto per predire la buona ripresa funzionale del fegato da impiantare. Anche l'uso di fattori di crescita per gli epatociti sembrerebbe migliorare la

preservazione del fegato grasso; lo stesso hanno fatto le prostaglandine E1 (PGE1). La causa di ciò è individuabile nelle numerose attività favorite da tale molecola come l'inibizione dell'adesione piastrinica, la vasodilatazione, l'incremento della deformabilità degli eritrociti, la stabilizzazione delle membrane lisosomiali e la stimolazione delle capacità rigenerative del fegato.

- Tempo di ischemia

I tempi di ischemia calda e fredda sono stati identificati come fattori di rischio indipendenti in grado di influenzare la mortalità post trapianto di fegato.

La sopravvivenza del ricevente è influenzata negativamente da tempi di ischemia fredda (CIT) superiori a 12 ore secondo dati dell'ELTR (European Liver Transplantation Registry), e da CIT superiore a 10 ore secondo dati dell'UNOS (United Network for Organ Sharing).

Diversi studi hanno mostrato come CIT superiori a 15 ore sono associati ad aumentato rischio di primary not function e alla riduzione della long-term survival post trapianto.

Sempre secondo dati dell'ELTR la sopravvivenza a 5 anni post trapianto si attesta a circa il 57% quando il CIT supera le 15 ore, versus il 64% con CIT compresa tra 12 e 15 ore, e il 67% con CIT al di sotto delle 12 ore.

I fegati di donatori anziani, e gli organi steatosici sono molto più sensibili a tempi prolungati di ischemia fredda ed al danno da ischemia riperfusione. Per ottenere una buona funzionalità epatica da questo pool di organi, si deve fare in modo di mantenere un CIT inferiore ad 8 ore.

Questi risultati enfatizzano la necessità di abbreviare il più possibile il CIT nei casi di extended criteria donors.

Negli ultimi 10 anni, nei diversi centri trapianto Europei il CIT si è ridotto in media da 570 a 470 minuti, un trend simile è stato osservato negli Stati Uniti. Pertanto c'è una crescente evidenza che, indipendentemente da altri fattori di rischio, ridurre il tempo di ischemia fredda si traduce in un migliore outcome post-trapianto.

- Epatite B

Diversi studi hanno evidenziato che una percentuale variabile dal 2 al 15% dei donatori di fegato, presentino una positività per gli Ab anti Hbc. La percentuale di positività anti-Hbc in donatori di età superiore a 60 anni può raggiungere il 25%.

Il tasso di trasmissione di infezione di HBV in riceventi HBV negativi attraverso questa via, in assenza di un'adeguata profilassi, varia dal 17 al 94%.

La somministrazione di immunoglobuline umane (HbIg), associata o meno a lamivudina, è attualmente utilizzata per prevenire sia la recidiva di infezione da HBV nel ricevente con epatite B che la trasmissione dell'infezione dal donatore al ricevente in caso di donatore anti Hbc positivo.

I tassi di sopravvivenza del paziente e del graft a 5 anni in riceventi di organi anti Hbc positivi che ricevono la doppia profilassi con HbIg e lamivudina sono significativamente più alti di quelli di pazienti che ricevono una singola profilassi o che non vengono trattati.

I fegati di donatori anti Hbc positivi devono essere assegnati selettivamente dapprima a riceventi HbsAg positivi, in quanto questi comunque richiedono un trattamento profilattico con HbIg a vita. In seconda istanza questi organi potrebbero essere assegnati a pazienti anti Hbs positivi, in quanto sembra che non richiedano un trattamento con HbIg. A tal proposito non è ancora chiaro se trattare o no con HbIg pazienti anti Hbs negativi, anti Hbc positivi.

I pazienti HBV negativi dovrebbero ricevere questi organi solo in caso di gravi condizioni cliniche. La terapia a vita con HbIg è mandatoria in questi casi.

A causa dei costi elevati della terapia immunoprofilattica, diverse sono le raccomandazioni per l'utilizzo di questi donatori in modo da ottimizzare il rapporto costo-beneficio. In questa ottica l'esecuzione della sola sierologia si è rivelato uno strumento insufficiente per guidare la terapia e in questi casi la determinazione del titolo dell'HBV DNA nel donatore è mandatoria per consentire un utilizzo più sicuro ed efficace degli organi anti-Hbc positivi.

La profilassi-terapia combinata con HbIg e lamivudina è raccomandata quando almeno il donatore o il ricevente sono HBV DNA positivi. La terapia con sola lamivudina è consigliata quando sia il donatore che il ricevente sono HBV DNA negativi. Se il ricevente è HBsAg negativo ma anti-Hbs positivo, la profilassi non è necessaria. Quando non sia disponibile il titolo HBV DNA, la lamivudina si somministra quando il ricevente è HBsAg e anti-Hbs negativo.

- Neoplasie

L'incidenza di neoplasie nei donatori è approssimativamente pari al 3%, mentre il rischio di trasmissione di neoplasie attraverso il trapianto di un organo solido

è circa lo 0,03%. Si può assumere ragionevolmente che il rischio di insorgenza di neoplasie aumenta con l'età, il che significa che trapiantare organi di donatori anziani può incrementare il rischio di trasmissione di neoplasie stesse. Indipendentemente dal tipo di organo trapiantato, le neoplasie più frequentemente trasmesse sono quelle del sistema nervoso centrale, il melanoma, il carcinoma renale ed il cancro del polmone.

Il rischio di trasmissione aumenta in caso di neoplasia metastatica nel donatore. Il grading di differenziazione della neoplasia rappresenta un ulteriore fattore di rischio, in quanto le forme poco differenziate si associano ad un rischio più elevato di trasmissione nel ricevente.

I donatori con una storia, documentata istologicamente, di neoplasia non vengono scartati necessariamente. Donatori con neoplasie a basso grado di malignità trattate anche anni prima (come ad esempio neoplasie cutanee, escluso il melanoma) o donatori con neoplasie a basso grado di malignità del sistema nervoso centrale, specialmente quelle a basso rischio di trasmissione del ricevente possono essere considerati. A tal proposito le linee guida variano molto nei diversi Paesi. Tuttavia la presenza di una neoplasia metastatica rappresenta una controindicazione assoluta alla donazione di organi.

I pazienti che ricevono un trapianto di fegato da un donatore con neoplasia, devono essere trattati con protocolli immunosoppressivi adeguati e personalizzati, in quanto un regime immunosoppressivo elevato riducendo la sorveglianza del sistema immunitario potrebbe accelerare la crescita tumorale.

- Split-liver

Dati su popolazioni occidentali indicano che il trapianto di fegato secondo la tecnica dello split-liver è associato con un rischio aumentato di circa il 10% in termini di graft survival e morbidità del ricevente. I risultati sono migliori nei pazienti pediatrici. Anche quando i graft di split-liver sono procurati da donatori giovani con una buona qualità del parenchima e con tempi di ischemia fredda brevi, tali organi devono essere considerati come quelli di extended criteria donors per le seguenti ragioni:

1. il volume del graft è generalmente inferiore al volume standard del fegato del ricevente e può essere insufficiente a soddisfare il fabbisogno metabolico durante le prime fasi del decorso post-operatorio;
2. sono necessari requisiti tecnici maggiori, tra l'altro il posizionamento non ottimale dell'emifegato può influire negativamente sullo scarico venoso dell'organo.

Come conseguenza complicanze quali leak biliari, trombosi acuta dell'arteria epatica, e la poor initial function sono più frequenti rispetto a quelle dopo trapianto con graft intero.

Il trapianto con tecnica split-liver per due adulti è attualmente eseguito in centri selezionati con risultati migliori per il graft destro rispetto al sinistro. Il trapianto di un adulto con uno split sinistro rappresenta una procedura tecnicamente impegnativa che richiede spesso l'esecuzione di complesse anastomosi biliari e vascolari, con un rischio elevato di PNF legato ad un volume parenchimale insufficiente.

Anche quando è stato selezionato un donatore ottimale, lo split liver è ostacolato da vincoli logistici che richiedono CIT brevi e limitazioni del ricevente.

Nonostante i notevoli progressi raggiunti nella tecnica chirurgica, il graft sinistro non può essere ampiamente utilizzato per riceventi adulti, ma è più adatto per riceventi pediatrici in cui il trapianto con split-liver è associato a risultati eccellenti. In riceventi adulti, l'utilizzo dell'emifegato destro aumenta leggermente il rischio di mancata ripresa funzionale dell'organo. Questo non dovrebbe disincentivare l'utilizzo dello split-liver come soluzione tecnica per espandere il pool di donatori, in particolare per riceventi pediatrici.

Dati recenti non hanno evidenziato differenze statisticamente significative fra la tecnica chirurgica in situ e quella ex vivo in centri esperti.

- *Living donor liver transplant (LDLT)*

Nell'ultima decade il trapianto di fegato da donatore vivente (LDLT) è diventato una modalità di trattamento ampiamente accettata.

L'esperienza più ampia è stata raggiunta inizialmente in Asia; in paesi come il Giappone, dove la disponibilità di organi da donatore cadavere è estremamente limitata, il LDLT sembra essere l'unica soluzione per il trattamento delle epatopatie croniche in fase terminale.

Secondo dati della *Japanese Liver Transplantation Society* il numero di casi di trapianto da donatore vivente per pazienti adulti è in costante aumento, mentre per quanto riguarda il trapianto pediatrico il numero di casi eseguiti ha raggiunto il picco di 100 unità per anno.

I tassi di sopravvivenza a 1 e 5 anni su tutti i pazienti sono pari all'81,8% e al 77% rispettivamente, mentre quelli dei soli pazienti pediatrici si attestano all'85,6% e all'82,6% rispettivamente.

La prognosi dei pazienti adulti è peggiore rispetto a quella dei pazienti pediatrici; si pensa che ciò sia dovuto al fatto che la recidiva della malattia di base, come l'epatite C o l'HCC, abbia un impatto significativamente negativo sulla sopravvivenza dei pazienti adulti.

I maggiori vantaggi del LDLT sono la buona qualità dell'organo, prelevato tra l'altro da un paziente sano, l'attenta selezione del timing del trapianto, il miglior potenziale match tissutale.

Gli svantaggi sono rappresentati dal rischio per la salute e le inevitabili ripercussioni psicologiche del donatore. Le procedure chirurgiche per il LDLT sono tecnicamente più impegnative ed è necessaria la piena conoscenza dell'anatomia epatobiliare.

In letteratura sono riportate ampie serie di tassi di complicanze nel donatore, che oscillano, a secondo delle diverse casistiche, tra il 9% e il 67%.

Uno dei problemi maggiori nel LDLT è rappresentato dal volume minimo di graft necessario. A tal scopo sono stati elaborati due metodi per esprimere il volume ideale del graft da trapiantare: il primo è dato dal rapporto tra il volume del graft (GV) e il volume epatico standard (SLV) del ricevente, calcolato in base all'altezza e al peso corporeo del ricevente; il secondo metodo è dato dal rapporto tra il peso del graft ed il peso del ricevente (GRWR: graft to recipient weight ratio). I limiti di sicurezza per prevenire *la small for size syndrome* sono

per il primo metodo pari al 30%-40% del rapporto GV/SLV, mentre per il GRWR sono pari a 0,6-0,8.

Per questi motivi i graft da LDLT dovrebbero essere considerati come quelli di extended criteria donors, nonostante il donatore vivente sia quello ideale, con la possibilità di complicanze maggiori e un aumentato rischio di graft failure specialmente quando l'equipe trapiantologica non ha molta esperienza tecnica.

Per mantenere questa modalità di trattamento anche in futuro sono necessari ulteriori studi in grado di stabilire il rapporto rischio-beneficio e la morbilità a lungo termine sul donatore.

NON HEART BEATING DONORS (NHBD)

Il trapianto di fegato è il trattamento di scelta per molti pazienti affetti da malattie epatiche acute e croniche, tuttavia la carenza di organi che rispondano adeguatamente alle caratteristiche indispensabili per un loro utilizzo ne limita fortemente l'applicazione. La conseguenza più immediata di tale problematica sono le assai lunghe liste d'attesa per coloro che, a causa di differenti disfunzioni epatiche, si trovano nella necessità di un nuovo fegato. Il trapianto di fegato da donatore a cuore non battente (NHBD), cioè in seguito all'arresto cardiaco del donatore, rappresenta una via promettente per incrementare il pool di donatori effettivamente disponibili per trapianto.

Il maggior problema di tali organi è rappresentato dall'ischemia calda che causa in essi una rapida deplezione di ATP e li sensibilizza moltissimo al successivo insulto da preservazione: quello da ischemia fredda-riperfusion. Nel pattern istopatologico determinato da ischemia fredda e calda si riscontrano comunque delle differenze, infatti mentre la prima causa prevalentemente danni alle cellule dei sinusoidi epatici, la seconda provoca lesioni a carico degli epatociti.

Un tempo di ischemia calda prolungato può predisporre, tra l'altro, questi organi all'insorgenza di una diffusa colangiopatia di tipo ischemico in grado di determinare stenosi della via biliare nell'immediato periodo post-trapianto.

Gli organi dei NHBD hanno però il beneficio di non essere esposti all'effetto citochino-mediato della morte cerebrale che causa infatti una *up-regulation* dei markers infiammatori pre e post trapianto, come dimostrato sia nell'animale

che nell'uomo. Studi su roditori hanno evidenziato come l'induzione di morte cerebrale provochi un'infiltrazione di linfociti e macrofagi nel fegato, che sembra determinata da un'aumentata espressione di molecole di adesione indotta da citochine. In seguito al trapianto del fegato di tali animali si è riscontrata una minore sopravvivenza rispetto al trapianto da donatore vivente, in entrambi i casi dopo una preservazione dell'organo per un periodo di 20 ore. Nonostante un elevato rischio per la sopravvivenza del graft e del paziente, gli organi di NHBD sono sempre più utilizzati con risultati accettabili. Sull'analisi di dati dell'UNOS, basati su 144 NHBD e 16856 donatori a cuore battente Abt ed al hanno evidenziato come la sopravvivenza del graft a 1 anno (70,2% vs 80,4%) e a 3 anni (63,3% vs 72,1%) sia inferiore per i fegati dei NHBD. Il rischio di PNF si è dimostrato significativamente più alto (11,8% vs 6,4%) nel gruppo NHBD.

È possibile ottenere buoni risultati con percentuali di incidenza di PNF inferiori al 15% e con una bassa incidenza di complicanze biliari adottando misure adeguate quali: età del donatore al di sotto di 40 anni, assenza di steatosi, specifiche tecniche di resuscitazione dell'organo, mediante eparinizzazione sistemica del donatore, l'utilizzo di by-pass cardio-polmonari in grado di ossigenare l'organo durante la fase di ischemia calda. Sarebbe desiderabile mantenere il tempo di ischemia calda al di sotto di 15 min ed il tempo di ischemia fredda al di sotto delle 10 ore.

Sebbene la procedura per il prelievo di organi da NHBD sia eseguita in pochi centri selezionati, e secondo specifici protocolli, i NHBD sono potenzialmente

in grado di aumentare il pool di donatori per trapianto di fegato dal 10% al 20%.

- Le categorie di NHBD

Nel primo Workshop internazionale di Maastricht (1994) sono state definite quattro categorie di NHBD (Categorie di Maastricht). A queste è stata aggiunta nel 2000 una quinta categoria proposta da un gruppo di studio spagnolo di Madrid.

I - Deceduti all'arrivo in ospedale

Questa categoria comprende le vittime di incidenti o i morti per suicidio (alcuni centri escludono questa categoria di donatori), che sono trovati morti sulla scena d'intervento e la cui rianimazione è giudicata inutile. Il problema con questi donatori è la determinazione del tempo di ischemia calda in relazione alla precisa datazione del decesso, e l'impossibilità di contattare i familiari in tempo utile.

II - Pazienti rianimati senza successo

Costituiscono la maggior parte del pool di donatori NHBD in Europa, e sono per lo più vittime di morte cardiaca improvvisa o di traumi cerebrali imponenti, giunti al reparto di Pronto Soccorso già sottoposti a RCP-ACLS durante il trasporto. In questi casi è più agevole la constatazione del decesso perché il personale sanitario può fornire indicazioni sul momento dell'arresto cardiaco. Data l'eterogeneità del gruppo, i tempi di ischemia calda sono molto variabili da caso a caso. Un altro sotto-gruppo include pazienti con trauma cranico, anossia o ictus e vittime di incidenti che muoiono poco tempo dopo il ricovero.

III - Arresto cardiaco atteso

Questo gruppo comprende pazienti in fin di vita, soprattutto nei reparti di terapia intensiva. Costituiscono la maggior parte dei donatori negli USA, per i quali si aspetta l'arresto cardiaco dopo la sospensione delle terapie invasive o rianimatorie non volute dal paziente stesso o dai suoi familiari. In Italia non è previsto.

IV - Arresto cardiaco in donatore in corso di accertamento di morte cerebrale.

Sono donatori (in cui già è stato ottenuto il consenso) che hanno avuto un arresto cardiaco durante o subito dopo il periodo di accertamento della morte encefalica. Sono i donatori più diffusi in Giappone, mentre in Europa costituiscono solo casi sporadici.

V - Arresto cardiaco o insufficienza cardiaca non attesa in corso di Terapia Intensiva.

Sono pazienti ricoverati in Terapia Intensiva che vanno incontro, in modo inatteso, a insufficienza cardiaca acuta e ad arresto cardiaco irreversibile. Questa categoria di donatori è stata proposta dal Gruppo di Studio dell'Hospital Clinico San Carlos di Madrid. La differenza rispetto alla categoria III di Maastricht sta nell'insorgenza non attesa dell'arresto cardiaco e rispetto alla categoria II sta nel verificarsi dell'evento ACC nella non immediatezza del ricovero.

- NHBD controllati e non controllati

Nell'ambito delle 4 categorie di Maastricht e della V di Madrid si possono ulteriormente identificare due gruppi di donatori:

1. NHBD non controllati (I, II, V)
2. NHBD controllati (III e IV)

- NHBD non controllati (uncontrolled NHBD o UNHBD)

Per donatori non controllati si intendono i soggetti nei quali la morte cardiaca avviene in modo improvviso, solitamente al di fuori dell'ospedale o in Pronto Soccorso.

A questa categoria appartengono:

- a. i pazienti giunti in PS già in ACC (in corso di ACLS - categoria II di Maastricht – o “giunti cadavere” – categoria I di Maastricht-),
- b. i pazienti che subiscono un ACC improvviso e non prevedibile durante la degenza o comunque all’interno di una struttura di cura (categoria II di Maastricht e V di Madrid)
- c. gli HBD che vanno in ACC irreversibile durante l’accertamento della morte con criteri neurologici (categoria IV di Maastricht).

Per i pazienti dei gruppi a e b la volontà rispetto alla eventuale donazione può non essere nota e si rende necessaria l’attesa (talvolta lunga) dell’accertamento di un’eventuale volontà precedentemente manifestata dal soggetto o, in subordine, della non opposizione dei parenti e familiari prossimi o del rappresentante legale (ex art. 23 L. 91/1999). Per il terzo tipo di pazienti (c) la volontà di donazione può essere già stata manifestata. In molti di questi casi, poi, il team di prelievo non è allertato in precedenza e già disponibile. Pertanto, in questi pazienti i tempi di ischemia sono inevitabilmente più lunghi rispetto al gruppo dei donatori controllati.

- *NHBD controllati (controlled NHBD o CNHBD)*

Classicamente si intendono i pazienti terminali che non posseggono ancora i criteri della morte encefalica e che abbiano manifestato la volontà, nei modi consentiti dalle leggi del proprio stato o attraverso un rappresentante legale, o attraverso direttive anticipate di trattamento o altre inequivoche modalità), di sospendere i sostegni vitali (categoria III di Maastricht). Tale fattispecie non è contemplata dalla normativa italiana che non prevede la possibilità di sospendere i sostegni vitali a un paziente la cui sopravvivenza è legata a interventi e presidi medicali, seppure affetto da una patologia terminale.

Tra i NHBD controllati si possono comprendere i pazienti ricoverati in un reparto di Rianimazione (inquadabili come NHBDp) di cui – nel corso della degenza - siano state accertate (a fini terapeutici) caratteristiche cliniche compatibili con l'eventuale donazione di organi a scopo di trapianto. In questi casi l'evenienza di un arresto di cuore è prevedibile (sebbene non programmabile) e la manifestazione di non opposizione al prelievo (ex art. 23 L. 91/1999) consente di considerare questi soggetti come NHBD controllati.

- Definizioni di NHBD e di NHBDp

Si definisce “donatore NHB (NHBD)” un soggetto per il quale sia stata accertata la morte per ACC irreversibile e che risulti idoneo alla donazione di organi e tessuti e di cui risulti - dai suoi documenti personali o da sue dichiarazioni presso il SIT o la A.S.L.di appartenenza - la volontà favorevole alla donazione oppure sia stata verificata la non opposizione dei parenti e familiari prossimi o del rappresentante legale (ex art. 23 L. 91/1999); o - nel caso di minori - la volontà sia stata manifestata in modo concorde dai genitori esercenti la potestà. L'accertamento della morte deve essere effettuato mediante il rilievo continuo dell'elettrocardiogramma protratto per non meno di 20 minuti primi, registrato su supporto cartaceo o digitale, ai sensi del D.M. 11 aprile 2008 che aggiorna il D.M. 22 Agosto 1994, n. 582.

Si definisce “potenziale donatore NHB (NHBDp)” un soggetto di cui il medico curante constata o prevede la morte (improvvisa o repentina) per cause cardiache, indipendentemente dalla patologia di base, e su cui siano state iniziate manovre di rianimazione (di base o avanzata) praticate secondo le linee guida accettate e condivise dal Sistema Sanitario cui il medico stesso appartiene. Condizione operativamente

necessaria per definire un soggetto NHBDp è la disponibilità di informazioni sulla sua identità e la consapevolezza di poter contattare i suoi parenti e familiari prossimi (o il rappresentante legale) in tempi brevi.

Nella stessa definizione rientra ogni NHBD nel periodo di tempo che eventualmente intercorre dopo l'accertamento della morte fino all'accertamento di un'eventuale volontà del soggetto o, in subordine, fino alla non opposizione e, quindi, fino alla verifica dell'idoneità clinica alla donazione.

La categoria NHBDp è indispensabile ai fini organizzativi interni alla struttura sanitaria per quanto di seguito espresso. La sua formulazione è clinicamente utile e comunque non contraria ad alcuna prescrizione né giuridica né etica.

Il NHBDp non è ovviamente un soggetto in cui è possibile prelevare gli organi. Tuttavia è un soggetto in cui si può e si deve prevedere la possibilità di evoluzione verso la categoria di NHBD. Non è quindi necessario, per la definizione di NHBDp, l'accertamento della morte; è infatti indispensabile l'identificazione precoce del NHBDp (prima ancora dell'accertamento di legge e addirittura ancora prima della diagnosi clinica).

La preservazione degli organi stessi infatti va iniziata molto precocemente mettendo in atto (fin dal momento in cui si identifica la possibilità di evoluzione da NHBDp a NHBD), tutte le azioni organizzative e tecniche idonee a tale scopo, comunque rispettando pienamente sia il fondamento consensuale che deve avere ogni attività che incide sul corpo umano, sia (se applicabile) lo statuto di persona vivente e le sue specifiche esigenze terapeutiche, sia la dignità del cadavere e la correlativa pietà verso i defunti. In assenza di tali azioni preventive, messe in atto nell'attesa (talvolta lunga) dell'accertamento di un'eventuale volontà del soggetto o, in subordine, della non

opposizione dei parenti e familiari prossimi o del rappresentante legale (ex art. 23 L. 91/1999), potrebbe essere frustrata la volontà di donazione (o il valore della non opposizione). In particolare, sarebbe contrario alle finalità della legge e al rispetto dovuto alla volontà del soggetto donatore accertare la sua volontà donativa e riconoscere l'impossibilità di darne attuazione per motivi tecnici di ritardo nell'esecuzione di alcune manovre preliminari.

- Strategie per la preservazione dei graft di NHBD

Molte sono le strategie proposte per evitare il danno da ischemia calda di fegati provenienti da donatori a cuore non battente sia durante il prelievo dell'organo sia durante la preservazione e la ri-perfusione. Un gruppo eterogeneo è quello dei sistemi di conservazione dell'organo tramite perfusione. Tra queste troviamo:

- La ricircolazione normotermica che consiste nel perfondere il donatore, non appena avvenuto l'arresto cardiaco, con sangue ossigenato a temperatura corporea attraverso un by-pass cardio-polmonare. In tal modo si determina una sintesi di ATP e recupero delle scorte energetiche nei tessuti. Dopo un certo periodo di ricircolazione, il donatore è raffreddato utilizzando sempre il by-pass cardio polmonare; l'organo quindi viene espantato e conservato in soluzione fredda. Si è stimato che la PNF con l'utilizzo di tale tecnica è del 28%.
- Preservazione in normotermia con Machine Perfusion che, attraverso la perfusione dell'organo espantato con sangue ossigenato a temperatura corporea, è in grado di "resuscitare" il fegato in donatori a cuore non

battente. Ulteriore vantaggio di tale tecnica è la possibilità di seguire durante tutto il periodo di conservazione la funzionalità del graft utilizzando alcuni parametri come la produzione della bile e il livello di enzimi epatici. Ciò ci può essere di aiuto nel capire se il fegato nel corso della perfusione si è ripreso e se si può effettivamente trapiantare senza rischi.

- Perfusione a freddo. Tale metodo di conservazione dell'organo si è dimostrato in grado di incrementare la sopravvivenza in ratti a seguito di trapianto con fegato da NHBD. Purtroppo nessuno studio mette a confronto direttamente la Machine Perfusion Ipotermica con quella Normotermica nel campo della preservazione di fegati di NHBD.
- La persufflazione di ossigeno umidificato e filtrato attraverso la vena cava costituisce un'altra tecnica per aumentare l'uso dei NHBD e ciò è permesso dal fatto che tale insufflazione pervenosa di ossigeno facilita la sintesi di ATP, prevenendo così il deterioramento del fegato durante la preservazione.

Tra le nuove strategie per la preservazione e trapianto di organi da donatori a cuore non battente citiamo, inoltre, quelle dette citoprotettive, che hanno il vantaggio di essere semplici nella loro applicazione in campo clinico consistendo nella somministrazione di farmaci, quali fentolamina, prima dell'arresto cardiaco e durante la preservazione.

IL DANNO DA ISCHEMIA-RIPERFUSIONE

Il danno epatico da ischemia-riperfusionazione rappresenta un *continuum* di processi che culminano con la morte epatocellulare. Questi processi vengono attivati nel momento in cui il fegato si trova a essere transitoriamente deprivato di ossigeno e quindi riossigenato, ed avviene in una serie di situazioni cliniche caratterizzate da basso flusso, come procedure chirurgiche quali il trapianto epatico. Proprio in questo settore della chirurgia l'insulto da ischemia-riperfusionazione rappresenta un grosso problema per il successo di tale intervento. Tale danno causa infatti più del 10% di insuccessi nella pratica trapiantologica dovuti alla mancata ripresa di funzionalità del graft. Ad essa si può attribuire inoltre la ridotta disponibilità di organi per il fatto che i così detti fegati marginali sono molto suscettibili a questo tipo di danno. Minimizzando dunque gli effetti avversi dell'insulto da ischemia-riperfusionazione si riuscirebbe sia ad avere un aumento nella sopravvivenza del paziente trapiantato sia un aumento del numero di organi suscettibili di trapianto.

Meccanismi cellulari di danno epatico da ischemia-riperfusionazione

- Cellule non parenchimali

Le cellule endoteliali sembrano in assoluto le meno resistenti tra le cellule non parenchimali al danno da ischemia-riperfusionazione. Già in corso di ischemia esse subiscono alterazioni strutturali e tendono a assumere una forma globosa con

retrazione del citoplasma. Se questo periodo non è comunque troppo protratto, le cellule tendono a recuperare la loro forma originaria, se invece l'ischemia è molto prolungata le modificazioni divengono irreversibili e si perde l'integrità endoteliale.

Nella fase di riperfusione esse vanno incontro ad un'ulteriore danno morfologico, perdita della loro funzionalità e molto spesso a necrosi. Sebbene la Primary Non Function (PNF) sia essenzialmente attribuita al danno epatocellulare ed istologicamente caratterizzata dalla necrosi epatocitaria, il primo evento è comunque rappresentato dall'instaurarsi di lesioni a carico della superficie endoteliale dei sinusoidi.

I mediatori rilasciati localmente dalle cellule infiammatorie possono produrre numerosi effetti a carico dell'endotelio e della microcircolazione: vasocostrizione (PAF, leucotrieni), effetti citotossici (radicali liberi dell'ossigeno, enzimi proteolitici, TNF- α), avvio di processi di coagulazione (PDGF, PAF), chemiotassi per linfociti, mononucleati e PMN (leucotrieni, trombossano). La morte e lo sfaldamento delle cellule endoteliali può produrre numerose conseguenze quali rilascio di tromboplastina tissutale e attivazione della coagulazione, richiamo di altre cellule infiammatorie, ridotta attività protettiva mediata dal rilascio di prostaglandine e dall'endocitosi.

Le lesioni delle cellule endoteliali sinusoidali pertanto sembrano costituire il primo di una serie di fenomeni che coinvolgono il microcircolo epatico e che culminano nella morte degli epatociti.

Un'altra cellula non parenchimale coinvolta nell'insulto da ischemia-riperfusione è la cellula di Kupffer. Come dimostrato da più autori la

riperfusion del graft, sottoposto a precedente ischemia, determina l'attivazione di tali cellule. Questo fenomeno è ben documentato morfologicamente dall'irregolarità della superficie cellulare associata a degranolazione, funzionalmente invece dall'aumento della fagocitosi e dal rilascio di enzimi idrolitici e radicali dell'ossigeno. L'attivazione delle cellule di Kupffer determina il rilascio di numerosi mediatori dell'infiammazione quali radicali dell'ossigeno, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleuchina 1 (IL-1), interleuchina 6 (IL-6), prostaglandine e ossido nitrico (NO). Questi mediatori aggravano lo stato di sofferenza dell'organo attraverso l'attivazione di un processo flogistico locale che in alcuni casi può essere tanto rilevante da promuovere l'evoluzione verso una sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS). Quest'attivazione flogistica, indotta dalle cellule di Kupffer, si caratterizza elettivamente attraverso alterazioni che includono l'adesione di leucociti e piastrine con conseguente formazione di microtrombi e danno severo delle strutture causando marcate alterazioni a carico del microcircolo. Il risultato è dunque una riduzione del flusso ematico e progressione dei processi ischemici che in corso di trapianto epatico possono aumentare le possibilità di insuccesso.

Secondo alcuni autori l'aggiunta di farmaci bloccanti il canale del calcio alla soluzione di preservazione riduce l'attivazione delle cellule di Kupffer e migliora la sopravvivenza dopo trapianto di fegato nel ratto. Quest'osservazione ha portato al riconoscimento in tali cellule di canali del calcio L-type che durante la fase di ischemia o di riperfusione favorirebbero

l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio ioni responsabili dell'attivazione cellulare.

Alla pari di altri macrofagi, le cellule di Kupffer come detto sintetizzano una notevole varietà di citochine tra le quali il TNF- α , che media le risposte sistemiche all'endotossina e alla sepsi. Il TNF- α è un importante mediatore anche nell'infiltrazione dei leucociti polmonari e nel danno da ischemia-riperfusion. L'impiego di anticorpi anti-TNF- α riduce il danno polmonare in modelli di ischemia calda e fredda nel ratto. Le endotossine stimolano la produzione di TNF- α da parte delle cellule di Kupffer. A tal proposito sono stati osservati una serie di agenti (nisoldipina, adenosina, pentossifillina, prostaglandina E1, ecc.) in grado di sopprimere la formazione di TNF- α LPS-mediata da parte delle cellule di Kupffer che migliorano la sopravvivenza del graft dopo il danno da ischemia-riperfusion conseguente al trapianto di fegato nel ratto. La soppressione del rilascio di TNF- α e possibilmente di altre citochine prodotte dalle cellule di Kupffer può spiegare l'efficacia degli effetti terapeutici delle prostaglandine E1 in pazienti sottoposti a trapianto di fegato. A conferma dell'importanza del ruolo svolto dalle cellule di Kupffer nella fisiopatologia nel danno da ischemia-riperfusion, alcuni autori hanno dimostrato il significativo aumento della produzione di superossido da parte di queste cellule se sottoposte ad anossia. E' ormai dimostrato inoltre che l'inattivazione delle cellule di Kupffer mediata da differenti agenti quali il Gadolinio, il Metil palmitato e la Glicina, può proteggere dal danno da ischemia-riperfusion in corso di trapianto epatico.

- Cellule parenchimali

Gli epatociti sono normalmente molto sensibili al danno ischemico, prevalentemente a causa della sua componente anossica, mentre le cellule non parenchimali sembrano dotate di una maggior resistenza.

Nel danno cellulare anossico le modificazioni più precoci si verificano nei mitocondri. La diminuzione di ossigeno, come accettore terminale di elettroni nella catena respiratoria, comporta il blocco della fosforilazione ossidativa e la conseguente rapida diminuzione di ATP intracellulare. La deplezione di questo nucleotide determina un'alterazione delle pompe ioniche di membrana ATP-dipendenti che favoriscono l'entrata di calcio, sodio e acqua all'interno della cellula determinando rigonfiamento cellulare. Il rapido incremento volumetrico della cellula può portare alla sua morte.

Negli epatociti oltre al rigonfiamento cellulare si osservano delle alterazioni strutturali di membrane con formazione di vescicole (*blebs*). Queste estroflessioni prendono origine dalla superficie sottosinusoidale della membrana dell'epatocita e, facendosi strada tra le fenestrazioni delle cellule endoteliali protrudono entro i sinusoidi, inducendo un danno a carico della microcircolazione con conseguente aumento delle resistenze vascolari.

L'osservazione che tali fenomeni regrediscono totalmente e rapidamente al momento della riperfusione ha portato a concludere che le alterazioni epatocitarie che si osservano nella fase ischemica non svolgono un ruolo determinante nella fisiopatologia del danno da ischemia-riperfusione, ma

costituiscono il risultato di un adattamento fisiologico e momentaneo alla situazione di anossia.

In aggiunta al rischio principale delle cellule epatiche di andare incontro al danno da ischemia, esistono altri fattori correlati allo stato del donatore che possono modulare la suscettibilità delle cellule al danno ischemico. Uno di questi fattori è rappresentato dallo stato nutrizionale del fegato del donatore. La preservazione dell'organo induce una deplezione delle scorte epatiche di glicogeno. Diversi studi condotti sia su animali da esperimento che sull'uomo convalidano l'ipotesi che la disponibilità di substrati glicolitici è importante ai fini del mantenimento dei livelli epatici di ATP durante l'ischemia e di una ripresa funzionale durante la riperfusione. L'effetto dell'ipossia può essere dunque attenuato dalla presenza di adeguati depositi di glicogeno.

Da più autori è stato invece riportato che il digiuno può migliorare la funzionalità dell'organo. Il digiuno infatti riduce la fagocitosi e la produzione di TNF- α . Entrambi questi fattori pregiudicano la funzionalità delle cellule di Kupffer ritenute, come si vedrà in seguito, le principali responsabili del danno da ischemia-riperfusione tanto che l'inattivazione metabolica di queste cellule può essere di beneficio per la buona ripresa funzionale del graft. In realtà l'effetto protettivo determinato dal digiuno è valido solo per brevi periodi di ischemia.

Nel corso della riperfusione si genera un quadro flogistico a livello dei tessuti precedentemente sottoposti a ischemia e questo provoca un ulteriore danno agli epatociti che determina spesso la necrosi di questi. Causa dell'insulto sono i radicali liberi dell'ossigeno prodotti sia dai neutrofili attivati, che vengono

richiamati nel letto vascolare sinusoidale, sia dalle cellule di Kupffer attivate. Anche le proteasi come l'elastina e la catepsina G, rilasciate dai polimorfonucleati sono fondamentali nella patogenesi dell'insulto alle cellule epatocitarie. Contribuiscono inoltre al danno da riperfusione il reclutamento di macrofagi, l'accumulo di linfociti T, l'aggregazione piastrinica, l'alterazione della microcircolazione nel tessuto. Tutti questi elementi, causa di danno epatocitario e spesso della morte di tali cellule, sono in parte stati trattati nel paragrafo precedente e in parte verranno presi in dettaglio di seguito.

- Cellule T e Polimorfonucleati

Ci sono molte evidenze riguardo l'importanza delle cellule T nel danno da ischemia-riperfusione. Si è infatti constatato che queste cellule sono coinvolte sia nel danno a breve termine che nel danno a lungo termine in corso di insulto da ischemia-riperfusione. Ciò è dimostrato ad esempio dal fatto che l'immunosoppressione sistemica (FK506, ciclosporina) riduce questo danno. L'aderenza dei linfociti nei sinusoidi epatici avviene già nelle fasi precoci della riperfusione e altera la funzione del fegato in corso di prolungati periodi di ischemia fredda. Le cellule T CD4+ potrebbero agire come mediatori cellulari nel richiamo di PMN nel danno da ischemia riperfusione. Inoltre l'effetto protettivo dell' IL-10 sembra legato non solo all'inibizione del rilascio di citochine da parte delle cellule di Kupffer ma anche dall'inibizione delle cellule T. Uno dei punti ancora da discutere sarebbe come le cellule T riescano ad essere attivate in un processo che di per sé non è antigene mediato.

I polimorfonucleati costituiscono un'altra cellula circolante fondamentale nella genesi del danno da ischemia-riperfusion. Il meccanismo che coinvolge queste cellule nell'insulto al parenchima epatico è caratterizzato da tre fasi distinte. La prima è costituita dall'accumulo dei neutrofilo nella microcircolazione epatica. Perché si determini ciò è necessaria l'espressione di molecole di adesione sui PMN ($\beta 2$ integrine), sulle cellule endoteliali (ICAM-1) e sugli epatociti (ICAM-1) stimolata dai numerosi mediatori dell'infiammazione prodotti in corso di riperfusion quali TNF- α , IL-1, fattori del complemento, PAF.... L'aumentata espressione della $\beta 2$ integrina Mac-1 (CD11b/CD18) sulla superficie dei neutrofilo circolanti è evidenziabile già dopo un'ora di riperfusion. L'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro la $\beta 2$ integrina Mac-1 (CD11b/CD18) deprime l'azione dei neutrofilo proteggendo dal danno da riperfusion. L'ICAM-1, espresso sulle cellule endoteliali e sugli epatociti, rappresenta il *contro-recettore* per le $\beta 2$ integrine e svolge un ruolo fondamentale per la migrazione transendoteliale e l'aderenza dei neutrofilo agli epatociti. Anche l'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro l'ICAM-1 ha dimostrato di possedere effetti protettivi nei confronti del danno da riperfusion. Altri studi hanno provato che l'uso di anticorpi ricombinanti PSGL, che mediano il blocco precoce delle P-selectine (CD62), le quali sono complici del meccanismo di interazione tra i neutrofilo e le cellule dell'endotelio, riescono a ridurre il danno da ischemia-riperfusion in modelli di ischemia fredda seguita da riperfusion o OLT in ratti. Come elementi coinvolti nel favorire il sequestro di neutrofilo nei sinusoidi sono da citare anche le sostanze vasocostrittrici come l'endotelina-1 e il rigonfiamento delle cellule

endoteliali; questi infatti provocano una riduzione del flusso nella microcircolazione e quindi intrappolamento dei PMN. La seconda fase è costituita dalla migrazione transendoteliale dei neutrofili che è dipendente dal legame tra la $\beta 2$ integrine e ICAM-1. Questo processo è importante solamente se vi è integrità della struttura sinusoidale, infatti, se sono presenti discontinuità a livello del rivestimento sinusoidale, i neutrofili possono avere diretto accesso alle cellule parenchimali evitando dunque la transmigrazione endoteliale. Il terzo step è infine costituito dal contatto con le cellule epatocitarie e dalla loro distruzione. Nonostante i PMN siano in grado di determinare un certo grado di stress ossidativo in sospensione, è il legame di tali cellule con gli epatociti e con la matrice extracellulare che incrementa e prolunga il rilascio di mediatori citotossici. In questo legame sembrano coinvolte le ICAM-1 sugli epatociti e le LFA-1 sui neutrofili. Questi dunque arrivati a bersaglio rilasciano grandi quantità di specie reattive dell'ossigeno e proteasi contenute nei propri granuli. Tra quest'ultime ricordiamo le catepsine-G e elastasi.

- Radicali liberi dell'ossigeno

I radicali liberi dell'ossigeno rappresentano uno dei più precoci e importanti componenti del danno da riperfusione dopo ischemia dell'organo. Tra questi ricordiamo l'ossigeno singoletto (O_2^{\cdot}) e il perossido di idrogeno (H_2O_2) che partecipano alla formazione, ferrocatalizzata, di radicale idrossile (OH^{\cdot}), altamente tossico e responsabile della perossidazione lipidica.

Tra le maggiore sorgenti di radicali annoveriamo il sistema della xantina-ossidasi citosolica. In corso di ischemia infatti si realizza un incremento della concentrazione cellulare di ipoxantina, derivante dal catabolismo dei nucleotidi adenosinici, con conseguente innalzamento dei livelli di xantino-ossidasi per conversione elettrolitica dalla xantina-deidrogenasi. L'accumulo intracellulare di elevate scorte di xantina-ossidasi è responsabile della massiva produzione e rilascio di radicali liberi dell'ossigeno al momento della ri-perfusione dei tessuti. La xantino-ossidasi è presente sia all'interno delle cellule endoteliali che delle cellule epatocitarie. Inibitori specifici dell'enzima quali l'allopurinolo attenuano significativamente i danni da ischemia. Altra sorgente di radicali è rappresentata dalle cellule di Kupffer, dai neutrofilo attivati e dalle cellule epatocitarie. In questi ultimi la produzione di specie reattive dell'ossigeno dipende maggiormente dall'alterazione nella catena respiratoria mitocondriale durante il periodo di ischemia che è stato stimato dover essere maggior di 4 ore. C'è d'aggiungere comunque che parallelamente all'incremento della formazione di tali specie reattive dell'ossigeno assistiamo ad un aumento della vulnerabilità cellulare che sicuramente contribuisce alla genesi del danno in questa fase. L'attivazione delle cellule di Kupffer e il rilascio da parte loro dei radicali liberi dell'ossigeno è invece conseguente alla sequenza di ipossia e riossigenazione. La produzione di tali composti tossici sembra mediata dall'aumento intracellulare di calcio al momento della riossigenazione. Altro elemento che sembra in grado di stimolare la produzione di radicali dell'ossigeno da parte delle cellule di Kupffer è il complemento, con fattori

quali il C5a, che viene attivato secondariamente alla presenza di composti rilasciati da cellule danneggiate.

I radicali prodotti sono in grado di procurare danno a proteine, enzimi, acidi nucleici, citoscheletro, membrane cellulari. L'insulto delle cellule endoteliali causato da questi danni porta alla perdita dell'integrità del microcircolo e alla riduzione del flusso.

Il nostro organismo è in grado di produrre delle sostanze anti-ossidanti capaci di bloccare questi radicali, come la superossido dismutasi, la catalasi, il glutatione e il beta-carotene, ma questi sono purtroppo insufficienti quando sono presenti grosse quantità di specie reattive come accade in corso di trapianto epatico. L'utilizzo quindi a livello clinico di questi elementi o di loro derivati a azione più prolungata, come la superossido dismutasi galattosilata, sembra essere una possibile strategia per il futuro nel trattamento del danno da ischemia-riperfusion.

- Sistema dell'Eme Ossigenasi

L'Eme Ossigenasi è un enzima ubiquitario che costituisce la tappa limitante nella degradazione ossidativa dell'eme in biliverdina, CO e ferro libero. La sua attività sembra essere indotta da stress ossidativi quali ipotermia, ipossia, radiazioni, e si considera uno degli indicatori più sensibili di danno cellulare ossidativo. La sua caratteristica più importante nel campo del danno da ischemia-riperfusion è la sua attività citoprotettiva. Questa si esplica: attraverso il controllo dei livelli intracellulari di eme libero (che di per sé è pro-ossidante), attraverso la produzione di biliverdina (anti-ossidante), attraverso il

rilascio di CO (che determina un aumento del flusso sanguigno) e promuovendo la produzione di ferritina.

Proprio per questo suo effetto citoprotettivo, numerosi sono stati gli studi fatti per capire bene il meccanismo di induzione di tale enzima e l'effettivo funzionamento di esso. Una maggiore comprensione di ciò potrebbe essere utile nella prevenzione del danno da ischemia-riperfusioni in ambito clinico. CO, biliverdina, bilirubina ridotta potrebbero rappresentare validi candidati per il trattamento dell'insulto da ischemia-riperfusioni nei pazienti trapiantati. Per tutti questi però la finestra terapeutica deve essere molto attentamente valutata a causa della loro tossicità.

- Il fenomeno del "pH paradosso"

Il danno tissutale da ischemia-riperfusioni riconosce diversi momenti patogenetici. Uno di questi potrebbe essere rappresentato dalla ripresa del normale metabolismo dopo prolungata ischemia. Infatti, l'ischemia (ipo o normotermica) determina una drastica riduzione del pH dovuto alla produzione di acido lattico per la prevalenza dei processi glicolitici anaerobi e per l'idrolisi dell'adenosin-trifosfato. L'acidosi che ne consegue svolge un ruolo altamente protettivo nei confronti della funzionalità cellulare durante l'ischemia stessa. Il ritorno del pH a livelli normali durante la riperfusioni, accelera la morte cellulare tramite l'attivazione di proteasi e fosfolipasi pH-dipendenti.

Il paradossale peggioramento del danno, quando il pH torna a livelli fisiologici, è detto fenomeno del *pH paradosso*.

L'aumento del pH promuove l'inizio di un fenomeno detto *transizione di permeabilità dei mitocondri* causata dall'apertura dei pori nella membrana mitocondriale interna. Ciò comporta la depolarizzazione mitocondriale, la preclusione del processo di produzione di energia e del ripristino dei livelli di ATP ed infine la morte cellulare.

- *Alterazione della microcircolazione*

Altro evento patogenetico fondamentale, che si sviluppa nelle fasi iniziali della riperfusione è rappresentato dall'alterazione della microcircolazione che può indurre infarto ischemico.

Sebbene sia stato ipotizzato che l'accumulo dei neutrofili all'interno dei sinusoidi possa determinare l'ostruzione di questi vasi, alcuni studi hanno dimostrato che i sinusoidi difficilmente vanno incontro ad ostruzione a causa dell'accumulo dei PMN al loro interno. Altre cellule ematiche (piastrine) possono accumularsi quando le cellule endoteliali sono danneggiate e le proteine della matrice extracellulare sono esposte, riducendo così il flusso ematico.

In aggiunta all'ostruzione meccanica passiva, intervengono molti mediatori che regolano il flusso. L'inibizione della sintesi di ossido nitrico (NO), ad azione vasodilatatrice, riduce l'apporto ematico del microcircolo al momento della riperfusione contribuendo all'evoluzione verso l'infarto ischemico in aggiunta al danno da riperfusione. Interessante l'osservazione che l'apporto di NO risolve l'infarto ischemico ma non il danno da riperfusione mediato dall'attivazione delle cellule di Kupffer dopo ischemia epatica. Bloccando gli

effetti vasocostrittori come del trombossano e endotelina-1 si ottiene un miglioramento della circolazione. Questi dati dimostrano come l'eccesso di produzione di vasocostrittori durante la ri-perfusione possa contribuire al determinismo della compromissione della microcircolazione vascolare; vasodilatatori endogeni, quali l'ossido nitrico, possono solo in parte contrastare i fattori ad attività vasocostrittrice.

PRESERVAZIONE D'ORGANO

L'enorme successo del trapianto d'organo è dovuto principalmente a tre fattori: lo sviluppo delle tecniche chirurgiche, la scoperta di agenti immunosoppressori e lo sviluppo di metodi per la preservazione degli organi.

La conservazione del graft conferisce al programma di trapianto una serie di vantaggi considerevoli. Essa permette infatti di avere sufficiente tempo per trasportare il graft dalla sede del prelievo alla sala del trapianto, per ottenere il miglior *match* donatore-ricevente e per preparare il team chirurgico e il paziente da trapiantare.

COLD STORAGE

Oggi giorno il metodo di conservazione del graft più diffusamente utilizzato è il *Cold Storage*, inteso come lavaggio e immersione dell'organo in una soluzione di preservazione (soluzione di Belzer o Università del Wisconsin, soluzione Celsior) a 4°C. Gli organi trattati in tale maniera possono essere conservati al massimo per un giorno e comunque sono sottoposti a un certo grado di danno che aumenta con l'aumentare del tempo di immersione del graft nel liquido. La causa di ciò non è totalmente chiara, ma sembra dovuta a meccanismi coinvolti

nel danno da ischemia-riperfusion come la riduzione della capacità di generare energia e ATP, la produzione di radicali liberi dell'ossigeno, l'attivazione della cascata dell'acido arachidonico con produzione di trombossani e leucotrieni. In più il freddo stesso sembra determinare apoptosi delle cellule per i cambiamenti che si manifestano a livello della membrana cellulare le quali passano da una fase liquida a una più cristallina. Questa fase di transizione comunque sembra essere totalmente reversibile per organi raffreddati e conservati per dieci ore o meno. Oltre a ciò l'ipotermia e lo stato di ischemia determinano edema cellulare a causa dell'inibizione della pompa ionica di membrana ATP dipendente che mantiene una bassa concentrazione intracellulare di sodio e una elevata di potassio.

La soluzione più usata, per la conservazione di rene, fegato, pancreas e cuore, fu quella creata da Belzer e Southard e il loro gruppo all'Università del Wisconsin verso la fine degli anni ottanta. Nell'elaborare la loro soluzione, Belzer e Coll., integrarono le conoscenze fisiopatologiche del danno da ischemia fredda con i principi del metabolismo cellulare. I costituenti furono scelti allo scopo di prevenire:

- l'imbibizione cellulare indotta dall'ipotermia;
- l'acidosi intracellulare;
- l'espansione dello spazio interstiziale;
- i danni alla membrana da radicali liberi dell'ossigeno;
- la deplezione delle scorte di adenosin-fosfato (ATP, ADP, etc.).

I due componenti principali, senza i quali l'efficacia della soluzione di Belzer risulta notevolmente ridotta, sono rappresentati dal *lattobionato* e dal *raffinosisio*, due soluti particolarmente efficaci nella prevenzione dell'edema cellulare. Il primo è un anione impermeabile con massa molecolare relativamente grande (358 kDa) mentre il secondo è un trisaccaride ad azione osmotica.

La soluzione comprende inoltre:

- un colloide stabile (*hydroxyethyl starch, HES*) che previene l'espansione dello spazio extracellulare durante l'ischemia fredda;
- l'adenosina che ha dimostrato di essere in grado di stimolare la sintesi di ATP dopo l'ischemia fredda e riperfusione;
- l'allopurinolo, analogo dell'ipoxantina ad azione inibente la xantina-ossidasi;
- il glutatione che inibisce la formazione di radicali liberi dell'ossigeno, proteggendo i gruppi SH di membrana dal danno ossidativo.

Inoltre l'*UW solution*, come anche la *Collins solution*, è caratterizzata da un'alta concentrazione di potassio, che ha lo scopo di ridurre l'efflusso di questo ione dalla cellula permettendole così di conservare l'energia necessaria nella riperfusione per ristabilire la giusta quantità di potassio intracellulare. L'alta concentrazione nella soluzione di tale ione sembra però causare nella conservazione del fegato dei danni all'endotelio e al tratto biliare mentre nella preservazione del rene la contrattura dei capillari glomerulari dopo trapianto dell'organo.

Con tale sistema di preservazione il fegato può essere conservato per un periodo superiore a 20 ore.

Un'altra soluzione, impiegata anche nel nostro centro, è quella di *Celsior*. Inizialmente essa fu creata per la conservazione del cuore ma poi il suo impiego si estese anche alla preservazione del fegato. La soluzione *Celsior* differisce da quella dell'UW per la presenza di basse concentrazioni di potassio, di alte concentrazioni di sodio, l'assenza di *hydroxyethyl starch* e bassa viscosità con caratteristiche isosmotiche extracellulari. Essa inoltre contiene sostanze quali mannitolo e lattobionato che riducono il rigonfiamento cellulare conseguente all'ipotermia, istidina con capacità tamponante, *scavengers* dei radicali liberi come glutatione (anche se il mannitolo e l'istidina hanno in parte tale attività), glutammato per creare ATP in condizioni di anaerobiosi.

LA MACHINE PERFUSION

Altro sistema di preservazione d'organo è invece la perfusione continua con utilizzo della *Machine Perfusion*. Già nel 1967 Belzer e altri dimostrarono come si può conservare il rene fino a tre giorni attraverso questo sistema utilizzando come liquido di perfusione un crio precipitato di plasma. Nel 1970 sempre Belzer descrisse per primo una macchina di perfusione epatica ipotermica che prevedeva una duplice via di perfusione (portale e arteriosa). I risultati furono soddisfacenti per periodi di perfusione di 8-10 ore, ma quando il tempo di perfusione superava le 24 ore solo 2 animali su 12 sopravvissero. La barriera delle 24 ore fu per la prima volta superata nel 1973 da Petrie e

collaboratori che idearono un sistema di perfusione portale e arteriosa ipotermica utilizzando plasma ossigenato con aggiunta di steroidi in esperimenti condotti sul cane. Nel 1980 Kamada propose l'aggiunta di un'emulsione di fluorocarbene come trasportatore di ossigeno in trapianti d'organo eseguiti sui ratti. Gli animali così trattati sopravvissero più a lungo rispetto ai gruppi di controllo che non prevedevano l'aggiunta dell'emulsione di fluorocarbene. Questi ultimi risultati estremamente incoraggianti promossero l'impiego della perfusione continua con aggiunta di ossigeno, dimostrando l'indiscutibile vantaggio di fornire un continuo supporto di substrati energetici vitali per la cellula. Questo fiorire di ricerche nell'ambito della Machine Perfusion era stimolato dal fatto che all'epoca non esisteva ancora un metodo efficace per preservare l'organo per più di 8 ore. Con l'avvento della soluzione di Belzer e i numerosi vantaggi da essa introdotti (aumentato tempo di preservazione, minor costo e più facile applicabilità in campo clinico) si ridusse però l'interesse nel campo di ricerca delle macchine a perfusione continua. Solo in questi ultimi anni si sono ripresi con vigore gli studi in questo ambito. La sempre più crescente necessità di organi da trapiantare ha spinto infatti i vari studiosi a approfondire ancora di più le conoscenze sulla perfusione continua extracorporea sia renale che epatica. Essa infatti consentirebbe di espandere sensibilmente il pool degli organi donati attraverso l'utilizzo di organi marginali come quelli dei donatori a cuore non battente. C'è da aggiungere inoltre che lo sviluppo di tecnologie sempre più avanzate ha permesso la creazione di macchinari sempre più piccoli e facili da trasportare.

In generale possiamo dire che sono tre i vantaggi della Machine Perfusion:

1. aumentare il tempo di preservazione dando all'organo continuo apporto di ossigeno e nutrienti e rimuovendo continuamente i prodotti finali del metabolismo;
2. valutare durante la preservazione la *viability* del graft;
3. "resuscitare" i graft danneggiati dall'insulto ischemico grave come gli organi dei donatori a cuore non battente.

Tale metodo sebbene possa essere considerato, soprattutto nel campo della trapiantologia renale, un sistema molto valido per conservare in maniera ottimale la qualità funzionale dell'organo, viene poco utilizzato a favore invece del Cold Storage che si dimostra più vantaggioso per semplicità e trasportabilità. E' dunque proprio nel campo renale che la Machine Perfusion ha raggiunto i massimi successi e sviluppi tanto che anche in commercio sono reperibili alcuni modelli di tale sistema. Le ragioni della sua superiorità rispetto al metodo di preservazione tradizionale sono diverse: attraverso la perfusione, l'organo riesce ad essere conservato per periodi più lunghi e inoltre la Machine Perfusion è superiore al Cold Storage in termini di ripresa di funzionalità iniziale del rene trapiantato. Infatti i reni conservati con il metodo tradizionale hanno una ritardata ripresa di funzionalità del graft pari al 20 – 30%. Quelli invece preservati con Machine Perfusion, nonostante il tempo di conservazione più lungo, hanno una ritardata ripresa di funzionalità di meno del 10%. Tutto ciò è imputabile al fatto che con la perfusione si permette al rene di continuare la sua attività aerobica, per il continuo apporto di substrati e ossigeno e la rimozione dei prodotti finali del metabolismo.

Nel campo del trapianto epatico invece i sistemi di perfusione meccanica vengono utilizzati solo in ambito sperimentale, mentre in ambito clinico è la preservazione a freddo classica la più usata. A questo proposito c'è da dire che il successo del trapianto epatico, soprattutto se il fegato prelevato è discutibile per qualità (donatore vecchio, ospedalizzato da molto...) e il ricevente è grave, dipende molto dal tempo di preservazione che in tali casi deve essere il più breve possibile. La Machine Perfusion potrebbe rappresentare la soluzione a questo problema. Inoltre, attraverso l'utilizzo della macchina a perfusione epatica normotermica, sembrerebbe esserci la possibilità di utilizzare anche i fegati prelevati da donatori a cuore non battente che, conservati in Cold Storage, non sono in grado di avere un'accettabile ripresa di funzionalità.

Le macchine per la perfusione continua del fegato usate in ambito sperimentale sono di due tipi: ipotermiche e normotermiche.

- Machine Perfusion Ipotermica epatica

Sono molti gli studi che mettono a confronto la Machine Perfusion ipotermica con il Cold Storage semplice, e tutti giungono alla conclusione che con la prima si riesce ad ottenere una maggior efficacia nella preservazione del graft. Dopo riperfusione calda l'organo perfuso dimostra di avere una maggior produzione di bile, valori di ALT più bassi e maggior *clearance* del verde di indocianina (usata per valutare l'escrezione canalicolare) rispetto al fegato conservato con metodo tradizionale. Risultati simili sono stati riportati anche da altri gruppi di ricerca con valutazioni sperimentali su organi trapiantati dopo preservazione con Machine Perfusion.

L'ipotermia ha il vantaggio di ridurre il metabolismo cellulare ma allo stesso tempo determina danni alle cellule. Proprio per questo motivo è necessario usare soluzioni per la perfusione che contengano dei componenti in grado di prevenire l'insulto da freddo; inoltre queste dovrebbero provvedere ad un lavaggio completo del letto vascolare del graft dal sangue del donatore, raffreddare rapidamente il fegato, mantenere il giusto bilancio osmotico tra lo spazio interstiziale e lo spazio vascolare, e trasportare ossigeno alle cellule epatiche. Sono state dunque studiate molte soluzioni tra le quali la più utilizzata è quella dell'Università del Wisconsin Modificata. Questa contiene gluconato per prevenire il rigonfiamento cellulare da ipotermia, fosfato per prevenire l'acidosi intracellulare, glutatione e allopurinolo per inibire la formazione di radicali liberi dell'ossigeno e in fine l'*hydroxyethyl starch* per mantenere il letto vascolare pervio e prevenire l'edema. La UW solution Modificata differisce dalla UW solution usata per il Cold Storage per l'assenza di lattobionato e la presenza invece di gluconato. Il gruppo di Bessems et Al. ha creato invece un'altra soluzione di perfusione chiamata Polysol che, a differenza di quella dell'Università del Wisconsin e di altre soluzioni per Machine Perfusion, contiene sostanze quali aminoacidi come glutamina, istidina, triptofano e arginina, e vitamine come l'acido ascorbico; questi sono importanti elementi per il metabolismo cellulare e per la prevenzione di danni da radicali liberi. Il razionale dell'aggiunta di metaboliti nella soluzione di perfusione è l'evidenza che il metabolismo cellulare anche se ridotto persiste a temperature di 4°C ed è stato valutato tra il 7 e il 35%. Anche la soluzione *Celsior* può essere impiegata negli esperimenti con la Machine Perfusion; essa è stata utilizzata con successo

dal gruppo di Compagnon et Al. Però, a differenza della UW solution, la *Celsior* è priva di colloidi che si sono effettivamente dimostrati necessari nella perfusione ipotermica per contrastare l'insulto derivante dalla pressione idrostatica sulle pareti del vaso. Perciò questa soluzione viene modificata con l'aggiunta di *hydroxyethyl starch*.

Nei minuti iniziali di perfusione del fegato viene usata la soluzione di Krebs-Henselett che ha il compito di lavare l'organo prelevato e di portare la temperatura di esso da 37°C a 4-5°C. La necessità di perfondere con questo tipo di soluzione deriva dal fatto che l'utilizzo di UW solution nei primi minuti della conservazione con la Machine Perfusion provoca un aumento delle resistenze vascolari e un flusso eterogeneo. Ciò potrebbe essere dovuto all'alta concentrazione di potassio e all'elevata viscosità che caratterizza la soluzione di Belzer.

Per quanto riguarda le vie attraverso le quali il fegato viene perfuso, in letteratura troviamo che nella maggior parte degli studi sperimentali questa avviene attraverso la doppia cannulazione di arteria Epatica e vena Porta. Una perfusione fatta solo attraverso la vena Porta determina un *pattern* di flusso eterogeneo. L'incremento delle pressioni all'interno di questi vasi, dopo conservazione con Machine Perfusion, è stata stimata del 42% rispetto al 130% dopo Cold Storage. Ciò vale però solo per brevi periodi di preservazione, infatti una perfusione continua in ipotermia per 24 ore porta ad aumenti pressori del 150% dopo un'ora di riscaldamento dell'organo. Un aumento così elevato delle pressioni sembra essere dovuto alla presenza di un flusso eterogeneo, stasi di globuli rossi ed edema cellulare, conseguenti a modificazioni morfologiche

delle cellule endoteliali. Questi dati però non sono confermati dal gruppo di Bessen e altri che riesce a conservare il fegato per 24 ore senza constatare alterazioni nella circolazione. Fattore importante è dunque il mantenimento di un pattern circolatorio ottimale. A tal proposito il gruppo di Hart e Vann der Plaats ha fatto uno studio sul bilancio tra pressioni di perfusione epatiche e il danno endoteliale, ed è giunto alla conclusione che tali pressioni devono aggirarsi attorno al 25% della circolazione epatica normotermica per permettere una completa perfusione associata a danno cellulare minimo.

Nella Machine Perfusion un altro aspetto di rilievo è l'apporto di ossigeno ai tessuti perfusi tramite l'ossigenazione della soluzione attraverso un ossigenatore. Come già detto, il metabolismo cellulare a temperature di 4°C si abbassa ma non si riduce a zero e quindi richiede sempre una certa quantità di O₂ stimata attorno ai 0.27 µmol/min/g di fegato. Ciò è stato dimostrato da Fujita et Al. attraverso uno studio comparativo tra l'utilizzo di una soluzione di perfusione ossigeno-saturata e una ossigeno-desaturata. Il fegato trattato con la soluzione saturata al 95% di ossigeno dimostra migliore ripresa di funzionalità mentre quello trattato senza ossigeno manifesta maggior danno soprattutto nel comparto endoteliale.

La perfusione continua ipotermica del fegato si è dimostrata in grado sia di conservare per lunghi periodi di tempo il graft, sia di utilizzare gli organi di donatori a cuore non battente. Numerosi studi sperimentali dimostrano quest'ultima cosa. Lee et Al. riescono a trapiantare con successo il fegato di ratto dopo che è stato esposto a 30 minuti di ischemia calda e quindi messo in Machine Perfusion per 5 ore. Le ipotesi per spiegare ciò sembrano essere: il

mantenimento della circolazione e il ripristino delle scorte energetiche. Ricerche fatte su pezzi di rene trattati con perfusione ipotermica continua mostrano l'effettivo recupero di ATP delle cellule. Lo stesso è confermato da Fuller e altri che hanno visto come tale tipo di conservazione possa mantenere vicino alla normalità i livelli di ATP.

Le possibili applicazioni di questo tipo di sistema di preservazione d'organo sono dunque molto vantaggiose e ormai manca poco per l'introduzione di questo in ambito clinico. Il gruppo di Bessems e Doorschodt ha già creato il primo sistema portatile di perfusione per fegato e rene che probabilmente presto entrerà in commercio.

- Machine Perfusion Normotermica epatica

Nel campo dello sviluppo di nuovi metodi di preservazione del graft, molti studiosi hanno concentrato la loro attenzione su un altro tipo di Machine Perfusion: quella normotermica. Essa assieme alla perfusione continua in ipotermia potrebbe in futuro essere applicata al trapianto epatico umano come evoluzione del sistema di conservazione classico. Rispetto a quest'ultimo, la Machine Perfusion normotermica ha una serie di vantaggi considerevoli. Primo tra tutti è il mantenimento di una temperatura uguale a quella fisiologica alla quale il fegato può mantenere un metabolismo normale. Il freddo che caratterizza la preservazione in Cold Storage, ma anche la perfusione in ipotermia, è in grado da solo di determinare danno alle cellule parenchimali ed endoteliali. Probabilmente ciò, come accennato in precedenza, è dovuto ad alterazioni delle membrane cellulari che si trovano costrette ad andare in contro

ad un cambiamento di fase. Le ridotte temperature in più sembrerebbero favorire ed accelerare il breakdown dell'ATP in adenosina. Questa è convertita in ipoxantina dalla xantina deidrogenasi (conversione NAD dipendente). Come già spiegato precedentemente, essa in condizioni ischemiche diviene xantina ossidasi. Nella riperfusione l'accumulo di xantina ossidasi utilizza l'ossigeno per degradare l'ipoxantina, che si è raccolta, in urato; questo processo porta alla creazione di radicali liberi (burst respiratorio). Per evitare tutto ciò si può utilizzare la perfusione in normotermia associata alla somministrazione di ossigeno così da permettere la costante generazione di ATP e NAD per prevenire l'accumulo di metaboliti potenzialmente tossici. Ulteriore vantaggio della Machine Perfusion normotermica è quello dell'utilizzo come liquido di perfusione di sangue intero. Esso viene ossigenato e costituisce un ottimo sistema di trasporto di tale molecola ai tessuti. Inoltre molti studi hanno dimostrato che le altre soluzioni ossigenate usate nel campo degli organi isolati e perfusi hanno bisogno di elevati flussi per un apporto adeguato di O₂ e possono dunque creare cambiamenti degenerativi nel tessuto perfuso, cosa che non si vede quando vengono usati globuli rossi. Sembra inoltre che gli eritrociti possano attenuare il danno sinusoidale neutralizzando i radicali xantino-ossidasi dipendenti nel fegato perfuso del ratto.

Il controllo della funzionalità del graft e della sua qualità durante il periodo di perfusione costituisce un altro punto in più della Machine Perfusion rispetto al Cold Storage. Questo può essere fatto attraverso la valutazione sia della produzione di bile che di alcuni esami ematochimici. La bile infatti rappresenta probabilmente il più sensibile parametro di funzionalità del fegato durante la

perfusione continua extracorporea e dopo l'impianto dell'organo. Affinché essa venga prodotta deve essere intatta l'architettura dei sinusoidi epatici e degli epatociti. Per quanto riguarda gli esami ematochimici che si possono fare durante il periodo di perfusione essi sono molteplici e devono andare a controllare: l'omeostasi dell'organo (pH ed elettroliti), la capacità di sintesi delle cellule epatiche (fattore V e complemento CH50), la capacità metabolica (glucosio), la lisi cellulare epatocitaria (AST e ALT), il danno delle cellule dell'epitelio biliare, i livelli di bilirubina e molti altri.

I due gruppi di riferimento nello studio della perfusione continua del fegato in normotermia sono quello di Schon e quello di Friend e Imber; tutti e due hanno condotto ricerche sia sulla preservazione a lungo termine del fegato sia sull'utilizzo dei fegati da donatori a cuore non battente.

Il gruppo di Imber è stato in grado di preservare per 72 ore il fegato porcino con Machine Perfusion, dimostrando che durante tutto il periodo di perfusione il graft manteneva i livelli fisiologici di pH ed elettroliti, la normale sintesi proteica e i normali parametri emodinamici. Anche i riscontri istologici hanno evidenziato l'assenza di danni importanti con conservazione della normale architettura epatica. Si sono osservate piccole aree di necrosi pericentrale in due dei cinque esperimenti condotti; in tre si sono riscontrate inoltre edema e dilatazione dei sinusoidi e delle vene centro-lobulari: questo sembra prodotto dall'inadeguato drenaggio venoso nonostante le fisiologiche pressioni in vena cava infraepatica.

Il gruppo di Schon ha portato a termine con successo il trapianto di fegato porcino dopo l'esposizione del graft a un'ora di ischemia calda e quattro ore di riperfusione con la Machine Perfusion.

Ricordiamo infine la possibilità di utilizzare questo tipo di tecnologia nell'assistenza ai pazienti affetti da epatite acuta e fulminante.

Dal punto di vista pratico la Machine Perfusion costituisce un sistema di non facilissima gestione, molto più complesso dal punto di vista tecnologico e molto più costoso rispetto al semplice Cold Storage. Esso è composto da un circuito di tubi all'interno dei quali circola la soluzione di perfusione costituita da sangue intero parzialmente diluito (con Ringer Lattato per esempio) che viene spinto a perfondere l'organo da pompe peristaltiche. Prima di entrare nell'organo questo viene ossigenato tramite un ossigenatore e riscaldato alla temperatura di 37-38°C da uno scambiatore di calore.

Il fegato viene irrorato, come avviene fisiologicamente, tramite arteria epatica e vena porta che sono dunque cannulate; lo stesso succede per la vena cava dalla quale viene ripescato il sangue che defluisce dall'organo. Il gruppo di Friend in particolare utilizza pressioni di 5-10 mmHg in vena porta e 85-95 mmHg in arteria epatica tentando di mimare una situazione fisiologica. Per fare ciò deve perfondere il fegato con un flusso più alto rispetto alla situazione in vivo, con un rapporto tra flusso portale e arterioso pari a 7:1 (fisiologicamente 3:1). Secondo questo gruppo c'è inoltre una correlazione strettissima tra le pressioni in vena porta e quelle in vena cava. Flussi e pressioni sono costantemente controllati da flussimetri e barometri.

Nel circuito progettato da Friend, il fegato viene conservato in un sacco intestinale che è sospeso in una soluzione salina in una camera di perfusione sterile. Il gruppo di Schon analogamente conserva il graft in un sacco di plastica immerso in acqua calda ma in più, per simulare maggiormente la situazione fisiologica, sottopone il fegato a compressioni prodotte da una pompa esterna (con una differenza di pressione tra 0 e 25 cm H₂O) con una frequenza di 15 per minuto. Queste dovrebbero mimare le variazioni di pressione intraddominali associate al respiro e così incrementare la perfusione dei lobuli periferici.

La soluzione di perfusione come ho già detto è costituita in parte da sangue intero e in parte da un'altra soluzione in modo da avere un ematocrito del 20%; un ematocrito tale conferisce alla soluzione una minor viscosità rispetto al sangue e allo stesso tempo la capacità di dare un sufficiente apporto di ossigeno alle cellule. Per evitare il formarsi di coaguli all'interno del circuito, viene infusa eparina nel sangue prelevato dall'animale. A causa del normale metabolismo cellulare che si ha alla temperatura di 37° C, secondo il gruppo di Friend, si rende necessaria l'aggiunta alla soluzione di sostanze nutritive. A questa viene somministrata a velocità costante nel circuito una mistura contenente nutrizione parenterale standard, emulsioni di lipidi e insulina. Anche glucosio e insulina vengono forniti a seconda della glicemia rivelata tramite stick in modo tale da mantenerla tra 4 e 10 mmol/L. Oltre a queste sostanze importanti per il metabolismo cellulare, viene aggiunta una prostaciclina per favorire la circolazione (o attraverso azione vasodilatante o inibente l'attivazione delle piastrine) e acido colico per migliorare la produzione di bile.

Per quanto riguarda il mantenimento del pH e della ionemia, Schon et Al., per evitare l'insorgenza di acidosi e iperpotassemia, forniscono il loro circuito di un sistema per l'emodialisi mentre Friend et Al. non la utilizzano, avendo notato che il fegato isolato e perfuso è in grado di mantenere il bilancio acido-base e la potassemia a livelli normali senza aggiunta di bicarbonati e altro. Proprio il controllo del pH e della potassemia può essere considerato un parametro molto sensibile di buona funzionalità epatica. Prima di azionare il circuito comunque il pH, pCO₂, assieme alla calcemia, vengono aggiustate così da portarli entro il range fisiologico.

4. SCOPO DELLO STUDIO

L'obiettivo del nostro lavoro è stato quello di realizzare un modello sperimentale di Machine Perfusion per la preservazione di fegati prelevati da donatore a cuore non battente, come valida alternativa alla preservazione tradizionale in Cold storage a 4°C.

Ulteriore scopo del nostro progetto è stato quello di identificare eventuali biomarcatori in grado di predire l'entità del danno da ischemia-riperfusion e la qualità della ripresa funzionale del graft dopo trapianto di fegato da donatore a cuore non battente.

Questo obiettivo rappresenta solo una fase iniziale di un progetto più ampio che prevede l'ingegnerizzazione, la miniaturizzazione della MP e la sua applicazione nella pratica clinica.

5. MATERIALI E METODI

Scelta dell'animale da esperimento

Per l'esecuzione degli esperimenti sono stati utilizzati dieci maiali Landrace X Large White di sesso femminile, del peso corporeo compreso tra 20 e 25 kg e dell'età di 2-3 mesi.

Gli animali sono stati trasportati dall'allevamento al Centro di Chirurgia Sperimentale tre giorni prima dell'intervento per la fase di acclimatamento e di controllo clinico (valutazione di peso, temperatura corporea, funzioni vitali).

Tutti gli animali sono stati tabulati a temperatura costante, in gabbie separate ed alimentati con acqua e cibo ad libitum fino a 24 ore prima dell'intervento.

La scelta su questo tipo di animale è legata alle sue caratteristiche biologiche, quali l'affinità filogenetica, anatomica, emodinamica e metabolica; in termini più pratici, l'aspetto economico e logistico, visti il minor costo e la più facile reperibilità rispetto ad altri animali quali il cane o il babuino, hanno fatto ricadere la scelta su questo animale.

Tutte le procedure e gli esperimenti sono stati condotti nel totale rispetto delle normative a tutela dell'animale attualmente vigenti nel nostro Paese (D.L. n. 116 del 27/01/1992).

Studio anatomico

Il fegato del maiale ha un peso che si aggira sul 1.7% del peso corporeo totale ossia di circa 800g negli animali impiegati nei nostri studi; ha colore rosso-bruno, talvolta violaceo.

Lo sviluppo notevole del connettivo perilobulare che si dirama dalla capsula di Glisson permette di individuare chiaramente i lobuli al di sotto della capsula superficiale.

Il fegato è fondamentalmente diviso in due emifegati, destro e sinistro, contenente la vena ombelicale obliterata. La lobatura è molto pronunciata ed è segnata da profonde scissure.

Vi sono complessivamente sei lobi: il destro laterale, il destro mediale, il quadrato, il sinistro mediale, il sinistro laterale e il caudato.

Solo quattro sono molto evidenti e riconoscibili sulla faccia diaframmatica: i lobi destri e sinistri, i laterali e i mediali. Su questa stessa faccia, i lobi mediali coprono ampiamente i laterali, mentre sulla faccia viscerale questi ultimi coprono i primi.

A differenza del fegato umano il lobo sinistro è quello più sviluppato nel maiale.

Il fegato di maiale può essere suddiviso in otto segmenti, analogamente a quello umano secondo la descrizione di Coinaud. Ciascun segmento è servito da un proprio ramo arterioso e portale e presenta un proprio drenaggio biliare: l'insieme di tali elementi, la triade portale, è rivestita da tessuto connettivo.

Il lobo sinistro laterale si divide nei segmenti II e III, il lobo sinistro mediano è costituito dal segmento IV, il lobo destro laterale si divide nei segmenti VI, VII e I, il lobo destro mediale nei segmenti V e VIII.

La colecisti è localizzata nel lobo destro mediale, lasciando una piccola incisura sull'adiacente lobo mediale sinistro.

Il dotto cistico decorre per un lungo tratto sulla superficie viscerale del fegato, dove si immette nel breve dotto epatico.

Le arterie che penetrano attraverso la *porta hepatis* sono numerose e si staccano di passaggio dall'arteria epatica. Generalmente se ne descrivono tre: un ramo destro laterale che fornisce l'arteria per il lobo caudato, un ramo destro mediale da cui nasce l'arteria cistica ed un ramo sinistro per i due lobi sinistri.

La vena porta segue il margine destro del piccolo omento: si trova in posizione dorsale rispetto all'arteria epatica e al dotto epatico comune. A livello ilare il tronco portale si divide in due rami di cui il sinistro, più grosso, si distribuisce ai lobi sinistri, al lobo quadrato ed al lobo destro mediale.

La vena cava caudale è completamente intraparenchimale ed è compresa all'interno del lobo caudato: in essa drenano le tre vene epatiche principali: la vena epatica di destra, che drena i due lobi destri; la vena epatica sinistra, che drena i due lobi sinistri; la vena epatica intermedia, che drena il lobo quadrato e la parte adiacente del lobo sinistro mediale. Spesso la vena epatica sinistra e quella intermedia presentano uno sbocco comune. Il lobo caudato è drenato direttamente da numerose piccole vene accessorie.

I vasi linfatici del fegato formano una rete superficiale ed una profonda, tra cui esistono diverse anastomosi. I vasi linfatici profondi drenano ai linfonodi portali, mentre i vasi superficiali sono tributari dei linfonodi mediastinici caudali, diaframmatici e sternali.

Premedicazione, gestione anestesiológica e preparazione dell'animale

La mattina dell'esperimento ciascun animale viene premedicato con una miscela di Zoletil (Tiletammina e Zolazepam, 20-40 mg/kg) con Xilazina (Rompun 0.3 mg/kg) per via intramuscolare e successivamente trasportato in sala di preparazione dove viene eseguita la fase pre-operatoria.

In ciascuna vena cefalica dell'arto anteriore destro e sinistro dell'animale viene reperito un accesso endovenoso e, dopo adeguata tricotomia e sterilizzazione della zona, si procede al posizionamento di un'agocannula (22 Gauge); viene inoltre posizionato un ulteriore accesso venoso (22 Gauge) di emergenza a livello dell'orecchio sinistro.

Si procede quindi a tricotomia della regione laterocervicale destra e sinistra e dell'addome, dalla regione sternale a quella pelvica.

L'animale viene preparato per l'intervento: viene posizionato sul letto operatorio e viene applicata nella regione lombo-sacrale posteriore la placca per l'elettrobisturi.

Dopo induzione dell'anestesia con Sodio Tiopentale alla dose di 250 mg in bolo e.v., o comunque fino ad ottenere l'effetto desiderato, si procede all'intubazione oro-tracheale. La cannula oro-tracheale viene connessa ad un circuito respiratorio collegato ad un respiratore automatico; si procede a successiva curarizzazione con Bromuro di Pancuronio e Fentanile 0.1 mg su 2 ml in bolo per l'analgisia profonda.

Per l'anestesia di mantenimento viene utilizzata una miscela di ossigeno, Protossido di Azoto e Sevoflurano (atmosfera variabile dal 2 al 4.5 % a seconda delle esigenze anestesiolgiche).

L'animale viene messo in posizione supina sul letto operatorio, dotato di un tappetino riscaldato allo scopo di mantenere un'adeguata temperatura corporea limitando la termodispersione.

A completamento della preparazione anestesiolgica, al fine di rilevare tutti i parametri vitali, vengono posizionati inoltre:

- elettrodi per la rilevazione dell'attivit  cardiaca;
- pulsossimetro per la rilevazione della saturazione di ossigeno;
- bracciale per la determinazione della pressione arteriosa indiretta;
- sonda per il rilevamento della temperatura corporea a livello esofageo

Durante tutta la durata dell'intervento l'animale viene idratato attraverso la somministrazione di Ringer Lattato o Soluzione Fisiologica adeguatamente riscaldata (10 ml/Kg/ora), mediante una pompa di infusione.

Si esegue un'ampia disinfezione cutanea delle regioni laterocervicali destra e sinistra e dell'addome dalla regione sternale fino a quella pelvica con Iodopovidone (Betadine chirurgico).

Durante l'intervento chirurgico tutte le emergenze anestesiolgiche sono gestite da personale specifico con ampia esperienza nella gestione dell'animale di laboratorio secondo le procedure standard in anestesiologia.

Cannulazione della Vena Giugulare esterna e dell'Arteria

Carotide

Dopo anestesia generale, vengono eseguite cervicotomia laterale destra e sinistra per l'isolamento e la successiva cannulazione delle vene giugulari e della carotide necessarie per il monitoraggio emodinamico e l'infusione di farmaci durante l'intervento. All'apertura della fascia del collo, si seziona il platisma, si identifica il muscolo sternocleidomastoideo. Lateralmente a questo si identifica la vena giugulare esterna che viene repertata con fettuccia. Medialmente allo stesso muscolo si identificano la vena giugulare interna e la carotide. Si posiziona una cannula in vena giugulare esterna per l'infusione di farmaci e cristalloidi. Nella vena controlaterale viene posizionata un'analogha cannula per il monitoraggio della pressione venosa centrale. La cannulazione della carotide consente il monitoraggio continuo della pressione arteriosa durante l'intervento di epatectomia. La carotide controlaterale viene repertata su fettuccia per essere successivamente legata nella fase dell'emorecupero (foto 9).

Induzione dell'arresto cardiaco e prelievo del fegato

L'arresto cardiaco è stato ottenuto inducendo un'insufficienza respiratoria, in anestesia generale, attraverso la deconnessione dell'animale dal ventilatore, lasciando integro l'addome in modo da riprodurre al meglio un donatore umano a cuore non battente. Tutti gli altri metodi descritti in letteratura quali il dissanguamento, il clampaggio del legamento epatoduodenale, la cardioplegia e

l'incisione del diaframma, avrebbero infatti, un'influenza sul flusso ematico epatico e quindi questo renderebbe il modello animale non comparabile ai donatori umani a cuore non battente.

L'arresto cardiaco di solito avviene entro 10 minuti dall'inizio dell'apnea, a seguito della deconnessione del ventilatore. Dopo l'arresto cardiaco, trascorrono 60 minuti prima dell'inizio delle operazioni di prelievo dell'organo.

Dopo eparinizzazione sistemica (500 UI/kg), l'animale viene sottoposto a laparotomia mediana xifo-pubica .

All'esplorazione della cavità addominale, il fegato si presenta di colorito bluastro (vedere foto 1); le anse intestinali vengono ribaltate lateralmente per esporre il piano aortico. Si isola l'aorta addominale sottorenale fino al carrefour iliaco. Si riconosce l'arteria mesenterica inferiore che viene sezionata tra legature. L'aorta addominale è pronta per la cannulazione (vedere foto 10) necessaria all'emorecupero prima e alla perfusione del graft dopo (vedere foto 2). Si procede con la cannulazione dell'aorta addominale e si esegue in successione la legatura delle carotidi precedentemente repertate. La cannula aortica è direttamente collegata ad un sistema di raccordi che raccoglie il sangue proveniente dall'animale e lo immette nel reservoir della Machine Perfusion dove verrà allocato il graft epatico. si procede con la fase dell'emorecupero

Il fegato viene mobilizzato mediante sezione dei suoi ligamenti (rotondo, falciforme, coronari e triangolari).

L'approccio all'ilo epatico prevede il riconoscimento delle strutture vascolari (vena porta e arteria epatica).

All'apertura del legamento epatoduodenale, il coledoco viene isolato e sezionato tra legature.

La vena porta e l'arteria epatica vengono scheletrizzate e reperate con fettuccia.

Dopo preparazione dell'ilo epatico si isola e si circonda con fettuccia la vena cava addominale sottoepatica e sovraepatica iuxtadiaframmatica.

Completata la fase di emorecupero il fegato viene immediatamente prelevato dopo sezione delle vene cave, della vena porta e dell'arteria epatica.

GRUPPI DI STUDIO

Sono stati utilizzati in totale 10 animali divisi in 2 gruppi:

1. **gruppo A** - 5 fegati prelevati da NHBD (60 minuti di WIT > Warm Ischemia Time) e conservati per 6 ore in MP (Machine perfusion) a 20°C con soluzione Celsior;
2. **gruppo B** - 5 fegati prelevati da NHBD (60 minuti di WIT > Warm Ischemia Time) e conservati per 6 ore in CS (Cold Storage) a 4°C

In tutti i gruppi di studio il periodo di preservazione è stato seguito da un periodo di rewarming inteso come riperfusione dell'organo con sangue autologo in normotermia (37°) per due ore.

MACHINE PERFUSION

Nel gruppo A, i fegati prelevati sono conservati in Machine Perfusion sub-normotermica (20° C). In questo sistema la soluzione di perfusione Celsior circola perfondendo l'organo per un periodo di sei ore.

La Machine Perfusion è composta da una reservoir in plexiglass delle dimensioni di 22x22x10cm e da due circuiti (vedere foto 8) che indipendentemente provvedono rispettivamente all'irrorazione dell'arteria epatica e della vena porta ed al recupero del liquido di perfusione dalla vena cava. Nel reservoir viene posto il fegato (vedere foto 3) in cui si sono cannulate l'arteria epatica, la vena porta e la vena cava. Alle cannule appena citate vengono connessi dei tubi ¼ di pollice in PVC (Medtronic) all'interno dei quali viene spinto, con l'ausilio di due pompe volumetriche rotative Watson Marlow 505U (vedere foto 6), una per ogni circuito, il liquido raccolto dalla vena cava. Nel circuito che perfonde l'arteria epatica il liquido viene ossigenato attraverso un ossigenatore pediatrico Lilliput1 D901(vedere foto 7). L'ossigeno è erogato a questo strumento da una bombola di O₂ 99.7% da un metro cubo dell'Air liquid e il flusso viene mantenuto a 0.3 litri/minuto tramite un Flussimetro (Mandelli) .

Un flussimetro Admac AE (vedere foto 5), posto prima dell'ingresso delle cannule nel fegato, misura il flusso di liquido nei due circuiti; questo flussimetro è ad induzione magnetica, particolarmente adatto a misurazioni in condizioni difficili e su fluidi viscosi, ed è in materiale biocompatibile. Il flusso dei due circuiti viene regolato aumentando o riducendo i giri per minuto delle due pompe peristaltiche. Durante tutto il corso della perfusione il flusso totale del fegato viene mantenuto sui 520 ml/min e cioè 200-220 e 300-320 ml/min rispettivamente in arteria Epatica e vena Porta.

Uno scambiatore di calore Haake D8, connesso con l'ossigenatore, consente al sistema di mantenere una temperatura costante del liquido circolante di 20°C durante tutta la conservazione del graft.

Questo sistema è detto "chiuso" perché il volume di liquido che ricircola all'interno del circuito rimane costante. Per evitare che si abbia un'evaporazione di liquido, si è provvisto il reservoir di un coperchio che viene tolto solo per il tempo necessario a fare le biopsie epatiche (ogni ora).

Per fare in modo che non si abbia coagulazione nel sistema, l'intero circuito, viene lavato con 500 ml di Ringer Lattato in cui sono diluite 5000 UI di eparina.

Da due rubinetti appositi posti prima e dopo l'ossigenatore nel circuito che perfora l'arteria Epatica vengono raccolti ogni ora campioni di liquido per le valutazioni ematochimiche.

Nella macchina a perfusione continua subnormotermica, come liquido di perfusione, è utilizzata la soluzione Celsior.

Il pH del liquido circolante viene monitorato ogni ora con l'emogas analisi.

COLD STORAGE

Nel Gruppo B, dopo la cannulazione dell'aorta e la fase dell'emorecupero il fegato del maiale viene perfuso in situ con 3 litri di Celsior a 4°C attraverso l'aorta. Dopo epatectomia il graft viene ulteriormente perfuso con un litro della stessa perfusione e conservato sempre a 4°C per sei ore in un contenitore per organi. Trascorse le sei ore il fegato viene rimosso dal suo contenitore e posto

nella Machine Perfusion per due ore alla temperatura di 37°C con sangue autologo.

REWARMING

La fase di rewarming consiste nella riperfusione dell'organo, dopo le sei ore di conservazione, con sangue autologo del maiale a temperatura di 37°C per un periodo di due ore (vedere foto 4). Il circuito impiegato è sempre quello della Machine Perfusion normotermica. I flussi arterioso e portale sono simili a quelli utilizzati nel gruppo di studio A.

Questa fase dell'esperimento è di fondamentale importanza per la raccolta di campioni ematici e di biopsie per valutare il danno a cui il fegato è stato esposto durante la conservazione e durante la stessa riperfusione.

VALUTAZIONE DEL DANNO EPATICO

- Esami di Laboratorio

Durante le sei ore di perfusione e le seguenti due di rewarming sono stati presi campioni di sangue dal circuito per sottoporli ad analisi di laboratorio.

Ogni ora sono stati valutati:

- AST e ALT (indici di citolisi degli epatociti);
- LDH (altro parametro che valuta il danno epatocitario);
- γ GT e ALP (indici di colestasi)
- Lattati (indici di capacità di detossificazione del fegato);
- Bilirubina

- Elettroliti (K⁺e Na⁺)
- Il-1, Il-6, TNF α

Per il dosaggio delle interleuchine ogni campione è stato centrifugato per 5 minuti a 4000 giri, una aliquota di siero è stata immediatamente separata e conservata a -20°C. Nel momento dell'analisi il siero è stato scongelato, agitato e dosato con IMMULITE 1000 *system* chemiluminescenza.

- Valutazione isto-patologica

Da ciascun fegato, è stato ottenuto un campione biotico cuneiforme in ognuno dei seguenti momenti:

- Ti: biopsia all'inizio dell'esperimento
- T0MP: biopsia inizio MP
- T MP: biopsia fine MP
- T CS: biopsia fine CS
- TRew 60: biopsia a 60 minuti dalla ri-perfusione
- TRew120: biopsia a 120 minuti dalla ri-perfusione

Le biopsie sono state immediatamente fissate in formalina al 4%, incluse in paraffina e colorate con Ematossilina-Eosina. Da ciascuna inclusione, sono state ottenute 2 sezioni e tutti i preparati istologici sono stati esaminati alla cieca da un patologo con esperienza in campo epato-patologico.

Il grado del danno da ischemia-ri-perfusione è stato espresso attraverso l'utilizzo di un sistema di *score* multiparametrico, già validato, basato sulla valutazione di 3 alterazioni morfologiche:

a) Vacuolizzazione epatocellulare:

I vacuoli sono strutture sferiche localizzate nel citoplasma, delimitate da membrana e contenenti materiale amorfo (non grasso, citosol od organelli cellulari). È stato dimostrato che essi sono espressione della severità del danno epatocellulare indotto dalla ischemia calda. La precisa etiologia dei vacuoli non è ancora completamente chiarita ma si ipotizza un ruolo della anossia e della elevata pressione venosa intra-epatica *post-mortem* come fattori critici per il loro sviluppo.

La vacuolizzazione è stata definita come:

- micro-vescicolare quando la dimensione dei vacuoli è inferiore a quella del nucleo dell'epatocita;
- medio-vescicolare quando il vacuolo ha circa le stesse dimensioni del nucleo;
- macro-vescicolare quando il vacuolo occupa oltre la metà del citoplasma dislocando eccentricamente il nucleo.

b) Congestione vascolare: definita come stasi di emazie all'interno dei sinusoidi e dei vasi portali e centroacinari e/o dilagamento ematico intraparenchimale (secondario a rottura delle pareti vascolari).

c) Necrosi epatocitaria: definita come assenza di epatociti (secondaria alla ischemia).

A ciascuno dei tre parametri morfologici, è stato attribuito un punteggio progressivo a seconda della loro estensione (i.e. gravità):

- Vacuolizzazione: da 0 a 3

- Congestione: da 0 a 3

- Necrosi epatocitaria: da 0 a 2

Lo *score* finale complessivo, derivante dalla somma dei punteggi attribuiti alle singole variabili, è compreso tra 0 e 8.

Parameter		Location Within Lobulus	Score
1. Vacuolation	No vacuoles		0
	Microvesicular	Acinar zone 3 or zones 3 and 2	1
	Microvesicular to mediovesicular		
	Mediovesicular	Acinar zones 3, 2, and 1 (panlobular)	2
	Mediovesicular to macrovesicular	Acinar zones 3, 2, and 1 (panlobular)	3
2. Congestion	Macrovesicular		
	No congestion		0
	Focal sinusoidal congestion		1
	Patchy sinusoidal congestion	<50% of the slide	2
		>50% of the slide	3
3. Cell dropout	No cell dropout		0
	Group of cells		1
	Centrolobular necrosis		2

Poiché precedenti lavori hanno dimostrato che, tra i 3 parametri isto-patologici sopra considerati, la vacuolizzazione epatocitaria è quella più soggetta a variazioni nei diversi stadi di preservazione (consentendo così una migliore discriminazione della entità del danno nelle diverse fasi temporali), sono stati utilizzati due diversi metodi per la sua quantificazione:

- **un sistema di score semiquantitativo**: analogamente al sistema utilizzato per la valutazione della steatosi, la quantità di vacuoli intracellulari è stata espressa in percentuale sul totale del parenchima.

- *un sistema di analisi digitale di immagini* (metodo morfometrico): i vetrini sono stati analizzati con un *software di imaging* morfometrico attraverso la sovrapposizione di una griglia costituita da 748 punti di intersecazione che hanno individuato aree di 0,5 mm quadrati (lato di ogni area pari a 25 μ).

Il numero dei vacuoli che si sovrappongono alla griglia in corrispondenza dei punti di incrocio delle linee verticali e orizzontali della stessa sono stati contati da un osservatore ed espressi come numero assoluto e numero medio per unità di superficie. Per ogni vetrino, sono state eseguite dieci misurazioni in dieci campi diversi per un totale di 5 mm quadrati di area studiata per ogni biopsia.

L'utilizzo di due diversi sistemi per la valutazione della vacuolizzazione epatocitaria ha consentito di:

- a) verificare la accuratezza e riproducibilità dello score patologico semiquantitativo rispetto a metodi di quantificazione oggettivi;
- b) verificare il valore della vacuolizzazione come marcatore di danno epatocellulare associato al rischio di PNF.

6. ANALISI STATISTICA

I dati continui sono stati descritti mediante Media e Deviazione Standard (DS).

I gruppi di studio diversi sono stati confrontati utilizzando il test di ANOVA per misure ripetute. La significatività statistica è stata fissata per $p < 0,00001$.

7. RISULTATI

Per la valutazione della funzionalità epatica abbiamo preso in considerazione parametri biochimici ed istopatologici.

Tra gli esami biochimici abbiamo valutato l'andamento di AST, LDH, acido lattico, IL-1, IL-6, TNF α .

- **Parametri ematochimici:** il dosaggio delle AST è stato maggiore nel gruppo B rispetto al gruppo A. In particolare la differenza è stata statisticamente significativa tra gruppo B e gruppo A a 30' ($p < 0.00001$), a 60' ($p < 0.00001$) e a 120' ($p < 0.00001$) dal rewarming (vedere grafico 2).

Il valore dell'LDH è stato significativamente maggiore nel gruppo B rispetto al gruppo A a 120' dal rewarming ($p < 0.00001$) (vedere grafico 3).

Il comportamento dell'acido lattico è rimasto stazionario nel gruppo A sia durante la Machine Perfusion che nelle due successive ore di rewarming. Nel gruppo B si è riscontrato un valore di acido lattico più elevato rispetto al gruppo A alla fine delle 6 ore di Cold Storage ed ha subito un aumento moderato al termine dei 120' di rewarming ($p < 0.00001$) (vedere grafico 1).

Il dosaggio delle interleuchine non è stato mai significativo. In particolare IL-1 ha sempre mostrato un valore < 5 e IL-6 < 2 sia durante la preservazione che al successivo rewarming. TNF-a ha mostrato valori che saranno oggetto di future valutazioni.

- **Parametri istopatologici:** i campionamenti biotici eseguiti su tessuto sono stati valutati mediante biopsia ottica tradizionale valutando come parametri di danno la presenza di congestione, necrosi e vacuolizzazione nei vari preparati istopatologici. Tra i parametri più sensibili per determinare il danno da ischemia calda abbiamo valutato la presenza della vacuolizzazione, mentre per la determinazione del danno da ischemia-riperfusion abbiamo preso in considerazione la presenza di necrosi e congestione valutati secondo parametri semiquantitativi.

La percentuale di vacuolizzazione, valutata con *score* patologico semiquantitativo, è risultata significativamente differente nelle biopsie dei due gruppi; in particolare a 120 minuti dal rewarming è risultata inferiore nel gruppo A rispetto al gruppo B (44% vs 60%).

Negli animali del gruppo A, sono stati ritrovati rari isolati focolai di necrosi a 120 minuti dal rewarming (vedere foto 16), mentre negli animali del gruppo B si è osservata diffusa necrosi centroacinare (vedere foto 15).

Anche per quanto riguarda la congestione a due ore dal rewarming i fegati del gruppo A hanno evidenziato una congestione focale minima, mentre quelli del gruppo B hanno evidenziato congestione diffusa.

Lo *score* patologico multiparametrico derivante dalla somma di vacuolizzazione, congestione e necrosi epatocellulare è risultato più elevato nel gruppo B rispetto al Gruppo A a 120' dal rewarming (B vs A = 7 versus 3,5 vedi tabella 4).

L'analisi digitale di immagine eseguita sulle biopsie dei due gruppi ha dimostrato una significativa differenza tra il numero (assoluto e medio) dei

vacuoli sia al termine della preservazione che al termine del rewarming ($p < 0.00001$) (vedere grafico 4). Inoltre, nel gruppo A, il numero dei vacuoli documentati nelle biopsie ottenute subito dopo la machine perfusion risulta significativamente ridotto rispetto al numero dei vacuoli contati nelle biopsie ottenute al termine della fase di ischemia calda ($p < 0.00001$); diversamente, nel gruppo B non si evidenzia nessuna differenza significativa.

8. DISCUSSIONE

Il trapianto di fegato rappresenta, al giorno d'oggi, il gold standard per il trattamento delle epatopatie ad evoluzione cronica (cirrosi post-necrotica virale, cirrosi alcolica, cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante, cirrosi autoimmune, neoplasie epatiche primitive, epatiti acute fulminanti ed epatopatie da causa metabolica).

Il primo trapianto di fegato sull'uomo fu eseguito da T.E. Starzl il 1 marzo 1963 a Denver in Colorado, su un bambino di tre anni affetto da atresia delle vie biliari. Questa prima esperienza, purtroppo, non fu coronata da successo e il bambino morì durante l'atto operatorio. Dopo un primo periodo di sconforto, che aveva indotto lo stesso Starzl ad abbandonare il progetto di trapianto epatico, si giunse al 1967 allorché la stessa équipe coordinata magistralmente dal Prof. Starzl, eseguì un nuovo trapianto su una bimba di un anno e mezzo. Questa volta la piccola paziente sopravvisse per 13 mesi.

Da allora i costanti progressi che si sono ripetutamente susseguiti in ambito tecnico/tecnologico oltre che in ambito farmacologico, anestesiologicalo e gestionale-organizzativo, hanno notevolmente migliorato la sopravvivenza dei pazienti sottoposti a trapianto ortotopico di fegato sia in termini di qualità che di quantità di vita. Basti pensare che se nel periodo compreso tra il 1963 e il 1970, la sopravvivenza ad un anno era circa del 24%, negli adulti oggi nell'U.O di Chirurgia Epatobiliare e Trapianto Epatico dell'Università degli Studi di Padova, diretta dal Prof. Umberto Cillo, supera il 90%.

Nonostante questo dato sia estremamente incoraggiante, una percentuale non trascurabile di pazienti (oltre il 7%) decede in attesa di ricevere un trapianto. Se, infatti, negli ultimi anni si è verificato un aumento delle risorse di donazioni, ancora ampio rimane il divario tra la richiesta di trapianto e la disponibilità di organi offerti.

Dati recenti indicano che, in Italia un milione sono i casi di infezione da HBV e un milione e mezzo i casi di infezione da HCV con 21.000 decessi/anno per epatopatia cronica terminale.

Secondo i dati forniti dal CNT (Centro Nazionale Trapianti), al 30 novembre 2013 sono stati eseguiti poco meno di mille trapianti di fegato in Italia, ma oltre 1300 sono state le nuove iscrizioni in lista d'attesa per trapianto.

Nell'ultima decade questo scottante problema ha portato a seguire diverse politiche allo scopo di aumentare il pool di donatori effettivamente disponibili per trapianto e questo attraverso soluzioni tecniche come il trapianto di fegato da donatore vivente e lo split-liver, nonché attraverso il ricorso sempre più esasperato a quei donatori definiti come *extended criteria donors* un tempo considerati non idonei alla donazione per età (superiore a 70 anni), per steatosi (superiore al 30%), per degenza in terapia intensiva (superiore a 7 giorni), per impiego di amine a dosaggi sovramassimali (dopamina, dobutamina, noradrenalina), per presenza di virus (HCV+, HBV+).

La possibilità di poter ricorrere ai donatori marginali è stata resa possibile dall'affinamento delle metodiche di preservazione del graft e dallo studio del danno da ischemia-riperfusion nel tentativo di comprenderne la sua

fisiopatologia e allestire soluzioni e sistemi di perfusione/preservazione sempre più efficaci.

Il Cold Storage è sicuramente, ancor oggi, l'unica valida metodica di preservazione del graft per trapianto epatico nell'uomo. Tale metodica consiste nel lavaggio epatico intravascolare con una soluzione di preservazione a 4°C a volumi variabili a seconda della soluzione impiegata (Celsior, UW, HTK). Il fegato così perfuso viene mantenuto immerso nella medesima soluzione di preservazione a 4°C fino al momento dell'impianto. Il graft epatico può essere mantenuto in queste condizioni (ischemia fredda) per un periodo massimo di 20 ore.

E' evidente che la percentuale di ripresa non ottimale del graft dopo trapianto (PDF, Primary Dysfunction) aumenta in maniera esponenziale con l'aumento del tempo di ischemia fredda e, soprattutto, è ancora maggiore se ad essere utilizzati sono quei donatori marginali nel tentativo di espandere il pool dei donatori.

Un gruppo molto vasto di questi *extended criteria donors* è costituito dai donatori a cuore non battente o NHBD il cui impiego permetterebbe di avere un incremento nel numero degli organi disponibili pari al 10%.

Il prelievo di organi da NHBD non è un concetto del tutto nuovo. Prima del 1968, anno in cui il Comitato creato ad hoc dall'Harvard Medical School definì i criteri di morte cerebrale, la quasi totalità delle donazioni d'organo provenivano proprio dai donatori a cuore non battente. Dopo quella data divenne routinario il ricorso ad organi provenienti da donatori a cuore battente che erano in grado di garantire migliori risultati sia in termini di mortalità e

morbilità, che di patient e graft survival. In Giappone il mancato riconoscimento della morte cerebrale, ha garantito il ricorso ai NHBD per un lungo periodo.

Nonostante il rinato interesse verso i NHBD, i dati riguardo i tassi di rischio di PNF, graft e patient survival sono contrastanti tra le diverse casistiche dei pochi centri selezionati nel mondo che eseguono il trapianto secondo questa tecnica.

Il problema sostanziale di questi donatori è l'esposizione degli organi a tempi prolungati di ischemia calda che, provocando in essi una rapida deplezione dell'ATP, ne sconsigliano l'utilizzo e possono portare all'insorgere di PNF, e stenosi biliari di tipo ischemico nei pazienti trapiantati; sappiamo infatti che il fegato è molto sensibile a questa situazione e riesce a sopportare solo brevi tempi di ischemia calda.

Muiesan ed al hanno riportato la loro casistica di trapianto di fegato utilizzando NHBD controllati. Su 32 pazienti trapiantati (uno con tecnica split), tutti gli organi hanno evidenziato una buona funzionalità precoce, è stata osservata solo una PNF nello split. Si sono verificati 4 decessi secondari a danni cerebrali ischemici, sepsi biliare, rigetto cronico e MOF secondaria a re-trapianto nell'unico caso di PNF. La sopravvivenza globale del graft e del paziente sono risultate pari all'84% e all'87% rispettivamente, con una mediana di follow-up di 15 mesi. Questi dati hanno confermato che l'utilizzo di NHBD rappresenta una valida alternativa, ma sono mandatori un'attenta selezione del donatore e brevi tempi di ischemia fredda.

Uno studio del gruppo della *Wisconsin University*, sul trapianto di fegato utilizzando non NHBD è stato condotto su una casistica di 36 NHBD e

confrontando i dati con quelli di donatori convenzionali. I tassi di complicanze biliari, ed in particolare le stenosi su base ischemica, si sono rivelati più alti nei NHBD a un anno (33% vs 10%) e a 3 anni (37% vs 12%). La percentuale di PNF è stata simile nei due gruppi. La sopravvivenza del paziente a 1 anno (80% vs 91%) e a 3 anni (68% vs 84%) è stata significativamente minore nel gruppo NHBD. Allo stesso modo la graft survival a 1 anno (67% vs 86%) e a 3 anni (56% vs 80 %) si è rivelata significativamente minore nei NHBD.

La Machine Perfusion è stata proposta come possibile tecnica di preservazione di questi graft, perché in grado di ristabilire nelle cellule le necessarie scorte energetiche per la ripresa di funzionalità dopo trapianto.

Molti sono stati i gruppi di ricercatori coinvolti in questa direzione, progettando e sperimentando modelli di macchina a perfusione continua sia ipotermica che normotermica i quali sono stati in grado di dimostrare la possibilità di “resuscitare” questi organi sia nel piccolo che nel grande animale.

La Machine Perfusion normotermica epatica è stata già studiata nelle fasi precoci dello sviluppo dei sistemi di preservazione epatici. La difficoltà maggiore, era rappresentata dalla necessità di ottenere un carrier in grado di apportare un'adeguata quantità di ossigeno, senza causare danni al microcircolo.

Uno studio recente ha dimostrato la fattibilità di una machine perfusion normotermica epatica utilizzando sangue autologo e nutrienti adeguati per un periodo fino a 72 ore.

Per quanto riguarda le vie e le pressioni di perfusione a livello sperimentale nei maiali si effettua attraverso la doppia cannulazione dell'arteria epatica e della

vena porta, mentre nei ratti si preferisce la sola perfusione portale. In entrambe i modelli le pressioni di perfusione sono aggiustate a valori fisiologici (7-10 mm Hg per la vena porta, e 90-100 mm Hg per l'arteria epatica).

La perfusione ossigenata normotermica di graft epatici di suini esposti a tempi di ischemia calda di 60 min ha determinato la sopravvivenza del ricevente, in contrapposizione ai fegati non trattati.

Un recente studio spagnolo ha dimostrato la possibilità di resuscitare fegati di NHBD umani applicando la perfusione normotermica immediatamente dopo l'ischemia calda. I NHBD (8 minuti dopo l'arresto cardiaco) sono stati trasportati eseguendo manovre rianimatorie, sottoposti a rapida cannulazione dei vasi femorali e preservati mediante perfusione normotermica ossigenata in situ con sangue autologo eparinizzato; cinque dei dieci riceventi hanno avuto una discreta sopravvivenza.

Il concetto centrale che sta alla base della machine perfusion normotermica è quello di mantenere la normale funzionalità epatica durante la preservazione per consentire l'immediata ripresa funzionale del graft.

Due studi sperimentali sono stati condotti sul maiale per mimare al meglio la tempistica del trapianto di fegato da NHBD. Un tempo di ischemia calda di 60 min è stato seguito da un tempo di Cold Storage rispettivamente di 1 e 4 ore (i tempi medi per il trasporto dell'organo dalla sede del prelievo a quella del trapianto). Successivamente gli organi sono stati preservati mediante machine perfusion normotermica, che tuttavia dopo la combinazione di ischemia calda e fredda si è dimostrata inefficace nel resuscitare tali organi.

Il vantaggio della machine perfusion normotermica è rappresentato dalla capacità di determinare la *viability* del graft epatico durante la preservazione attraverso l'analisi della produzione biliare, del consumo di ossigeno, della produzione di urea e del rilascio di enzimi citolitici. Tra l'altro, in teoria, i graft epatici potrebbero essere preservati per più giorni senza il rischio di danni per l'organo.

Lo svantaggio maggiore è legato al fatto che la machine perfusion normotermica sembra esplicare il suo ruolo protettivo solo in assenza di esposizione al cold storage.

L'applicazione della perfusione ipotermica ossigenata (HOPE) si fonda sul concetto che la produzione di energia attraverso la catena mitocondriale è presente anche a temperature basse. Il valore dell'HOPE appare più evidente se si considera il ruolo centrale dei mitocondri nella mediazione del danno da ischemia-riperfusion.

Diverse vie di perfusione sono state testate per la machine perfusion ipotermica. La perfusione continua ipotermica per 72 ore di fegati porcini attraverso la sola vena porta ha determinato una buona qualità dell'organo.

Un target critico del danno da preservazione fredda è rappresentato dalle cellule endoteliali dei sinusoidi. Le condizioni di perfusione devono essere gestite con molta cautela e molti studi sono condotti con pressioni basse di 3-4 mmHg nella vena porta e 30-40 mm Hg nell'arteria epatica. Sperimentalmente sono state realizzate sia perfusioni a flusso costante, che perfusioni a pressione costante. L'applicazione prolungata di un flusso costante in corso di ipotermia danneggia le cellule endoteliali sinusoidali a causa dell'incremento delle

resistenze vascolari e dello *shear stress*. La perfusione portale ipotermica a pressione costante con valori pressori del 25% rispetto alle condizioni di normotermia determina una completa perfusione del fegato, senza induzione di danno endoteliale.

L'apporto di ossigeno durante la perfusione consente all'organo di ripristinare le riserve energetiche tissutali. Anche brevi periodi di HOPE sia durante, che dopo lunga preservazione su fegati di ratti incrementano significativamente le scorte energetiche ed il contenuto di glicogeno.

Studi di risonanza magnetica su fegati di maiali hanno evidenziato che i segnali dell'ATP erano assenti quando i graft venivano preservati mediante cold storage, invece in quelli sottoposti a pochi minuti di HOPE, il segnale dell'ATP epatico era evidenziabile.

Pochi studi comparano la machine ipotermica non ossigenata con l'HOPE; tuttavia tutti suggeriscono il continuo supporto di ossigeno per una machine perfusion ipotermica efficace.

I meccanismi di protezione attraverso i quali agisce la machine perfusion ipotermica implicano vie differenti. In particolare la respirazione mitocondriale è riattivata in quanto la HOPE ossida i complessi di elettroni mitocondriali prima del rewarming e della riperfusione. Dopo la riperfusione l'overload di elettroni mitocondriali sembra essere prevenuto con una ridotta produzione di specie libere dell'ossigeno (ROS), fatto già mostrato su fegati di ratto attraverso una ridotta perossidazione lipidica ed il mantenimento delle riserve cellulari di glutazione.

Altri studi suggeriscono che durante l'ischemia calda e fredda si determina un danno a carico del reticolo endoplasmatico sinusoidale. La deficienza di ATP può favorire la fuoriuscita di Calcio dal reticolo endoplasmatico al citosol, determinando il disassemblaggio dell'actina ed il rilascio di metalloproteasi (MMP). Ciò a sua volta porta all'espressione di fattore di von Willerbrand, e molecole di adesione intercellulare quali ICAM-1 sulla superficie dei sinusoidi. La HOPE, con soluzione UW o HTK, si è dimostrata in grado di ridurre non solo la deplezione di ATP, ma di inibire anche l'attivazione delle MMP, probabilmente come risultato dell'azione specifica del lattobionato e dell'istidina. Queste osservazioni sono correlate con cambiamenti evidenti dell'aspetto dell'endotelio sinusoidale dopo brevi periodi di preservazione in machine perfusion ipotermica di fegati di ratti ottenuti da NHBD e sottoposti a cold storage.

In letteratura, diversi sono gli studi sperimentali sul trapianto che riguardano la HOPE.

Guarrera e al hanno condotto uno studio su fegati di maiali confrontando due gruppi di organi: uno preservato mediante 5 ore di CS ed uno mediante 5 ore di HOPE. La funzionalità epatica post trapianto si è dimostrata comparabile nei due gruppi, e tutti gli animali sono sopravvissuti per 5 giorni. Pienaar ha riportato con successo una perfusione continua ipotermica di fegati di cani per 72 ore. Sette cani su otto sono sopravvissuti al trapianto.

Lee ed al hanno dimostrato ulteriormente i benefici della machine perfusione ipotermica attraverso uno studio sul trapianto di fegato nel ratto. Infatti

l'esecuzione della HOPE per 5 ore dopo 30 min di ischemia calda ha determinato la sopravvivenza di 6 ratti su 6 dopo il trapianto.

La forza della machine perfusion ipotermica sta nella sua capacità di ripristinare la funzionalità degli epatociti e delle cellule sinusoidali in condizioni non fisiologiche. Lo svantaggio è legato al fatto che durante la perfusione fredda si ha un incremento delle resistenze vascolari, tempo dipendente, che può aumentare l'entità del danno all'endotelio sinusoidale ed al reticolo endoplasmatico, specialmente quando la perfusione supera le 18 ore.

Sull'evidenza di tali dati Guarrera ed al nel 2010 hanno riportato la prima serie clinica di fegati umani preservati mediante machine perfusion ipotermica. Lo studio è basato su 20 casi di trapianto di fegato, preservato mediante machine perfusion ipotermica per un periodo variabile tra 3 e 7 ore, confrontati con una coorte di pazienti in cui il fegato è stato preservato mediante cold storage. In entrambi i gruppi non ci sono stati casi di PNF. I tassi di early graft dysfunction sono stati del 5% nel gruppo di studio e del 25% nel gruppo di controllo in cold storage. I parametri biochimici di funzionalità epatica sono stati significativamente più bassi nel gruppo di studio.

Diversi studi del nostro gruppo condotti in collaborazione con l'Università di Pavia, hanno evidenziato come la perfusione continua di graft epatici steatosici, sia sul grande che sul piccolo animale, in condizioni di subnormotermia (20°C) si sia dimostrata più efficace nel mantenere una buona qualità dell'organo in termini di performance biochimica, produzione biliare ed assenza di necrosi alla valutazione istopatologica rispetto alla perfusione normotermica ed a quella ipotermica.

Uno studio preliminare di *temperature finding* condotto sui ratti ha dimostrato la maggiore efficacia della preservazione in Machine Perfusion a 20°C rispetto a quella a 4°C, 10°C, 25°C, 30°C e 37°C.

Sulla base di tali conoscenze abbiamo voluto sviluppare un nostro modello di machine perfusion subnormotermica (20°C), per la preservazione di fegati ottenuti da NHBD con un tempo di ischemia calda di 60 minuti, per valutare se la perfusione continua a 20°C fosse in grado di “resuscitare” tali organi, così come abbiamo dimostrato nei fegati steatosici; ulteriore scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare diversi biomarcatori in grado di predire la ripresa funzionale del graft.

Abbiamo quindi testato il fegato suino in Machine perfusion a 20°C ed in cold storage a 4°C. Quest’ultimo costituisce il metodo di preservazione standard, uniformemente utilizzato nell’attuale pratica clinica, e per noi il gruppo di controllo.

Abbiamo utilizzato un modello di Machine perfusion già collaudato ed utilizzato in nostri precedenti esperimenti, che trae spunto dal sistema ideato e realizzato da Belzer, che si basa sulla cannulazione dell’arteria epatica, della vena porta e della vena cava sottoepatica.

Come soluzione di perfusione abbiamo utilizzato, come altri gruppi, la soluzione di Celsior che è facilmente disponibile con dei prezzi più contenuti rispetto ad altre soluzioni per machine perfusion, garantendo comunque buoni risultati.

Per ottenere un modello suino di NHBD, dopo preparazione ed intubazione del maiale, abbiamo indotto un arresto respiratorio nell'animale, attraverso la deconnessione dello stesso dal respiratore.

Per mimare il trapianto dell'organo conservato, abbiamo sottoposto i graft dei vari gruppi di studio a due ore di rewarming a 37°C e ne abbiamo valutato il comportamento.

La performance biochimica osservata nel gruppo di studio in Machine Perfusion è migliore per quanto riguarda AST, ALT, LDH e acido lattico sia nella perfusione che nel rewarming, dimostrando una significativa differenza con il Cold Storage che viceversa dà risultati meno soddisfacenti (vedere grafici 1,2,3)

Anche l'analisi dei preparati istologici ha evidenziato l'effettiva capacità della Machine perfusion subnormotermica di resuscitare i graft ottenuti da NHBD in quanto la percentuale di vacuolizzazione valutata secondo diversi metodi è risultata inferiore a due ore dalla riperfusione nei fegati trattati con MP. Ancora più interessante è stato valutare come tale differenza sia già ben evidente alla fine della preservazione e venga confermata a due ore dalla riperfusione (vedere foto11, 12, 13, 14, 15, 16).

Il dosaggio di AST, ALT, Acido lattico ed LDH si è dimostrato essere un parametro attendibile per la valutazione del danno d'organo e della ripresa funzionale del graft epatico. Il dosaggio di citochine quali IL1, IL6, TNf alfa non ha mostrato alcuna significatività.

9. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Il modello sperimentale da noi proposto si è dimostrato di facile esecuzione tecnica e facile riproducibilità. Il *rewarming* con sangue ossigenato a 37°C mima la reale condizione della riperfusione dopo impianto del fegato evitando di dover ricorrere al trapianto riducendo, in tal modo, immaginabili problematiche legate a *bias* chirurgici e risorse economiche.

La scelta del maiale come animale per l'esperimento è stata fondamentale legata alla sua affinità anatomica e fisiologica con l'uomo. La scelta del NHBD come modello di donatore sub-ottimale è stata, invece, proposta per la sua rapida e semplice disponibilità. Dopo circa 10 minuti dall'arresto del respiratore, infatti, è possibile osservare anomalie elettrocardiografiche che conducono all'*exitus* dell'animale in breve tempo. L'ischemia calda che ne consegue prima del prelievo degli organi rende il donatore sub-ottimale.

L'originalità di questo modello sperimentale è essenzialmente legata alla sua possibilità di poter testare nuovi biomarcatori, durante la fase di preservazione in MP, in grado di poter predire la ripresa funzionale del *graft* dopo trapianto e di poterne, quindi, testare la bontà prima dell'impianto stesso.

Numerose sostanze, infatti, sono recentemente oggetto di studio quali potenziali biomarcatori umorali di ripresa funzionale del *graft* dopo prelievo e preservazione del fegato. E' facilmente intuibile come, nell'era degli *extended*

criteria donors, l'opportunità di poter testare gli organi prima del trapianto, rappresentano un argomento di crescente interesse.

I passi successivi della nostra ricerca consisteranno nell'approfondimento delle problematiche connesse alla conservazione degli organi marginali ed in particolar modo di quelli steatosici.

L'ingegnerizzazione e la miniaturizzazione del nostro modello, insieme alla ricerca di strategie per minimizzare il danno da ischemia / riperfusione saranno fondamentali per approdare con successo alla pratica clinica.

10. ICONOGRAFIA

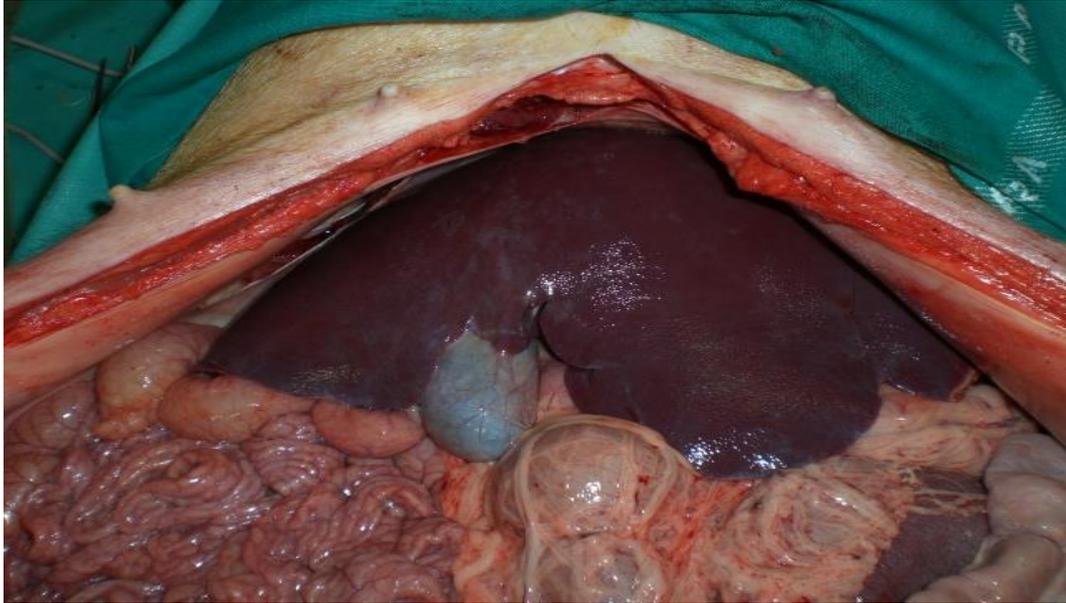


Foto 1: fegato di NHBD dopo 1 h di ischemia calda

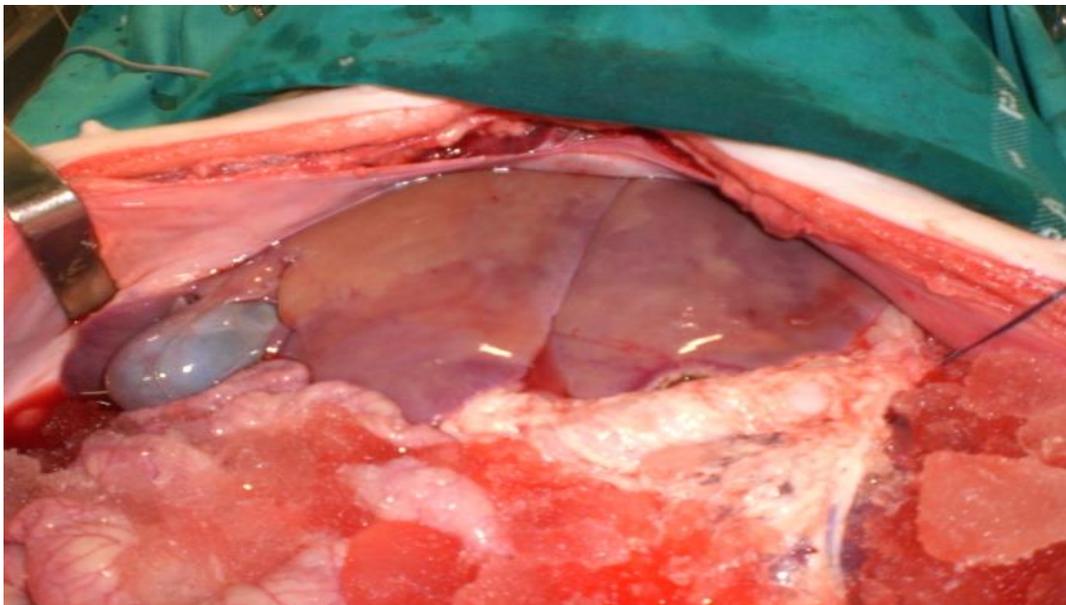


Foto 2: aspetto macroscopico del fegato dopo la perfusione

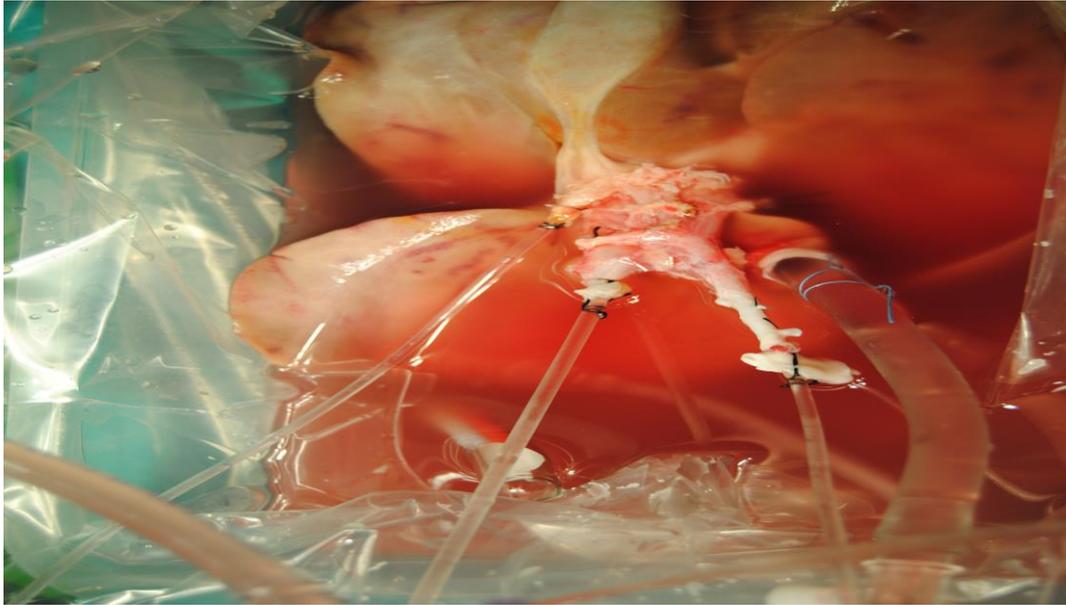


Foto 3: fegato in Machine perfusion, particolare delle cannule in arteria epatica, vena porta, vena cava sottoepatica e via biliare

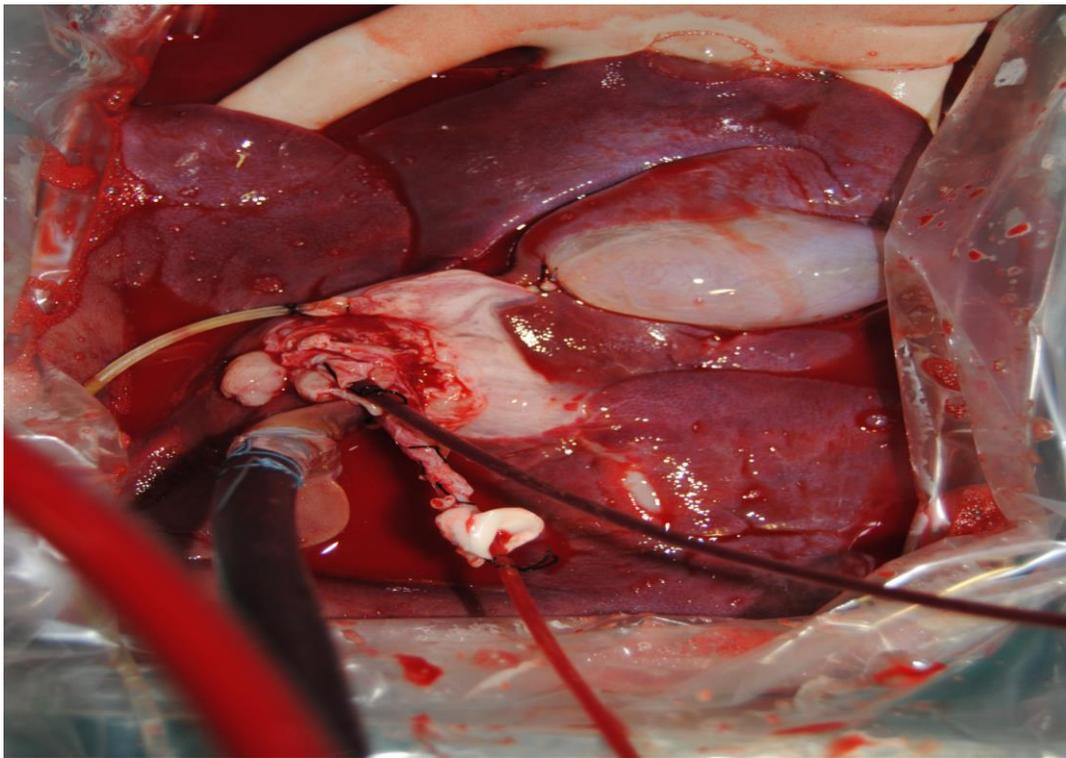


Foto 4: fegato in Machine perfusion durante il rearming



Foto 5: flussimetro Admac AE



Foto 6: pompa volumetrica rotativa Watson Marlow 505



Foto 7: ossigenatore pediatrico Lilliput 1 901



Foto 8: sistema per Machine perfusion

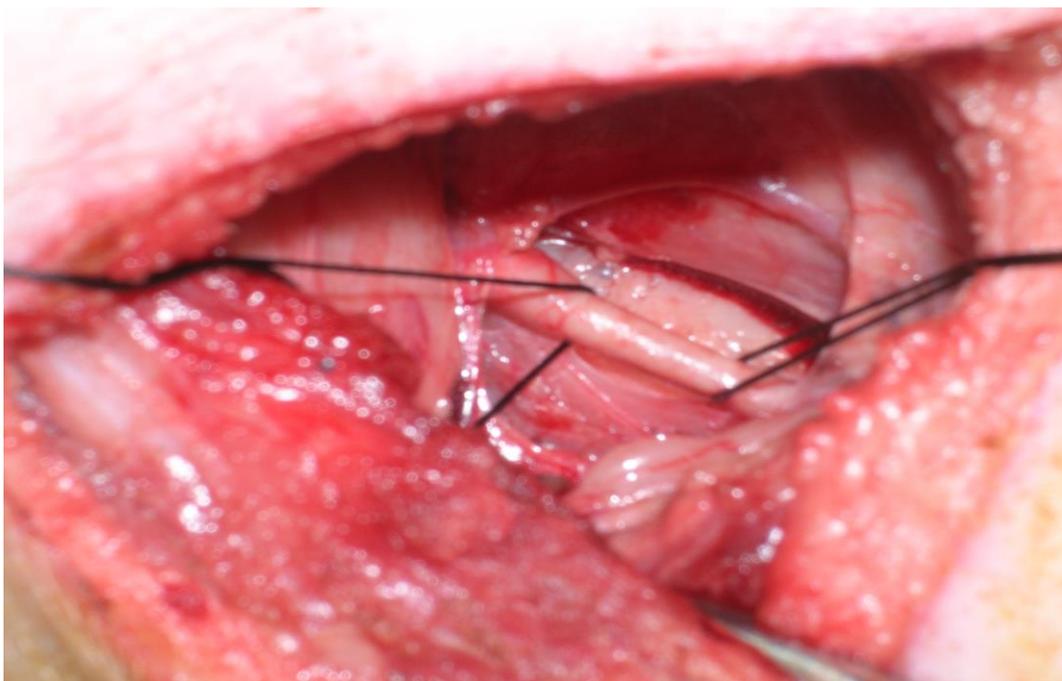


Foto9: isolamento della carotide

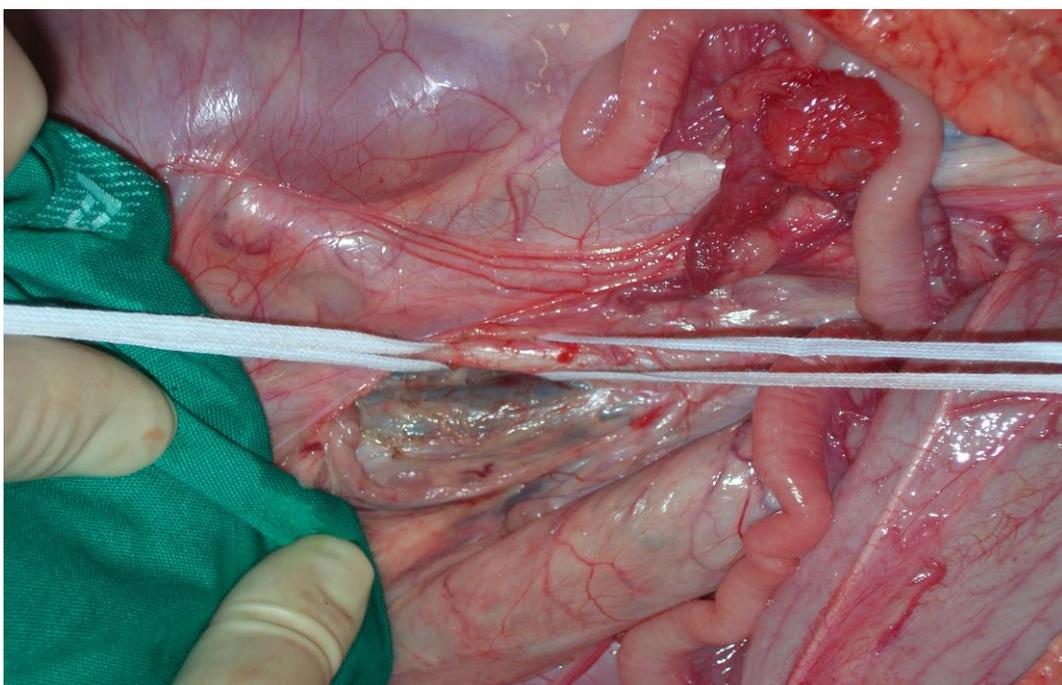


Foto 10: isolamento dell'aorta

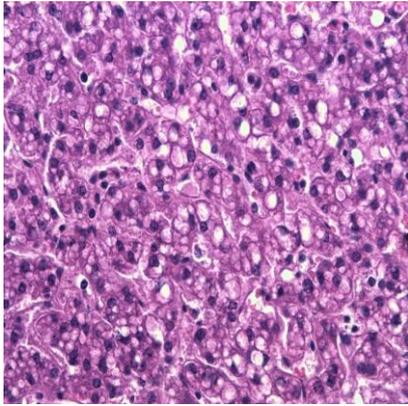


Foto 11: biopsia dopo 60' WIT+6hCS

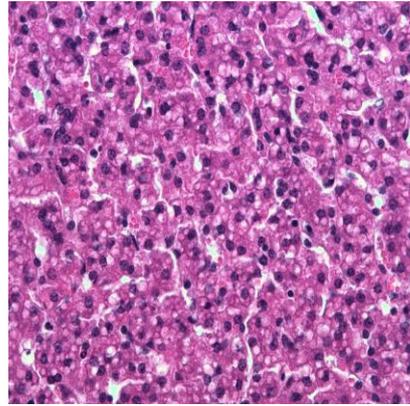


Foto 12: biopsia dopo 60' WIT+ 6h MP

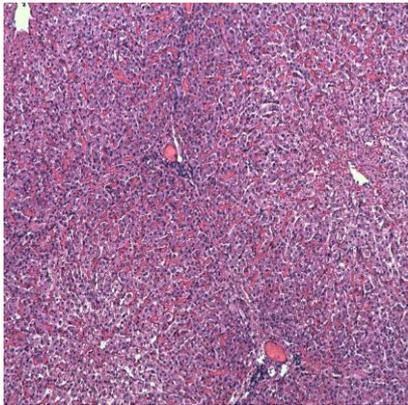


Foto 13: biopsia gruppo B a 60 min dal rewarming

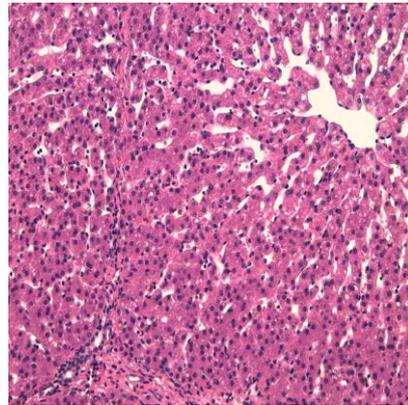


Foto 14: biopsia gruppo A a 60 min dal rewarming

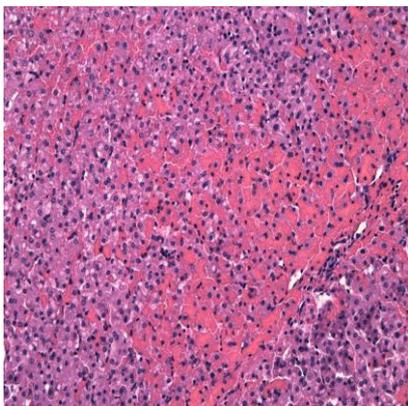


Foto 15: biopsia gruppo A a 120 min dal rewarming

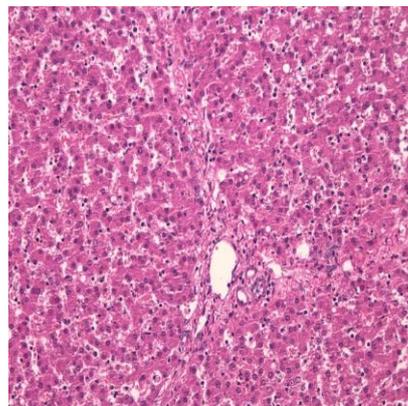


Foto 16: biopsia gruppo A a 120 min dal rewarming

11. GRAFICI E TABELLE

	MP	CS	P
AST	500,2 ± 213,6	5964 ± 2437	p<0.00001
LDH	1469 ± 350,7	11845 ± 2406	p<0.00001
Ac. Lattico	3,980 ± 1,427	9,36 ± 1,650	p<0.00001

Tab. 1 Andamento di AST, LDH e Ac. Lattico a 30' dal rewarming

	MP	CS	P
AST	495,6 ± 202,2	6834 ± 499,0	p<0.00001
LDH	1544 ± 305,0	12485 ± 2920	p<0.00001
Ac. Lattico	5,260 ± 3,047	10,04 ± 1,718	p<0.00001

Tab. 2 Andamento di AST, LDH e Ac. Lattico a 60' dal rewarming

	MP	CS	P
AST	499.0 ± 197,9	7648 ± 2806	p<0.00001
LDH	1685 ± 418,0	12998 ± 3039	p<0.00001
Ac. Lattico	4,780 ± 3,016	10,46 ± 1,787	p<0.00001

Tab. 3 Andamento di AST, LDH e Ac. Lattico a 120' dal rewarming

SCORE	T 0'	T 60'	T 120'
CS	3	4	7
MP	2.25	3.25	3.5

Tab.4 Confronto dello score anatomico-patologico tra i due gruppi

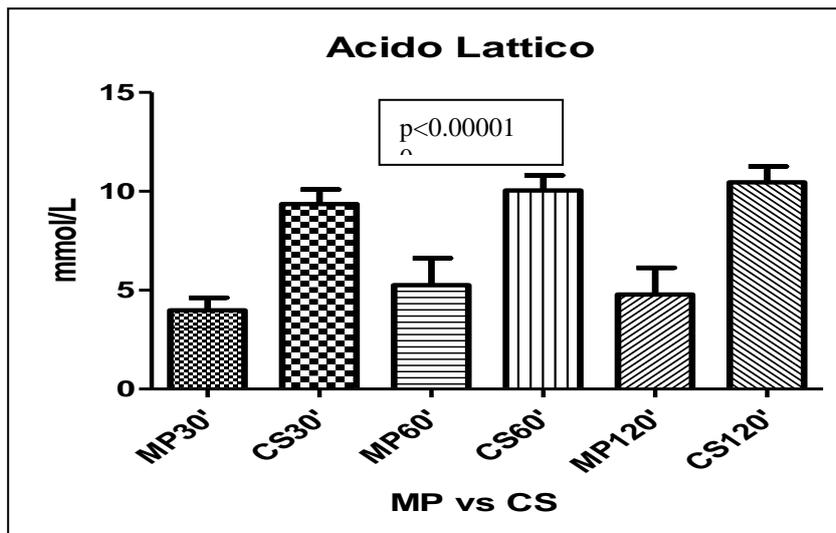


Grafico 1: andamento dell'ac.lattico a 30', 60', 120' minuti dal rewarming nei due gruppi

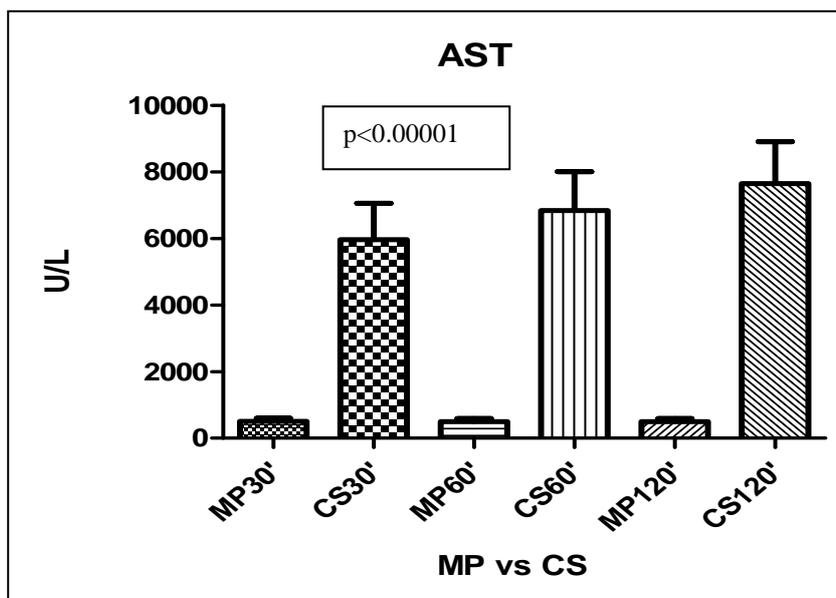


Grafico 2: andamento delle AST nei 2 gruppi a 30', 60', 120' dal rewarming

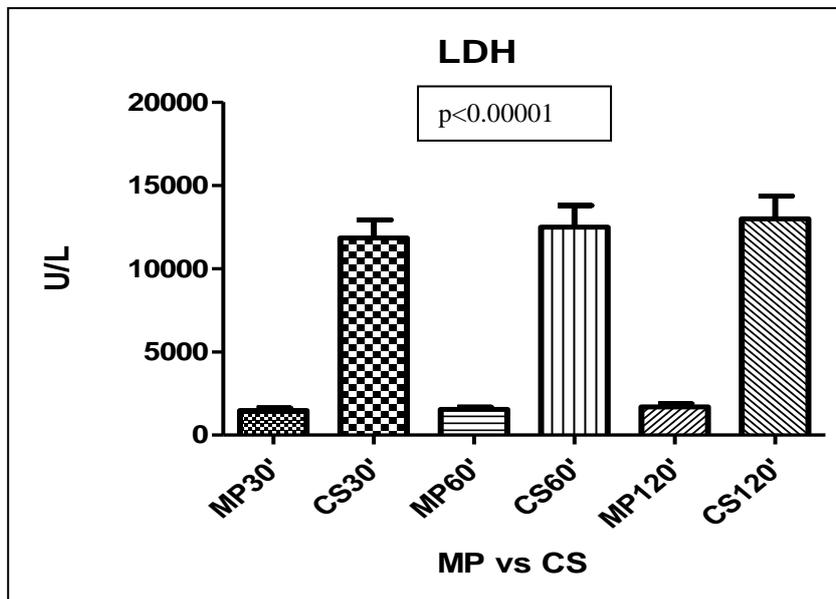


Grafico 3: andamento della LDH nei 2 gruppi a 30', 60', 120' dal rewarming

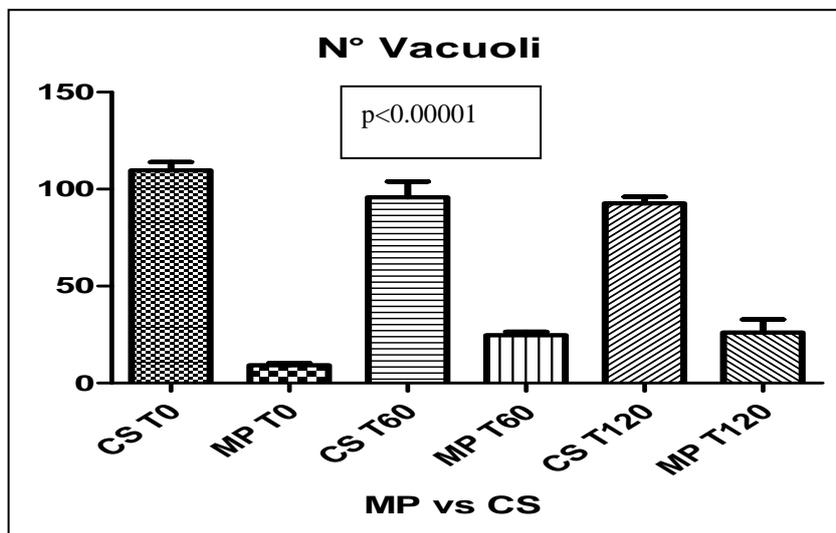


Grafico 4: numero di vacuoli per campo all'analisi di immagine digitale

12. BIBLIOGRAFIA

- Cameron AM, Ghobrial RM, Yersiz H, Farmer DG, Lipshutz GS, Gordon SA, et al. Optimal utilization of donor grafts with extended criteria: a single-center experience in over 1000 liver transplants. *Ann Surg* 2006;243:748-753; discussion 753-745.
- European Liver Transplant Registry. Available at: <http://www.eltr.org>. Accessed September 2013
- Kauffman HM, McBride MA, Cherikh WS, Spain PC, Delmonico FL. Transplant tumor registry: donors with central nervous system tumors. *Transplantation* 2002;73:579-582
- Buell JF, Alloway RR, Steve Woodle E, Trofe J, Sethuraman G, Hanaway MJ, et al. How can donors with a previous malignancy be evaluated? Donors with central nervous system malignancies: are they truly safe? *J Hepatol* 2006;45:503-507.
- Sampietro R, Goffette P, Danse E, De Reyck C, Roggen F, Ciccarelli O, et al. Extension of the adult hepatic allograft pool using split liver transplantation. *Acta Gastroenterol Belg* 2005;68:369-375.
- Humar A, Ramcharan T, Sielaff TD, Kandaswamy R, Gruessner RW, Lake JR, et al. Split liver transplantation for two adult recipients: an initial experience. *Am J Transplant* 2001;1:366-372.
- Merion RM, Rush SH, Dykstra DM, Goodrich N, Freeman RB Jr, Wolfe RA. Predicted lifetimes for adult and pediatric split liver versus adult whole liver transplant recipients. *Am J Transplant* 2004;4:1792-1797.
- Noujaim HM, Gunson B, Mayer DA, Mirza DF, Buckels JA, Candinas D, et al. Worth continuing doing ex situ liver graft splitting? A single-center analysis. *Am J Transplant* 2003;3:318-323.
- Shneider BL, Emre S. Pediatric liver transplantation: past, present, and future. *Liver Transpl* 2006; 12: 511-513
- Tanaka K. Progress and future in living donor liver transplantation. *Keio J Med* 2003; 52: 73-79
- Sugawara Y, Makuuchi M. Living donor liver transplantation: present status and recent advances. *Br Med Bull* 2005; 75:15-28
- Lo CM, Fan ST, Liu CL, Chan JK, Lam BK, Lau GK, Wei WI, Wong J. Minimum graft size for successful living donor liver transplantation. *Transplantation* 1999; 68: 1112-1116
- Ben-Haim M, Emre S, Fishbein TM, Sheiner PA, Bodian CA, Kim-Schluger L, Schwartz ME, Miller CM. Critical graft size in adult-to-adult living donor liver transplantation: impact of the recipient's disease. *Liver Transpl* 2001; 7: 948-953

- Ghobrial RM, Busuttil RW. Future of adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; 9: S73-S79
- Serracino – Inglott FS, Habib NA, Mathie R. Hepatic ischemia – reperfusion injury *Am J Surg*; 2001 181: 160 – 166
- Selzner N, Rudiger H, Graf O, Clavien PA Protective strategies against Ischemic Injury of the Liver. *Gastroenterology* 2003; 125:917-936
- Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield TE, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA Factors in the pathophysiology of the liver – ischemia reperfusion injury. *J Surg Res* 2008 June 1; 147 (1): 153-159
- Jaeschke H Molecular mechanisms of hepatic – ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G15-26
- Mc Cuskey RS Morphological mechanism for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver* 2000; 20: 3-7
- Ramalo FS, Fernandez-Monteiro IF, Rosello-Catafau J, Peralta C Hepatic microcirculatory failure. *Acta Cir Bras* 2006; 21 Suppl. 1
- Clemens MG, Zhang JX, Regulation of sinusoidal perfusion: in vivo methodology and control by endothelins. *Semin Liver Dis* 1999; 19:383-96
- Vollmar B, Richter S, Menger Md Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996; 270:G798-803
- Zhang JX, Jones DV, Clemens MG Effect of activation on neutrophil-induced hepatic microvascular injury in isolated rat liver. *Shock* 1994; 1:273-8
- Nakamura S, Nishiyama R, Serizawa A, Yokoi Y, Suzuki S, Konno H, Baba S, Muro H Hepatic release of endoyhelin-1 after warm ischemia. Reperfusion injury and its hemodynamic effect. *Transplantation* 1995; 59: 679-84
- Pannen BH New insights into the regulation of hepatic blood flow after ischemia and reperfusion. *Anesth Analg* 2002; 94: 1448-57
- Urakami A, Todo S, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishikazi N, Shimamura T, Totsuka E, Subbotin v, Lee R, Starzl TE Attenuation of ischemic liver injury by monoclonal anti-endothelin antibody, AwETN40. *J Am Coll Surg* 1997; 185; 358-64
- Shah V, Kamath PS Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl* 2003; 9: 1-11
- Peralta C, Rull R, Rimola A, Deulofeu R, Rosello.Catafau J, Gelpi E, Rodes J Endogenous nitric oxide and exogenous nitric oxide supplementation in hepatic ischemia – reperfusion injury in the rat. *Transplantation* 2001; 71: 529-36

- Pannen Bh, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998; 27: 755-64
- Kawachi S, Hines IN, Laroux FS, Hoffman J, Bharwani S, Gray L, Leffer D, Grisham MB Nitric oxide synthase and postischemic liver injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 276: 851-4
- Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, seok JH, Lee JH Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 917-22
- Glantzounis GK, Salcinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl* 2005; 11: 1031-47
- Teoh NC, Farrell GC Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanism and basis for hepatoprotection. *J Gastr Hepat* 2003; 18: 891-902
- St Peter SD, Imber CJ, Friend PJ. Liver and kidney preservation by perfusion. *Lancet* 2002;359:604–613.
- Garcia-Valdecasas JC, Tabet J, Valero R, Deulofeu R, Taura P, Rull R, et al. Evaluation of ischemic injury during liver procurement from non-heart-beating donors. *Eur Surg Res* 1999;31:447–456.
- Schon MR, Kollmar O, Wolf S, Schrem H, Matthes M, Akkoc N, et al. Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion. *Ann Surg* 2001;233:114–123.
- St Peter SD, Imber CJ, Lopez I, Hughes D, Friend PJ. Extended preservation of non-heart-beating donor livers with normothermic machine perfusion. *Br J Surg* 2002;89:609–616.
- Schon MR, Hunt CJ, Pegg DE, Wight DG. The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury. *Transplantation* 1993;56:24–31.
- Lee CY, Zhang JX, Jones JW Jr, Southard JH, Clemens MG. Functional recovery of preserved livers following warm ischemia: improvement by machine perfusion preservation. *Transplantation* 2002;74:944–951.
- Lee CY, Jain S, Duncan HM, Zhang JX, Jones JW, Jr., Southard JH, Clemens MG. Survival transplantation of preserved nonheart- beating donor rat livers: preservation by hypothermic machine perfusion. *Transplantation* 2003;76:1432–1436.
- Saad S, Minor T, Kotting M, Fu ZX, Hagn U, Paul A, Nagelschmidt M. Extension of ischemic tolerance of porcine livers by cold preservation including postconditioning with gaseous oxygen. *Transplantation* 2001;71:498–502.
- Ohwada S, Sunose Y, Aiba M, Tsutsumi H, Iwazaki S, Totsuka O, et al. Advantages of Celsior solution in graft preservation from non-heart-beating donors in a canine liver transplantation model. *J Surg Res* 2002;102:71–76.

- Abt P, Crawford M, Desai N, Markmann J, Olthoff K, Shaked A. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors: an increased incidence of biliary complications. *Transplantation* 2003; 75: 1659-1663
- Abt PL, Desai NM, Crawford MD, Forman LM, Markmann JW, Olthoff KM, Markmann JF. Survival following liver transplantation from non-heart-beating donors. *Ann Surg* 2004; 239: 87-92
- Reddy S, Zilvetti M, Brockmann J, McLaren A, Friend P. Liver transplantation from non-heart-beating donors: current status and future prospects. *Liver Transpl* 2004; 10: 1223-1232
- Balupuri S, Buckley P, Mohamad M, et al. Early results of a nonheartbeating donor (NHBD) program with machine perfusion. *Transpl Int.* 2000;13(suppl 1):255–258.
- Muiesan P, Ghirlanda R, Jassem W, Melendez H, O’Grady J, Bowles M, Rela M, Heaton N. Single-center experience with liver transplantation from controlled Non-Heartbeating donors- A viable source of grafts. *Ann Surg* 2005; 242 (5): 732-738
- Nocito A, El-Badry AM, Clavien PA. When is steatosis too much for transplantation? *J Hepatol* 2006; 45: 494–499.
- Merion RM, Goodrich NP, Feng S. How can we define expanded criteria for liver donors? *J Hepatol* 2006; 45: 484–488.
- Deshpande R, Heaton N. Can non-heart-beating donors replace cadaveric heart-beating liver donors? *J Hepatol* 2006; 45: 499–503.
- Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M. Selecting donor livers: Risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20: 829–838.
- Fuller BJ, Lee CY. Hypothermic perfusion preservation: The future of organ preservation revisited? *Cryobiology* 2007; 54: 129–145.
- van der Plaats A, ‘t Hart NA, Verkerke GJ, Leuvenink HGD, PlegRJ, Rakhorst G. Hypothermic machine perfusion in liver transplantation revisited: Concepts and criteria in the new millenium. *Ann Biomed Eng* 2004; 32: 623–631.
- Schreinemachers M-CJM, Doorschodt BM, van Gulik TM. Machine perfusion preservation of the liver: A worthwhile clinical activity? *Curr Opin Organ Transplant* 2007; 12: 224–230.
- Maathuis MH, Leuvenink HGD, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 2007; 83: 1289–1298.
- Butler AJ, Rees MA, Wight DG et al. Successful extracorporeal porcine liver perfusion for 72 hr. *Transplantation* 2002; 77: 1212–1218.
- Imber CJ, St Peter SD, de Cenarruzabeitia IL et al. Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation. *Transplantation* 2002; 73: 701–709.

- Vajdova K, Smrekova R, Mislanova C, Kukan M, Lutterova M. Cold preservation induced sensitivity of rat hepatocyte function to rewarming injury and its prevention by short-term reperfusion. *Hepatology* 2000; 32: 289–296.
- Iwane T, Akamatsu Y, Narita T, Nakamura A, Satomi S. The effect of perfusion prior to cold preservation and addition of biliverdin on the liver graft from non-heart-beating donors. *Transplantation Proc* 2006; 38: 3358–3361.
- Tolboom H, Pouw R, Uygun K et al. A model for normothermic preservation of the rat liver. *Tissue Eng* 2007; 13: 2143–2151.
- Fondevila C, Hessheimer AJ, Ruiz A et al. Liver transplant using donors after unexpected cardiac death: Novel preservation protocol and acceptance criteria. *Am J Transplant* 2007; 7: 1849–1855.
- Reddy SP, Bhattacharjya S, Maniakin N et al. Preservation of porcine non-heart beating donor livers by sequential cold storage and warm perfusion. *Transplantation* 2004; 77: 1328–1332.
- Reddy S, Greenwood J, Maniakin N et al. Non-heart beating donor porcine livers: The adverse effect of cooling. *Liver Transplant* 2005; 11: 35–38.
- Compagnon P, Clement B, Campion J, Boudjema K. Effects of hypothermic machine perfusion on rat liver function depending on the route of perfusion. *Transplantation* 2001; 72: 606–614.
- van der Plaats A, Maathuis MH, 't Hart NA et al. The Groningen hypothermic liver perfusion pump: Functional evaluation of a new machine perfusion system. *Ann Biomed Eng* 2006; 34: 1924–1934.
- 't Hart NA, van der Plaats A, Moers C et al. Development of the isolated dual perfused rat liver model as an improved reperfusion model for transplantation research. *Int J Artif Organs* 2006; 29: 219–227.
- Guarrera JV, Estevez J, Boykin J et al. Hypothermic machine perfusion of liver grafts for transplantation: Technical development in human discard and miniature swine models. *Transplant Proc* 2005; 37: 323–325.
- Pienaar BH, Lindell SL, van Gulik T, Southard JH, Belzer FO. Seventy-two-hour preservation of the canine liver by machine perfusion. *Transplantation* 1990; 49: 258–260.
- Lee CY, Jain S, Duncan HM et al. Survival transplantation of preserved non-heart-beating donor rat livers: Preservation by hypothermic machine perfusion. *Transplantation* 2003; 76: 1432–1436.
- Dutkowski P, Furrer K, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Novel short term hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) system prevents injury in rat liver graft from non-heart beating donor. *Ann Surg* 2006; 244: 968–976.

- de Rougemont O, Breitenstein S, Leskosek B, Weber A, Graf R, Clavien PA. One hour hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects nonviable liver allograft donated after cardiac death. *Ann Surg* 2009; 250: 674-682
- Jain S, Xu H, Duncan H et al. Ex vivo study of flow dynamics and endothelial cell structure during extended hypothermic machine perfusion preservation of livers. *Cryobiology* 2004; 48: 322-332.
- Xu H, Lee CY, Clemens MG, Zhang JX. Prolonged hypothermic machine perfusion preserves hepatocellular function but potentiates endothelial cell dysfunction in rat livers. *Transplantation* 2004; 77: 1676-1682.
- 't Hart NA, van der Plaats A, Leuvenink HG et al. Determination of an adequate perfusion pressure for continuous dual vessel hypothermic machine perfusion of the rat liver. *Transplant Int* 2007;20: 343-352.
- Vajdova K, Graf R, Clavien PA. ATP-supplies in the cold preserved liver: A long neglected factor of viability. *Hepatology* 2002; 36:1543-1552.
- Dutkowski P, Graf R, Clavien PA. Rescue of the cold preserved rat liver by hypothermic oxygenated machine perfusion. *Am J Transplant* 2006; 6: 903-912.
- Manekeller S, Minor T. Possibility of conditioning predamaged grafts after cold storage: Influences of oxygen and nutritive stimulation. *Transplant Int* 2006; 19: 667-674.
- Mitchell SJ, Churchill TA, Winslet MC, Fuller BJ. Energy metabolism following prolonged hepatic cold preservation: Benefits of interrupted hypoxia on the adenine nucleotide pool in rat liver. *Cryobiology* 1999; 39: 130-137.
- Bessems M, Doorschodt BM, van Marie J, Vreeling H, Meijer AJ, van Gulik TM. Improved machine perfusion preservation of the non-heart beating donor rat liver using Polysol: A new machine perfusion preservation solution. *Liver Transplant* 2005; 11: 1379-1388.
- Upadhyga GA, Strasberg SM. Glutathione, lactobionate, and histidine: Cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidin/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology* 2000; 31: 1115-1122.
- Kamada N, Calne R, Wight D, Lines J. Orthotopic rat liver transplantation after long-term preservation by continuous perfusion with fluorocarbon emulsion. *Transplantation* 1980; 30: 43-48.
- Tamaki T, Kamada N, Wight D, Pegg D. Successful 48-hour preservation of the rat liver by continuous hypothermic perfusion with haemaccel-isotonic citrate solution. *Transplantation* 1987; 43: 468-471.
- Dutkowski P, Krug A, Krysiak M, Dunschede F, Seifert JK, Junginger T. Detection of mitochondrial electron chain carrier redox status by transhepatic light intensity during rat liver reperfusion *Cryobiology* 2003; 47: 125-142.

- Dutkowski P, Schonfeld S, Heinrich T et al. Reduced oxidative stress during acellular reperfusion of the rat liver after hypothermic oscillating perfusion. *Transplantation* 1999; 68: 44–50.
- Minor T, Manekeller S, Sioutis M, Dombrowski F. Endoplasmic and vascular surface activation during organ preservation: Refining upon the benefits of machine perfusion. *Am J Transplant* 2006; 6:1355–1366.
- Bailly-Maitre B, Fondevila C, Kaldas F et al. Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmatic reticulum stress and ischemia reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2809–2814.
- Lauschke H, Olschewski P, Tolba R, Schulz S, Minor T. Oxygenated machine perfusion mitigates surface antigen expression and improves preservation of predamaged donor livers. *Cryobiology* 2003; 46: 53–60.
- Rauhen U, Petrat F, Li T, de Groot HH. Hypothermia injury/cold induced apoptosis—evidence of an increase in chelatable iron causing oxidative injury in spite of low O₂⁻ / H₂O₂ formation. *FASEB J* 2000; 14: 1953–1964.
- ‘t Hart NA, van der Plaats A, Faber A et al. Oxygenation during hypothermic rat liver preservation: An in vitro slice study to demonstrate beneficial or toxic oxygenation effects. *Liver Transplant* 2005; 11: 1403–1411.
- Bessems M, Doorschodt BM, Kolkert JL et al. Preservation of steatotic livers: A comparison between cold storage and machine perfusion preservation. *Liver Transplant* 2007; 13: 497–504.
- Manekeller S, Dobberrahn V, Hirner A, Minor T. Liver integrity after warm ischemia in situ and brief preservation ex vivo: The value of aerobic postconditioning. *Cryobiology* 2007; 55: 249–254.