



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Gastroenterologiche
"Pier Giuseppe Cévese"

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA in SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI
indirizzo in
SCIENZE CHIRURGICHE ED APPLICAZIONI TECNOLOGICHE
CICLO XX

**Un nuovo sistema di perfusione parenchimale
per la preservazione del graft epatico per trapianto:
valutazione sperimentale sul piccolo e grande animale**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Silvano Todesco

Coordinatore : Ch.mo Prof. Davide F. D'Amico

Supervisore :Ch.mo Prof. Umberto Cillo

Dottorando : Dr. Enrico Gringeri

DATA CONSEGNA TESI
31 gennaio 2008

*A Tommaso,
a cui va tutto il mio
amore di padre*

INDICE

1. RIASSUNTO	Pag 1
ABSTRACT	3
2. INTRODUZIONE	5
3. PREMESSE GENERALI	8
• Fisiopatologia del danno da ischemia-riperfusion	7
Meccanismi cellulari	
Formazione di radicali liberi	
Alterazioni del micro-circolo	
• Metodiche di perfusione e preservazione d'organo	19
La preservazione convenzionale	
La preservazione con <i>Machine Perfusion</i>	
• I donatori "sub-ottimali"	32
I donatori a cuore non battente (Non Heart Beatine Donors – NHBD)	
Steatosi epatica e trapianto	
4. STUDIO PRELIMINARE SUL PICCOLO ANIMALE	40
5. SCOPO DELLO STUDIO	42
6. MATERIALI E METODI	43
Scelta degli animali	
Studio anatomico	
Premedicazione e gestione anestesiológica	
Intervento chirurgico	
Gruppi di studio	
Cold Storage	
Machine Perfusion normotermica	

Machine Perfusion in ipotermia moderata

Rewarming

Valutazione del danno epatico

7. VALUTAZIONE STATISTICA	54
8. RISULTATI	55
9. DISCUSSIONE	58
10. CONCLUSIONI	66
11. TABELLE	
12. ICONOGRAFIA	
13. BIBLIOGRAFIA	

RIASSUNTO

Premesse generali

I costanti progressi fatti registrare, nell'ultimo decennio, in ambito trapiantologico, hanno consentito un netto miglioramento della sopravvivenza dopo trapianto. Tale dato ha fatto lievitare la richiesta di trapianto e l'afferenza dei pazienti ai centri trapianto creando una netta 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 o con steatosi maggiore al 60%, potrebbe consentire di ampliare in maniera sensibile il *pool* degli organi disponibili per trapianto. L'impiego di questi fegati, però, potrebbe innalzare il rischio di stentata ripresa funzionale del *graft* dopo trapianto (PDF - Primary Dysfunction) come risultato del danno secondario alla preservazione tradizionale a 4°C.

Si apre un'interessante area di ricerca verso l'utilizzo di metodiche alternative alla preservazione convenzionale ipotermica.

La preservazione del graft con Machine Perfusion, in condizioni di moderata ipotermia, potrebbe offrire vantaggi sia nella preservazione del graft ideale che nella preservazione del graft marginale (steatosico e da donatori a cuore non battente).

I numerosi studi pubblicati in letteratura ci hanno spinto ad approfondire questo affascinante tema di ricerca.

Scopo dello studio

Sulla base dei dati forniti dalla recente letteratura e sugli studi condotti in collaborazione con l'Università di Pavia sul piccolo animale, abbiamo sviluppato il nostro modello sperimentale di Machine Perfusion sul grande animale analizzando la bontà di tale sistema a temperature e tempi differenti.

Materiali e metodi

Sono stati utilizzati 24 maiali Landrace di peso corporeo compreso tra 20 e 24 Kg sottoposti ad epatectomia totale. Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi di 8 ciascuno: nel primo gruppo (Gruppo C) il fegato è stato prelevato e conservato in Cold Storage per 8 ore a 4°C. Nel secondo gruppo (Gruppo N) il fegato prelevato è stato preservato per 8 ore in Machine Perfusion a 37°C, nel terzo gruppo (Gruppo I) la perfusione in Machine Perfusion è stata condotta ad una temperatura costante di 20° sempre per otto ore. Tutti i 24 graft, sono stati sottoposti a due ore di rewarming a 37°C per valutare la risposta alla ri-perfusione. Durante tutte le dieci ore dell'esperimento sono stati raccolti campioni ematici e istologici. La funzionalità epatica è stata valutata mediante il test dell'*indocianine green*.

Risultati

Dal punto di vista biochimico (AST, ALT, LDH), funzionale (produzione biliare e clearance del verde d'indocianina) e istologico (necrosi e congestione) la perfusione a 20°C si è dimostrata superiore rispetto a quella in normotermia e al Cold Storage.

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, la Machine Perfusion in moderata ipotermia è di beneficio nella preservazione del graft. Su questa base siamo portati a pensare che, sia su fegati steatosici altamente sensibili alla ipotermia severa, che di donatori a cuore non battente, questo tipo di setting potrebbe significativamente ridurre l'incidenza di *dysfunction* del graft post trapianto. Le fasi successive di questo studio consisteranno nell'approfondimento

delle problematiche connesse con la conservazione degli organi marginali e in particolar modo di quelli steatosici

ABSTRACT

Background

In liver transplantation one of the most important problem which has not a solution yet is the large discrepancy between supply and demand for liver transplantation. To expand the pool of organs we should find the way to utilize marginal livers like the Non-heart-beating-donors ones and the fatty grafts. The use of these livers is associated with high incidence of post-operative primary dysfunction caused by the damage due to the Cold Storage preservation in the context of the process of ischaemia- reperfusion in extreme hypothermia (4° C). The utilization of new methods in the conservation of hepatic grafts like Machine Perfusion becomes necessary, especially for its ability to reduce the damage of ischaemia-reperfusion in hypothermia.

The great potentiality of this Machine in sane and marginal organ preservation and the number of works which took place about it, stimulated us to the deepen this argument.

Purpose

We decided to create a experimental model of Machine Perfusion for pigs and to test it with different temperatures to obtain the best condition of perfusion and graft preservation. We based our study on the various works that can be find in literature and on the research developed by the Università di Pavia on rats.

Methods

We used in our experiments 15 Landrace pig of the weight of 22 kilos each. We divided them in three groups of study. Group C: after hepatectomy the pig

liver was preserved in Cold Storage (4° C) for 8 hours. Group N: after hepatectomy the pig liver was perfused in Normothermic Machine Perfusion (37°C) for 8 hours. Group I: the pig liver was perfused in Moderate Hypothermic Machine (20°C). After the preservation, all the 15 livers were tested with a rewarming (37°C) of 2 hours. During the two hours of the experiment we performed samples of blood and biopsies and we also valued the indocyanine green clearance.

Results

The results obtained by the histology, the functional test and biochemical levels of AST, ALT and LDH, in the moderate hypothermic perfusion prove the superiority of this machine .

Conclusion

It is concluded after these experiments the great ability of 20°C Machine Perfusion in pig's liver transplantation. We think that this method of preservation will be able to improve the pool of donors using NHBD livers and fatty livers. In future our research will deepen the problematic connected with the preservation of marginal organs, in particular of steatotic livers.

INTRODUZIONE

I costanti progressi fatti registrare in ambito trapiantologico, sia dal punto di vista tecnico-chirurgico che gestionale e anestesiologicalo-farmacologico hanno reso il trapianto di fegato una metodica ormai standardizzata e ben codificata.

Dal III secolo A.C., epoca a cui si fa risalire il primo trapianto ad opera dei Santi Cosma e Damiano, che sostituirono la gamba del loro sagrestano andata in cancrena con quella di un etiope deceduto poco tempo prima, molte cose sono cambiate e, al giorno d'oggi, sicuramente non si parla più di situazioni miracolistiche riferendosi ai trapianti.

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, infine della gestione del paziente sia intra- sia peri-operatoria.

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 *quod 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 in epoche relativamente recenti 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 trapianto di fegato da donatore vivente. 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 riperfusione, 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 dall'impiego della Machine Perfusion come sistema di perfusione e preservazione dell'organo da trapiantare.

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 ad una prolungata fase di ischemia calda (donatori a cuore non battente) e dall'altra di ridurre il danno da conservazione del graft steatosico.

Altri interessanti vantaggi potrebbero essere rappresentati dalla 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 con per fusione e preservazione statica a 4°C (Cold Storage), consentendo di avere più tempo per trasportare il graft dalla sede del prelievo alla sala del trapianto, e più tempo per scegliere il candidato ideale per le caratteristiche di quello specifico donatore (ottimizzazione del *match* donatore-ricevente).

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 sia sul piccolo che sul grande animale.

PREMESSE GENERALI

Fisiopatologia del danno da ischemia-riperfusion

Il danno epatico da ischemia-riperfusion 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 privato 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-riperfusion 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-riperfusion si riuscirebbe sia ad avere un aumento nella sopravvivenza del paziente trapiantato sia un aumento del numero di organi suscettibili di trapianto¹.

Meccanismi cellulari

A. Cellule non parenchimali

Le cellule endoteliali sembrano in assoluto le meno resistenti tra le cellule non parenchimali al danno da ischemia-riperfusion. 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

prolungato le modificazioni divengono irreversibili e si perde l'integrità endoteliale².

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 epatociti³.

Un'altra cellula non parenchimale coinvolta nell'insulto da ischemia-riperfusione è la cellula di Kupffer. Come dimostrato da più autori la riperfusione 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 degranulazione, 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)⁴. 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^{5,6,7}.

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^{8,9}. Quest'osservazione ha portato al riconoscimento in tali cellule¹⁰ 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 riperfusione. L'impiego di anticorpi anti-TNF- α riduce il danno polmonare in modelli di ischemia calda e fredda nel ratto^{11,12,13}. 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-riperfusione conseguente al trapianto di fegato nel ratto¹⁴. 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^{15,16,17}. 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 anossia¹⁸. 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^{19,20}.

B. 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^{21,22,23} determinando rigonfiamento cellulare. Il rapido incremento volumetrico della cellula può portare alla sua morte²⁴.

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^{25,26}.

L'osservazione che tali fenomeni regrediscono totalmente e rapidamente al momento della ripersione 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-riperfusion, 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^{27,28,29,30,31}. 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^{32,33}. 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-riperfusion tanto che l'inattivazione metabolica di queste cellule può essere di beneficio per la buona ripresa funzionale del graft¹⁹. 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 le 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.

C. Cellule T e Polimorfonucleati

Ci sono molte evidenze riguardo l'importanza delle cellule T nel danno da ischemia-riperfusion. 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-riperfusion. 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 riperfusion 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 riperfusion³⁴. 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 mediato¹.

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...^{35,36}. 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 neutrofilii proteggendo dal danno da riperfusione³⁷. 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 neutrofilii agli epatociti. Anche l'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro l'ICAM-1 ha dimostrato di possedere effetti protettivi nei confronti del danno da riperfusione³⁸. Altri studi¹ hanno provato che l'uso di anticorpi ricombinanti PSGL, che mediano il blocco precoce della P-selectin (CD62), le quali sono complici del meccanismo di interazione tra i neutrofilii e le cellule dell'endotelio, riescono a ridurre il danno da ischemia-riperfusione in modelli di ischemia fredda seguita da riperfusione o OLT in ratti. Come elementi coinvolti nel favorire il sequestro di neutrofilii 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 neutrofilii 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 neutrofilii 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 neutrofilii. 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 elastasi³⁹.

D. 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^-) e il perossido di idrogeno (H_2O_2) che partecipano alla formazione, ferrocatalizzata, di radicale idrossile (OH°), 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 riperfusione dei tessuti⁴⁰. 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^{41,42}. Altra sorgente di radicali è rappresentata dalle cellule di Kupffer, dai neutrofilii 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 danneggiate⁴³.

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-riperfusion⁴⁴.

E. 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^{1,45}.

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-riperfusionione in ambito clinico. CO, biliverdina, bilirubina ridotta potrebbero rappresentare validi candidati per il trattamento dell'insulto da ischemia-riperfusionione nei pazienti trapiantati. Per tutti questi però la finestra terapeutica deve essere molto attentamente valutata a causa della loro tossicità.

F. Il fenomeno del "pH paradosso"

Il danno tissutale da ischemia-riperfusionione 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 stessa⁴⁶. Il ritorno del pH a livelli normali durante la riperfusionione, accelera la morte cellulare tramite l'attivazione di proteasi e fosfolipasi pH-dipendenti⁴⁷.

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 cellulare⁴⁸.

G. Alterazione della microcircolazione

Altro evento patogenetico fondamentale, che si sviluppa nelle fasi iniziali della ri-perfusione è rappresentato dall'alterazione della microcircolazione che può indurre infarto ischemico⁴⁹.

Sebbene sia stato ipotizzato che l'accumulo dei neutrofilici 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 ri-perfusione contribuendo all'evoluzione verso l'infarto ischemico in aggiunta al danno da ri-perfusione. Interessante l'osservazione che l'apporto di NO risolve l'infarto ischemico ma non il danno da ri-perfusione mediato dall'attivazione delle cellule di Kupffer dopo ischemia epatica⁵⁰. Bloccando gli effetti vasocostrittori come del trombossano⁵¹ e endotelina-1⁵² 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.

Metodiche di perfusione e 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.

A. La preservazione convenzionale

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, HTK, etc) a 4°C. Gli organi trattati in tale maniera possono essere conservati al massimo per 24 ore 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-riperfusiones 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 la quale sembrerebbe passare 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.)⁵³.

I due componenti principali, senza i quali l'efficacia della soluzione di Belzer risulta notevolmente ridotta, sono rappresentati dal *lattobionato*⁵⁴ 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 riperfusione⁵⁵;
- l'allopurinolo, analogo dell'ipoxantina ad azione inibente la xantina-ossidasi;
- il glutatione⁵⁶ 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^{57,58}.

Con tale sistema di preservazione il fegato può essere conservato per un periodo superiore a 20 ore⁵⁹.

Un'altra soluzione, largamente impiegata nella pratica clinica, 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 e degli altri organi addominali.

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^{60,61} (tabella I).

B. La preservazione con Machine Perfusion

Altro sistema di preservazione d'organo è invece la perfusione continua con utilizzo della *Machine Perfusion*. Già nel 1967 Belzer e altri⁶² 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 premesso la creazione di macchinari sempre più piccoli e facili da trasportare.

In generale sono tre i vantaggi offerti dall'impiego della perfusione con 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 graft⁶³;

3. "resuscitare" i graft danneggiati dall'insulto ischemico grave come gli organi dei donatori a cuore non battente⁶⁴.

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. (foto 7)

Le ragioni della sua superiorità rispetto al metodo di preservazione tradizionale sono diverse: attraverso la perfusione, l'organo riesce ad essere conservato per periodo 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%^{65,66}. 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 classica a freddo la più usata.

L'utilizzo della macchina a perfusione epatica normotermica, sembrerebbe offrire l'indiscutibile vantaggio di poter utilizzare anche i fegati steatosici che,

conservati in Cold Storage, non sono in grado di avere un'accettabile ripresa di funzionalità⁶⁷.

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^{68,69,70}, 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^{71,72,73}.

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 gluconato⁷⁴. 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 rationale 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%⁶³. Anche la soluzione *Celsior* può essere impiegata negli esperimenti con la Machine Perfusion.; essa è stata utilizzata con successo dal gruppo di Compagnon et Al⁷¹. 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 Belzer⁷⁵.

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 eterogeneo⁶⁸. L'incremento delle pressioni all'interno di questi vasi, dopo

conservazione con Machine Perfusion, è stata stimata del 42% rispetto al 130% dopo Cold Storage⁷⁶. 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'organo⁷⁷. 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 altri⁶³ 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 minimo⁷⁸.

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 fegato⁸⁰. 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 endoteliale⁸¹.

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^{68,69,70,76}. 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 ore⁶⁸. Le ipotesi per spiegare ciò sembrano essere: il

mantenimento della circolazione e il ripristino delle scorte energetiche. Ricerche fatte su pezzi di rene⁸¹ 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 ATP⁸².

Le possibili applicazioni di questo tipo di sistema di preservazione d'organo sono dunque molto vantaggiose e ormai manca poco per l'introduzione di questa metodica 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 commercio⁸³.

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 solo di determinare danno alle cellule parenchimali ed endoteliali (nota 40 art. 8). Probabilmente ciò, come accennato in precedenza, è dovuto ad alterazioni delle membrane cellulari che si trovano costrette ad andare incontro ad un cambiamento di fase. Le ridotte temperature, inoltre, sembrerebbero favorire ed accelerare il breakdown dell'ATP in adenosina. Questa è convertita in ipoxantina dalla xantina deidrogenasi (conversione NAD dipendente). Come già accennato precedentemente, essa in condizioni ischemiche diviene xantina ossidasi. Nella

riperfusionem 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 tossici⁷⁵. 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^{84,85}. Sembra inoltre che gli eritrociti possano attenuare il danno sinusoidale neutralizzando i radicali xantino-ossidasi dipendenti nel fegato perfuso del ratto⁸⁶.

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 epatociti⁸⁷. 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 infraepatica⁸⁸.

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 Perfusion⁸⁹.

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 spinta 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 particolare⁹⁰ 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 cava⁸⁸. 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 sterile⁸⁸. 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 cmH₂O) 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 (art. 3, 4, 6)^{75,90,91}.

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'emodialisi⁸⁹ 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 fisiologico⁸⁸.

I donatori sub-ottimali

Pur non esistendo, in letteratura, un definizione universalmente accettata di donatore sub-ottimale o donatore marginale, si è ritenuti a definire tali donatori tutti quei donatori che presentano elevati fattori di rischio per una mancata ripresa funzionale del graft dopo trapianto. In particolare vengono definiti come marginali tutti quei donatori di età superiore ai 70 anni, che siano sottoposti ad un dosaggio sovramassimale di inotropi, che presentino un degenza prolungata in terapia intensiva (> 7 giorni), HCV o HBV positivi, che presentano una macrosteatosi epatica superiore al 30% o nelle situazioni di prelievo a cuore non battente.

In tutte queste situazioni, in epoche non eccessivamente lontane, tali donatori venivano considerati non idonei per l'elevato rischio di mancata ripresa funzionale e conseguente ricorso al ritrapianto.

L'exasperazione della carenza di donazioni e il progressivo lievitare delle liste d'attesa, da una parte, e l'affinamento delle metodiche di preservazione e di gestione dell'intero processo trapiantologico, dall'altra, hanno reso giustificabile il ricorso a tutta questa categoria di donatori.

In realtà il concetto di donatore sub-ottimale non tiene conto di altre importantissime variabili in grado di influenzare significativamente la ripresa funzionale del graft dopo trapianto: il tempo di ischemia fredda e il tempo di ischemia calda.

Il primo è il tempo che intercorre tra il prelievo del fegato dal donatore e il suo impianto sul ricevente. Il secondo è il tempo necessario per eseguire le anastomosi vascolari prima di ri-perfondere definitivamente il graft impiantato nell'addome del ricevente. Queste variabili assumono ancora più peso proprio in caso di donatori marginali per età o per presenza di steatosi severa, casi nei quali i tempi di ischemia fredda e calda devono essere i più brevi possibili.

A tal proposito, pertanto, sarebbe più corretto parlare di situazione marginale piuttosto che di donatore marginale.

Non-Heart-Beating Donors (NHBD) nel trapianto epatico

Nell'ambito della già citata carenza di donazioni e nel tentativo di recuperare quanti più organi possibili per soddisfare le esigenze di lista d'attesa, il ricorso ai donatori da cuore non battente potrebbe rappresentare un valido bacino di reclutamento attualmente poco sfruttato.

Tale pratica viene già attuata per il prelievo di reni, con risultati sovrapponibili a quelli dei donatori convenzionali. Il fegato dei NHBD al contrario viene prelevato molto raramente a causa della sua suscettibilità al danno da ischemia calda, come dimostrano gli esperimenti condotti su modelli porcini di trapianto epatico da soggetti a cuore non battente che testimoniano come tali organi riescano a tollerare bene solo brevi periodi di ischemia calda (15 min)⁹².

I NHBD sono classificati nelle quattro categorie di Maastricht:

1. morte all'arrivo
2. mancata risposta alla rianimazione

3. attesa di arresto cardiaco

4. arresto cardiaco in condizioni di morte cerebrale.

I soggetti che rientrano nella categoria 3 sono detti “controlled” NHBD e sono contraddistinti dal fatto che già prima della cessazione dell’attività cardiaca è possibile ottenere il consenso dei familiari e mobilitare il team per il recupero degli organi. Il tempo di ischemia calda in tale gruppo risulta pertanto ridotto.

Per i soggetti delle categorie 1 e 2, detti invece “uncontrolled”, l’organizzazione del prelievo degli organi e la richiesta del consenso alla donazione può essere fatta necessariamente solo dopo l’arresto del battito cardiaco dato che questi donatori sono spesso pazienti o che arrivano al pronto soccorso ormai morti o per i quali le manovre rianimatorie vengono tentate inutilmente. Il periodo prolungato di ischemia calda, cui sono soggetti gli organi di tali donatori, rende in questo modo praticamente impossibile il loro utilizzo.

Il maggior problema di tali tessuti è dunque l’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 epatociti⁹³.

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^{94,95}.

L'utilizzo di organi da NHBD si associa ad un aumento della Primary Non Function che vale soprattutto per i fegati dei Uncontrolled-NHBD, i quali, in uno studio di Pittsburgh fatto su una serie di sei trapianti, sono andati incontro nel 50% dei casi a PNF e solo nel 17% dei casi a sopravvivenza superiore a un anno⁹⁶. Viceversa per quanto riguarda i fegati di Controlled-NHBD il gruppo di Reich et Al. (Philadelphia) in una serie di 8 trapianti da NHBD ha riportato una PNF pari a zero, con sopravvivenza del graft a 18 mesi del 100%, dimostrando così ,attraverso gli ottimi risultati, una potenzialità sempre crescente per un loro impiego, sebbene si abbia rigetto e colestasi precoce pari al doppio rispetto ai donatori a cuore battente⁹⁷.

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 riperfusione. Un gruppo eterogeneo è quello dei sistemi di conservazione dell'organo tramite perfusione. Tra queste troviamo:

1. 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%⁹⁸.

2. 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 battente⁶⁴. 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.

3. 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 NHBD⁶⁸. 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.

In conclusione possiamo dire che allo stato attuale solo i fegati da NHBD appartenenti alla categoria 3 si possono considerare trapiantabili, anche se comunque per sfruttare al massimo le potenzialità dei donatori a cuore non battente, in particolare di quelle uncontrolled, si rende necessario lo sviluppo di nuove tecniche in grado di resuscitare, preservare e valutare la qualità dell'organo prima dell'impianto.

Steatosi epatica e trapianto

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 cellula 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'epatocita⁹⁹.

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%¹⁰⁰. Purtroppo la presenza di degenerazione grassa nel fegato prelevato si associa ad un'elevata incidenza di PNF dopo preservazione a freddo. Secondo Ploeg et Al¹⁰¹ 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 normali¹⁰².

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 Al¹⁰³ 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 epatocellulare¹⁰⁴.

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 anossia¹⁰⁵.

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-riperfusionemetterebbe 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-riperfusionemetterebbe di 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 grasso¹⁰⁶; parimenti le prostaglandine E1(PGE1) sembrerebbero avere lo stesso effetto protettivo¹⁰⁷. 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.

STUDIO PRELIMINARE SUL PICCOLO ANIMALE

Questo studio sulla Machine Perfusion rientra nell'ambito di una ricerca in collaborazione con l'Università di Pavia. Il gruppo di Pavia ha concentrato la propria attenzione sul piccolo animale (ratto) sul quale ha condotto una serie di esperimenti per valutare la miglior soluzione di preservazione e la miglior temperatura per il fegato nella macchina a perfusione continua e ha paragonato questa con il metodo classico di conservazione del graft.

I fegati prelevati dal ratto (foto 1) sono stati conservati in Machine Perfusion per un tempo di sei ore e quindi sottoposti a rewarming di due ore a 37°C con la soluzione di Krebs-Henseleit, ossigenata attraverso bubbling, per valutare la ripresa di funzionalità dell'organo e il danno a cui è sottoposto nella preservazione e nella ri-perfusione (figura 1).

Per ragioni di semplicità è stata cannulata solo la vena Porta e attraverso questa perfuso il fegato.

La soluzione scelta per le sei ore di perfusione è stata la soluzione di Krebs alla quale è stato addizionato del calcio in concentrazioni pari a quella del Celsior (CaCl_2 , 0.25 mmol/L). Gli elementi contenuti in questo liquido di perfusione sono (mmol/L): Na^+ , 144; K^+ , 5.9; CaCl_2 , 0.25; Mg^{2+} , 1.2; Cl^- , 128.7; HCO_3^- , 25; SO_4^- , 1.2; H_2PO_4^- , 1.2; e glucosio, 11.

I test in Machine Perfusion sono stati condotti a temperature diverse: a 37°C , a 30°C , a 25°C e a 20°C .

Come controllo si sono impiegati fegati conservati in Cold Storage sia con soluzione di Celsior sia con soluzione dell'Università del Wisconsin. Dopo le sei ore di immersione in questi liquidi, i graft sono stati posti in un circuito di perfusione dove si è studiato la risposta di tali organi al rewarming di due ore.

Sono stati considerati, come parametri rilevanti nella valutazione degli organi preservati con le varie tecniche, la produzione biliare e la concentrazione di LDH (grafici 1, 2, 3, 4, 5, 6).

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del nostro lavoro è quello di creare un modello sperimentale di Machine Perfusion nella preservazione del graft epatico nel trapianto come valida alternativa alla preservazione tradizionale a 4°C.

Un ulteriore scopo è quello di testare e validare sul grande animale gli interessanti risultati ottenuti sul piccolo animale.

Questo rappresenta il primo step di un progetto assai ben più ampio che in futuro ci permetterà di studiare prima il comportamento in Machine Perfusion del fegato steatosico porcino e poi quello dei fegati steatosici umani considerati non idonei alla donazione per steatosi maggiore al 60%.

MATERIALI E METODI

Scelta degli animali

Per l'esecuzione degli esperimenti sono stati utilizzati 15 maiali Landrace X Large White di sesso femminile, del peso corporeo compreso tra i 20 e 25 Kg e dell'età di 2-3 mesi, stabulati a temperatura costante, in gabbie separate ed alimentati con acqua e cibo *ad libitum* fino a 24 prima dell'intervento. La scelta è ricaduta su questo tipo di animale per le sue caratteristiche biologiche, quali l'affinità filogenetica, anatomica, emodinamica e metabolica; in termini più pratici, l'aspetto economico e logistico, visto il minor costo e la più facile reperibilità rispetto ad altri animali quali il cane, il babuino, etc, hanno fatto ricadere la scelta su questo tipo di animale.

Gli esperimenti sono stati condotti nel totale rispetto delle normative a tutela dell'animale attualmente vigenti nel nostro Paese.

Studio anatomico

Il Fegato di Maiale

Il fegato del maiale ha un peso che si aggira attorno al 1.7% del peso corporeo totale ossia di circa 400g negli animali impiegati nei nostri studi; ha colore rosso-bruno, talvolta violaceo.

Lo sviluppo notevole del connettivo perilobulare permette di individuare chiaramente i lobuli al di sotto della capsula superficiale.

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.

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, un ramo destro mediale ed un ramo sinistro.

La vena porta invece si divide in due rami di cui il sinistro, più grosso, si distribuisce ai lobi sinistri, al lobo quadrato ed al lobo destro mediale.

Esistono tre vene epatiche principali: la destra drena i due lobi destri, la sinistra i due lobi sinistri e l'intermedia il lobo quadrato e la parte adiacente del lobo sinistro mediale. Le ultime due sboccano molto spesso in comune.

Il Fegato di Ratto

Il fegato di ratto, molto schematicamente, presenta due principali caratteristiche:

- la presenza di quattro ben individualizzabili lobi (lobo mediano, lobo caudato, lobo laterale destro, lobo laterale sinistro) separati tra loro da profonde scissure (figura 2, foto 2);
- l'assenza della colecisti.

Il fegato è situato all'interno della cavità addominale in sede sottodiaframmatica destra. È l'organo più grande del ratto e il suo peso è estremamente variabile in rapporto al tipo di nutrizione. Tuttavia, in ratti che sono sottoposti allo stesso regime alimentare vi è una buona correlazione tra il peso corporeo dell'animale e il peso totale del fegato. Questa correlazione che è stata calcolata ($R_{60} = 0.9803$) consente di stabilire, con buona approssimazione, il peso del fegato a partire dal peso corporeo dell'animale (D. Castaing, D. Houssin, H. Bismuth; *Hepatic and portal surgery in the rat*. Masson, 1980).

L'ilo epatico è localizzato al di fuori del fegato e al suo ingresso all'interno del parenchima epatico descrive una curva a concavità verso sinistra. L'ilo epatico è completamente circondato da un pellicola translucida di rivestimento peritoneale che si continua con la capsula epatica.

L'ilo epatico è costituito:

- dalla via biliare, nella sua porzione più superficiale, che si divide all'interno del fegato in un settore paramediano destro e paramediano sinistro;
- dall'arteria epatica, che si colloca su un piano intermedio sotto la via biliare e sopra la vena porta e segue la medesima distribuzione della via biliare; non è infrequente la presenza di un ramo anomalo dell'arteria epatica sinistra che origina dall'arteria gastrica sinistra;
- dalla vena porta che rappresenta la struttura più grande dell'ilo epatico e si colloca sul piano più profondo di esso. Al pari degli altri elementi dell'ilo epatico, al suo ingresso dentro il fegato, descrive

una dolce curvatura con concavità verso sinistra distribuendosi in tre rami principali uno per il lobo caudato e mediano, uno per i settori laterali di destra e uno per i settori laterali di sinistra.

Le vene sovraepatiche sono suddivise in due gruppi fondamentalmente:

- le vene sovraepatiche inferiori che drenano il lobo caudato e i segmenti laterali di destra;
- le vene sovraepatiche superiori in numero di tre: destra, mediana e sinistra drenano i settori di destra, mediano e di sinistra rispettivamente.

Premedicazione e gestione anestesiológica

Ciascun animale, dopo 24h di completo digiuno, viene sottoposto a preanestesia con Ketamina 8mg/Kg con somministrazione per via intramuscolare, si procede quindi con la cannulazione venosa periferica attraverso ago-cannula G18 e, in seguito, ad induzione dell'anestesia con Pentothal sodico 10mg/Kg. Seguono l'intubazione oro-tracheale, la curarizzazione con Bromuro di Pancuronio alla dose di 0.25mg/Kg e la somministrazione di 7gamma/Kg di Fentanil per l'induzione dell'analgesia.

Il mantenimento dell'anestesia viene ottenuto con una miscela di Ossigeno ed NO₂ nel rapporto di 3:7 e Forane all'1-1.5% utilizzando sempre Bromuro di Pancuronio per la mio-risoluzione e Fentanil, in dose totale non superiore ai 16 gamma/Kg, per l'analgesia.

Vengono inoltre posizionati degli introduttori arteriosi e venosi rispettivamente nell'arteria carotide sinistra e nella vena giugulare interna sinistra

per permettere il monitoraggio emodinamico (pressione arteriosa sistemica, pressione venosa centrale), la rilevazione del pH e l'infusione di cristalloidi e farmaci.

Intervento chirurgico

L'intervento chirurgico consiste nell'epatectomia totale secondo metodica classica già descritta da Starzl nel 1984¹⁰⁸.

Dopo anestesia generale, viene eseguita cervicotomia laterale destra e sinistra per l'isolamento e la successiva cannulazione delle vene giugulari e carotidi 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 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 3).

L'animale viene sottoposto a laparotomia mediana xifo-pubica (foto 4).

Dopo esplorazione della cavità addominale, 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 necessaria all'emorecupero prima e alla perfusione del graft dopo.

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).

Dopo isolamento e sezione del dotto cistico e della sua arteria si esegue colecistectomia per via anterograda. All'apertura del legamento epatoduodenale, il coledoco viene isolato e sezionato tra legature.

La vena porta e l'arteria epatica vengono scheletrizzate e repertate 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 preparazione al prelievo del graft epatico, si procede con la fase dell'emorecupero.

Dopo eparinizzazione sistemica (500 UI/kg) si esegue legatura in successione delle carotidi precedentemente repertate e si procede con la cannulazione dell'aorta addominale. 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.

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 24 animali divisi in tre gruppi (tabella II):

- Nel Gruppo C (Cold Storage, 8 animali) il fegato prelevato viene perfuso e preservato tradizionalmente in Cold Storage a 4°C per un periodo di otto ore con soluzione di Celsior.
- Nel Gruppo N (Normotermia, 8 animali) il fegato viene conservato in Machine Perfusion in normotermia (37°C) per otto ore con soluzione di Krebs.

- Nel Gruppo I (Ipotermia, 8 animali) il fegato viene conservato in Machine Perfusion in ipotermia moderata (20°C) per otto ore con soluzione di Krebs.

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

Cold Storage

Nel Gruppo C, 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 otto ore in un contenitore per organi. Trascorse le otto ore il fegato viene rimosso dal suo contenitore e posto nella Machine Perfusion per due ore alla temperatura di 37°C con sangue autologo.

Machine Perfusion normotermica

Nel gruppo N, i fegati prelevati sono conservati in Machine Perfusion normotermica. In questo sistema il sangue autologo prelevato dal suino nel corso dell'intervento chirurgico circola perfondendo l'organo per un periodo di otto ore.

La Machine Perfusion è composta da una reservoir (foto 5) in plexiglass e da due circuiti (figura 1) che indipendentemente provvedono all'irrorazione rispettivamente dell'arteria epatica e della vena porta. Nel reservoir viene posto il fegato in cui è cannulata sia l'arteria epatica che la vena porta (foto 6) mentre le vene cava sovra e sotto-epatica vengono lasciate libere di scaricare il

sangue da esse refluo nello stesso reservoir. Alle cannule appena citate vengono connessi dei tubi $\frac{1}{4}$ di pollice in PVC (Medtronic) all'interno dei quali viene spinto, con l'ausilio di due pompe volumetriche rotative Watson Marlow 505U (foto 7), una per ogni circuito, il sangue raccolto dalla scatola. Nel circuito che perfora l'arteria epatica il sangue viene ossigenato attraverso un ossigenatore pediatrico Lilliput1 D901 (foto 8). 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 (foto 9), posto prima dell'ingresso delle cannule nel fegato, misura il flusso ematico 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 a 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 (foto 10), connesso con l'ossigenatore, consente al sistema di mantenere una temperatura costante del sangue circolante di 37°C durante tutta la conservazione del graft.

Questo sistema è detto "aperto" perché le vene cava sopra e sotto epatiche, come già accennato, scaricano liberamente nella vasca di contenimento del fegato. Per evitare che si abbia un'evaporazione di liquido e quindi un'emoconcentrazione, si è provvisto il reservoir di un coperchio che viene tolto solo per il tempo necessario a fare le biopsie epatiche.

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

Machine Perfusion in ipotermia moderata

I fegati del Gruppo I vengono perfusi per otto ore in Machine Perfusion in ipotermia moderata (20°C). Il sistema è praticamente uguale a quello utilizzato per il Gruppo N, cambiano solo la temperatura alla quale il graft è conservato e i flussi del sangue in arteria epatica e vena porta: questi sono rispettivamente di 105 e 160 ml/min (50% circa di quelli impiegati nella Machine Perfusion normotermica).

Rewarming

La fase di rewarming consiste nella riperfusione dell'organo, dopo le otto ore di conservazione, con sangue autologo del maiale a temperatura di 37°C per periodo di due ore. Il circuito impiegato è sempre quello della Machine Perfusion normotermica. I flussi arterioso e portale sono simili a quelli utilizzati nel Gruppo N.

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.

Al circuito viene somministrata prostaciclina (Flolan, Glaxowellcome, 0,5mg diluiti in 50 ml di soluzione) in infusione continua alla velocità di 4ml/h.

Valutazione del danno epatico

Esami di Laboratorio

Durante le otto ore di perfusione e le seguenti due di rewarming vengono prelevati campioni di liquido (Krebs e sangue) per la determinazione di:

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

Questi parametri appena citati non sono però in grado di dare un stima sensibile della funzionalità del fegato. A tale scopo è stato impiegato il Test con il Verde Indocianina (ICG). La prova con ICG è ritenuta utile per evidenziare precoci o modeste alterazione della funzionalità epatica. Il verde indocianina viene somministrato all'inizio del rewarming in un bolo di 3 cc e subito dopo in pompa a 66ml/h in quantità di 7 cc diluiti in 100 ml. Dopo 60, 65 e 70 min dalla somministrazione del bolo, vengono eseguiti prelievi ematici successivamente analizzati con un metodo spettrofotometrico. Le caratteristiche che rendono ideale questo tipo di test sono da un lato l'escrezione imm modificata della sostanza utilizzata da parte degli epatociti nella bile, dall'altro l'assenza di interazioni con altri farmaci, bilirubina ed emolisi.

Valutazione isto-patologica

Nello studio istologico, le biopsie epatiche fissate in formalina al 10% sono state successivamente disidratate nella serie scalare degli alcoli e inclusi in paraffina.

Ciascun frammento bioptico è stato studiato istologicamente con colorazione di routine Ematossilina Eosina per valutare necrosi epatocitaria,

edema e congestione sinusoidale, e con colorazione con acido periodico di Schiff per la valutazione semiquantitativa della carica glicogenica.

La necrosi epatocitaria è stata, nei diversi intervalli di tempo, valutata semiquantitativamente con score da 0 a 3:

- 0 = assenza di necrosi;
- 1 = presenza di microfocolaio di necrosi (<20% di parenchima);
- 2 = presenza di focolai multipli di necrosi (20-50% di parenchima);
- 3 = presenza di necrosi diffusa (>50% di parenchima).

L'estensione dell'edema cellulare è stata valutata semiquantitativamente con score da 0 a 3:

- 0 = assente edema;
- 1 = focale edema (<20% di parenchima);
- 2 = discreto edema(20-50% di parenchima);
- 3 = severo edema(>50% di parenchima).

L'estensione della congestione sinusoidale è stata valutata semiquantitativamente con score da 0 a 3:

- 0 = assente congestione;
- 1 = focale congestione (<20% di parenchima);
- 2 = discreta congestione (20-50% di parenchima);
- 3 = severa congestione (>50% di parenchima).

La presenza di glicogeno intraepatocitario è stata calcolata secondo uno score da 0 a 3:

- 0 = nessuna carica glicogenica;
- 1 = scarsa carica glicogenica; epatociti PAS positivi <30%;
- 2 = discreta carica glicogenica; epatociti PAS positivi 30-70%;
- 3 = spiccata carica glicogenica; epatociti PAS positivi >70%.

VALUTAZIONE 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 $p < 0,05$.

RISULTATI

Machine perfusion nel piccolo animale (ratto)

Per la realizzazione di questo lavoro ci siamo avvalsi della collaborazione del Centro di chirurgia sperimentale dell'Università degli Studi di Pavia. Il gruppo di Pavia ha realizzato un analogo modello di fegato isolato e perfuso sul piccolo animale (ratto) utilizzando Krebs-Henselett solution per la perfusione del graft. La preservazione del fegato di ratto è stata eseguita sia in condizioni di Cold Storage (utilizzando Celsior o UW) che in Machine Perfusion a differenti temperature (20°C, 25°C, 30°C, 37°C). I fegati perfusi a 37°C hanno mostrato un significativo incremento di LDH rispetto ai graft perfusi a 30°C, 25°C e 20°C alla fine delle sei ore di perfusione (grafico 1 e 2). Nella fase di rewarming nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata per l'LDH nei fegati perfusi con Machine a differenti temperature e quelli preservati tradizionalmente a 4°C con Celsior o UW (grafico 3).

La produzione di bile è stata significativamente più bassa durante la perfusione con machine a 20°C rispetto alla perfusione a 30°C in tutte le 6 ore dello studio (grafico 4). Nella successiva fase di rewarming, però, i fegati perfusi a 30°C hanno mostrato una minor produzione biliare rispetto ai fegati perfusi in machine a 25° e 20°C (grafico 5). La produzione di bile, infine, è stata ancora maggiore nei fegati preservati a 4°C con Celsior rispetto a quelli perfusi con machine a 20°C e 25°C (grafico 6).

Machine perfusion nel grande animale (maiale)

Per la valutazione della funzionalità epatica nel grande animale abbiamo preso in considerazione parametri ematochimici e istopatologici, quantificazione della produzione biliare e test funzionale al verde di Indocianina.

a. Parametri ematochimici: il dosaggio delle AST è stato maggiore nel gruppo C rispetto ai gruppi N e I. In particolare la differenza è stata statisticamente significativa tra gruppo C e gruppo N a 30' ($p=0,022$), a 60' ($p < 0,0001$) e a 120' ($p < 0,0001$) dal rewarming e tra gruppo C e gruppo I a 30' ($p=0,003$), a 60' ($p < 0,0001$) e a 120' ($p < 0,0001$) (grafico 7).

Il dosaggio delle ALT è stato maggiore nel gruppo C rispetto ai gruppi N e I. In particolare la differenza è stata statisticamente significativa soltanto a 120' dal rewarming ($p=0,002$) tra gruppo C e gruppo N e tra gruppo C e gruppo I (grafico 8).

Il comportamento dell'acido lattico è rimasto stazionario nel gruppo I e N sia durante la Machine Perfusion che alle due successive ore di rewarming. Nel gruppo C l'elevato valore di acido lattico riscontrato alla fine delle 8 ore di Cold Storage ha subito un calo significativo al termine dei 120' di rewarming (grafico 9).

Il valore dell'LDH è stato significativamente maggiore nel gruppo C rispetto ai gruppi N e I a 120' dal rewarming ($p < 0,0001$)(grafico 10).

b. Parametri istopatologici: i campionamenti biotici eseguiti su tessuto sono stati valutati mediante biopsia ottica tradizionale valutando come parametri di danno la presenza di congestione, edema, necrosi, carica glicogenica e vacuolizzazione nei vari preparati istopatologici. Tra i parametri più sensibili per determinare il danno da ischemia-riperfusion abbiamo preso in considerazione la presenza di necrosi e congestione valutati secondo parametri semiquantitativi (grafico 12 e 13).

In nessuno dei cinque animali del gruppo I è stata documentata la presenza di necrosi.

Nel gruppo N in un solo animale è stato osservato un focolaio di necrosi a 120' dalla ri-perfusione.

Nel gruppo C, infine, compare necrosi già a 60' e 120' dal rewarming (foto 13,14,15).

Analogo sembra essere il comportamento della congestione che è pressoché assente nel gruppo I (foto 12), compare progressivamente nel gruppo N ed è ancora maggiore nel gruppo C soprattutto a 120' dal rewarming (foto 13,14,15).

c. Produzione biliare: analogamente a quanto osservato negli esperimenti condotti nel piccolo animale la produzione biliare ha assunto un comportamento temperatura dipendente. Al termine delle 8 ore di preservazione è stata nulla nel gruppo C, di $15,5 \pm 1$ ml nel gruppo N e $1,6 \pm 0,4$ nel gruppo I. Nella successiva fase di rewarming, mentre nel gruppo N la produzione di bile rimane costante, aumenta progressivamente nel gruppo C e nel gruppo I (grafico 11).

d. Test funzionale al verde di indocianina: la clearance del verde di indocianina è stata di 59 ± 1 nel gruppo C, 115 ± 3 nel gruppo I e di 124 ± 2 nel gruppo N.

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/anestesiologico 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%¹⁰⁸ negli adulti oggi nel Centro Trapianto Epatico dell'Università degli Studi di Padova, diretto dal Prof. Davide F. D'Amico, supera il 90%¹⁰⁹.

Nonostante questo dato sia estremamente incoraggiante, però, una percentuale non trascurabile di pazienti (oltre il 4% nelle principali casistiche italiane) decede in attesa di ricevere un trapianto. Se, infatti, negli ultimi anni si è verificato un aumento delle risorse di donazione, 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) nel 2007 sono stati eseguiti più di mille trapianti di fegato in Italia, ma oltre 1500 sono state le nuove iscrizioni in lista d'attesa per trapianto.

Questi numeri non possono non far riflettere sull'importanza della gestione delle risorse e da soli bastano a far comprendere il motivo per cui è sempre più esasperato il ricorso a quei donatori cosiddetti "marginali" 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-riperfusionne 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 ore⁵⁹.

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 donatori marginali è costituito da quello dei donatori a cuore non battente o NHBD il cui impiego permetterebbe di avere un incremento nel numero degli organi disponibili pari al 4-10%⁹⁸. 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 nel 50% dei pazienti trapiantati; sappiamo infatti che il fegato è molto sensibile a questa situazione e riesce a sopportare solo brevi tempi di ischemia calda (15 minuti al massimo)⁹². 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^{64,68,69,70} i quali sono stati in grado di dimostrare la possibilità di "resuscitare" questi organi sia nel piccolo che nel grande animale.

Altro gruppo molto numeroso di organi marginali è quello dei fegati steatosici che sono estremamente sensibili al danno ischemico, soprattutto quando a questo si associa l'ipotermia. Secondo Ploeg et Al l'incidenza di PDF è dell'80%¹⁰¹ in caso di utilizzo di graft con steatosi maggiore del 60% e la presenza di una steatosi compresa tra il 30% e il 60% deve indiscutibilmente essere considerato uno dei principali fattori di rischio di PDF.

Altri Autori (Hayash et Al)¹⁰³ hanno dimostrato, però, di poter utilizzare, con buona probabilità di successo, fegati steatosici provenienti da donatori viventi. In

queste condizioni, infatti, i tempi di ischemia sono relativamente brevi e i graft steatosici non sembrano accusare, in maniera significativa, il danno ischemico/ipotermico.

Diversi sono i meccanismi fisiopatologici coinvolti durante la fase di preservazione a freddo e la successiva fase di riperfusione con ripristino della normotermia. La solidificazione dei trigliceridi durante il raffreddamento causerebbe una citolisi epatocitaria al momento della riperfusione con alterazione del microcircolo e conseguente danno epatocitario. Inoltre, gli stessi epatociti ingrossati potrebbero esercitare una compressione sui sinusoidi aumentando le resistenze a livello del microcircolo e rendendo gli stessi epatociti ancora più sensibili all'insulto anossico. Infine, in seguito alla lisi cellulare, il rilascio in circolo di acidi grassi liberi e trigliceridi attiverrebbe le fosfolipasi e la perossidazione lipidica, con conseguente produzione di radicali liberi dell'ossigeno a loro volta responsabili di danno cellulare^{104,105}.

E' sulla base di queste considerazioni fisiopatologiche, e partendo dal presupposto che il fegato steatosico di un individuo sano svolge regolarmente le sue funzioni metaboliche e sintetiche, che trova un razionale clinico il ricorso alla Machine Perfusion per la preservazione del graft in corso di trapianto di fegato, l'intuizione, cioè, di poter realizzare un sistema di preservazione del graft col tentativo di avvicinarsi quanto più possibile alle reali condizioni fisiologiche e biologiche oltre che anatomiche. In letteratura non esistono lavori che dimostrino l'efficacia di questa macchina anche se il gruppo di Imber ipotizza che una Machine Perfusion normotermica potrebbe riuscire ad essere impiegata con successo nel prelievo e trapianto di graft steatosici.

Per questi motivi ,ma anche per il fatto che la Machine Perfusion in più studi^{73,88} si è dimostrata capace di preservare fino a 72 ore il graft in maniera ottimale, abbiamo scelto di approfondire questo argomento creando una Machine Perfusion nel centro di Chirurgia sperimentale dell'Università di Padova. La Machine Perfusion che abbiamo voluto realizzare trae spunto da un sistema già

ideato e realizzato da Belzer et Al.⁶² nel 1967 per la preservazione del graft renale per trapianto. Ci siamo basati ,nella progettazione del sistema, su lavori pubblicati negli ultimi anni che descrivono l'impiego sperimentale della Machine Perfusion sia sul piccolo che sul grande animale^{63,64,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,82,83,88,89,90,91}.

Per comprendere appieno le problematiche connesse con questo sistema di preservazione ci siamo avvalsi della collaborazione di ricercatori dell'Università di Pavia per lo studio sul piccolo animale. Il ratto infatti si presta molto bene ad esperimenti di questo tipo per la sua fisiologia abbastanza vicina a quella dell'uomo, la facile gestione dal punto di vista logistico e il basso costo economico.

Il lavoro condotto dal gruppo di Pavia ha valutato prevalentemente il comportamento del graft epatico del ratto conservato a differenti temperature con una soluzione di perfusione non biologica (soluzione di Krebs) e ha confrontato i vari risultati tra di loro e con quelli derivanti dalla preservazione in Cold Storage. Ciò è stato fatto per dimostrare l'effettiva superiorità della macchina a perfusione sul Cold Storage e per valutare a quali temperature il fegato in Machine Perfusion dia i migliori risultati.

Come parametri di necrosi cellulare e funzionalità epatica sono stati scelti in questi esperimenti le LDH e la produzione biliare. Le prime nel corso delle 6 ore di perfusione si innalzano significativamente soprattutto nel gruppo di graft perfusi a 37°C, dimostrando in essi un certo grado necrosi cellulare; viceversa a temperature tra 30 e 20°C le LDH sono nettamente inferiori e in particolar modo sono molto basse alla temperatura di 20°C (grafico 1 e 2).

La produzione di bile, anche da altri autori utilizzata come parametro sensibile di funzionalità del fegato⁸⁷, è molto differente tra i vari gruppi alle differenti temperature, cioè molto alta nelle 6 ore di perfusione per i fegati a 37°C e bassa per quelli a 20° , dimostrando come il metabolismo cellulare epatico già con modeste riduzioni di temperature si abbassi significativamente. Alla riperfusione

a 37°C i graft conservati a 20°C dimostrano una ripresa dell'attivazione dell'escrezione biliare molto più alta di quella dei fegati preservati in normotermia e anche migliore di quelli conservati in Cold Storage.

In base ai dati presenti in letteratura e a quelli forniti dagli studi condotti sul piccolo animale, abbiamo deciso di confermare sul grande animale i risultati ottenuti in precedenza date le sue caratteristiche anatomiche, metaboliche, emodinamiche più affini a quelle umane. Abbiamo creato dunque una Machine Perfusion adatta alla preservazione del fegato suino che differisce da tutte quelle descritte in letteratura perché priva della cannulazione diretta della Vena Cava sopra e sotto epatica. Il sangue perfuso nel graft attraverso due cannule, una in Arteria Epatica e l'altro in Vena Porta, defluisce dalla Vena Cava sopra e sotto epatica che scarica liberamente nello stesso reservoir contenente il fegato immerso nel suo stesso sangue. Questo nuovo sistema detto "aperto" dà notevoli vantaggi:

- permette di eseguire un numero illimitato di biopsie senza il temibile rischio di emorragia poiché il sanguinamento provocato dall'infissione dell'ago tranciante all'interno del parenchima epatico viene raccolto all'interno del reservoir che lo immette nel circuito.

- per analoghe motivazioni consente la perfusione anche di *Split* di fegato
- infine, avendo a livello delle Vene Sovraepatiche pressioni bassissime, riduce il rischio di danni endoteliali che viceversa si potrebbero creare in presenza di pressioni più alte.

Come liquido di perfusione abbiamo impiegato il Krebs, già utilizzato con successo nella preservazione del fegato di ratto.

In uno studio preliminare avevamo impiegato per la perfusione il sangue prelevato dallo stesso suino con l'indiscutibile vantaggio di ottenere un ottimo trasporto di ossigeno ai tessuti senza la necessità di avere flussi di perfusione elevati che potrebbero danneggiare gli endoteli^{84,85}. Il sangue contiene sostanze

nutritive per il graft e sembra in grado di neutralizzare i radicali xantina ossidasi-dipendenti⁸⁶.

Questa procedura è stata ben presto accantonata per semplificare le procedure di preservazione (difficoltà nel reperire e conservare una quantità di sangue soddisfacente per la preservazione) e per l'entusiasmo derivato dai buoni risultati ottenuti col preservazione con Krebs nel piccolo animale.

Abbiamo quindi testato il fegato suino in Machine Perfusion a temperature di 20°C, come suggerito dalle ricerche sul ratto, a temperature di 37°C e in Cold Storage a 4°C. Questi ultimi due fungono da gruppi di controllo con i quali confrontare i risultati ottenuti nella perfusione a 20°C, in quanto rappresentano le temperature massima e minima utilizzate in questo ambito di ricerca. La scelta della temperatura a 20° in particolare è dettata dalle necessità da una parte di abbassare il metabolismo cellulare epatico in maniera significativa e dall'altra di avere una temperatura ragionevolmente alta per utilizzare i fegati steatosici, molto sensibili al danno da freddo. Ricordiamo che l'ipotermia (0-4°C) non è soltanto dannosa per il graft epatico grasso ma lo può essere, se protratta, anche per tutte le cellule, infatti il freddo sembra determinare apoptosi di queste per i cambiamenti che si manifestano a livello della membrana cellulare le quali passano da una fase liquida a una più cristallina.

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 nei due gruppi di studio in Machine Perfusion è sovrapponibile per quanto riguarda AST, ALT e LDH sia nella perfusione che nel rewarming, dimostrando una significativa differenza con il Cold Storage che viceversa dà risultati meno soddisfacenti (grafici 7, 8 e 10).

La produzione biliare nei graft perfusi a 20°C, come già evidenziato nel piccolo animale, nel rewarming è superiore rispetto agli altri due gruppi e dimostra l'ottima ripresa di funzionalità del fegato dopo riperfusione (grafico 11).

Come ulteriore riprova della buona funzionalità del fegato conservato a 20°C abbiamo eseguito test dinamici al verde di indocianina. Nella preservazione a 20°C i valori di clearance del verde d'indocianina si sono dimostrati simili a quelli ottenuti in normotermia e di molto superiori a quelli ottenuti a 4°C.

Un altro risultato estremamente importante proviene dall'analisi dei preparati istologici in cui i parametri più significativi per la valutazione del danno da ischemia-riperfusion sono la necrosi e la congestione vascolare (grafico 12-13). Nel gruppo conservato a 20°C alla seconda ora di reperfusion non è presente necrosi (foto 13 e 14), mentre questa si può riscontrare nei preparati dei fegati in Cold Storage, sempre dopo due ore di rewarming. La Machine Perfusion a 37°C dà risultati quasi sovrapponibili a quelli dell'ipotermia moderata tranne che per la maggior congestione vascolare, cosa che si trova ancora di più nella preservazione a 4°C.

Quindi dalla nostra ricerca risulta evidente che vi è differenza tra la perfusione a 37° e a 20°C a vantaggio naturalmente di quest'ultima e attraverso questi riscontri possiamo dimostrare quindi l'efficacia della preservazione con la macchina a perfusione continua a 20°C sul grande animale.

CONCLUSIONI

Se su fegati normali sia dal punto di vista biochimico che istologico si è dimostrato come la Machine Perfusion in moderata ipotermia sia di valido beneficio nella preservazione del graft, induttivamente, siamo portati a pensare che, sia su fegati steatosici che di donatori a cuore non battente, questo tipo di setting potrebbe funzionare dando risultati altrettanto soddisfacenti. Quindi i passi successivi della nostra ricerca consisteranno nell'approfondimento delle problematiche connesse alla conservazione degli organi marginali e in particolar modo di quelli steatosici.

Dati preliminari di uno studio ancora in corso, in collaborazione con l'Università di Pavia, su fegati steatosici di ratti Zucker, conferma i risultati ottenuti con la preservazione in Machine Perfusion a 20°C.

L'ingegnerizzazione del nostro modello e il passaggio alla fase clinica sono altri punti che dovranno essere sviluppati nel tentativo di ottenere un sistema di Machine Perfusion trasportabile e di facile impiego come quelle già esistenti in commercio per la preservazione del graft cardiaco (foto 16).

Component	CS	UW
Hydroxy-ethyl-starch (g/L)		50
Raffinose (mmol/L)		30
Mannitol (mmol/L)	60	
Lactobionate (mmol/L)	80	100
Glutammate (mmol/L)	20	
Glutathione (mmol/L)	3	
Allopurinolo (mmol/L)	1	
Adenosine (mmol/L)		5
Histidine (mmol/L)	30	
Potassium phosphate (mmol/L)		25
Magnesium sulfate (mmol/L)		4.8
Potassium chloride (mmol/L)	15	
Calcium chloride (mmol/L)	0.25	
Magnesium chloride (mmol/L)	13	
Sodium hydroxile (mmol/L)	100	
Potassium hydroxile (mmol/L)		100
Osmolarity (mOsM)	320	320

Da Cavallari et Al. Liver Trasplantation, 2003,9,:814-21

Tabella I: Costituenti della soluzione Celsior e dell'UW

	Numero di animali	Liquido di preservazione	Tempo di preservazione	Tempo di rewarming a 37°C	Temperatura di preservazione
GRUPPO C	8	Celsior	Otto ore	Due ore	4°C
GRUPPO N	8	Krebs	Otto ore	Due ore	37°C
GRUPPO I	8	Krebs	Otto ore	Due ore	20°C

Tabella II: Gruppi di Studio

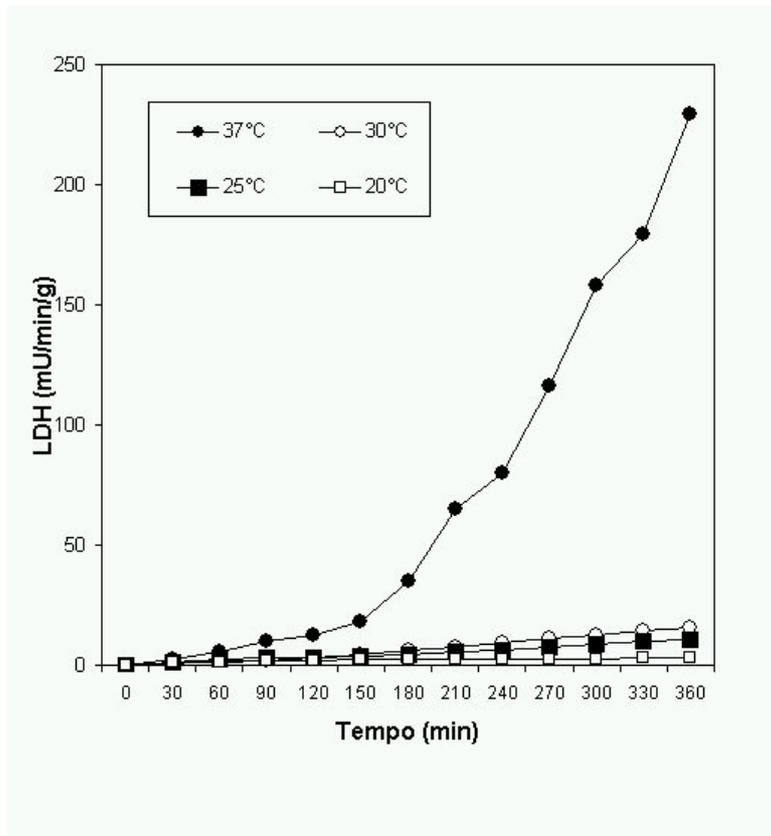


Grafico 1: Piccolo animale: andamento dell'LDH in Machine Perfusion a temperature differenti (20, 25, 30, 37°C).

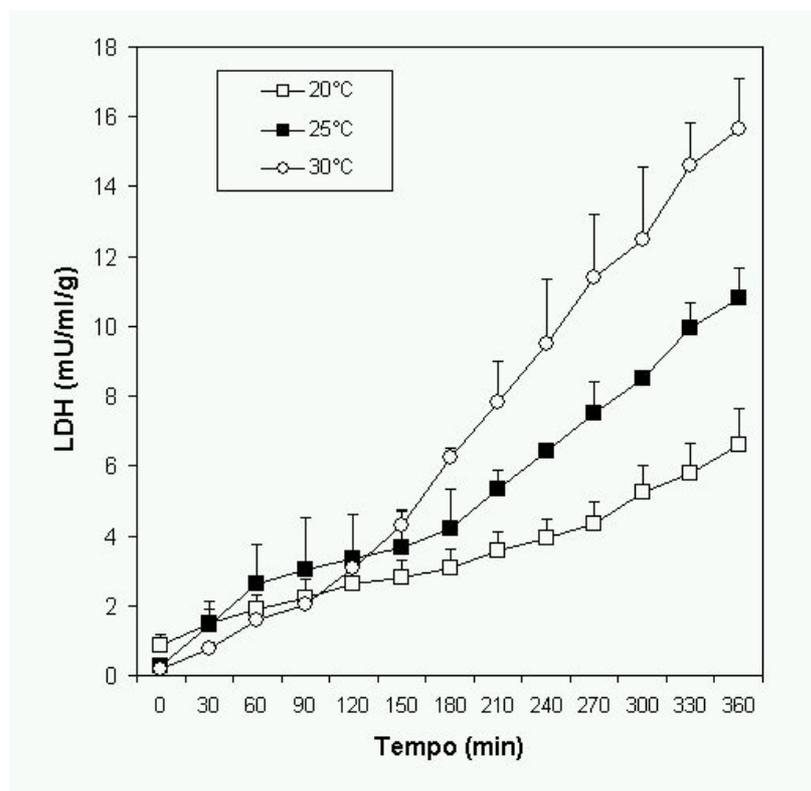


Grafico 2: Piccolo animale: particolare del grafico precedente. Vengono qui sottolineati gli andamenti dell'LDH in Machine Perfusion a 20, 25, 30°.

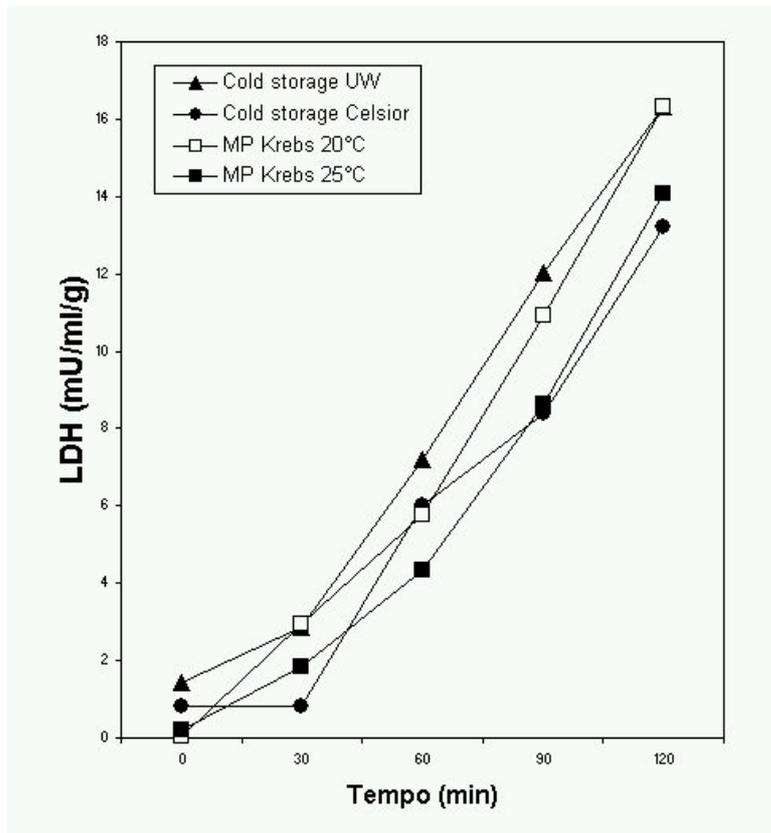


Grafico 3: Piccolo animale: andamento dell'LDH nella fase di rewarming dei gruppi conservati in Cold Storage con Celsior e UW, e in Machine Perfusion a 20 e 25°C.

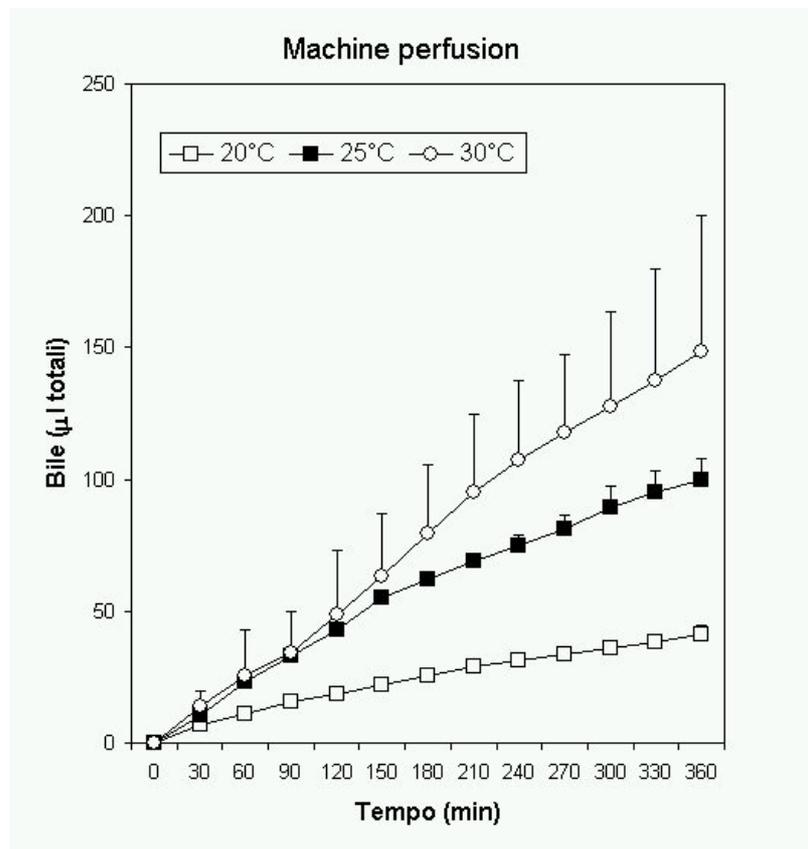


Grafico 4: Produzione biliare in Machine Perfusion a 20, 25, 30°C nel corso delle 6 ore di preservazione.

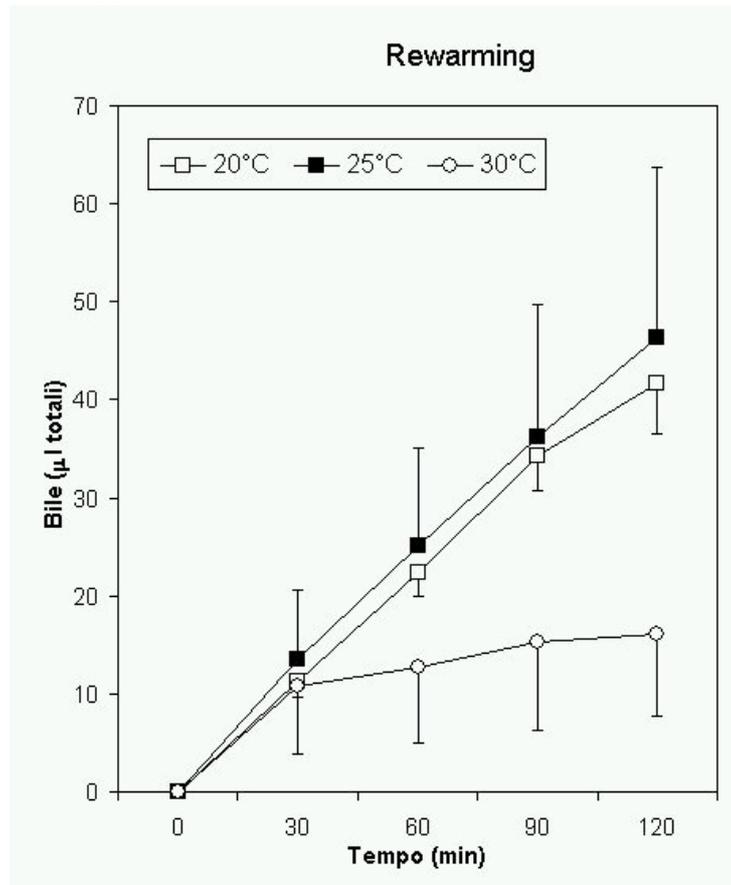


Grafico 5: Piccolo animale: produzione biliare nel corso del rewarming di organi preservati in Machine Perfusion a 20, 25, 30°C.

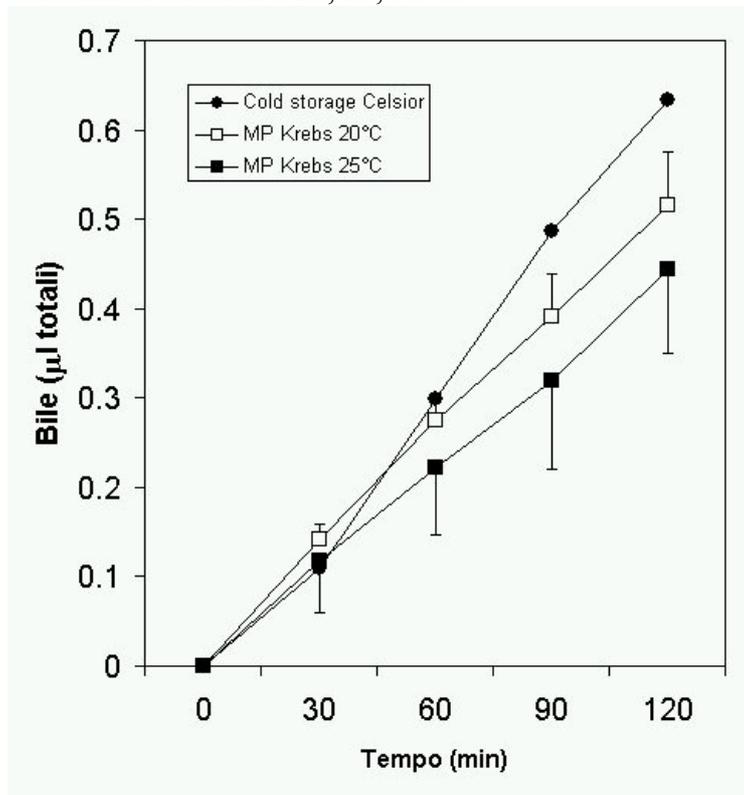


Grafico 6: Piccolo animale: produzione biliare nel corso del rewarming di organi conservati in Machine Perfusion a 20 e 25°C, e in Cold Storage con Celsior.

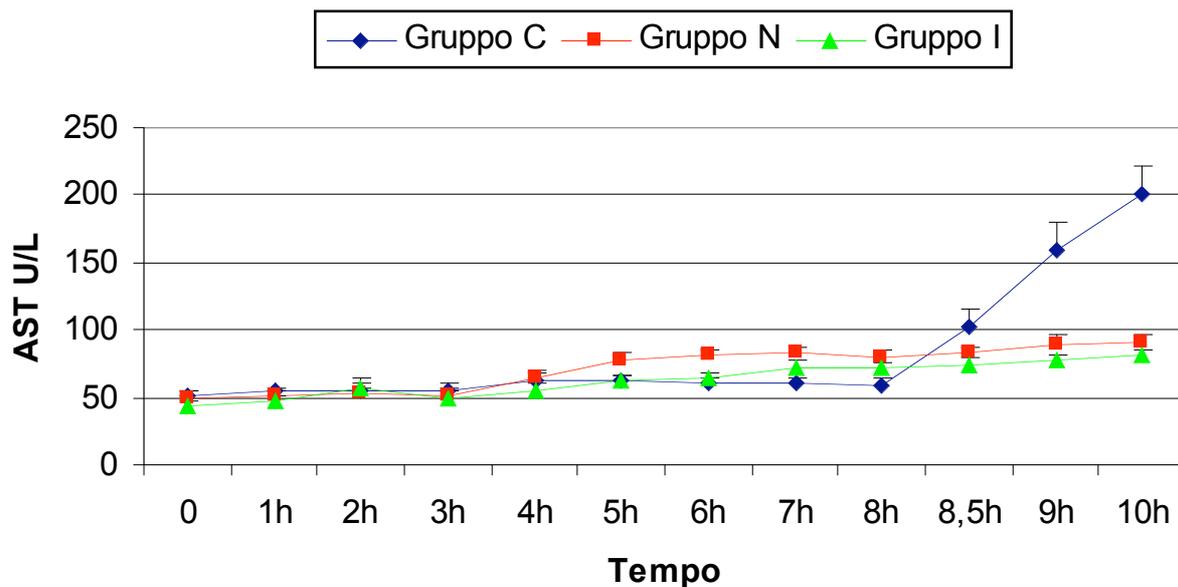


Grafico 7: Grande animale: andamento delle AST nelle 8 ore di preservazione e nelle seguenti 2 di rewarming in Cold Storage (gruppo C), in Machine perfusion a 37°C (gruppo N) e in Machine Perfusion a 20°C (gruppo I).

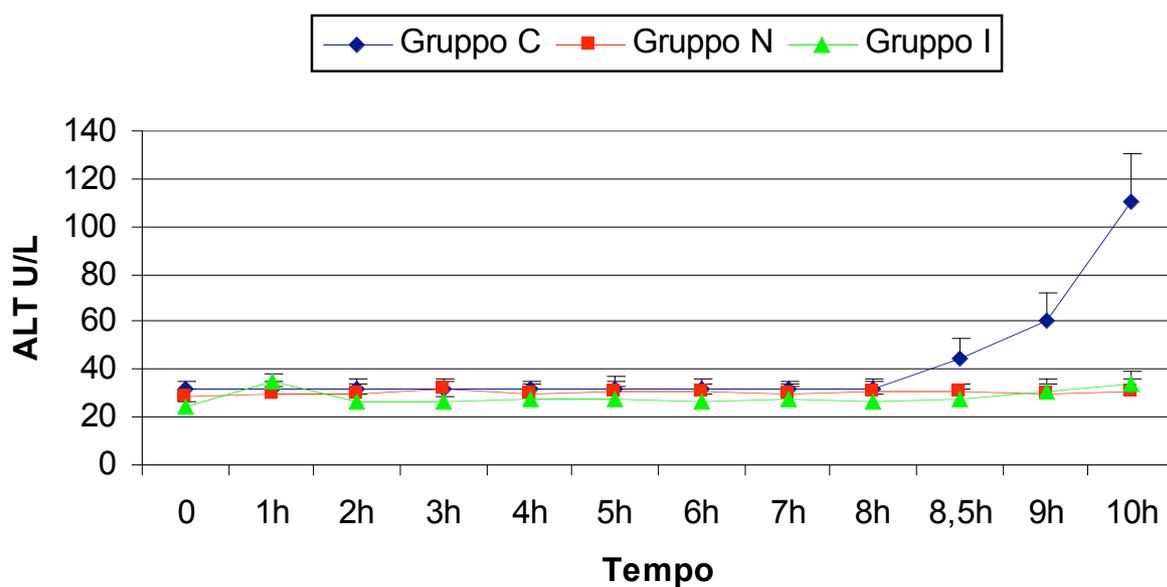


Grafico 8: Grande animale: andamento delle ALT nelle 8 ore di preservazione e nelle seguenti 2 di rewarming in Cold Storage (gruppo C), in Machine perfusion a 37°C (gruppo N) e in Machine Perfusion a 20°C (gruppo I).

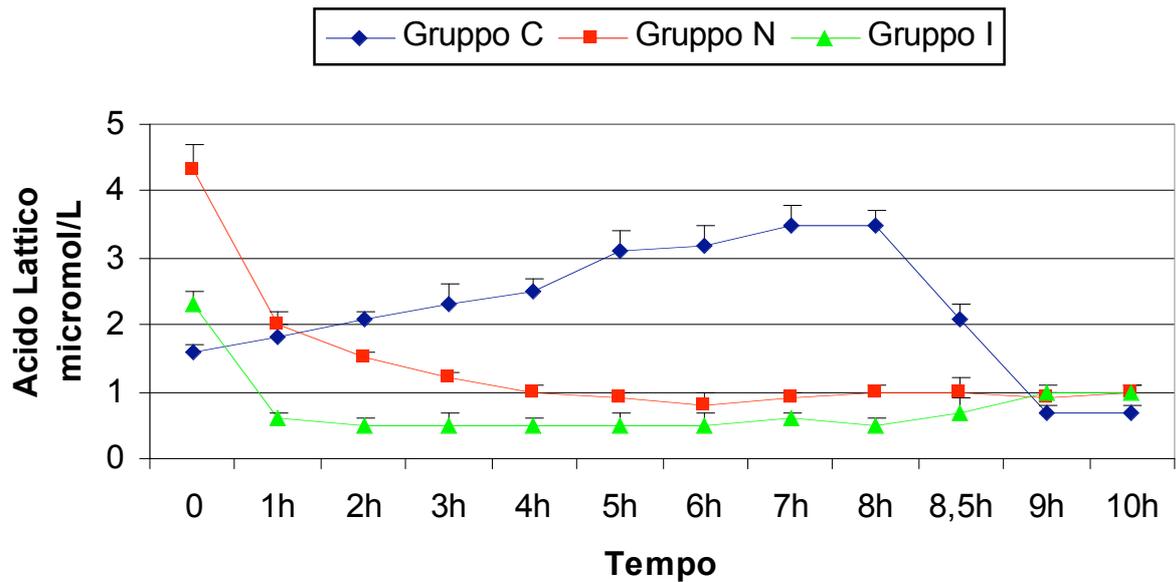


Grafico 9: Grande animale: andamento dell'Acido Lattico nelle 8 ore di preservazione e nelle seguenti 2 di rewarming in Cold Storage (gruppo C), in Machine perfusion a 37°C (gruppo N) e in Machine Perfusion a 20°C (gruppo I).

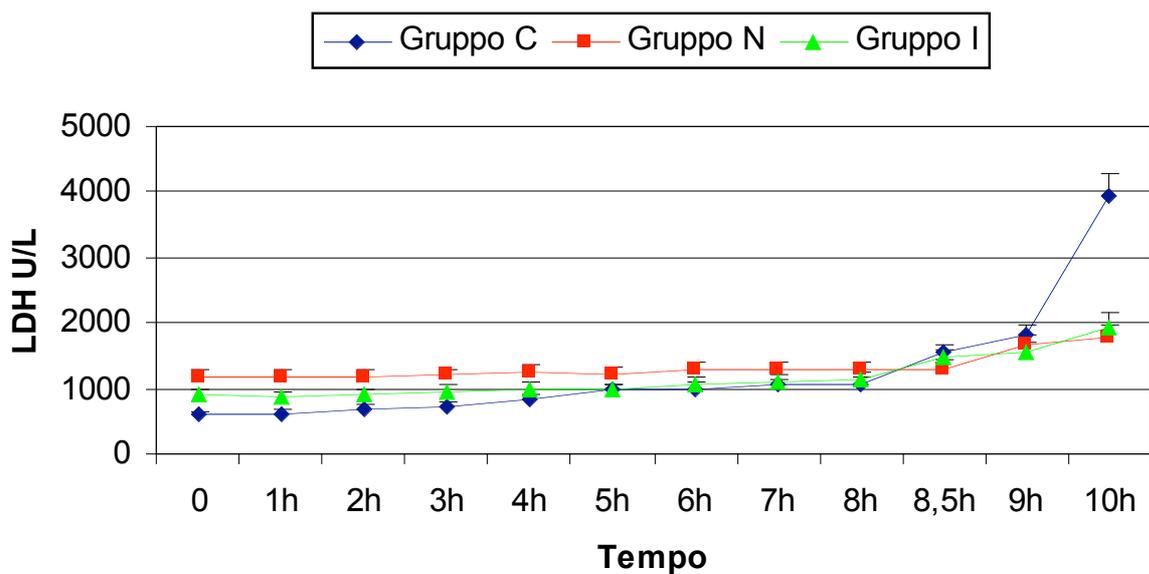


Grafico 10: Grande animale: andamento dell'LDH nelle 8 ore di preservazione e nelle seguenti 2 di rewarming in Cold Storage (gruppo C), in Machine perfusion a 37°C (gruppo N) e in Machine Perfusion a 20°C (gruppo I).

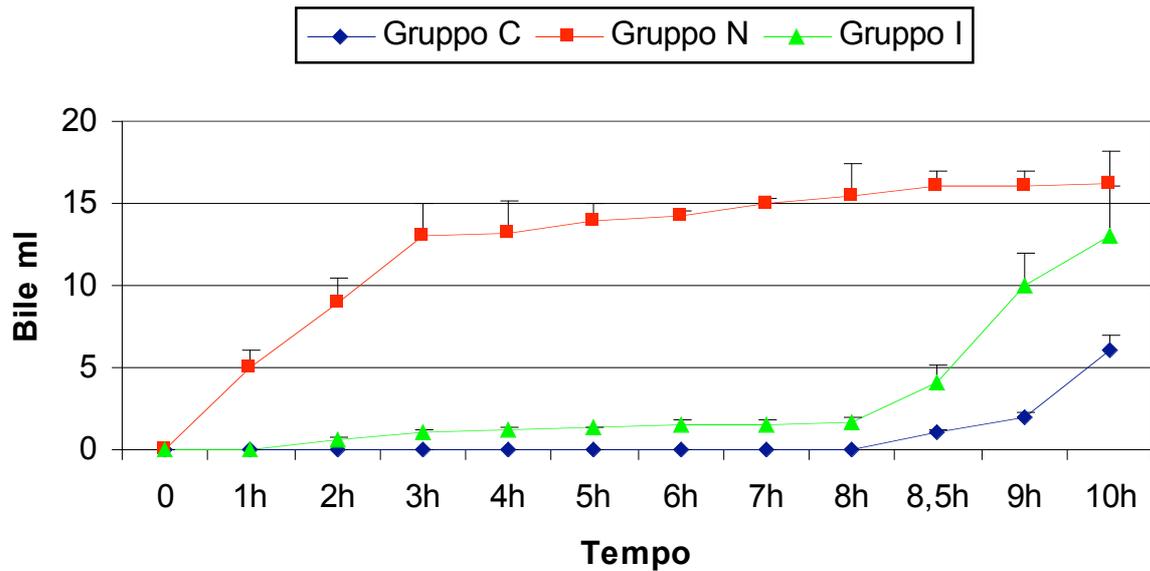


Grafico 11: Grande animale: produzione biliare nelle 8 ore di preservazione e nelle seguenti 2 di rewarming in Cold Storage (gruppo C), in Machine perfusion a 37°C (gruppo N) e in Machine Perfusion a 20°C (gruppo I).

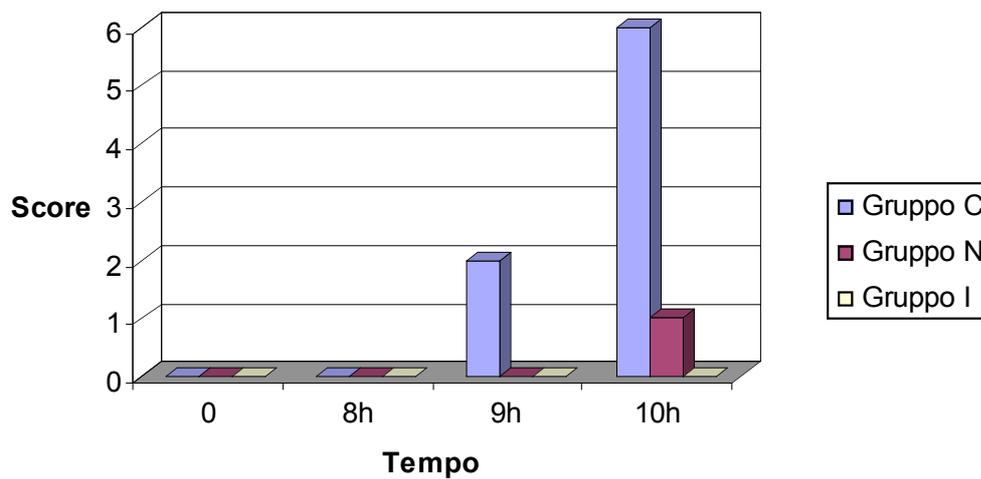


Grafico 12: Grande animale: valutazione della necrosi parenchimale in campioni prelevati a 0, 8h, 9h (prima ora di rewarming) e 10h (seconda ora di rewarming) in Cold Storage (gruppo C), in Machine perfusion a 37°C (gruppo N) e in Machine Perfusion a 20°C (gruppo I). Lo Score totale di necrosi rappresentato per ciascun gruppo è la somma dei singoli score di necrosi dei vari animali.

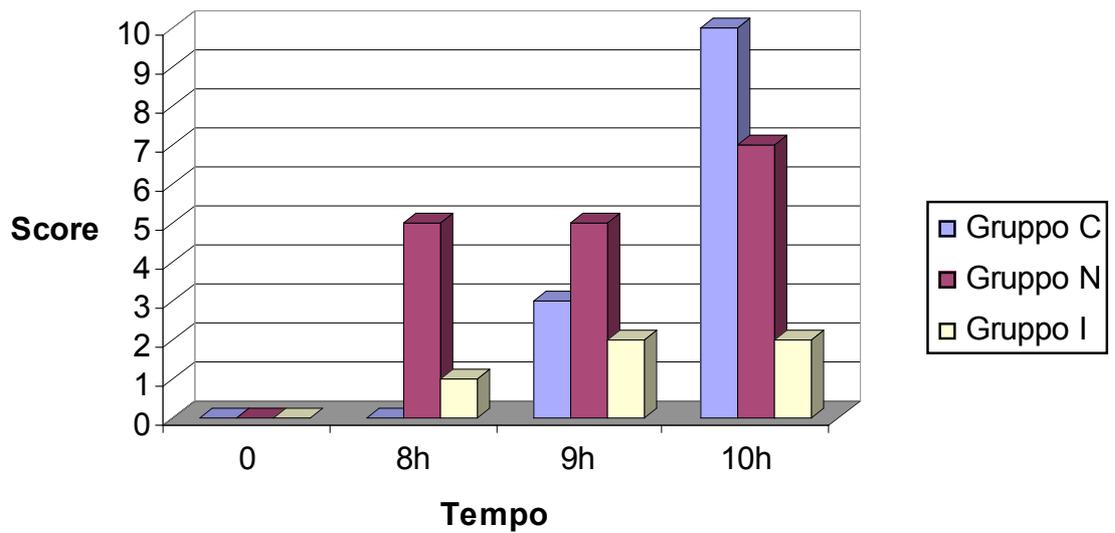


Grafico 13: Grande animale: valutazione della congestione in campioni prelevati a 0, 8h, 9h (prima ora di rewarming) e 10h (seconda ora di rewarming) in Cold Storage (gruppo C), in Machine perfusion a 37°C (gruppo N) e in Machine Perfusion a 20°C (gruppo I). Lo Score totale di congestione rappresentato per ciascun gruppo è la somma dei singoli score di necrosi dei vari animali.



Foto 1: Fegato di ratto prelevato e perfuso, previa cannulazione della vena porta, prima di essere allocato in *machine perfusion*

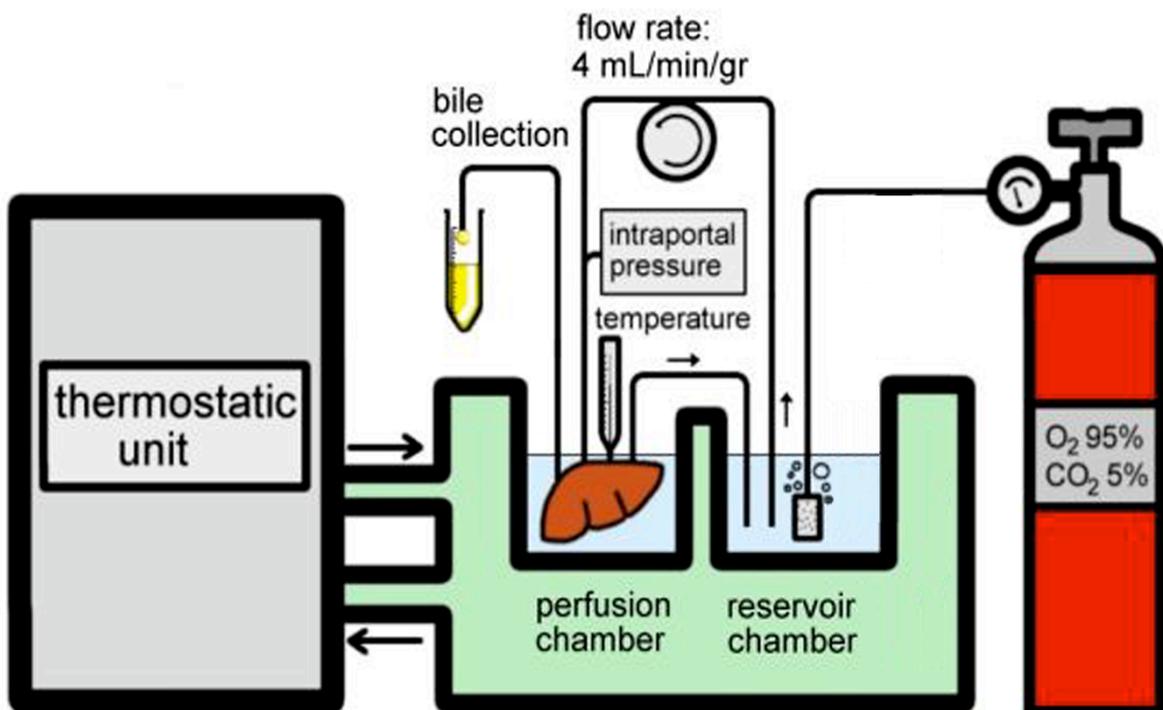


Figura 1: Rappresentazione schematica della *machine perfusion* per la preservazione del fegato nel piccolo animale (ratto)

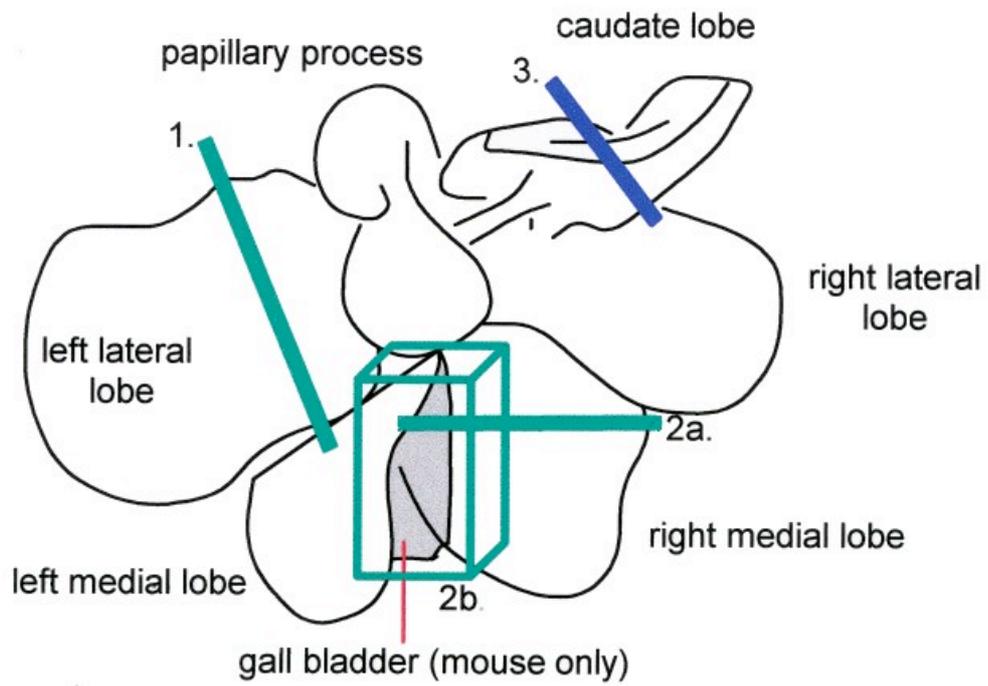


Figura 2: Rappresentazione schematica del fegato con identificazione dei 4 lobi principali.

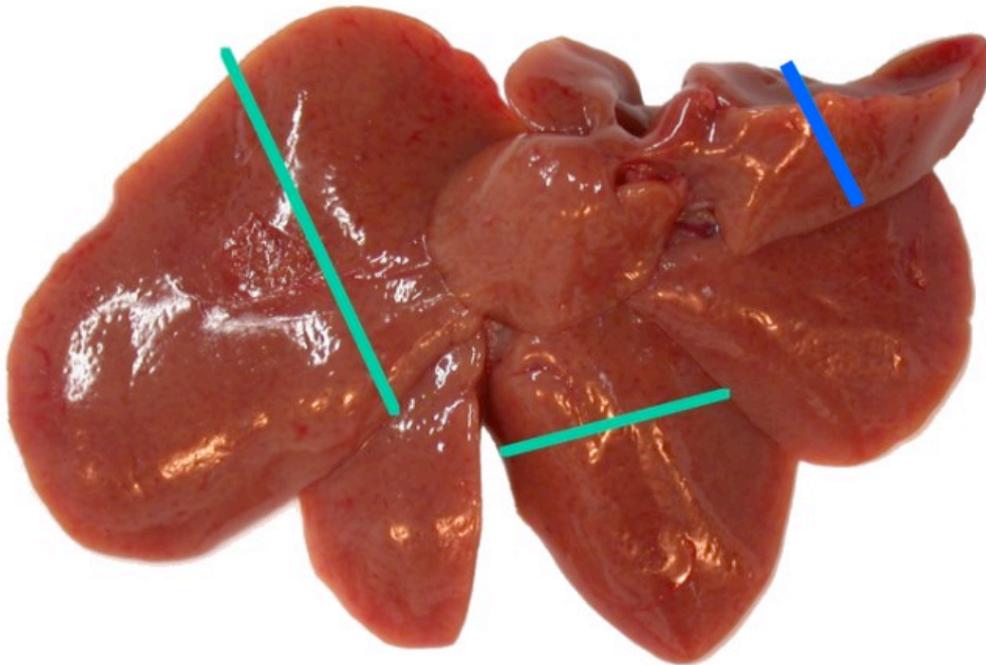


Foto 2: anatomia macroscopica del fegato. Si identificano i 4 lobi principali: lobo mediano (laterale e mediale), lobo caudato, lobo laterale destro, lobo laterale sinistro.

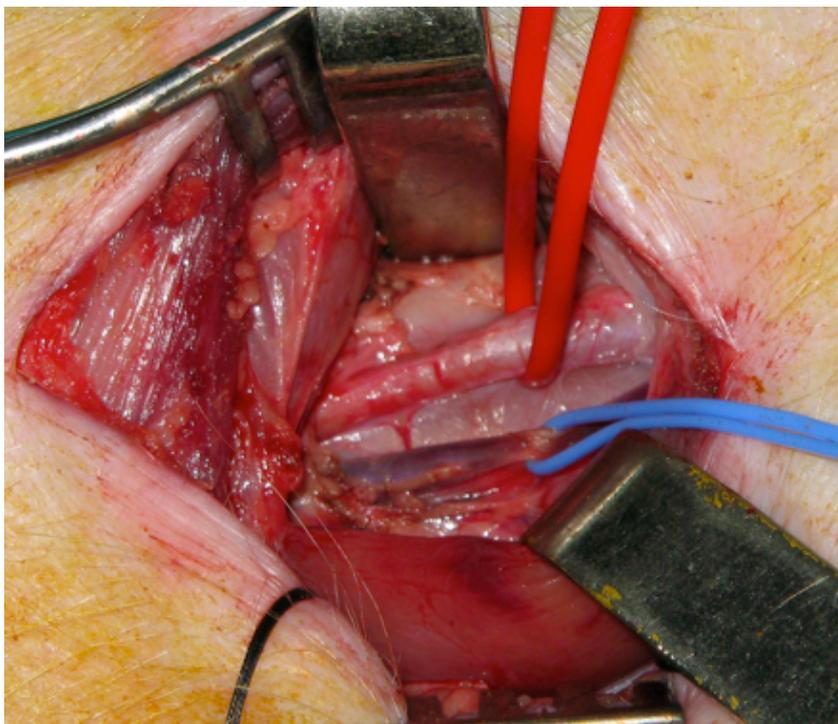


Foto 3: Fase preliminare di preparazione al collo del maiale: isolamento della vena giugulare e della carotide.

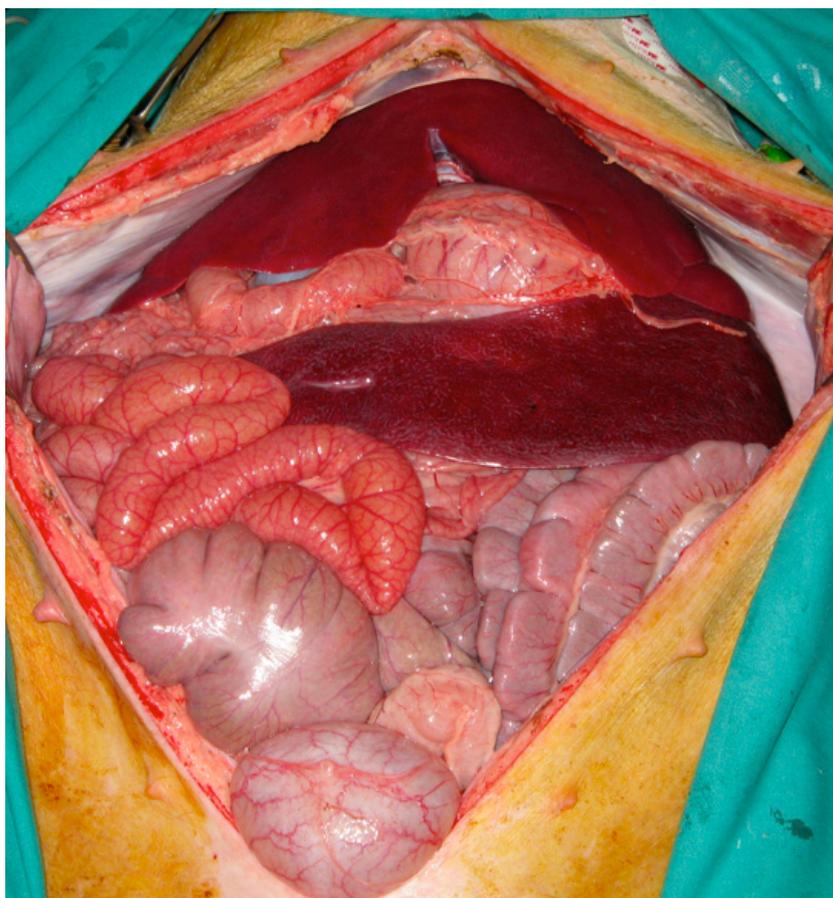


Foto 4: Laparotomia mediana ed espollazione della cavità addominale.

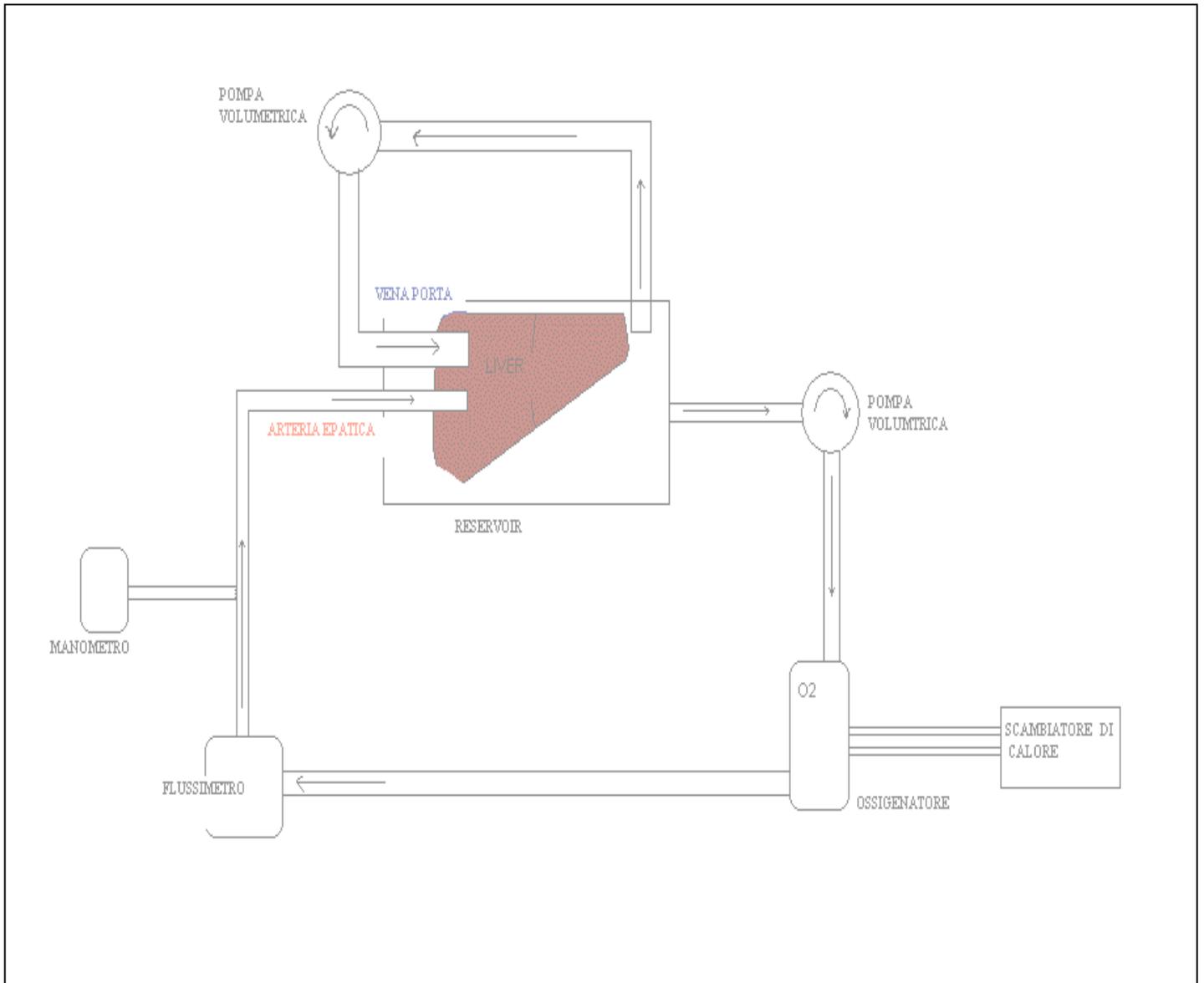


Figura 3: Illustrazione schematica della Machine Perfusion nel grande animale (maiale).



Foto 5: Reservoir

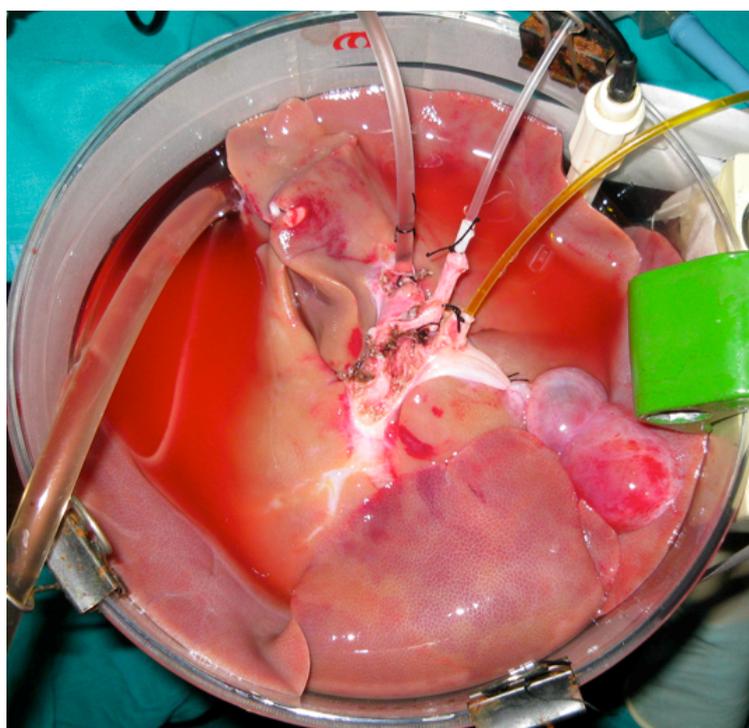


Foto 6: Fegato cannulato nel reservoir



Foto 7: Pompa volumetrica rotativa Watson Marlow



Foto 8: Ossigenatore pediatrico Lilliput 2



Foto 9: Flussimetro magnetico Admac AE



Foto 10: Circuito con scambiatore di calore.

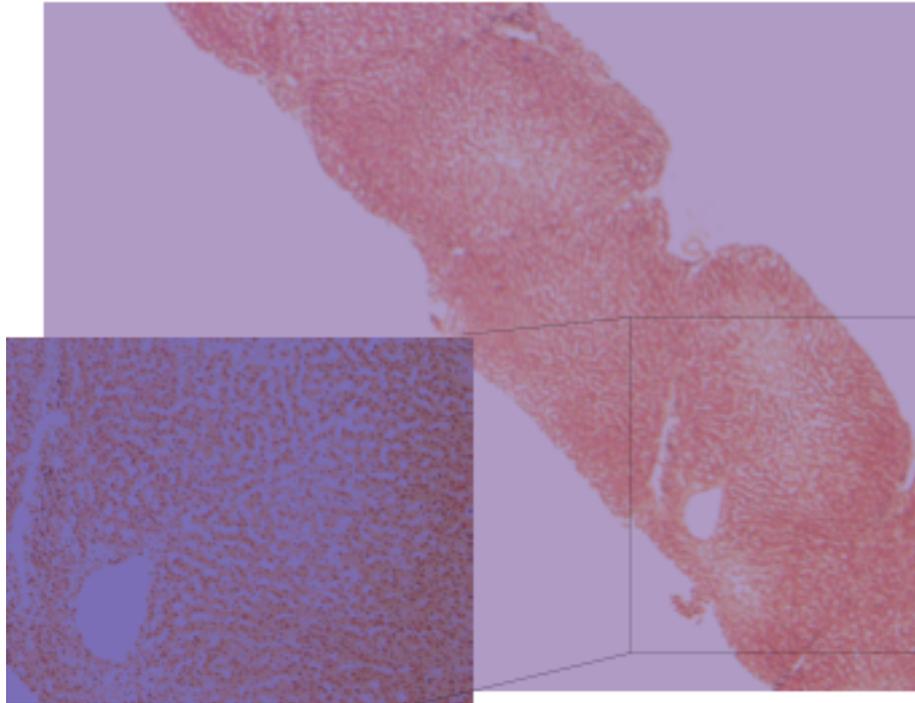


Foto 11: Frammento istologico di fegato di maiale appartenente al gruppo I (20°C) alla 1h di perfusione. Edema: score 2; Vacuolizzazione: score 2
Ematossilina-eosina: 15X e 25X
Nel riquadro il lobulo in cui si evidenzia edema con scostamento delle lamine epatocitarie.

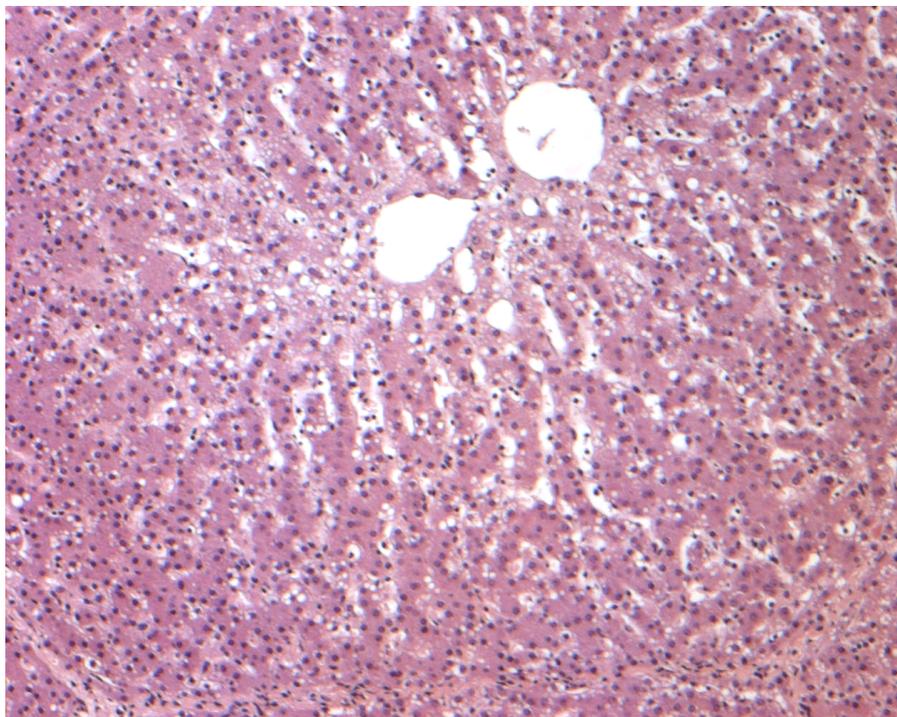


Foto 12: Frammento istologico di fegato di maiale appartenente al gruppo I (20°C) alla 8h di perfusione. Edema: score 3; Vacuolizzazione: score 3
si evidenzia un maggior edema con scostamento delle lamine epatocitarie, anche i lobuli vicini mostrano scostamento delle lamine.

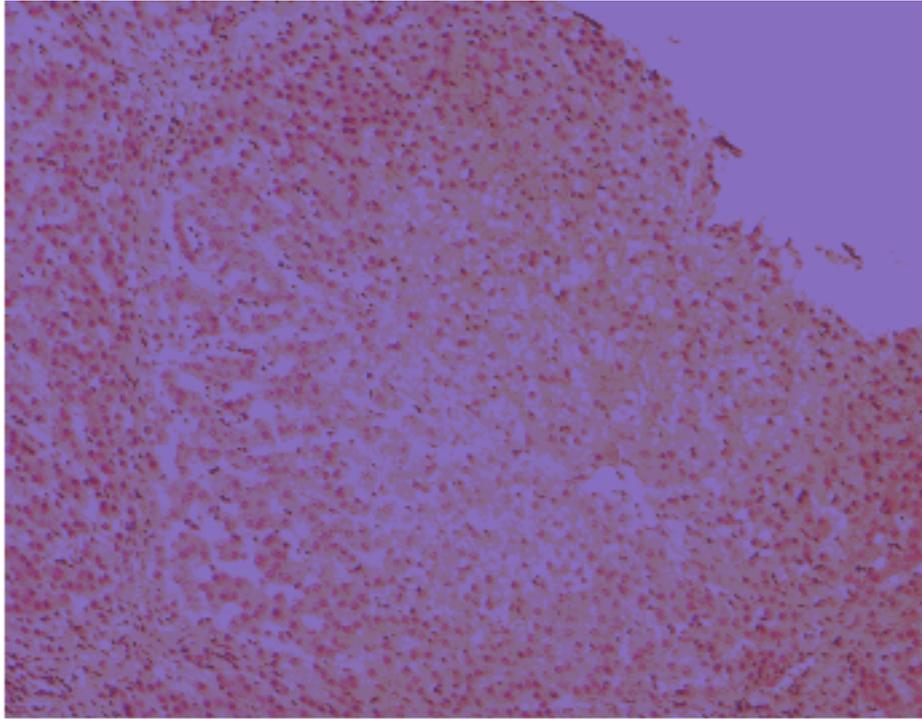


Foto 13: Frammento istologico di maiale appartenente al gruppo C (4°C) alla 2h di rewarming.

Ematossilina-eosina: 25X

In questo lobulo si evidenzia la congestione e la necrosi di alcuni epatociti.

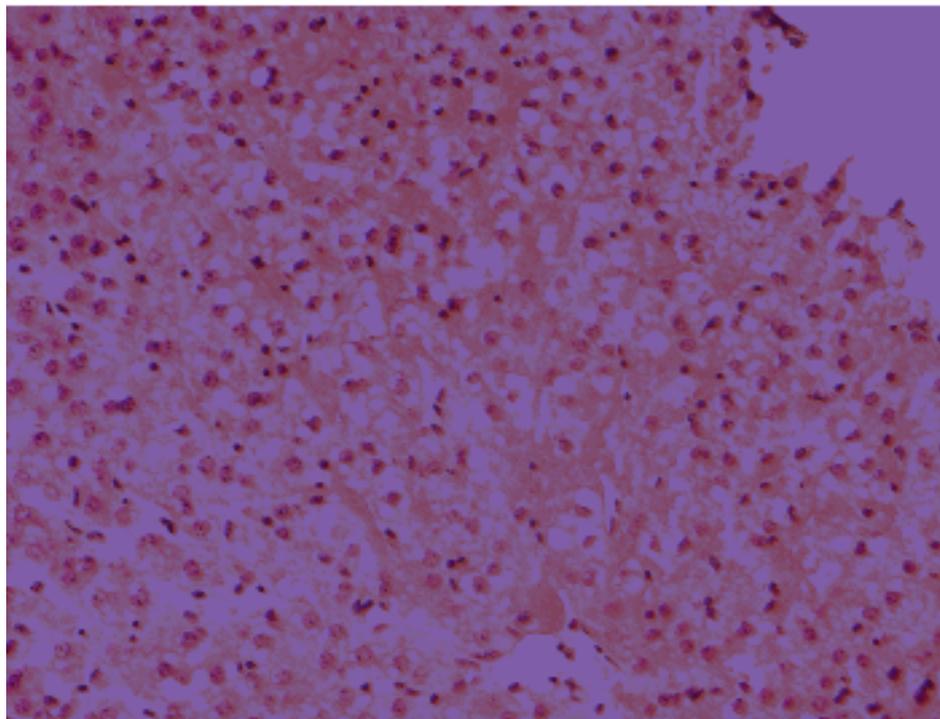


Foto 14: Particolare della precedente in cui è più evidente la necrosi associata ad elementi infiammatori.

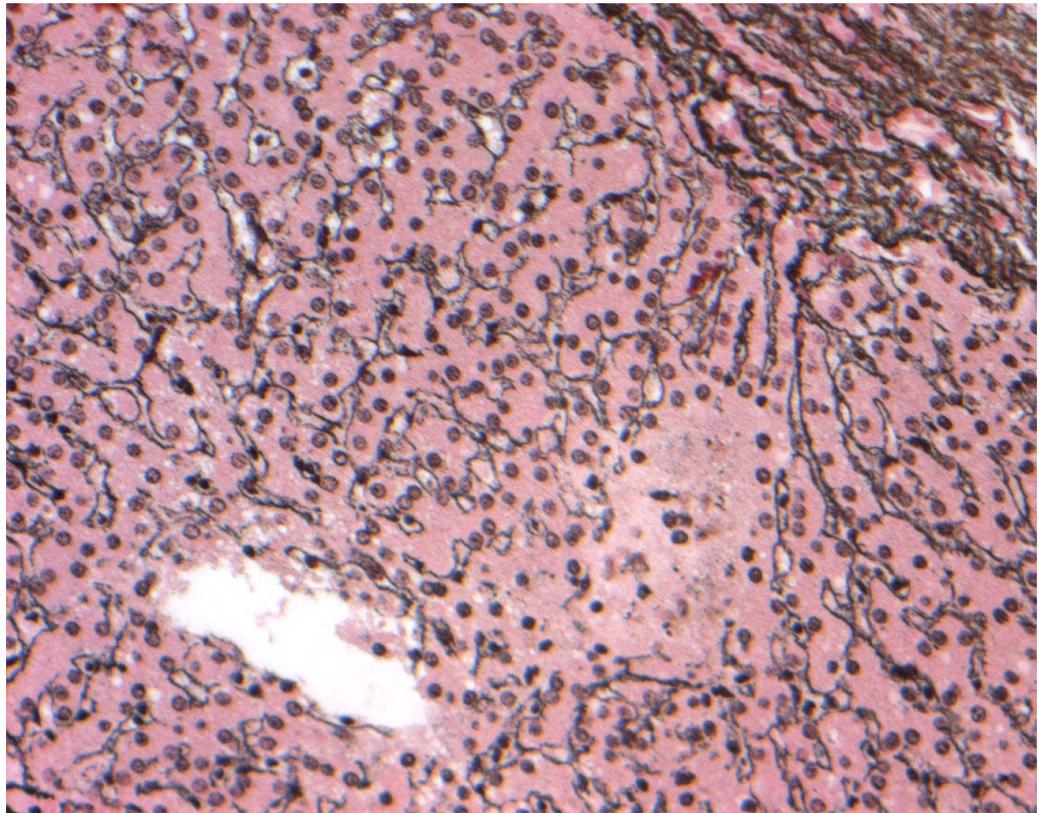


Foto 15: Frammento istologico di maiale appartenente al gruppo C (4°C) alla 2h di rewarming.
Colorazioni per fibre reticolari secondo Gomori: 50X.
La foto mostra il lobulo con necrosi in cui la trama reticolare (le linee scure) sono state distrutte.

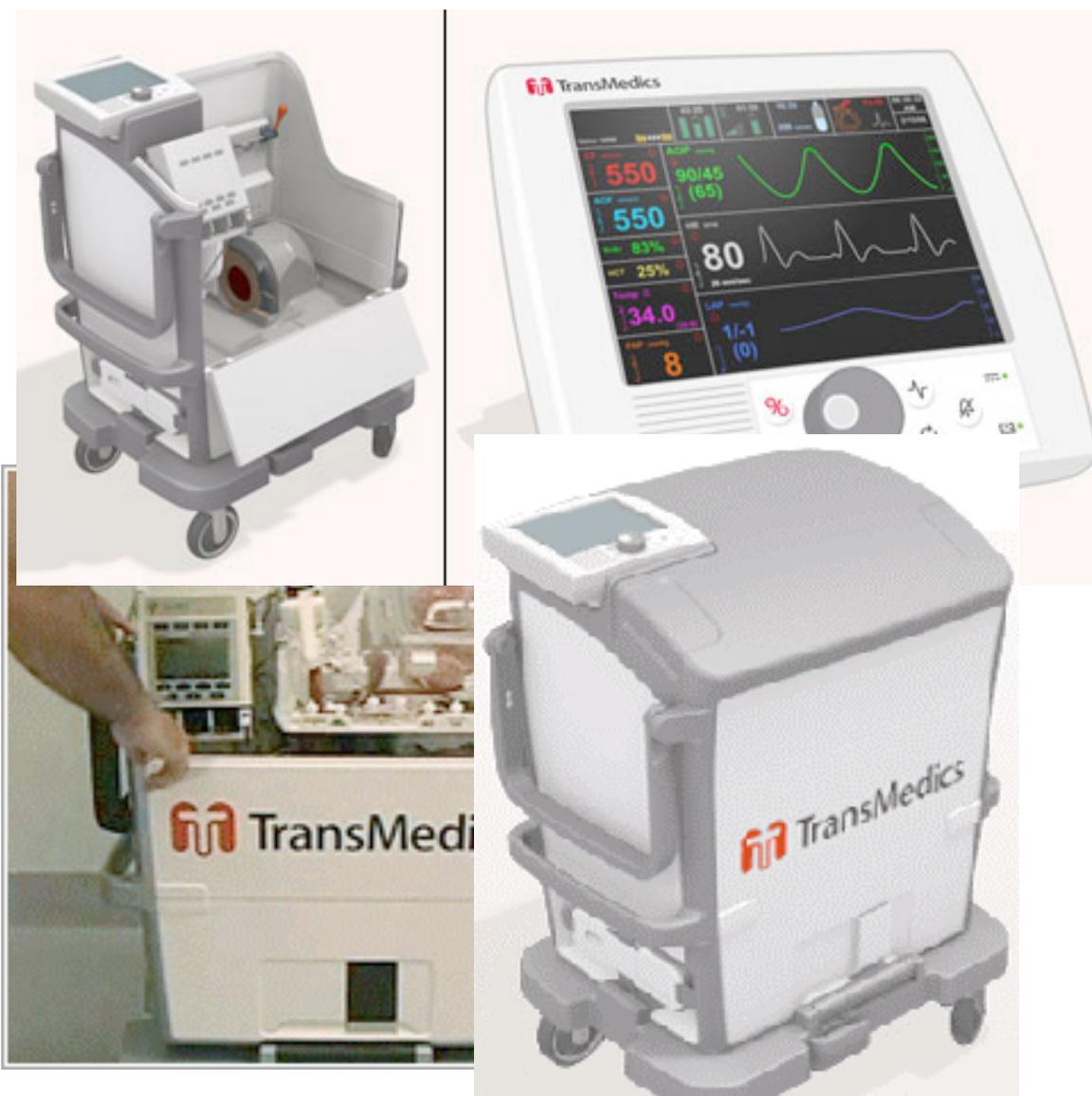


Foto 16: Sistema di perfusione parenchimale trasportabile presente già in commercio e adottato per la perfusione del graft cardiaco per trapianto. (TransMedics, OCS - Organ Care System)

Bibliografia

1. Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW.

Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation.

Transplant Proc. 2005 May;37(4):1653-6.

2. McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM.

Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat.

Transplantation. 1988 Aug;46(2):178-91.

3. Chazouilleres O, Calmus Y, Vaubourdolle M, Ballet F.

Preservation-induced liver injury. Clinical aspects, mechanisms and therapeutic approaches.

J Hepatol. 1993 Apr;18(1):123-34. Review.

4. Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Wisse E, Geerts A.

Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells.

Gut. 1994 Nov;35(11):1509-16. Review.

5. Takei Y, Gao WS, Hijioka T, Savier E, Lindert KA, Lemasters JJ, Thurman RG.

Increase in survival of liver grafts after rinsing with warm Ringer's solution due to improvement of hepatic microcirculation.

Transplantation. 1991 Aug;52(2):225-30.

6. Takei Y, Marzi I, Gao WS, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG.

Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat.

Transplantation. 1991 May;51(5):959-65.

7. **Cywes R, Mullen JB, Stratis MA, Greig PD, Levy GA, Harvey PR, Strasberg SM.**
Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donor liver allografts. Evidence of the importance of prepreservation injury.
Transplantation. 1993 Aug;56(2):316-23.
8. **Takei Y, Marzi I, Kauffman FC, Currin RT, Lemasters JJ, Thurman RG.**
Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker, nisoldipine.
Transplantation. 1990 Jul;50(1):14-20.
9. **Liang J, Yamaguchi Y, Matsumura F, Goto M, Akizuki E, Matsuda T, Okabe K, Ohshiro H, Ishihara K, Yamada S, Mori K, Ogawa M.**
Calcium-channel blocker attenuates Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion in rat liver.
Dig Dis Sci. 2000 Jan;45(1):201-9.
10. **Hijioka T, Rosenberg RL, Lemasters JJ, Thurman RG.**
Kupffer cells contain voltage-dependent calcium channels.
Mol Pharmacol. 1992 Mar;41(3):435-40.
11. **Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr.**
Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat.
J Clin Invest. 1990 Jun;85(6):1936-43.
12. **Goto M, Takei Y, Kawano S, Tsuji S, Fukui H, Fushimi H, Nishimura Y, Kashiwagi T, Fusamoto H, Kamada T.**
Tumor necrosis factor and endotoxin in the pathogenesis of liver and pulmonary injuries after orthotopic liver transplantation in the rat.
Hepatology. 1992 Aug;16(2):487-93.

13. **Wanner GA, Muller PE, Ertel W, Bauer M, Menger MD, Messmer K.**
Differential effect of anti-TNF-alpha antibody on proinflammatory cytokine release by Kupffer cells following liver ischemia and reperfusion.
Shock. 1999 Jun;11(6):391-5.

14. **Currin RT, Reinstein LJ, Lichtman SN, Thurman RG, Lemasters JJ.**
Inhibition of tumor necrosis factor release from cultured rat Kupffer cells by agents that reduce graft failure from storage injury.
Transplant Proc. 1993 Feb;25(1 Pt 2):1631-2.

15. **Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor BR, Blendis LM, Superina RA, Glynn MF, Langer B, et al.**
Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E1.
Transplantation. 1989 Sep;48(3):447-53.

16. **Henley KS, Lucey MR, Normolle DP, Merion RM, McLaren ID, Crider BA, Mackie DS, Shieck VL, Nostrant TT, Brown KA, et al.**
A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of prostaglandin E1 in liver transplantation.
Hepatology. 1995 Feb;21(2):366-72.

17. **Kornberg A, Schotte U, Kupper B, Hommann M, Scheele J.**
Impact of selective prostaglandin E1 treatment on graft perfusion and function after liver transplantation.
Hepatology. 2004 Mar-Apr;51(56):526-31.

18. **Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ.**
Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats.
J Leukoc Biol. 1992 Oct;52(4):377-82.

19. **Rentsch M, Puellmann K, Sirek S, Iesalnieks I, Kienle K, Mueller T, Bolder U, Geissler E, Jauch KW, Beham A.**
Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival.*
Transpl Int. 2005 Sep;18(9):1079-89.
20. **Roland CR, Naziruddin B, Mohanakumar T, Flye MW.**
Gadolinium blocks rat Kupffer cell calcium channels: relevance to calcium-dependent prostaglandin E2 synthesis and septic mortality.
Hepatology. 1999 Mar;29(3):756-65.
21. **Fitzpatrick DB, Karmazyn M.**
Comparative effects of calcium channel blocking agents and varying extracellular calcium concentration on hypoxia/reoxygenation and ischemia/reperfusion-induced cardiac injury.
J Pharmacol Exp Ther. 1984 Mar;228(3):761-8.
22. **Wilson DR, Arnold PE, Burke TJ, Schrier RW.**
Mitochondrial calcium accumulation and respiration in ischemic acute renal failure in the rat.
Kidney Int. 1984 Mar;25(3):519-26.
23. **Grinyo JM.**
Reperfusion injury.
Transplant Proc. 1997 Feb-Mar;29(1-2):59-62. Review.
24. **Lemasters JJ, DiGuseppi J, Nieminen AL, Herman B.**
Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes.
Nature. 1987 Jan 1-7;325(6099):78-81.

25. Lemasters JJ, Ji S, Thurman RG.

Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver.

Science. 1981 Aug 7;213(4508):661-3.

26. Lemasters JJ, Stemkowski CJ, Ji S, Thurman RG.

Cell surface changes and enzyme release during hypoxia and reoxygenation in the isolated, perfused rat liver.

J Cell Biol. 1983 Sep;97(3):778-86.

27. Cywes R, Greig PD, Sanabria JR, Clavien PA, Levy GA, Harvey PR, Strasberg SM.

Effect of intraportal glucose infusion on hepatic glycogen content and degradation, and outcome of liver transplantation.

Ann Surg. 1992 Sep;216(3):235-46; discussion 246-7.

28. Morgan GR, Sanabria JR, Clavien PA, Phillips MJ, Edwards C, Harvey PR, Strasberg SM.

Correlation of donor nutritional status with sinusoidal lining cell viability and liver function in the rat.

Transplantation. 1991 Jun;51(6):1176-83.

29. Boudjema K, Lindell SL, Southard JH, Belzer FO.

The effects of fasting on the quality of liver preservation by simple cold storage.

Transplantation. 1990 Dec;50(6):943-8.

30. Palombo JD, Hirschberg Y, Pomposelli JJ, Blackburn GL, Zeisel SH, Bistran BR.

Decreased loss of liver adenosine triphosphate during hypothermic preservation in rats pretreated with glucose: implications for organ donor management.

Gastroenterology. 1988 Oct;95(4):1043-9.

31. Jaeschke H.

Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences.

J Hepatol. 1996 Nov;25(5):774-80. Review.

32. Sumimoto R, Southard JH, Belzer FO.

Livers from fasted rats acquire resistance to warm and cold ischemia injury.

Transplantation. 1993 Apr;55(4):728-32.

33. Sankary HN, Chong A, Foster P, Brown E, Shen J, Kimura R, Rayudu G, Williams J.

Inactivation of Kupffer cells after prolonged donor fasting improves viability of transplanted hepatic allografts.

Hepatology. 1995 Oct;22(4 Pt 1):1236-42.

34. Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF.

CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver.

J Clin Invest. 1997 Jul 15;100(2):279-89.

35. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW.

Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo.

FASEB J. 1990 Dec;4(15):3355-9.

36. Essani NA, Fisher MA, Farhood A, Manning AM, Smith CW, Jaeschke H.

Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure.

Hepatology. 1995 Jun;21(6):1632-9.

37. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ, Smith CW.
Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver.
Hepatology. 1993 May;17(5):915-23.

38. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H.
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver.
J Leukoc Biol. 1995 Mar;57(3):368-74.

39. Jaeschke H, Smith CW.
Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury.
J Leukoc Biol. 1997 Jun;61(6):647-53. Review.

40. Mandel LJ, Takano T, Soltoff SP, Murdaugh S.
Mechanisms whereby exogenous adenine nucleotides improve rabbit renal proximal function during and after anoxia.
J Clin Invest. 1988 Apr;81(4):1255-64.

41. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P.
Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues.
Circulation. 1989 Nov;80(5):1115-27. Review.

42. Rhoden E, Pereira-Lima L, Lucas M, Mauri M, Rhoden C, Pereira-Lima JC, Zettler C, Petteffi L, Bello-Klein A.
The effects of allopurinol in hepatic ischemia and reperfusion: experimental study in rats.
Eur Surg Res. 2000;32(4):215-22.

43. **Rauen U, Viebahn R, Lauchart W, de Groot H.**
The potential role of reactive oxygen species in liver ischemia/reperfusion injury following liver surgery.
Hepatogastroenterology. 1994 Aug;41(4):333-6. Review.
44. **Yuzawa H, Fujioka H, Mizoe A, Azuma T, Furui J, Nishikawa M, Hashida M, Kanematsu T.**
Inhibitory effects of safe and novel SOD derivatives, galactosylated-SOD, on hepatic warm ischemia/reperfusion injury in pigs.
Hepatogastroenterology. 2005 May-Jun;52(63):839-43.
45. **Bauer M, Bauer I.**
Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress.
Antioxid Redox Signal. 2002 Oct;4(5):749-58. Review.
46. **Gores GJ, Nieminen AL, Fleishman KE, Dawson TL, Herman B, Lemasters JJ.**
Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP-depleted hepatocytes.
Am J Physiol. 1988 Sep;255(3 Pt 1):C315-22.
47. **Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Coote A, Thurman RG, Lemasters JJ.**
Reperfusion injury to endothelial cells after cold storage of rat livers: protection by mildly acidic pH and lack of protection by antioxidants.
Transpl Int. 1995;8(2):77-85.
48. **Gunter TE, Wingrove DE, Banerjee S, Gunter KK.**
Mechanisms of mitochondrial calcium transport.
Adv Exp Med Biol. 1988;232:1-14.
49. **Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD.**
Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion.
Am J Pathol. 1994 Dec;145(6):1421-31.

50. **Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H.**
Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia.
Shock. 1995 Oct;4(4):282-8.
51. **Hanazaki K, Kuroda T, Haba Y, Shiohara E, Kajikawa S, Iida F.**
Protective effect of the thromboxane A2 receptor antagonist ONO 3708 on ischemia-reperfusion injury in the dog liver.
Surgery. 1994 Nov;116(5):896-903.
52. **Goto M, Takei Y, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Masuda E, Nishimura Y, Okumura S, Kashiwagi T, Fusamoto H, et al.**
Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances.
Hepatology. 1994 Mar;19(3):675-81.
53. **Southard JH., Pienaar BH., McAnulty JF.:**
The UW solution for organ preservation
Transplant rev.1989; 3:103-130
54. **Sumimoto R, Kamada N.**
Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation.
Transplant Proc. 1990 Oct;22(5):2198-9.
55. **Vregdenhil PK, Belzer FO, Southard JH:**
Adenine stimulation of adenosine triphosphate synthesis in cold-stored hepatocytes.
Transplantation 1991 51:909-911

56. Boudjema K, Van Gulik TM, Lindell SL, Vreugdenhil PS, Southard JH, Belzer FO.

Effect of oxidized and reduced glutathione in liver preservation.

Transplantation. 1990 Dec;50(6):948-51.

57. Nardo B, Bellusci R, de Badiali GL, Pasquinelli G, Ferlaino F, de Raffe E, Recordare A, Vivarelli M, Mazziotti A, Cavallari A, et al.

Ultrastructural aspects of the iliac arteries of multiorgan donor preserved in University of Wisconsin solution for 48 hours.

Transplant Proc. 1992 Oct;24(5):2077-8.

58. Cavallari A, Nardo B, Pasquinelli G, Badiali de Giorgi L, Bellusci R, Ferlaino F, Recordare A, De Raffe E, Vivarelli M, Mazziotti A, et al.

Subcellular lesions of the biliary tract in human liver transplants incurred during preservation.

Transplant Proc. 1992 Oct;24(5):1979-80.

59. Southard JH, Belzer FO.

Organ preservation.

Annu Rev Med. 1995;46:235-47. Review.

60. Cavallari A, Cillo U, Nardo B, Filipponi F, Gringeri E, Montalti R, Vistoli

F, D'amico F, Faenza A, Mosca F, Vitale A, D'amico D.

A multicenter pilot prospective study comparing Celsior and University of Wisconsin preserving solutions for use in liver transplantation.

Liver Transpl. 2003 Aug;9(8):814-21.

61. Menasche P, Termignon JL, Pradier F, Grousset C, Mouas C, Alberici G, Weiss M, Piwnica A, Bloch G.

Experimental evaluation of Celsior, a new heart preservation solution.

Eur J Cardiothorac Surg. 1994;8(4):207-13.

62. **Belzer FO, Ashby BS, Dunphy JE.**
24-hour and 72-hour preservation of canine kidneys.
Lancet. 1967 Sep 9;2(7515):536-8.
63. **Bessems M, Doorschodt BM, van Vliet AK, van Gulik TM.**
Improved rat liver preservation by hypothermic continuous machine perfusion using polysol, a new, enriched preservation solution.
Liver Transpl. 2005 May;11(5):539-46.
64. **Schon MR, Hunt CJ, Pegg DE, Wight DG.**
The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury.
Transplantation. 1993 Jul;56(1):24-31.
65. **Barber WH, Hudson SL, Deierhoi MH, Laskow DA, Diethelm AG.**
Pulsatile perfusion preservation: early posttransplant dialysis requirement predicts rapid graft loss.
Transplant Proc. 1990 Apr;22(2):446-7.
66. **Henry ML, Sommer BG, Tesi RJ, Ferguson RM.**
Improved immediate renal allograft function after initial simple cold storage.
Transplant Proc. 1990 Apr;22(2):388-9.
67. **Friend PJ, Imber C, St Peter S, Lopez I, Butler AJ, Rees MA.**
Normothermic perfusion of the isolated liver.
Transplant Proc. 2001 Nov-Dec;33(7-8):3436-8.
68. **Lee CY, Jain S, Duncan HM, Zhang JX, Jones JW Jr, Southard JH, Clemens MG.**
Survival transplantation of preserved non-heart-beating donor rat livers: preservation by hypothermic machine perfusion.
Transplantation. 2003 Nov 27;76(10):1432-6.

69. Jain S, Lee CY, Baicu S, Duncan H, Xu H, Jones JW Jr, Clemens MG, Brassil J, Taylor MJ, Brockbank KG.

Hepatic function in hypothermically stored porcine livers: comparison of hypothermic machine perfusion vs cold storage.

Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):340-1.

70. Matsuno N, Uchiyama M, Iwamoto H, Hama K, Narumi Y, Kikuchi K, Degawa H, Kozaki K, Nagao T.

Machine perfusion preservation for liver transplantation from non-heart-beating donors with agonal stage.

Transplant Proc. 2002 Nov;34(7):2610-1.

71. Compagnon P, Clement B, Campion JP, Boudjema K.

Effects of hypothermic machine perfusion on rat liver function depending on the route of perfusion.

Transplantation. 2001 Aug 27;72(4):606-14.

72. Kim JS, Boudjema K, D'Alessandro A, Southard JH.

Machine perfusion of the liver: maintenance of mitochondrial function after 48-hour preservation.

Transplant Proc. 1997 Dec;29(8):3452-4.

73. Pienaar BH, Lindell SL, Van Gulik T, Southard JH, Belzer FO.

Seventy-two-hour preservation of the canine liver by machine perfusion.

Transplantation. 1990 Feb;49(2):258-60.

74. van der Plaats A, 't Hart NA, Verkerke GJ, Leuvenink HG, Ploeg RJ, Rakhorst G.

Hypothermic machine preservation in liver transplantation revisited: concepts and criteria in the new millennium.

Ann Biomed Eng. 2004 Apr;32(4):623-31. Review.

75. Imber CJ, St Peter SD, Lopez de Cenarruzabeitia I, Pigott D, James T, Taylor R, McGuire J, Hughes D, Butler A, Rees M, Friend PJ.

Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation.

Transplantation. 2002 Mar 15;73(5):701-9.

76. 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 Oct 15;74(7):944-51

77. Jain S, Xu H, Duncan H, Jones JW Jr, Zhang JX, Clemens MG, Lee CY.

Ex-vivo study of flow dynamics and endothelial cell structure during extended hypothermic machine perfusion preservation of livers.

Cryobiology. 2004 Jun;48(3):322-32.

78. 't Hart NA, van der Plaats A, Leuvenink HG, van Goor H, Wiersema-Buist J, Verkerke GJ, Rakhorst G, Ploeg RJ.

Hypothermic machine perfusion of the liver and the critical balance between perfusion pressures and endothelial injury.

Transplant Proc. 2005 Jan-Feb;37(1):332-4.

79. Fujita S, Hamamoto I, Nakamura K, Tanaka K, Ozawa K.

Evaluation of oxygen necessity during hypothermic liver perfusion.

Nippon Geka Hokan. 1993 Sep 1;62(5):228-40.

80. Fujita S, Hamamoto I, Nakamura K, Tanaka K, Ozawa K.

Isolated perfusion of rat livers: effect of temperature on O₂ consumption, enzyme release, energy store, and morphology.

Nippon Geka Hokan. 1993 Mar 1;62(2):58-70.

81. Stubenitsky BM, Ametani M, Danielewicz R, Southard JH, Belzer FO.

Regeneration of ATP in kidney slices after warm ischemia and hypothermic preservation.

Transpl Int. 1995;8(4):293-7.

82. Lockett CJ, Fuller BJ, Busza AL, Proctor E.

Hypothermic perfusion preservation of liver: the role of phosphate in stimulating ATP synthesis studied by ³¹P NMR.

Transpl Int. 1995;8(6):440-5.

83. Doorschodt BM, Bessems M, van Vliet AK, van Gulik TM.

The first disposable perfusion preservation system for kidney and liver grafts.

Ann Transplant. 2004;9(2):40-1.

84. Starnes HF Jr, Tewari A, Flokas K, Kosek JC, Brown D, Van-Kessel AL, Mondon CE.

Effectiveness of a purified human hemoglobin as a blood substitute in the perfused rat liver.

Gastroenterology. 1991 Nov;101(5):1345-53.

85. Felker TE, Gantz D, Tercyak AM, Oliva C, Clark SB, Small DM.

A comparison of lipoprotein secretion, bile production and hepatic morphology in isolated rat livers perfused with a perfluorocarbon emulsion or rat erythrocytes.

Hepatology. 1991 Aug;14(2):340-51.

86. Motoyama S, Saito S, Inaba H, Kitamura M, Minamiya Y, Suzuki H, Saito R, Kamata S, Nakae H, Ogawa J.

Red blood cells attenuate sinusoidal endothelial cell injury by scavenging xanthine oxidase-dependent hydrogen peroxide in hyperoxic perfused rat liver.

Liver. 2000 Jun;20(3):200-8.

87. Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC.

Bile flow--an index of ischemic injury.

J Surg Res. 1987 May;42(5):565-9.

88. Butler AJ, Rees MA, Wight DG, Casey ND, Alexander G, White DJ, Friend PJ.

Successful extracorporeal porcine liver perfusion for 72 hr.

Transplantation. 2002 Apr 27;73(8):1212-8.

89. Schon MR, Kollmar O, Wolf S, Schrem H, Matthes M, Akkoc N, Schnoy NC, Neuhaus P.

Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion.

Ann Surg. 2001 Jan;233(1):114-23.

90. 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 May;89(5):609-16.

91. Imber CJ, St Peter SD, de Cenarruzabeitia IL, Lemonde H, Rees M, Butler A, Clayton PT, Friend PJ .

Optimisation of bile production during normothermic preservation of porcine livers.

Am J Transplant. 2002 Aug;2(7):593-9.

92. Monbaliu D, Crabbe T, Roskams T, Fevery J, Verwaest C, Pirenne J.

Livers from non-heart-beating donors tolerate short periods of warm ischemia.

Transplantation. 2005 May 15;79(9):1226-30.

93. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K.

Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats.

Hepatology. 1992 Aug;16(2):454-61.

94. Van der Hoeven JA, Lindell S, van Schilfgaarde R, Molema G, Ter Horst GJ, Southard JH, Ploeg RJ.

Donor brain death reduces survival after transplantation in rat livers preserved for 20 hr.

Transplantation. 2001 Nov 27;72(10):1632-6.

95. van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, de Vos P, Girbes AR, Postema F, Freund RL, Wiersema J, van Schilfgaarde R, Ploeg RJ.

Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat.

Ann Surg. 2000 Dec;232(6):804-13.

96. Casavilla A, Ramirez C, Shapiro R, Nghiem D, Miracle K, Fung JJ, Starzl TE.

Experience with liver and kidney allografts from non-heart-beating donors.

Transplant Proc. 1995 Oct;27(5):2898

97. Reich DJ, Munoz SJ, Rothstein KD, Nathan HM, Edwards JM, Hasz RD, Manzarbeitia CY.

Controlled non-heart-beating donor liver transplantation: a successful single center experience, with topic update.

Transplantation. 2000 Oct 27;70(8):1159-66.

98. Otero A, Gomez-Gutierrez M, Suarez F, Arnal F, Fernandez-Garcia A, Aguirrezabalaga J, Garcia-Buitron J, Alvarez J, Manez R.

Liver transplantation from maastricht category 2 non-heart-beating donors: a source to increase the donor pool?

Transplant Proc. 2004 Apr;36(3):747-50.

99. ROBBINS;et al.

Le basi patologiche delle malattie.6a ed. 2 v.

Padova, Piccin, 2000.

100. D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, Pirsch JD, Hafez GR, Lorentzen D, Belzer FO.

The predictive value of donor liver biopsies on the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation.

Transplant Proc. 1991 Feb;23(1 Pt 2):1536-7.

101. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M.

Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis.

Transplantation. 1993 Apr;55(4):807-13.

102. Fishbein TM, Fiel MI, Emre S, Cubukcu O, Guy SR, Schwartz ME, Miller CM, Sheiner PA.

Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool.

Transplantation. 1997 Jul 27;64(2):248-51.

103. Hayashi M, Fujii K, Kiuchi T, Uryuhara K, Kasahara M, Takatsuki M, Takeichi T, Kitade H, Sugimoto T, Uemoto S, Asonuma K, Egawa H, Fujita S, Inomata Y, Tanaka K.

Effects of fatty infiltration of the graft on the outcome of living-related liver transplantation.

Transplant Proc. 1999 Feb-Mar;31(1-2):403.

104. Sun B, Jiang HC, Piao DX, Qiao HQ, Zhang L.

Effects of cold preservation and warm reperfusion on rat fatty liver.

World J Gastroenterol. 2000 Apr;6(2):271-274.

105. Hui AM, Kawasaki S, Makuuchi M, Nakayama J, Ikegami T, Miyagawa S.

Liver injury following normothermic ischemia in steatotic rat liver.

Hepatology. 1994 Nov;20(5):1287-93.

106. **Takeda Y, Arii S, Kaido T, Niwano M, Moriga T, Mori A, Hanaki K, Gorrin-Rivas MJ, Ishii T, Sato M, Imamura M.**

Morphologic alteration of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in rat fatty liver during cold preservation and the protective effect of hepatocyte growth factor.

Transplantation. 1999 Mar 27;67(6):820-8.

107. **Husberg BS, Genyk YS, Klintmalm GB.**

A new rat model for studies of the ischemic injury after transplantation of fatty livers: improvement after postoperative administration of prostaglandin.

Transplantation. 1994 Feb;57(3):457-8.

108. **D'Amico D.F., Bassi N., Tedeschi U., Cillo U.**

Liver Trasplantation, procedures and management.

Milano, Masson, 1994

109. **Cillo U., Vitale A. et Al.**

Liver trasplantation for the treatement of moderately and well-differentiated hepato carcinoma.

Ann Surg. 2004 Feb; 23 (2): 150-9.

RINGRAZIAMENTI

- Al Prof. Davide D'Amico, onorato e orgoglioso di essere suo allievo, per tutto quello che mi ha insegnato in questi anni, dentro e fuori dalla sala operatoria, e per tutte le attenzioni che vorrà dedicarmi ancora in futuro.
- Ad Umberto Cillo, amico sincero, prima ancora che Maestro, per avermi sempre suggerito la giusta strada con sapienza e paziente dedizione.
- A tutto il gruppo di lavoro (Dr. Amedeo Carraro, Dr. Domenico Bassi, Dr. Francesco D'Amico) per il loro entusiasmo e la loro passione per la ricerca e che con me hanno condiviso i momenti più difficili degli iniziali insuccessi senza mai arrendersi.
- Ai miei genitori, che anche da lontano mi stimolano e gioiscono dei miei progressi.
- A Sonia, perché crede in ciò che faccio e quotidianamente condivide con me gioie e delusioni della mia professione.