

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIRURGICHE  
E GASTROENTEROLOGICHE "P.G. Cevese"**

***SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA, CICLO XXI:  
SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI***

***(Direttore: Prof. A. Tiengo)***

***INDIRIZZO: SCIENZE CHIRURGICHE ED APPLICAZIONI  
TECNOLOGICHE (Coordinatore: Prof. D.F. D'Amico)***

***INFUSIONE SISTEMICA E LOCO-REGIONALE DI N-  
ACETIL-CISTEINA NEL PRELIEVO DI FEGATO:  
UNO STUDIO PROSPETTICO RANDOMIZZATO  
CONTROLLATO***

**Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo**

**Supervisore: Ch.mo Prof. Umberto Cillo**

**Dottorando: Francesco D'Amico**

**Anno accademico 2007-2008**



**1999 > 2009...**

**A Alberta Mi Amor  
y Augusto M.Grazia Andrea M.Lavinia**

*Questo lavoro è risultato vincitore del premio:*

**Rising Star Award - International Liver Transplantation Society, Paris 2008**



# INDICE

- **IL TRAPIANTO DI FEGATO: CENNI STORICI**
  
- **LA CARENZA DELLE DONAZIONI NELLA REALTÀ ITALIANA**
  
- **L'ESPANSIONE DEL POOL DEI DONATORI**
  - *Lo split liver*
  - Il trapianto di fegato da donatore vivente (LDLT)
  - Il trapianto *domino*
  - Il donatore marginale
  - *Lo xenotrapianto*
  
- **I SISTEMI DI ALLOCAZIONE DEGLI ORGANI: LA GESTIONE DELLA LISTA D'ATTESA**
  - I punteggi di priorità
    - *Child-Turcotte-Pugh score*
    - *UNOS status*
    - *MELD score*
  - L'esclusione dalla lista d'attesa (*drop-out*)

- **TECNICA CHIRURGICA NEL DONATORE MULTIORGANO**

- Prelievo di fegato
- Back table
- Modifiche alla Tecnica Chirurgica da parte del nostro Centro

- **DANNO DA ISCHEMIA-RIPERFUSIONE: IMPLICAZIONI**

**FISIOPATOLOGICHE**

- Introduzione
- Danno da ischemia
- Danno da riperfusione

- **N - ACETIL CISTEINA ( NAC )**

- E' possibile prevenire il danno da ischemia – riperfusione in chirurgia epatica?
- Ruolo potenziale del NAC
- Farmacocinetica
- Effetti Collaterali
- Indicazioni e modo di somministrazione del NAC

**MATERIALI E METODI**

- Campione dello Studio
- Presupposti dello studio
- Obiettivi

- Durata
- Disegno dello studio
- Analisi statistica

- **RISULTATI**
- **DISCUSSIONE**
- **CONCLUSIONI**
- **RINGRAZIAMENTI**
- **BIBLIOGRAFIA**



## RIASSUNTO

*Presupposti.* Gli agenti anti-ossidanti hanno la capacità di ridurre il danno da ischemia – riperfusione degli organi destinati al trapianto di fegato (TF). In questo studio prospettico randomizzato, abbiamo testato l'impatto sull'*outcome* post TF dell'infusione di N-acetilcisteina (NAC) durante la procedura di prelievo del fegato.

*Metodi.* Il protocollo NAC prevedeva: una infusione sistemica di NAC (30 mg/kg) un'ora prima dell'inizio dell'intervento di prelievo d'organo; una infusione loco - regionale di NAC (300 mg attraverso la vena porta) subito prima del *cross-clamp*.

Tra Dicembre 2006 e Dicembre 2007, 56 organi assegnati a candidati adulti con malattia epatica cronica listati per primo TF, sono stati inclusi in modo randomizzato nel protocollo NAC (gruppo NAC = 28 pazienti) o nella procedura standard senza NAC (gruppo no - NAC = 28 pazienti).

*Risultati.* Le variabili del donatore e del ricevente sono risultate confrontabili nei due gruppi. Il tempo mediano di ischemia fredda è stato di 393 minuti nel gruppo NAC e di 383 minuti nel gruppo no - NAC ( $P>0,05$ ). La proporzione di fegati sub - ottimali è stata del 50% nel gruppo NAC e 43% nel gruppo no - NAC ( $P>0,05$ ). Il gruppo NAC ha avuto valori ematici significativamente minori di transaminasi e bilirubina dopo il TF. L'incidenza di disfunzioni epatiche precoci è stata significativamente minore ( $P=0,04$ ) nel gruppo NAC (11%) che nel gruppo no - NAC (32%). Non ci sono stati casi di non funzione epatica o di re - trapianto precoce nei due gruppi. La mortalità precoce del paziente (< 3 mesi) è stata significativamente minore ( $P=0,05$ ) nel gruppo NAC (4%) che nel gruppo no - NAC (21%).

*Conclusione.* Questo studio ha dimostrato una incidenza molto bassa di disfunzione epatica e di morte precoce del paziente dopo TF quando il protocollo NAC viene utilizzato durante il prelievo di fegato.

## ABSTRACT

*Background/Aims.* Anti-oxidant agents have the potential to reduce the ischemia-reperfusion damage of organs for liver transplantation (LT). In this randomized prospective study, we tested the impact on the post-LT outcome of the infusion of N-acetylcysteine (NAC) during the liver procurement procedure.

*Methods.* The NAC protocol scheduled: a systemic NAC infusion (30 mg/kg) one hour before the beginning of liver procurement; a loco-regional NAC infusion (300 mg through the portal vein) just before cross-clamping. Between December 2006 and December 2007, 56 grafts, assigned to adult candidates with chronic liver disease enlisted for first LT, were randomly included in the NAC protocol (NAC group=28 patients) or in the standard procedure without NAC (No-NAC group=28 patients).

*Results.* Donor and recipient variables were comparable in the two study groups. Median cold ischemia time was 393 minutes in the NAC group and 383 minutes in the no-NAC group ( $P>.05$ ). The proportion of suboptimal livers was 50% in the NAC group and 43% in the no-NAC group ( $P>.05$ ). The NAC group had significantly lower blood transaminases and bilirubin levels after LT. The prevalence of graft primary dysfunction (PDF) was also significantly lower ( $P=.04$ ) in the NAC group (11%) than in the No-NAC group (32%). There were no cases of primary non function and early re-LT in the 2 groups. Early patient mortality (< 3 months) was significantly lower ( $P=.05$ ) in the NAC (4%) than in the no-NAC group (21%).

*Conclusion.* The present study showed a very low prevalence of PDF, and early patient death (< 3 months) after LT when the NAC protocol was adopted during liver procurement.



# INTRODUZIONE

## CENNI STORICI

Il trapianto d'organi rappresenta una delle più importanti conquiste cliniche del secondo millennio sia per i positivi risvolti clinici nella cura di numerose malattie ad evoluzione fatale, sia per le implicazioni organizzative che tutt'oggi presenta.

Le origini dell'era trapiantologica risalgono al 1902, allorché Alexis Carrel, chirurgo francese trasferitosi a Chicago, riuscì per primo a trovare una tecnica capace di suturare tra loro i vasi sanguigni, passo fondamentale per poter pensare di trasferire un organo da un corpo all'altro: senza soluzioni di continuità tra segmenti vascolari è impensabile l'impianto di un organo.

Il primo trapianto d'organo venne effettuato negli Stati Uniti, a Boston nel 1954 ad opera di Murray che eseguì un trapianto di rene da donatore vivente consanguineo e geneticamente identico al ricevente.

Dieci anni dopo, nel 1964, Hardy (USA) eseguì il primo trapianto di cuore su un uomo utilizzando uno scimpanzé come donatore. E' opera di Barnard, invece, il primo trapianto ortotopico di cuore da uomo a uomo, eseguito in Sud Africa nel 1967.

Nello stesso anno, il 23 luglio del 1967, T.E. Starzl e la sua équipe eseguì il primo trapianto ortotopico di fegato seguito da lunga sopravvivenza (13 mesi). Il ricevente era un piccolo paziente di 1 anno e mezzo affetto da una neoplasia epatica. Negli anni successivi anche in Inghilterra, a Cambridge, Sir Roy Calne, intraprese l'attività di trapianti di fegato, e così Pichlmayr dal 1972 ad Hannover e Bismuth a Parigi dal 1974.

In Italia il primo trapianto di fegato venne eseguito qualche anno più tardi e precisamente nel 1982 a Roma ad opera di Raffaello Cortesini.

In realtà già nel 1952 sempre un Italiano, il Prof. V. Staudacher, Direttore dell'Istituto di Patologia Chirurgica dell'Università di Milano, in occasione del 54° Congresso della Società Italiana di Chirurgia tenutosi a Venezia, descrisse, per la prima volta, una tecnica per l'espianto e il trapianto ortotopico di fegato. Tale evento rappresentò il primo approccio sperimentale al trapianto di fegato che

proseguì con i vari tentavi di sperimentazione condotti sui cani dallo stesso Starzl e ancor prima da Moore e Welch.

Ufficialmente, infatti, fu proprio Welch, nel 1955, il primo al mondo ad eseguire un trapianto di fegato nel cane. Si trattava, però, di un trapianto eterotopico, cioè della collocazione nella cavità addominale, in fossa iliaca destra, di un nuovo fegato, più piccolo, aggiunto a quello dell'ospite, che avrebbe potuto supplire, anche solo temporaneamente alla funzione compromessa del fegato nativo nell'attesa della sua potenziale capacità rigenerativa.

I primi trapianti ortotopici di fegato, furono eseguiti, sempre nel cane, indipendentemente da Moore e collaboratori al Peter Bent Brigham Hospital a Boston nel 1959 e da Starzl e collaboratori al North Western University a Chicago nel 1960. Le percentuali di insuccesso all'inizio furono molto elevate. Comunque Starzl continuò a migliorare la tecnica chirurgica, l'anestesia ed i metodi di conservazione degli organi, e già nel 1965 descrisse una sopravvivenza di 2 gironi in 23 cani e di 6 giorni in 19 cani. Questi animali servirono poi come gruppo di controllo per gli esperimenti successivi eseguiti con l'apporto della terapia immunosoppressiva (Azatioprina, Prednisone, globulina antilinfocitaria) potendo così valutare gli aspetti istopatologici del rigetto del fegato.

La maggior parte delle metodiche sperimentali, applicate sugli animali, furono, in seguito, direttamente trasferite nei primi interventi eseguiti sull'uomo e, con piccole modifiche, servirono come fondamento per le procedure cliniche attuali.

Come già ricordato in precedenza, T.E. Starzl fu il primo ad eseguire un trapianto di fegato ortotopico sull'uomo. Era l'1 marzo del 1963 quando Starzl e la sua equipe impiantò il fegato nell'addome di un bambino di 3 anni affetto da atresia delle vie biliari. Ma il piccolo ricevente morì durante l'intervento per complicanze emorragiche.

Nei 10 mesi successivi, 4 ulteriori insuccessi ottenuti a Denver, 1 a Boston da Moore e 1 a Parigi da Demirleau, indussero Starzl alla decisione di sospendere l'attività clinica del trapianto di fegato. Solo dopo 3 anni il programma venne ripreso, ma 2 pazienti trapiantati a Denver fra il 1966 e il 1967 non superarono brillantemente l'intervento morendo dopo pochi giorni.

Il primo significativo successo fu ottenuto da Starzl su una bimba di 18 mesi, affetta da epatocarcinoma, che visse 13 mesi prima di morire a causa di metastatizzazione diffusa.

Nel maggio del 1968, Sir Roy Calne, presso il dipartimento di chirurgia dell'ospedale di Adden Brooke dell'Università di Cambridge, istituì un consorzio per la programmazione clinica del trapianto.

Nel periodo 1963-1970, comunque, la sopravvivenza ad 1 anno era del 24% negli adulti e del 33% nei pazienti pediatrici.

Dal 1970 in poi nacquero altri centri: in Germania (Hannover), in Olanda (Gronigen) e negli ultimi anni la metodica si è andata diffondendo un po' in tutta Europa (Francia, Spagna, Svizzera, Austria, Italia) e negli USA dove sono sorti numerosi altri Centri oltre a quello storico fondato da Starzl a Pittsburgh.

Parallelamente alla diffusione dei Centri, con l'acquisizione di una sempre maggiore esperienza, si è registrato un notevole incremento della sopravvivenza dei trapianti, che oggi supera il 90% ad 1 anno.

Il conseguimento di risultati così prestigiosi sono da attribuire essenzialmente al perfezionamento della tecnica chirurgica e all'ausilio della tecnologia (Bio-Pump, Cell Cever, RIS, Argon Beem Coagulator, suturatici vascolari, CUSA), ma un ruolo determinante va sicuramente riconosciuto alla standardizzazione dei protocolli immunosoppressori e alla Ciclosporina in particolare. La Ciclosporina si è andata affermando definitivamente nella pratica clinica intorno agli anni '80. Un fungo, il *Tolypocladium inflatum*, scoperto casualmente nel 1969 da alcuni ricercatori della Sandoz, si rivelerà fondamentale nella prevenzione del rigetto acuto dell'organismo nei confronti dell'organo trapiantato, grazie alla sua capacità di inibire la risposta immunitaria anticorpale.

Caduta gran parte della problematica legata al suo uso prolungato (aumento di incidenza di neoplasie linfatiche o di infezioni virali tipo Citomegalovirus) essa è diventata, per parecchi anni, il trattamento immunosoppressore di scelta nei trapianti d'organo, consentendo contemporaneamente di ridurre notevolmente le dosi di cortisone, minimizzando gli effetti collaterali che si erano rivelati in passato molto pesanti, particolarmente in età pediatrica.

Attualmente, accanto alla Ciclosporina, si sono affiancati altri farmaci nella prevenzione e trattamento del rigetto dopo trapianto. Il Tacrolimus (FK506) è un antibiotico macrolide della stessa famiglia della Eritromicina con azione simile alla Ciclosporina sui linfociti T ma più potente a minor dosaggio e con minor impatto sulla funzionalità renale rispetto alla stessa Ciclosporina.

## **LA CARENZA DELLE DONAZIONI NELLA REALTA' ITALIANA**

Alla progressiva evoluzione in ambito clinico, grazie agli entusiasmanti progressi fatti registrare in ambito chirurgico, farmacologico ed anestesiologicalo fa da contro altare il sempre più attuale problema della carenza delle donazioni.

Al 30 novembre 2008, sono 1544 i pazienti in lista d'attesa per trapianto di fegato a fronte di 1554 nuovi iscritti in lista per malattia epatica terminale [38].

Nonostante negli ultimi anni si sia assistito ad una stabilizzazione del numero delle donazioni (figura n. 5), e di conseguenza dei trapianti di fegato (figura n. 6), e addirittura nel corso dell'ultimo anno ad una riduzione del 14% delle donazioni, l'afferenza ai vari centri di trapianto di pazienti affetti da epatopatia cronica che necessitano di una terapia sostitutiva è sempre maggiore.

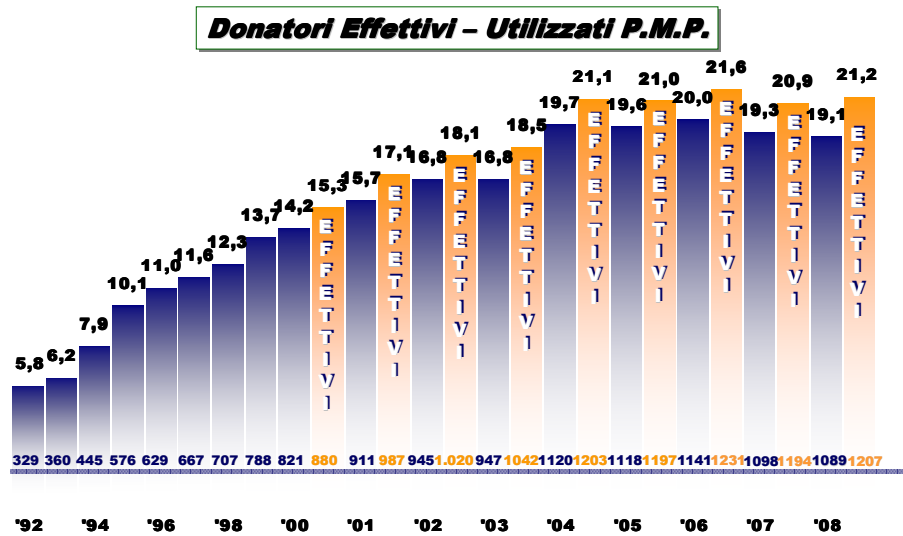
Quello che oggi si realizza si può configurare come la *sindrome del Titanic*: poche scialuppe disponibili per troppi passeggeri.

A fronte dell'enorme impegno clinico - organizzativo, il numero di donatori disponibili non è ancora sufficiente a coprire il numero di nuovi pazienti che ogni anno afferisce alle liste d'attesa.

La conseguenza di questa triste realtà è rappresentata da un incremento della mortalità in lista di pazienti in attesa di ricevere il trapianto [39-42].

\*Dati preliminari al 30 novembre 2008

### Donatori utilizzati ed effettivi- Anni 1992/2008\*

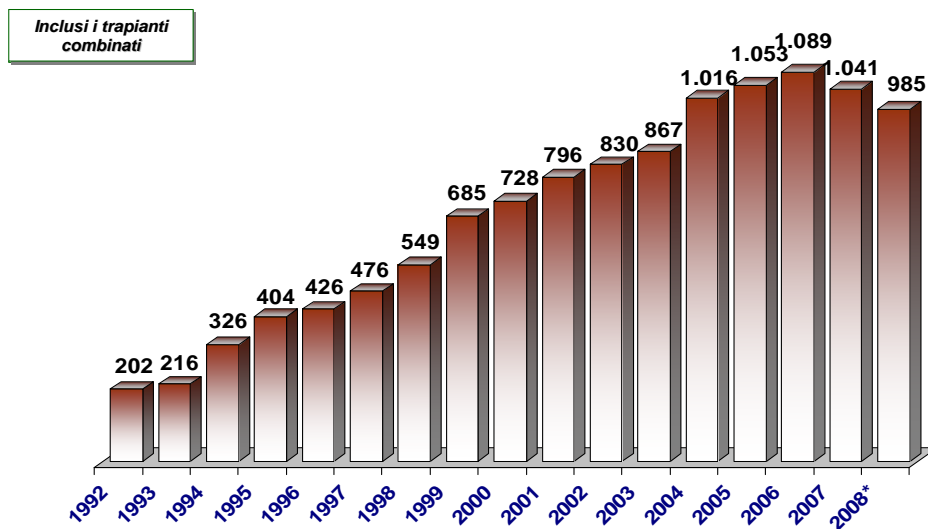


FONTE DATI: Dati Reports CIR

**Figura n. 1** Donatori utilizzati dal '92 ad oggi. Dati preliminari al 30 Novembre 2008 forniti dal Centro Nazionale Trapianti

\*Dati preliminari al 30 novembre 2008

### Trapianti di FEGATO – Anni 1992/2008\*



FONTE DATI: Dati Reports CIR

**Figura n. 2.** Numero di trapianti di fegato eseguiti in Italia dal 1992 al 30 Novembre 2008. Dati forniti dal Centro Nazionale Trapianti

## L'ESPANSIONE DEL POOL DEI DONATORI

La triste conseguenza della carenza delle donazioni è rappresentata dal fatto che una certa quota di pazienti non riuscirà ad accedere al trapianto di fegato con un organo prelevato da un donatore cadavere. Negli ultimi anni molti gruppi chirurgici hanno cercato di arginare il problema ricorrendo a tecniche chirurgiche innovative quali la divisione di un organo in due unità funzionalmente autonome (*split liver*) da trapiantare in due riceventi diversi; in altri casi sono ricorsi al trapianto di fegato da donatore vivente, (*Living Donor Liver Transplantation – LDLT –*) anche “geneticamente non correlato” al ricevente, con risultati sovrapponibili a quelli ottenuti con il trapianto tradizionale da donatore cadavere.

Altre metodiche, di minor impatto clinico, comprendono il trapianto di fegato sequenziale o *Domino* e lo *xenotrapianto*.

### *Lo split liver*

La capacità rigenerativa del fegato è nota sin dai tempi dell'Antica Grecia. Nella Teogonia di Esiodo si narra il mito di Prometeo, che avendo rubato il segreto del fuoco agli dei dell'Olimpo, fu condannato a un'atroce punizione: di giorno una porzione del suo fegato veniva divorata da un'aquila; rigenerando durante la notte il suo fegato forniva al rapace cibo eterno e a Prometeo una equivalente tortura. In epoca moderna, il modello sperimentale più affidabile e realistico per lo studio della rigenerazione epatica è quello proposto da Higgins e Anderson: una semplice operazione di resezione epatica, in cui si rimuovevano i due terzi dell'organo del ratto, permetteva al parenchima residuo di proliferare con un processo di iperplasia tale da ricostituire la massa dell'organo nativo nel giro di 5-7 giorni.

Questa peculiare capacità, esclusiva per il parenchima epatico associata alla possibilità di dividere l'organo in due unità assolutamente indipendenti dal punto di vista anatomico e funzionale ha permesso di poter sviluppare tecniche di *split* che potessero garantire l'esecuzione di due trapianti di fegato da un unico organo donatore.

La procedura di divisione epatica, denominata per l'appunto *split liver* prevede la divisione dell'organo in due unità indipendenti che può essere eseguita in sede di prelievo con donatore a cuore battente (*split in situ*) o a prelievo ultimato durante la chirurgia di banco in condizioni di ipotermia (*split ex situ*). Nella maggior parte dei casi i segmenti 2 e 3 vengono destinati ad un ricevente pediatrico, mentre il resto dell'organo è assegnato ad un ricevente adulto.

Tale metodica ha permesso una significativa riduzione, e in alcuni casi un azzeramento, della lista d'attesa per trapianto di fegato pediatrico, garantendo al tempo stesso ottimi risultati anche a confronto di trapianti eseguiti con fegato intero. Tuttavia gran parte dei pazienti in lista d'attesa è rappresentata da adulti, ed è tra questi che si riscontra la maggiore incidenza di mortalità in lista d'attesa. E' questo il motivo dell'estensione del principio dello *split liver* al fine di ottenere due emifegati trapiantabili in due riceventi adulti, ma la quota di parenchima da resecare, per essere sufficiente a mantenere in vita un soggetto adulto, deve essere maggiore di quella utilizzabile per un bambino. L'intervento di resezione nel donatore deve quindi essere ampliato. Emond (**Transplantation 1993**) aveva individuato nel 50% della massa epatica ideale, la quota minima di parenchima da trapiantare. A tale scopo sono stati messi a punto dei metodi matematici per stabilire, sulla base delle indagini radiologiche mirate (TC, RM), il rapporto tra quota di fegato prelevabile in un particolare donatore e quota di fegato necessaria per quel particolare tipo di ricevente (*Graft Recipient Weight Ratio, GRWR*). E' evidente che l'utilizzo di un donatore ottimale diventa un punto imprescindibile per la prognosi dei riceventi. Ma anche gli stessi riceventi dovrebbero essere in una fase intermedia di gravità della loro malattia. Appare, quindi, chiaro che oltre alle ben note difficoltà tecniche insite di questo approccio chirurgico, gioca un ruolo determinante il rispetto di tutti i parametri per arrivare ad un buon match donatore-ricevente.

### ***Il trapianto di fegato da donatore vivente***

L'attività dei trapianti di fegato da donatore vivente inizia con Raia nel 1988 negli Stati Uniti col chiaro intento di poter in parte risolvere il problema

della carenza di donatori e, conseguentemente, ridurre l'incidenza della mortalità in lista d'attesa per trapianto. Il programma era inizialmente rivolto esclusivamente ad una popolazione pediatrica anche per la maggior semplicità di eseguire la resezione di una porzione del fegato di sinistra da impiantare nel piccolo ricevente.

Il 2 Novembre del 1993 il Gruppo di Shinshu eseguì con successo, per la prima volta, un trapianto di fegato da donatore vivente tra due adulti. La paziente, una donna di 53 anni affetta da cirrosi biliare primitiva, ricevette il lobo epatico destro dal proprio figlio. Il numero di trapianti di fegato da donatore vivente eseguiti tra adulti, da allora, aumentò in maniera esponenziale negli anni successivi e venne in parte frenato dalla notizia di due decessi, tra i donatori, fatti registrare nel 2001 e 2002. Dal Giugno del 2002 i trapianti di fegato da donatore vivente tra adulti eseguiti in Europa, riportati nel Registro Europeo dei Trapianti di Fegato (*European Liver Transplantation Registry – ELTR –*) erano 433 con una *graft e patient survival* del 65% e 68% rispettivamente. Negli Stati Uniti sono stati eseguiti 731 trapianti fra adulti dall'Ottobre del 2001 con una *graft survival* del 61%. Ma il maggior contributo all'attività trapiantologica epatica da vivente è stato fornito, senza ombra di dubbio, dalla scuola giapponese e da Koichi Tanaka, a Kioto, in particolare. Anche in Giappone le prime esperienze di trapianto di fegato da donatore vivente furono rivolte ai piccoli riceventi pediatrici. Tali esperienze hanno consentito l'affinamento di tecniche microchirurgiche volte a ridurre al minimo le temibili complicanze legate alla trombosi dell'arteria epatica. Come riportato dalla *Japanese Liver Transplantation Society*, dalla fine del 2002 ad oggi, sono stati eseguiti 1063 trapianti di fegato da donatore vivente tra adulti.

In Italia il primo trapianto di fegato da donatore vivente fu eseguito a Padova il 22 ottobre 1997, proprio nel nostro Centro dall'equipe diretta dal Prof. D'Amico. Il ricevente era un bambino croato di 11 anni affetto da epatoblastoma multifocale non resecabile. La finestra terapeutica chirurgica in questi pazienti è particolarmente ristretta, pertanto, la possibilità di un trapianto di fegato da donatore vivente, offre il vantaggio di programmare la data dell'intervento che rappresenta, probabilmente, l'unica opzione terapeutica. La porzione di fegato per

il trapianto fu donata dal padre dopo un'autorizzazione speciale fatta pervenire dal Ministero della Sanità in un'epoca in cui, in Italia, il trapianto di fegato non era ancora regolato da leggi.

Anche per il *LDLT*, come per lo *split*, la base di partenza fisiopatologia e anatomica è rappresentata dalla capacità rigenerativa del parenchima epatico e dalla possibilità di poterlo suddividere in due emisistemi assolutamente autonomi e funzionanti.

Una condizione assolutamente essenziale è rappresentata dall'estremo rispetto del donatore (*donor safety*) nel chiaro intento di ridurre al minimo la comparsa di complicanze. Tre sono i decessi fatti registrare negli Stati Uniti su oltre 1300 trapianti di fegato da donatore vivente eseguiti tra adulti. Due si sono verificati entro il primo mese dal trapianto e pertanto correlati alla procedura chirurgica: un donatore deceduto per una complicanza in seguito ad una polmonite *ab ingestis*, un altro donatore deceduto in seguito a sepsi. Il terzo donatore morto suicida a 23 mesi dal trapianto. Nel resto del mondo altri decessi sono stati riportati in Europa e in Asia, ma il numero esatto è tuttora sconosciuto. La mortalità globale tra i donatori è pari allo 0,15%. Vi sono poi una serie di complicanze riportate in letteratura e che oscillano tra lo 0% e il 67% e che comprendono le complicanze biliari (stenosi e leak, 0%-7%), le complicanze addominali (infezioni di ferita, occlusione intestinae, laparocèle, 9%-19%).

### ***Il trapianto domino***

Il trapianto di fegato *domino* o *sequenziale* rappresenta un'altra metodica che permette di incrementare il pool dei donatori oltre alle già citate *split* e *LDLT*. Con tale metodica un primo ricevente (affetto da amiloidosi) viene trapiantato con un fegato da donatore cadavere; il suo fegato nativo verrà utilizzato per trapiantare un secondo ricevente. Pertanto da un solo donatore cadavere vengono trapiantati due riceventi. Questa tecnica, però, è applicabile solo in presenza di determinati disordini metabolici responsabili di una malattia sistemica che non altera la regolare funzionalità epatica permettendo, pertanto, di poter utilizzare il fegato nativo del primo ricevente come donatore per un secondo ricevente.

La polineuropatia amiloidosica di tipo II è un disordine del metabolismo trasmesso come carattere autosomico dominante nel quale il fegato produce un gene mutante della transtiretina che si deposita a livello vascolare, del sistema nervoso e di altri organi. Clinicamente si manifesta con una progressiva e invalidante polineuropatia. I primi sintomi compaiono dopo 20-30 dalla nascita, tempo necessario per la deposizione delle fibre di amiloide a livello dei vari tessuti. Partendo da questo presupposto pertanto, si è ritenuto idoneo utilizzare i fegati di questa categoria di pazienti per poter trapiantare altri riceventi che manifesteranno i segni clinici dell'amiloidosi non prima di 20-30 anni dal trapianto.

Altra situazione analoga è rappresentata dalla ipercolesterolemia familiare omozigote, disordine genetico del metabolismo caratterizzato dall'assenza o ridotta efficienza dei recettori per le lipoproteine a bassa densità (LDL-Rs) con elevati livelli sierici di colesterolo.

### ***Il donatore marginale***

Fino a qualche anno fa l'ipotesi di poter utilizzare un donatore ultrasessantenne non era universalmente accettata da tutti i Centri a causa dell'elevato rischio di scarsa ripresa funzionale del *graft* dopo il trapianto. Ai giorni d'oggi, in parte sollecitati dalla cronica carenza delle donazioni, in parte incoraggiati da nuovi e più efficaci sistemi di preservazione d'organo si fa sempre più ricorso a quei donatori che un tempo venivano scartati per età (> 60 anni), per steatosi (> 30%), per infezione virale (HBV +, HCV +). Tali donatori, etichettati come *donatori marginali*, hanno consentito, negli ultimi anni, una significativa espansione del pool dei donatori.

Numerosi studi hanno dimostrato, infatti, che organi provenienti da donatori ultrasessantenni o con steatosi epatica inferiore al 60%, possono essere utilizzati per trapianto con basso rischio di scarsa ripresa funzionale del graft (*Primary Dysfunction – PDF –*)

Donatori HBV o HCV positivi vengono utilizzati su riceventi affetti da cirrosi epatica HBV e HCV correlata, rispettivamente. Studi recenti hanno

dimostrato, infatti, che un trapianto tra un donatore HCV positivo e un ricevente HCV non è correlata a maggior rischio di complicanze o di recidiva virale a breve termine.

Analogamente un donatore con anticorpi anti-core per HBV può essere utilizzato per trapianto su un ricevente con cirrosi HBV previo trattamento profilattico con Lamivudina e immunoglobuline per l'epatite B (HBIG).

### *Lo xenotrapianto*

Il concetto di *xenotrapianto* inteso come il trapianto di cellule, tessuti ed organi tra specie differenti con la creazione di un organismo chimerico, è così antico da essere facilmente riconoscibile nella mitologia classica Greca e Romana. Tuttavia solo nei primi decenni del nostro secolo è iniziato un approccio scientifico sia sperimentale che clinico. I primi tentativi furono caratterizzati da completo insuccesso principalmente a causa della scarsa conoscenza delle problematiche fisiopatologiche, chirurgiche e immunologiche di quei tempi. I primi articoli che riportano successi, almeno parziali, risalgono agli anni 60. L'organo principalmente utilizzato per i primi trapianti clinici fu il rene. Infatti l'emodialisi non rappresentava ancora una realtà terapeutica ed i pazienti affetti da insufficienza renale erano destinati a morte per uremia. Xenotrapianti clinici di cuore e di fegato furono eseguiti agli inizi degli anni '80 ma con risultati non sempre incoraggianti. Ancora oggi l'applicazione clinica dello xenotrapianto non sembra proponibile nell'immediato futuro.

## **I SISTEMI DI ALLOCAZIONE DEGLI ORGANI: LA GESTIONE DELLA LISTA D'ATTESA**

Appare evidente come la cronica carenza dei donatori imponga una attenta selezione del ricevente nel tentativo di evitare, per quanto possibile, lo spreco dei graft. La difficoltà, poi di reperire un numero di organi in grado di soddisfare

sufficientemente le sempre crescenti richieste, come già discusso in precedenza, determina una dilatazione dei tempi d'attesa in lista che, per fortuna solo in taluni casi, si traduce in una maggiore incidenza di mortalità in lista.

Per tali motivi gran parte degli sforzi in questo ambito sono stati incentrati nel tentativo di sviluppare dei sistemi di priorità finalizzati a ridurre la mortalità in attesa del trapianto. In tal senso la gestione della lista diventa l'elemento principale del processo che condurrà al trapianto.

### *Punteggi di priorità*

L'applicazione di un modello matematico per l'allocazione dei graft è stato oggetto di studi controversi sia in passato che in epoca più recente. Prima del 1997 il criterio di priorità era dettato dalla sede in cui si trovava il ricevente al momento della segnalazione (a domicilio, ospedalizzato in reparto medico, degente in terapia intensiva) e dall'anzianità di lista. Negli anni a seguire questi criteri vennero via via abbandonati

per lasciar posto all'anzianità di lista come principale criterio di allocazione degli organi. Freeman e coll. dimostrarono, però, che non vi era correlazione tra l'attesa in lista e la mortalità in attesa di ricevere il trapianto. Nel 1997 una Consensus Conference organizzata dall'American Association for the Study of Liver Disease, the International Liver Transplant Society and the American Society of Transplant Physicians disegnarono un nuovo sistema di allocazione basato esclusivamente sulla gravità di malattia. La classificazione di Child-Turcotte-Pugh venne utilizzata come score di gravità della malattia.

### *Child-Turcotte-Pugh score*

E' una classificazione costruita su 3 variabili ematochimiche (bilirubinemia, tempo di protrombina e albuminemia) e 2 variabili cliniche

(encefalopatia e ascite) e composta da 3 classi di gravità: classe A (punteggio 5-6), classe B (punteggio 7-9), classe C (punteggio 10-15). Storicamente, la classificazione di Child fu proposta per la valutazione del rischio operatorio di pazienti affetti da malattia epatica cronica con varici esofagee sanguinanti sottoposti a shunt porto-sistemico chirurgico.

Nel 1973 Pugh e coll introdussero una versione modificata della classificazione di Child-Turcotte per la valutazione dell'*outcome* di pazienti sottoposti a legatura chirurgica delle varici esofagee. Lo stato nutrizionale presente nella classificazione di Child-Turcotte fu sostituito col tempo di protrombina da Pugh. Studi successivi validarono l'efficacia della classificazione di Child-Turcotte-Pugh nella prognosi di malattie epatiche ad evoluzione cronica.

Christensen e coll applicarono lo score di Child in un gruppo di pazienti affetti da cirrosi epatica di diversa etiologia. Questo studio validò l'efficacia prognostica della classificazione di Child.

**Tabella 1.** Classificazione di Child-Turcotte

<b>Classificazione originaria di Child-Turcotte</b>			
<i>Variabili</i>	<i>Classe A</i>	<i>Classe B</i>	<i>Classe C</i>
Bilirubina (mg/dL)	<2	2-3	>3
Albumina (g/dL)	>3.5	3.0-3.5	<3.0
Encefalopatia	Assente	Minima	Coma
Ascite	Assente	Ben controllata	Refrattaria
Stato nutrizionale	Eccellente	Buono	Scadente

**Tabella 2.** Classificazione di Child-Turcotte modificata da Pugh

<b>Classificazione modificata da Pugh</b>			
<i>Variabili</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
Bilirubina (mg/dL)	<2	2-3	>3
Albumina (g/dL)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
Tempo di protrombina (sec)	<4	4-6	>6
Encefalopatia (grado)	Assente	1-2	3-4
Ascite	Assente	Lieve	Moderata

Nota. Child-Pugh score classe A = 5-6, classe B = 7-9, classe C = 10-15

#### *UNOS status*

E' un sistema di allocazione che si basa sulla classificazione di Child-Turcotte-Pugh e riconosce tre categorie di severità di malattia: Status 3 (Child score  $\geq 7$ ), Status 2B (Child score  $\geq 10$ ), Status 2A (Child score  $\geq 10$  o degenza in terapia intensiva con prognosi *quod vitam* < 7 giorni). E' facilmente intuibile come, con sole tre categorie di severità di malattia, il tempo d'attesa in lista sia diventato il principale determinante all'interno di ciascuna categoria. Tale osservazione è maggiormente evidente nel gruppo 2B, che costituisce la categoria più numerosa (56%) di pazienti sottoposti a trapianto e racchiude in sé diversi gradi di severità di malattia. In questa categoria, infatti, rientrano, da una parte quei pazienti che vivono a casa e svolgono ancora una regolare attività lavorativa e vita di relazione, e dall'altra parte quei pazienti che richiedono ospedalizzazioni frequenti per la comparsa di complicanze correlate all'avanzato stato di malattia ma che ancora non posseggono i requisiti per essere inseriti, di merito, in classe 2A. In tali casi a parità di gravità di Status il trapianto viene eseguito sul paziente con maggiore anzianità di lista.

### *MELD score*

E' un modello matematico (*MELD – Model for End-stage Liver Disease*) derivato da un eterogeneo gruppo di pazienti, proposto in 4 differenti Centri negli USA, validato in Olanda e che fu originariamente realizzato per studiare la prognosi a breve termine di pazienti cirrotici sottoposti a shunt porto-sistemico intraepatico trans-giugulare (*TIPS*). Questo modello prende in considerazione la creatinina sierica, la bilirubina e l'*international normalized ratio* (INR) del tempo di protrombina. La sua comprovata efficacia prognostica nei pazienti cirrotici sottoposti a TIPS ne suggerì il suo impiego anche in ambito trapiantologico come indicatore di priorità in pazienti cirrotici in lista d'attesa per trapianto di fegato. La sua efficacia, anche in questo campo, fu validata attraverso uno studio condotto, presso la Mayo Clinic tra il gennaio del 1994 e il gennaio del 1999, su 282 pazienti affetti da complicazioni della cirrosi epatica. Il MELD score si è rilevato superiore alla classificazione di Child nel predire la mortalità in lista e possiede l'indubbio vantaggio di utilizzare variabili facilmente disponibili, riproducibili, standardizzate e oggettive e pertanto garantire la massima trasparenza nella procedura di allocazione del graft al momento della segnalazione di disponibilità dell'organo.

### *L'esclusione dalla lista d'attesa (drop-out)*

L'esclusione dalla lista d'attesa legata a progressione di malattia o comparsa di complicanze rappresenta ancora un tema di scottante attualità e rientra di diritto nella già discussa problematica della gestione della lista d'attesa in rapporto al numero di donatori disponibili.

Le principali cause di *drop-out* sono rappresentate dalla comparsa di complicanze emorragiche secondarie all'ipertensione portale, alla trombosi vascolare, alla progressione di malattia neoplastica epatica, all'elevata carica virale.

Per tale motivo vengono adottate delle metodiche *bridge* al trapianto mirate al tentativo di ridurre l'incidenza di *drop-out* in attesa che si renda disponibile un donatore.

Le metodiche adottate vanno dai trattamenti percutanei (alcolizzazione, radiofrequenza, crioterapia) alla chemioembolizzazione (TACE) per il trattamento dell'epatocarcinoma, dalla scleroterapia endoscopica al posizionamento di shunt porto-sistemici intraepatici transgiugulari (TIPS) per il trattamento delle varici esofagee e dell'ipertensione portale, dai sistemi dialitici (MARS, PAP) ai supporti bioartificiali (fegato bioartificiale) nel trattamento dell'insufficienza epatica acuta, ed infine al trattamento antivirale (Lamivudina, Interferone, Ribavirina) per ridurre la carica virale in previsione del trapianto.

## **PRELIEVO DELL'ORGANO EPATICO DAL DONATORE MULTIORGANO**

La qualità del prelievo e della preservazione dell'organo è estremamente importante per il successo del trapianto di fegato.

Il prelievo di fegato negli interventi di prelievo multiorgano è ormai standardizzato e fa parte di un tempo chirurgico, in cui diversi team chirurgici si susseguono nel prelevare i diversi organi che nell'ordine sono cuore, polmoni, fegato, pancreas, reni e intestino.

La sequenza è ben definita e il fegato è il primo organo addominale.

La tecnica di prelievo epatico si basa sui seguenti principi:

- Mantenimento dell'integrità anatomica dell'organo
- Riconoscimento degli elementi vascolari in particolare le anomalie che possono essere sezionate involontariamente se non riconosciute
- Raffreddamento dell'organo con una soluzione apposita di preservazione che non deve superare i 4 C\* di temperatura

### **Tecnica Chirurgica**

La tecnica chirurgica per il prelievo del fegato è universalmente eseguita ed accettata in accordo con le direttive della tecnica classica ( standard e rapida ) descritte nel 1984 e quindi riviste nel 1987 da T. Starzl padre della chirurgia sostitutiva epatica.

La tecnica standard è generalmente eseguita nel caso in cui il donatore sia pressoché emodinamicamente stabile, e prevede un completo isolamento delle strutture vascolari e dell'ilo epatico.

La tecnica rapida al contrario si esegue nel caso in cui il donatore evidenzia una certa instabilità emodinamica anche in fase di intervento e prevede l'immediato incanalamento degli elementi vascolari per la fusione rapida.

Nella tecnica classica l'intervento inizia con una lunga incisione mediana giugulo-pubica, che ha soppiantato la precedente incisione a croce dell'addome in quanto l'apertura dello sterno da una migliore esposizione soprattutto del fegato.

Dopo aver eseguito un accurata emostasi della cute e del periostio dello sterno anche con l'utilizzo della cera da osso, si posizionano i divaricatori di Finocchietto e il divaricatore addominale all'altezza dell'ombelico per avere una migliore esposizione.

Precedentemente all'apertura del divaricatore addominale si lega il legamento rotondo in prossimità del fegato e si disconnette il legamento falciforme dal peritoneo superiore fino all'apertura dei due foglietti a livello della regione sovra epatica. Conseguentemente viene eseguita una pericardiotomia per potere avere una maggiore apertura del divaricatore di finocchietto con una conseguente esposizione del cuore e del fegato, a questo si associa un minima incisione a livello delle pareti del diaframma e dei legamenti perivescicali per migliorare appunto l'esposizione addominale.

Gli organi addominali vengono valutati visivamente e palpatariamente per escludere lesioni sostitutive, così come il fegato che viene anche valutato per dimensioni e per eventuale presenza di steatosi e fibrosi ( associando eventualmente l'esecuzione di una biopsia per conferma istologica ).

Dopo aver sollevato il colon trasverso verso l'alto e il piccolo intestino a sx si procede all'isolamento dell'aorta sottorenale, dopo aver inciso il peritoneo posteriore fino alle arterie iliache per escludere la presenza di arterie renali accessorie. L'arteria mesenterica inferiore viene legata e sezionata e si isola l'aorta posteriormente, circondandola con due fettucce di cotone facendo attenzione a non ledere la vena cava subito a dx e le arterie lombari posteriori. Naturalmente si deve procedere anche ad una minima scheletrizzazione della cava che successivamente verrà ventata nella fase di per fusione fredda.

Si esegue anche l'isolamento della vena mesenterica inferiore reperimentandola lateralmente a legamento di Treits e si sospende tra lacci.

Si passa pertanto all'isolamento del fegato liberandolo dai legamenti triangolari destro e sinistro e da quello coronario . Viene inciso il piccolo omento superiormente fino alla vena sovraepatica sinistra, esponendo il primo segmento e

valutando l'eventuale presenza di un ramo epatico accessorio sinistro dall'arteria gastrica sinistra. Successivamente viene esplorato il forame di Winslow a livello del legamento gastro epatico per valutare la presenza di un ramo accessorio destro a partenza dall'arteria mesenterica superiore e talvolta dall'arteria gastroduodenale.

Dopo aver isolato e sezionato il coledoco con successivo lavaggio della colecisti, si isolano e si circondano con lacci rispettivamente, l'arteria gastrica sinistra a livello della piccola curva, l'arteria gastroduodenale a livello del piloro e l'arteria splenica distalmente aprendo il legamento gastro colico per avere una maggiore esposizione sul pancreas.

Queste manovre variano nel caso di anomalie vascolari o contemporaneo prelievo di pancreas.

Successivamente eseguiamo la manovra di Kocker che prevede la dissezione del duodeno in modo da esporre la cava inferiore per facilitarci l'identificazione dell'emergenza delle vene renali o le eventuali anomalie.

L'ultima fase prevede l'isolamento dell'aorta sottorenale con incisione dei pilastri diaframmatici e caricamento su fettuccia dell'aorta collocata posteriormente all'esofago.

Si procede pertanto all'eparinizzazione sistemica del donatore con 500 U / Kg e quindi si incanalano l'aorta sotto renale e la vena mesenterica inferiore fino alla porta con particolari cannule da perfusione collegate ad un set in cui viene infusa una soluzione di preservazione che negli anni è stata modificata ( UW, Celsior Custodiol ) modificando le concentrazioni ioniche dei suoi costituenti.

Siamo pertanto pronti per il Cross Clamp, momento che segna la fine della cosiddetta fase calda o a cuore battente e l'inizio della fase fredda in cui l'intero torrente ematico viene sostituito con il liquido di preservazione.

In questa fase dopo che i cardiocirurghi eseguono la cardioplegia attraverso un liquido infuso attraverso l'aorta ascendente, noi clampiamo l'aorta diaframmatica precedentemente isolata e facciamo partire attraverso la cannula aortica e portale il lavaggio con il liquido di preservazione freddo che si associa al "vent" della cava superiore o sottorenale associato a innondazione di acqua mista a ghiaccio

di tutto l'addome ed il torace in particolare nei seni costo frenici che raffreddano la cupola epatica e i reni.

La soluzione infusa corrisponde totalmente a circa 6/8 L di liquido di preservazione con tecnica flush in base al peso del paziente.

Leghiamo e sezioniamo quindi le arterie precedentemente isolate quali la gastrica sinistra la gastroduodenale e la splenica e le utilizziamo come via per reperire l'arteria epatica e il tripode celiaco, in particolare dopo aver visualizzato la porta sezionando a freddo il legamento gastroduodenale identifichiamo l'arteria mesenterica superiore inferiormente al pancreas e la seguiamo sul margine supero laterale destro per raggiunge e identificare l'aorta. Questa manovra viene eseguita per non lesionare accidentalmente l'arteria epatica nel tentativo di identificare l'aorta e per non sezionare eventuali rami destri anomali che nascono generalmente nei primi 2 cm dall'emergenza dell'arteria mesenterica superiore.

Identificata l'aorta e sezionata nell'inoscuro dell'arteria mesenterica per non ledere le arterie renali che possono emergere in prossimità; si crea un cappuccio intorno al tripode celiaco che era stato identificato precedentemente.

Viene contemporaneamente sezionata la cava inferiore a circa ½ cm dall'emergenza delle vene renali.

In questo modo il fegato viene escluso dal corrente circolatorio, anche se del liquido di perfusione, in quanto la vena porta lo era già al termine della fase a "flash".

Pertanto avendo tutti i vasi in mano, a questo punto il fegato può essere estratto dall'addome dopo averlo liberato dal diaframma.

### **Back Table**

A questo punto il fegato viene perfuso al banco con circa 1 L di soluzione di preservazione, attraverso la vena porta, lavando con qualche centinaio di cc. anche la via biliare e l'arteria epatica; quindi viene impacchettato e crioconservato ad una temperatura che si aggira intorno ai 0/3 C\*.

Il trasporto deve essere molto meticoloso per evitare qualsiasi tipo di insulto. Quando l'organo arriva nelle nostre sale operatorie, viene preparato per il così detto "back table"; momento ugualmente importante e complesso in quanto, pur rimanendo immerso nel liquido di preservazione freddo, l'organo deve essere completamente pulito e "verificato" per testarne la sua tenuta durante le manovre di trapianto. Questa fase che normalmente dura un ora, lievita in termini di tempo nel caso siano necessarie delle ricostruzioni vascolari tipo "fold over" per esempio il ramo epatico destro sul tripode o per riparare delle lesioni traumatiche del donatore o iatrogene in seguito a manovre non erranee.

Questa tecnica di prelievo viene modificata nella tecnica di prelievo en block per trapianti multiviscerali, con perfusione solo aortica o per pancreas in cui non può essere cannulata la porta per evitare un ostacolo al deflusso ematico nella fase di perfusione fredda ed un conseguente edema del parenchima; inoltre in caso di presenza di ramo destro anomalo diventa complesso l'isolamento della mesenterica superiore con un aumento dei tempi di ischemia fredda.

### **Modifiche alla tecnica**

Il nostro centro per ovviare al problema dell'edema pancreatico durante l'incanalazione portale ha modificato la tecnica di Starzl, isolando la porta a caldo e circondandola con laccio in modo da stringergli un Turnike a freddo. Questo ha permesso di poter ventare la Porta a monte del Turnike per far defluire il deflusso venoso Pancreatico e contemporaneamente ha permesso che il fegato non risentisse dei metaboliti della traslocazione batterica subite dall'intestino durante le fasi ischemiche di clampaggio, che evidentemente seguendo il torrente venoso defluivano inesorabilmente verso il fegato causando conseguentemente un danno da ischemia /riperfusion.

## **DANNO DA ISCHEMIA/ RIPERFUSIONE : IMPLICAZIONI FISIOPATOLOGICHE**

L'importanza del problema del danno da ischemia-riperfusion non soltanto nell'ambito delle discipline chirurgiche ma anche di quelle internistiche è ben comprensibile se solo ci si riferisce alla rilevanza clinica del concetto di danno ischemico post-inafrtuale.

In epatologia il danno post-ischemico, la sua fisiopatologia e le relative possibilità di profilassi e trattamento si ripercuotono in maniera significativa non soltanto, com'è facilmente intuibile sull'attività trapiantologica ma anche su quella correlata alla chirurgia resettiva maggiore.

I tempi di ischemia fredda e, in particolare, quelli di ischemia calda parziale in corso di trapianto di fegato, rappresentano, ancor oggi, elementi critici ai fini della qualità della ripresa funzionale del graft dopo trapianto.

La necessità di reperire un maggior numero di organi, nel contesto della grave carenza di donatori, pone il problema del reclutamento di un numero maggiore di fegati per trapianto, reclutamento che può essere ottenuto anche attraverso l'ottimizzazione della conservazione e della preservazione d'organo.

Molti fegati segnalati per la donazione vengono oggi scartati, infatti, perché considerati ad alto rischio di alterata riprese funzionale del graft dopo trapianto.

Nel contesto della chirurgia epatica maggiore, inoltre, l'utilizzo dell'isolamento vascolare totale, anche per tempi prolungati, diviene sempre più frequente e viene esteso anche a selezionati pazienti affetti da stadi iniziali di epatopatia cirrotica.

Analogamente la chirurgia epatica *ex situ in vivo* ed *ex situ ex vivo* inizia a rivestire rilevanza clinica sempre maggiore.

Sia in corso di trapianto di fegato che di resezioni epatiche maggiori con clampaggio vascolare, pertanto, il fegato è soggetto a un danno che interessa tanto le cellule parenchimali (epatociti) quanto le cellule non-parenchimali (cellule endoteliali, cellule di Kupffer, cellule di Ito).

Nel danno epatico da ischemia-riperfusion devono essere considerati due distinti eventi patogenetici, che risultano conseguenti e strettamente correlati:

1. il danno anossico/ischemico prodotto dal mancato apporto di ossigeno ai tessuti e dal ristagno di metaboliti tossici;
2. il successivo danno da rivascolarizzazione prodotto dall'azione dell'ossigeno stesso sul tessuto già sottoposto ad ipossia/anossia

## ***1. Il danno da ischemia***

### **A. Gli epatociti**

Gli epatociti sono molto sensibili al danno ischemico, prevalentemente a causa della sua componente anossica.

Nel danno cellulare anossico le modificazioni più precoci si verificano a carico dei mitocondri.

La diminuzione di ossigeno come accettore terminale di elettroni nella catena respiratoria comporta un blocco della fosforilazione ossidativa e la conseguente rapida diminuzione di ATP intracellulare.

La deplezione di questo nucleotide determina un'alterazione delle pompe ioniche di membrana ATP-dipendenti che favoriscono l'entrata di calcio, sodio e acqua all'interno della cellula determinando rigonfiamento cellulare. Il rapido incremento volumetrico della cellula può condurre alla sua morte.

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

L'osservazione che tali fenomeni regrediscono totalmente e rapidamente al momento della riperfusion 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.

Nell'epatocita che può sfruttare le riserve di glicogeno per la glicolisi anaerobia, l'effetto dell'ipossia può essere attenuato dalla presenza di adeguati depositi di glicogeno.

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.

Da più Autori è stato riportato che il digiuno può migliorare la funzionalità dell'organo. Il digiuno, infatti, riduce la fagocitosi e la produzione di TNF- $\alpha$ . Entrambi questi fattori pregiudicano la funzionalità delle cellule di Kupffer ritenute, come si vedrà in seguito, le principali responsabili del danno da ischemia-riperfusione tanto che l'inattivazione metabolica di queste cellule può essere di beneficio per la buona ripresa funzionale del graft.

Altri studi, invece, sono giunti a conclusioni contrapposte alle precedenti: in uno studio condotto sui ratti un elevato contenuto epatico di glicogeno ha dimostrato di avere effetto protettivo sull'insulto ischemico; sull'uomo l'infusione di glucosio è risultata efficace quando il periodo di ischemia calda, alla fine del trapianto, è risultato superiore a 90 minuti; al contrario, è stato riportato un effetto protettivo del digiuno solo per brevi periodi di ischemia.

Da questi dati si evince che un'elevata riserva metabolica di glicogeno epatico può attenuare il danno ischemico cellulare e attivare meccanismi di difesa nei confronti dei mediatori rilasciati dalle cellule di Kupffer. Al contrario, per brevi periodi di ischemia, sono sufficienti basse riserve metaboliche e il danno ischemico proporzionalmente correlato al grado di attivazione delle cellule di Kupffer.

### *B. La xantina-ossidasi*

In corso di ischemia si realizza, inoltre, un incremento della concentrazione cellulare di ipoxantina, derivante dal catabolismo dei nucleotidi adenosinici, con conseguente innalzamento dei livelli di xantina-ossidasi per conversione elettrolitica dalla xantina-deidrogenasi. L'accumulo intracellulare di elevate scorte di xantina-ossidasi è responsabile della massiva produzione e rilascio di radicali liberi dell'ossigeno al momento della ri-perfusione dei tessuti.

La xantina-ossidasi è presente sia all'interno delle cellule endoteliali che delle cellule epatocitarie.

Inibitori specifici dell'enzima quali l'allopurinolo attenuano significativamente le lesioni indotte dall'ischemia.

### *C. Le cellule endoteliali*

Anche le cellule endoteliali sinusoidali subiscono alterazioni strutturali tendendo ad assumere una forma globosa con retrazione del citoplasma. Le cellule riassumono, in parte, la loro forma originale, dopo la ri-perfusione, se il tempo di ischemia fredda o calda non è tanto protratto a lungo; al contrario, si osserva perdita dell'integrità dell'endotelio dopo periodi prolungati di ischemia.

## ***2. Il danno da riperfusione***

Paradossalmente la riperfusione dell'organo, e quindi la riossigenazione dei tessuti ischemici, può produrre un danno maggiore di quello indotto durante la fase di ischemia.

In modelli animali di preservazione epatica, il danno da riperfusione, dopo prolungati tempi di preservazione, produce due prevalenti fenomeni: da una parte l'attivazione delle cellule di Kupffer e dall'altra l'alterazione morfologica-strutturale e la perdita della funzionalità delle cellule endoteliali sinusoidali.

### *A. Attivazione delle cellule di Kupffer*

Come dimostrato da più Autori la riperfusione del graft sottoposto a precedente ischemia, determina l'attivazione delle cellule di Kupffer. Tale metodo è ben documentato morfologicamente, dall'irregolarità della superficie cellulare associata a degranulazione e, funzionalmente, 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- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuchina 1 (IL-1), interleuchina-6 (IL-6), prostaglandine (PGs) e ossido nitrico (NO). Questi mediatori aggravano lo stato di sofferenza dell'organo attraverso l'attivazione di un processo flogistico locale che può, in alcuni casi, essere tanto rilevante da promuovere l'evoluzione verso una sindrome da risposta infiammatoria sistemica (SIRS). Questa attivazione flogistica, indotta dalle cellule di Kupffer, si caratterizza selettivamente 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. Tali alterazioni includono adesione di leucociti e piastrine, riduzione del flusso ematico e progressione dei processi ischemici.

Secondo alcuni Autori l'aggiunta di farmaci bloccanti i canali del calcio alla soluzione di preservazione riduce l'attivazione delle cellule di Kupffer e migliora la sopravvivenza dopo trapianto di fegato nel ratto. Questa osservazione ha portato al riconoscimento di canale del calcio L-type nelle cellule di Kupffer i quali

durante la fase di ischemia o di ri-perfusione favorirebbero l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio ioni responsabili dell'attivazione cellulare.

Va però detto che il ruolo del calcio nel determinismo del danno ischemico è ancor oggi oggetto di diatribe e non universalmente accettato.

Alla pari di altri macrofagi, le cellule di Kupffer, sintetizzano, come detto, una notevole varietà di citochine tra le quali il TNF- $\alpha$  che media le risposte sistemiche all'endotossina e alla sepsi. Il TNF- $\alpha$  media anche l'infiltrazione dei leucociti polmonari e il danno conseguente ad ischemia-ri-perfusione. L'impiego di anticorpi anti-TNF- $\alpha$  riduce il danno polmonare in modelli di ischemia calda e fredda nel ratto. Le endotossine (lipopolisaccaride, LPS) stimolano la produzione di TNF- $\alpha$  da parte delle cellule di Kupffer.

E' stato osservato che una notevole varietà di agenti (nisoldipina, adenosina, pentossifillina, prostaglandina E1) in grado di sopprimere la formazione di TNF- $\alpha$  LPS-mediata da parte delle cellule di Kupffer, migliorano la sopravvivenza del graft dopo il danno da preservazione-ri-perfusione conseguente a trapianto di fegato nel ratto. La soppressione del rilascio di TNF- $\alpha$  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.

L'adesione di leucociti e piastrine alla parete dei sinusoidi epatici aumenta la possibilità di insuccesso del trapianto.

A conferma dell'importanza del ruolo svolto dalle cellule di Kupffer nella fisiopatologia del danno da ischemia-ri-perfusione, alcuni Autori hanno dimostrato il significativo aumento della produzione di superossido da parte di queste cellule se sottoposte ad anossia.

E' ormai dimostrato, inoltre, che il trattamento con gadolinio (GdCl<sub>3</sub>) inibisce la capacità delle cellule di Kupffer di generare specie reattive dell'ossigeno con effetti vantaggiosi per il parenchima epatico.

#### *B. Danno delle cellule endoteliali*

Dopo una conservazione del graft superiore a 24 ore in soluzione di Belzer la ri-perfusione con un medium aerobico caldo causa la morte improvvisa delle cellule endoteliali in poche minuti.

Studi sperimentali hanno dimostrato l'importanza delle lesioni delle cellule endoteliali nel determinismo del danno da ischemia-riperfusion. Sebbene la primary-non-function (PNF) sia essenzialmente attribuita al danno epatocellulare e, 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- $\alpha$ ), avvio di processi di coagulazione (PDGF, PAF), chemiotassi per linfociti, mononucleati e polimorfonucleati (leucotrieni, trombossani). 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, diretta esposizione degli epatociti alle stesse 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 sinusoidale e che culminano nella morte degli epatociti.

### *C. Il fenomeno del "pH-paradosso"*

Il danno tissutale da ischemia-riperfusion riconosce diversi moventi 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 dovuta alla produzione di acido lattico per la prevalenza dei processi glicolitici anaerobi e per l'idrolisi dell'adenosin-trifosfato (ATP). L'acidosi che ne consegue svolge un ruolo altamente protettivo nei confronti della funzionalità delle cellule durante l'ischemia stessa. Il ritorno del pH a livelli normali durante la riperfusion, accelera la morte delle cellule tramite l'attivazione di proteasi e fosfolipasi pH-dipendenti. Il paradossale peggioramento del danno quando il pH ritorna 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 di pori della membrana mitocondriale interna. Ciò comporta la depolarizzazione mitocondriale e il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa.

#### *D. Ruolo dei radicali liberi*

Radicali liberi dell'ossigeno vengono prodotti da diverse fonti. Le cellule di Kupffer costituiscono la sorgente maggiore di produzione di radicali liberi che possono formarsi anche da mitocondri danneggiati e dalla xantina ossidasi.

L'ossigeno singoletto ( $O_2^-$ ) e il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) partecipano alla formazione ferro catalizzata di radicale idrossile (OH) altamente tossico e responsabile della perossidazione lipidica.

Le cellule di Kupffer, una volta attivate, producono anche ossido nitrico (NO) che potrebbe contribuire al danno tramite la formazione di perossinitrito (dalla reazione tra  $O_2^-$  ed NO).

I radicali dell'ossigeno non sarebbero responsabili della morte delle cellule endoteliali indotta dalla riperfusione, perché i bassi livelli raggiunti non giustificano l'entità del danno, ma sarebbero importanti come secondi messaggeri capaci di attivare e/o promuovere altri processi direttamente o indirettamente citolitici.

In passato Jaeschke e coll. hanno dimostrato che l'infiltrazione di neutrofili dopo ischemia calda aumentava il danno epatico.

L'osservazione che la perossidasi diminuisce la marginazione dei leucociti sia dopo ischemia calda che fredda, ha portato a concludere che i superossidi promuovono l'adesione dei leucociti ai sinusoidi epatici.

#### *E. Le cellule infiammatorie e le molecole di adesione*

Sebbene venga, ormai, universalmente accettato che l'attivazione delle cellule di Kupffer, al momento della riperfusione, costituisce un evento cardine per la progressione del danno, bisogna, altresì, non trascurare il ruolo svolto da altri elementi cellulari quali neutrofili, leucociti, piastrine e altre cellule infiammatorie. Infatti la prima fase della riperfusione è caratterizzata

dall'infiltrazione dei neutrofili, ma un danno significativamente valido compare solo dopo 4-5 ore dalla riperfusione periodo, questo, necessario perché avvenga l'adesione dei neutrofili all'endotelio sinusoidale, lo stravasamento e l'aggressione alle cellule parenchimali.

Questi processi richiedono l'espressione di molecole di adesione sui neutrofili ( $\beta_2$  integrine), sulle cellule endoteliali (ICAM-1) e sugli epatociti (ICAM-1).

L'aumentata espressione di  $\beta_2$  integrina Mac-1 (CD 11b/CD 18) sulla superficie dei neutrofili circolanti è evidenziabile già dopo un'ora dalla riperfusione.

L'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro la  $\beta_2$  integrina Mac-1 deprime la funzione dei neutrofili proteggendo dal danno da riperfusione.

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 trans-endoteliale e l'adesione dei neutrofili agli epatociti.

L'ischemia, e la successiva riperfusione, inducono l'espressione dell'ICAM-1 sulle cellule endoteliali sinusoidali e sugli epatociti.

Anche l'impiego di anticorpi monoclonali diretti contro l'ICAM-1 ha dimostrato di possedere effetti protettivi nei confronti del danno da riperfusione.

Una volta accertata l'importanza delle cellule di Kupffer e dei neutrofili nella fisiopatologia del danno da ischemia-riperfusione, maggiore attenzione è stata rivolta ai mediatori dell'infiammazione prodotti da queste cellule.

L'aumentata produzione di  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1, PAF e l'attivazione del complemento è stata dimostrata da diversi Autori, e la neutralizzazione o l'inibizione di questi mediatori induce effetti sicuramente protettivi.

L'attivazione del sistema del complemento favorisce l'espressione di Mac-1 (CD11b/CD18) da parte dei neutrofili e stimola la produzione di superossido da parte delle cellule di Kupffer.

Anche PAF e  $\text{TNF-}\alpha$  possono indurre l'espressione di Mac-1 e attivare neutrofili e cellule di Kupffer.

TNF- $\alpha$  e IL-1 possono iniziare la trascrizione del gene dell'ICAM-1, che determina un incremento dell'espressione di ICAM-1 sulle cellule endoteliali sinusoidali e sugli epatociti.

Da quanto descritto, appare ben evidente l'importanza del ruolo svolto dai vari mediatori generati durante la ri-perfusione, i quali innescano una risposta infiammatoria che favorisce l'espressione di molecole di adesione, il richiamo di neutrofili e l'attivazione di macrofagi e neutrofili.

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

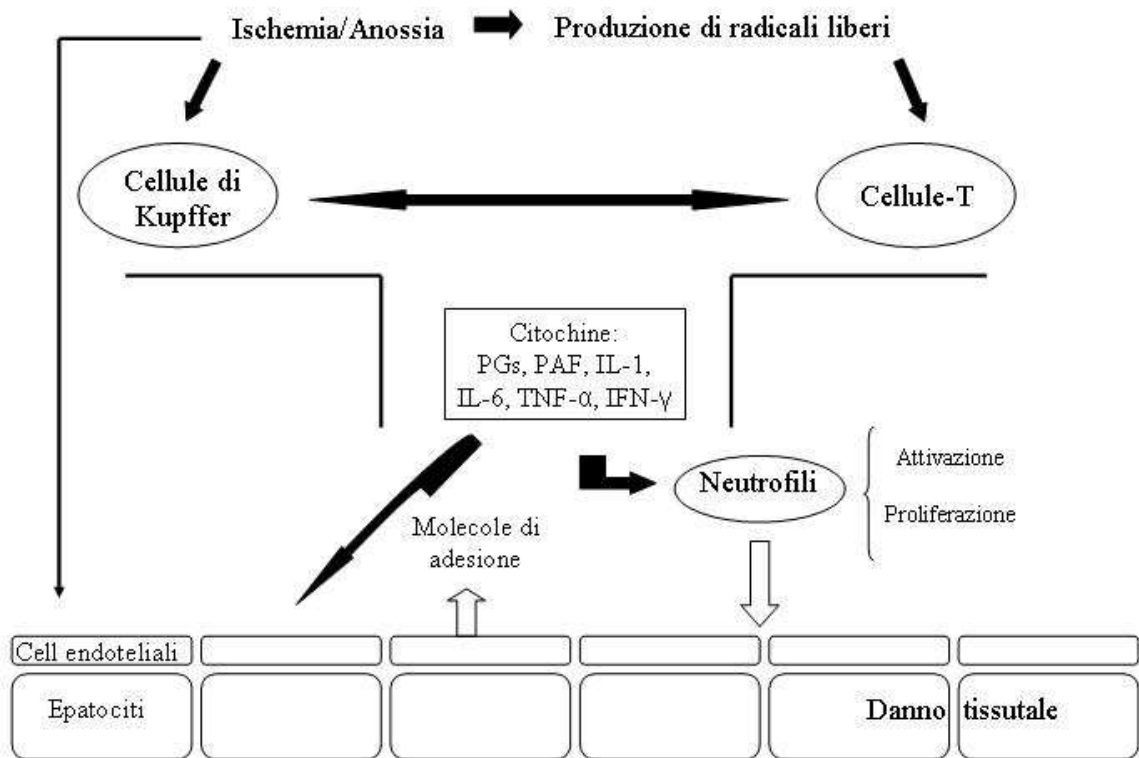
Sebbene sia stato ipotizzato che l'accumulo dei neutrofili all'interno dei sinusoidi possa determinare l'ostruzione di questi vasi, studi recenti hanno dimostrato che i sinusoidi difficilmente vanno incontro ad ostruzione a causa dell'accumulo dei neutrofili al loro interno.

Altre cellule ematiche (piastrine) possono accumularsi quando le cellule endoteliali sono danneggiate e le proteine della matrice extracellulare sono esposte riducendo, pertanto, il flusso ematico.

L'inibizione della sintesi di ossido nitrico, ad azione vasodilatatrice, riduce il flusso 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 ossido nitrico risolve l'infarto ischemico ma non migliora il danno da ri-perfusione mediato dall'attivazione delle cellule di Kupffer.

Bloccando gli effetti di vasocostrittori come il trombossano e l'endotelina-1 si ottiene un miglioramento della microcircolazione. 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 l'azione di fattori di attività vasocostrittrice.



**Figura n. 3.** Meccanismo della cascata degli eventi cellulari in corso di I/R. I radicali liberi generati durante la fase acuta del danno da ischemia-riperfusione promuovono la cascata infiammatoria che porta alla risposta sub-acuta caratterizzata dall'infiltrazione e dall'attivazione dei polimorfonucleati nel fegato immediatamente dopo la riperfusione. L'attivazione delle cellule di Kupffer e dei linfociti-T determinano un richiamo di polimorfonucleati e successivamente l'espressione di molecole di adesione (ICAM-1) sulla superficie delle cellule endoteliali e degli epatociti. Le cellule di Kupffer e i linfociti-T attivati producono una serie di citochine (PGs, PAF, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) che amplificano il processo e mediano la distruzione tissutale.

## *N-Acetil Cisteina ( NAC )*

### *E' possibile prevenire il danno da ischemia-riperfusion in chirurgia epatica?*

Diverse strategie protettive sono state proposte nei confronti del danno da I/R in trapiantologia epatica, basate sostanzialmente sull'impiego di specifici agenti farmacologici.

Essi comprendono agenti antiossidanti (n-acetilcisteina, albumina, bucillamina, allopurinolo, glicirrizina, etc.), agonisti dell'adenosina, donatori di NO (L-arginina, NONOate, FK409), pentossifillina (riduce il rilascio di TNF- $\alpha$  da parte delle cellule di Kupffer), inibitori delle proteasi, molecole antiapoptotiche, prostaglandine (sono rilasciate dalle cellule di Kupffer durante la fase di riperfusione; agiscono riducendo il rilascio di proteasi e la formazione di radicali liberi dai leucociti attivati), inibitori delle metalloproteinasi, ipotermia (riduzione dell'attività metabolica alla temperatura di 4°C), soluzioni di preservazione (UW, Celsior, HTK).

### *Ruolo potenziale della N-acetilcisteina.*

Cysteine	N-AcetylCysteine (NAC)
$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{HS}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{HN}-\text{CO}-\text{CH}_3 \end{array}$

**Figura n. 4.** Formula della Cisteina e della N-Acetil-L-Cisteina.

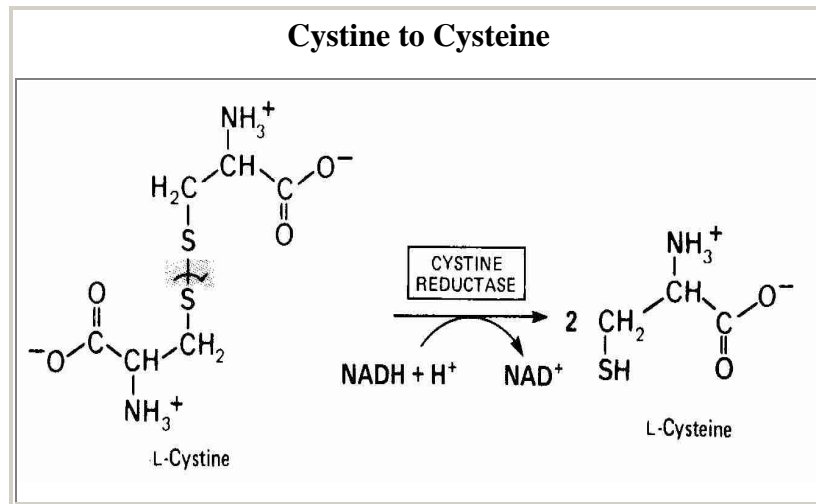
L'N-AcetilCisteina ( NAC , N-Acetil-L-Cisteina ) e' composta dall'aminoacido L-Cisteina piu' un gruppo acetile ( -CO-CH<sub>3</sub> ) legato al gruppo amminico ( NH<sub>2</sub>).

Il gruppo acetile ha la funzione di aumentare l'assorbimento per via orale della cisteina mentre gli aminoacidi che contengono un gruppo solforico hanno proprietà antiossidanti.

L'atomo di idrogeno del gruppo Tiolo (-SH) contenuto nei gruppi solfurei di alcuni antiossidanti può comportarsi come un elettrone per neutralizzare i radicali liberi. L'Acido Lipoico, il tripeptide glutatione, gli aminoacidi cisteina e metionina e i gruppi organici solforici presenti nell'aglio sono tutti tioli con effetto antiossidante. Anche l'albumina può avere una funzione antiossidante nel plasma per la presenza di Cisteina-34.

Il Glutatione ( GSH, L-gamma-glutammina-L-cisteinglicina ) è l'antiossidante predominante nel citoplasma delle cellule. Virtualmente tutte le cellule richiedono glutatione per la loro sopravvivenza. Il Glutatione è sintetizzato da tre aminoacidi in un processo in due step, che inizia con la combinazione dell'acido glutammico e la cisteina terminando con l'aggiunta della glicina. Il fegato e i polmoni sono i siti primari della sintesi di glutatione. La Glicina e l'acido glutammico sono presenti in abbondanza nelle cellule, così la velocità della reazione è controllata dalla disponibilità della Cisteina.

L-Cisteina non è molto idrosolubile né viene assorbita bene dall'intestino. Il fabbisogno giornaliero dipende dalla dieta in particolare la degradazione dei peptidi che la contengono. Poiché la Cisteina è instabile, la principale fonte extracellulare della Cisteina intracellulare, è il dipeptide Cistina ( formato dalla coniugazione di due cisteine ). Cistina compete con il glutammato per il trasporto dentro la cellula, così che condizioni di elevata concentrazione extracellulare di glutammato può indurre il consumo di glutatione, causare stress ossidativo e morte cellulare ([JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY; Sato,H; 274\(17\):11455-11458 \(1999\)](#)). S-AdenosilMetionina può aumentare la sintesi di glutatione.



**Figura n. 5.** Formazione della Cisteina a partire dalla Cistina.

L'integrazione anche orale di NAC provvede ad un aumento del glutathione intracellulare attraverso l'aumento della cisteina intracellulare. NAC è assorbito rapidamente dopo la somministrazione orale e raggiunge il massimo livello plasmatico in 2-3 ore con un T/2 di circa 6 ore. NAC rapidamente entra nelle cellule ed è idrolizzato a Cisteina.

Glutathione ( GSH ) può degradare i perossinitriti e i radicali idrossilati così come può convertire il perossido di idrogeno in acqua.

Sebbene si formi un radicale di glutathione ( GS.), è rapidamente neutralizzato dalla combinazione di un altro radicale di glutathione per produrre GSSG.

GSSG può essere convertito di nuovo a GSH dall'enzima glutathione reduttasi NADPH dipendente.

La Vitamina C può rigenerare un radicale di Vitamina E e il GSH può rigenerare un radicale di vitamina C nella sua forma non ossidata, creando una "reazione di dipendenza" fra molecole anti ossidanti.



NAC viene usato nella pratica clinica per il trattamento degli avvelenamenti da Acetaminofene o Alcohol; Il glutatione detossifica l'acetaminofene ma quando lo stesso viene depleto c'è una significativa citolisi nel fegato. [THE AMERICAN JOURNAL OF MEDICINE; Flanagan,RJ; 91\(Suppl C\):131S-139S \(1991\)\].](#)

Esperimenti sui topi indicano che il NAC può aumentare la sopravvivenza neuronale nella regione CA1 dell'ippocampo in conseguenza dei danni da ischemia-riperfusion e, se viene somministrato prima o dopo l'infarto; inoltre durante questi eventi che riducono i livelli di NAC si associa anche una riduzione dei livelli plasmatici di omocisteina endoteliale. NAC può ridurre l'apoptosi nei neuroni in assenza dei fattori di crescita attraverso l'attivazione e la regolazione della via delle Kinasi del Ras- Extracellulare ( ERK ), un effetto dovuto all'azione diretta sui fattori di trascrizione dei gruppi tiolici, più che agli effetti antiossidanti; può attivare la risposta immunitaria, ricreare le riserve di cellule Natural-Killer e indurre l'apoptosi p-53 mediata nelle cellule tumorali. NAC può prevenire la resistenza-insulinica dovuta alle alte dosi di glucosio ematico e tutti gli altri effetti legati alla sua azione antiossidante. [AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY; Haber,CA; 285\(4\):E744-E753 \(2003\)](#) ANTICANCER RESEARCH; Gustavo, B; 23:1411-1416 (2003) JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY; Sochman, J; 39(9):1422-1428 (2002)

NAC fra le altre cose legate alla sua azione antiinfiammatoria e mucolitica nel tratto respiratorio, blocca la produzione dell'ossido Nitrico (NO) legato alla produzione di citochine infiammatorie, attraverso l'inibizione dell'attivazione di NF-kB. NF-kB è normalmente legata all'IkB, proteina presente nel citoplasma, ma è rilasciata per entrare nel nucleo in caso di infezione, stress ossidativi e citochine infiammatorie ( TNF-alfa ) causano degradazione delle proteasi di IkB.

NF-kB aumenta la trascrizione di codoni per il gene TNF-alfa e IL-1 con effetto feedback +. NAC blocca l'attivazione del TNF-alfa in modo indipendente dall'NF-kB, per la sua attività antiossidante, causando cambiamenti strutturali nei recettori del TNF riducendone l'affinità per il TNF-alfa. [THE EMBO](#)

[JOURNAL; Hayakawa,M; 22\(13\):3356-3366 \(2003\)](#). Il TNF-alfa e' cosi' tossico in assenza di GSH che puo' uccidere gli animali da esperimento se non viene somministrato rapidamente il NAC che puo' essere considerato l'antidoto.

NAC ha anche un effetto diretto nel rigenerare la complessa fosforilazione ossidativa nei mitocondri a causa dell'azione dei gruppi sulfidrilici sugli stessi, nell'invecchiamento cellulare, e come protettore dal danno da radiazioni e radicali liberi , piu' che per la sua capacita' a produrre glutatione. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY; Miquel,J; 292:333-335 (1995)// FREE RADICAL BIOLOGY & MEDICINE; Neal,R; 34(6):689-695 (2003).

La Cisteina ha anche un effetto di ridurre il legame del rame con LDL colesterolo e di ridurre gli ioni rame 2+ e ferro 2- con conseguente aumento del danno da radicali liberi ; tuttavia questo e' stato dimostrato solo da test di laboratorio in provetta e non e' chiaro quale sia il suo effetto in vivo visto che la cisteina extracellulare non e' stabile. Questo fa sorgere domande su cosa puo' accadere nella cellula in presenza di metalli pesanti, ma l'evidenza suggerisce che i benefici legati all'aumento del Glutatione ( GSH ) e' il fattore chiave, forse perche' il gruppo sulfidrilico contenuto nel NAC puo' chelare i metalli pesanti. ( il NAC e' utilizzato per gli avvelenamenti da metalli pesanti )

### **Farmacocinetica**

La Farmacocinetica del NAC e' del tipo dose dipendente con picco di concentrazione e biodisponibilita' che aumenta con l'aumentare della dose.

Bassa disponibilita' per via orale 4-10% per elevata estrazione epatica da primo passaggio.

CL Renale : 30% della CL totale con 0,21 l/h/Kg

T ½ : per via endovenosa varia tra 1,95 h a 5,58 in base alla forma ridotta o totale rispettivamente del NAC

Volume di Distribuzione : 0,33/0,47 l/Kg

Volume di Distribuzione Apparente: circa 35l in un uomo di 75 Kg

**Effetti Collaterali:**

Reazione anafilattica in rari casi per ipersensibilità al farmaco senza evidenza di morti per questa evenienza descritte in letteratura.

Evidenza di un T  $\frac{1}{2}$  raddoppiato in pazienti con insufficienza epatica o cirrotici

Nessuna evidenza in letteratura di effetti collaterali dose dipendente

**Indicazioni e Modo di Somministrazione del NAC**

Comunemente il farmaco viene utilizzato come:

1. Mucolitico; 3-5 ml in soluzione al 20% per via nasale tramite aerosol 3 volte al giorno
2. Avvelenamento da Paracetamolo; Protocollo standard: 150 mg/Kg in Glucosta 5% ( 200 ml ) in 15 min. per via ev. ( Dose da Carico ), seguito da 30-50 mg/Kg in G5% ( 500 ml ) in 4 h.ev., seguito da 100 mg/Kg in G5% ( 1000 ml ) in 16 h.ev. Per via orale visto la biodisponibilità del NAC: 140mg/Kg in cp. ( Dose da carico ) seguito da 70 mg/Kg in cp. ogni 4 h per 17 dosi.
3. Insufficienza Renale e a protezione di mezzi di contrasto iodati: 600 mg in G5% (500 ml) ev. prima e dopo la procedura.



## PAZIENTI E METODI

In questa tesi analizzerò l'interim analisi a 15 mesi ( Dicembre 2006 – Marzo 2008 ) di questo studio prospettico randomizzato, per valutare l'impatto di infusione sistemica e loco regionale di NAC, nell'outcome del paziente trapiantato di fegato.

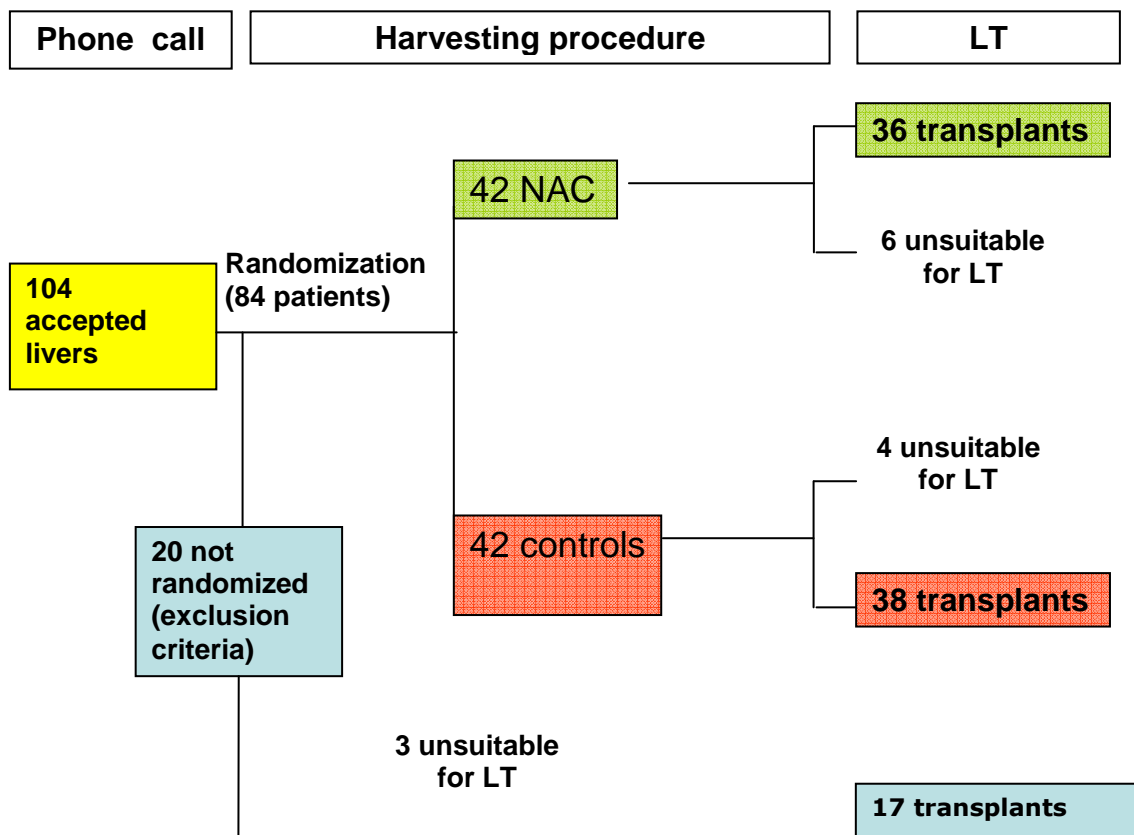
Il disegno dello studio includeva un periodo di arruolamento di 30 mesi ( per ottenere una validità statistica ) a partire dal Dicembre 2006, con un follow up minimo di 1 anno. Abbiamo incluso nella randomizzazione tutti gli organi interi e gli split di donatori consecutivi, e abbiamo escluso direttamente nella fase di allocazione dell'organo, tutti i donatori pediatrici o allocati a riceventi pediatrici, tutti i graft per re-trapianto o status UNOS 1.

La tecnica chirurgica di prelievo come già descritto precedentemente è una doppia perfusione modificata dal nostro centro; con cooling aortico e portale, e clampaggio con tourniquet del vaso portale in modo tale da consentire la perfusione con il liquido di preservazione freddo, evitando nel contempo l'inflow spleno mesenterico della fase fredda. Abbiamo usato invece la tecnica classica di prelievo solo nelle procedure split e nel prelievo di intestino o multiorgano.

La randomizzazione pertanto è stata centralizzata in 2 gruppi paralleli ( Studio e controllo ).

Nel gruppo di studio, abbiamo deciso di infondere ev. per via sistemica 30 mg/Kg ( peso paziente ) di NAC in 500 cc di G5% in 15 minuti , circa 30 minuti prima dell'inizio del prelievo. Successivamente, 5 minuti prima del cross clamp abbiamo infuso per via loco-regionale nella vena porta, 150 mg/Kg ( peso del fegato ) in bolo ( Standard liver volume 2% body weight ). Abbiamo calcolato la concentrazione T zero nelle due fasi: nella fase sistemica è pari a 75 mg/l e in quella portale 600 mg/l.

Nella fase sistemica la dose è la stessa che viene somministrata durante il periodo stazionario dell'intossicazione epatica acuta; invece nella fase loco regionale la dose equivale alla dose da carico .



**Figura n. 8.** Schema dell'Algoritmo durante la randomizzazione Dic. '06–Mar. '08.

## **Campione di Studio**

Il campione di studio previsto per completare il protocollo ( Dicembre 2006 Luglio 2009 ) sara' di circa 90 pazienti per braccio. Questo per avere uno studio di superiorita' statistica con una stima di vantaggio nel gruppo NAC di circa il 15%.

Per quanto riguarda l'interym Analysis, tra il Dicembre 2006 e il Marzo 2008 abbiamo accettato 104 Fegati dopo chiamata, 20 sono stati subito esclusi perche' non seguivano i criteri del protocollo; i rimanenti 84 sono stati randomizzati , 42 nel gruppo NAC e 42 nel controllo. Di questi solo 36 nel gruppo NAC e 38 nel controllo sono stati trapiantati. Gli scartati nel gruppo NAC furono 6 ( 3 steatosi eccessiva, 2 cancro nel donatore , 1 fibrosi ) 4 nel non NAC ( 2 per steatosi , 1 per cancro e 1 per necrosi significativa ).

## **PRESUPPOSTI DELLO STUDIO**

Il danno post-ischemico, la sua fisiopatologia e le relative possibilità di profilassi e trattamento si ripercuotono in maniera significativa sull'attività trapiantologica epatica.

I tempi di ischemia fredda e, in particolare, quelli di ischemia calda parziale in corso di trapianto di fegato, rappresentano, ancor oggi, elementi critici ai fini della qualità della ripresa funzionale del graft dopo trapianto. La necessità di reperire un maggior numero di organi, nel contesto della grave carenza di donatori, pone il problema del reclutamento di un numero maggiore di fegati per trapianto, reclutamento che può essere ottenuto anche attraverso l'ottimizzazione della conservazione e della preservazione d'organo. Molti fegati segnalati per la donazione vengono oggi scartati, infatti, perché considerati ad alto rischio di alterata ripresa funzionale del graft dopo trapianto. Nel periodo che va dal clampaggio aortico sul donatore alla riperfusione post impianto nel ricevente, il graft epatico è soggetto a un danno che interessa tanto le cellule parenchimali (epatociti) quanto le cellule non-parenchimali (cellule endoteliali, cellule di Kupffer, cellule di Ito).

Riteniamo di dimostrare che l'apporto di un precursore di glutatione nella fase di prelievo , associato alla modifiche della tecnica di prelievo per cui l'efficacia e' gia stata dimostrata scientificamente, possa migliorare significamente l'outcome del paziente e dell'organo trapiantato modificando i limiti di ' donatore marginale ' che mai come ora puo' essere definito ' sub ottimale ' .

## **OBIETTIVI DELLO STUDIO**

Questo studio prospettico randomizzato è stato disegnato per testare l'impatto sull'outcome post-trapianto di fegato (TF) dell'infusione sistemica e loco-regionale di N-acetilcisteina (NAC) durante la procedura di prelievo del fegato.

Gli *end-point* dello studio sono pertanto i seguenti:

### *End-point primari.*

1. Prevalenza di PDF nei due gruppi.
2. Sopravvivenza del paziente 3 mesi dal TF.
3. Sopravvivenza del graft a 3 mesi dal TF.

### *End-point secondari*

1. Valori di transaminasi, tempo di protrombina (PT)/INR, bilirubina ed acido lattico tra la 2° e la 7° giornata p.o.
2. Complicanze infettive, chirurgiche.
3. Rigetti.
4. Recidiva precoce (< 12 mesi) di malattia (HCV, HCC).

## **DURATA DELLO STUDIO**

Per questo studio prospettico è previsto un periodo di arruolamento di 30 mesi ed un follow-up minimo per i pazienti arruolati di 12 mesi. La durata massima dello studio sarà quindi di 42 mesi.

E' prevista una analisi ad interim a 18 mesi (12 mesi di arruolamento + 6 mesi di follow-up).

## **DISEGNO DELLO STUDIO**

Studio pilota prospettico di fase II, randomizzato e controllato.

## **DEFINIZIONE DEL GRUPPO DI STUDIO**

Nello studio viene arruolato un binomio graft – ricevente. I criteri di selezione riguardano quindi sia le caratteristiche del fegato (definizione di fegato sub-ottimale) che del ricevente.

### *Criteri di inclusione del graft:*

Verranno randomizzati tutti i fegati consecutivi da donatore cadavere segnalati telefonicamente per un ricevente potenziale che rientra nei criteri di inclusione.

### *Criteri di inclusione del ricevente:*

- Età > 18 anni
- Entrambi i sessi
- Razza qualsiasi
- Primo trapianto

### *Criteri di esclusione del graft:*

- Fegato destinato a ricevente pediatrico
- Fegato destinato a ri-trapianto
- Fegato destinato a paziente con epatopatia acuta (UNOS status 1).

### *Criteri di esclusione del ricevente:*

- Età < 18 anni
- Re – trapianto
- UNOS status 1.

## **DISEGNO E PROCEDURE**

### *Randomizzazione*

La randomizzazione è centralizzata e realizzata mediante un sistema informatico di allocazione tale da dare uguali proporzioni di pazienti per i due bracci di ciascuno studio. Tutti i fegati segnalati e destinati ad un ricevente che rispetta i criteri di inclusione vengono randomizzati 1:1 in due gruppi: infusione di fluimucil (gruppo di studio), procedura standard (gruppo di controllo).

### *Definizione di fegato sub-ottimale:*

- Almeno uno dei seguenti criteri maggiori: segni ecografici di steatosi; BMI > 30; fegato parziale; età del donatore > 60 anni; positività HCV o HBsAg;
- Almeno due criteri minori: picco di Na<sup>+</sup> > 155 mmol/l, terapia intensiva > 7 giorni, Dopamina > 10 microg/kg min, instabilità emodinamica o importante alterazione indici epatici.

### *Definizione di Initial Poor Function*

In accordo con la definizione di Ploeg , quando il livello di AST e' maggiore di 2000 e il PT inferiore al 40% dalla giornata post operatoria 2 alla 7.

### *Infusione di NAC*

Il protocollo NAC prevede: l'infusione sistemica (30 mg/kg) di NAC diluiti in 500 ml di soluzione glucosata al 5%, da infondere in 15' a 30 minuti prima dell'inizio dell'intervento di prelievo del fegato; una infusione loco-regionale di NAC non diluita (150 mg/Kg di fegato stimato) attraverso la vena porta 5 minuti prima del clampaggio aortico.

### *Tecnica chirurgica*

Nei donatori sottoposti a tecnica di split liver o in particolari casi di espanti multiviscerali (fegato+pancreas±intestino) viene preferenzialmente eseguita la

tecnica della singola perfusione aortica (SAP). Brevemente, nella tecnica SAP, una singola cannula viene inserita nell'aorta addominale sottorenale e l'ilo epatico viene solo marginalmente coinvolto.

In tutti i donatori che non rispondono alle caratteristiche sopra descritte, viene preferenzialmente utilizzata la tecnica della doppia perfusione modificata (MDP). Nella tecnica MDP, vengono inserite due cannule per la perfusione, una in aorta ed una in vena mesenterica inferiore, come nella tecnica originale di Starzl. In aggiunta, dopo avere confermato con la palpazione la presenza della cannula all'interno della vena porta, la vena porta viene circondata a livello di ilo epatico con un tourniquet, che viene clampato subito dopo il clampaggio aortico.

I graft vengono perfusi in situ attraverso la singola o le due cannule con soluzione Celsior a 4°C. Circa il 60% del volume della soluzione (30 ml/kg attraverso la vena porta e 60 ml/kg attraverso l'aorta nella tecnica MDP, 90 ml/kg attraverso l'aorta nella tecnica SAP) vengono infusi rapidamente (in 10-15 min) dopo il cross-clamp. La perfusione viene quindi rallentata per il restante 40% della soluzione fino al completamento della procedura di prelievo (20-40 min). Dopo l'epatectomia, i fegati vengono ulteriormente perfusi al back-table con Celsior (700 ml nella vena porta e 300 ml nell'arteria epatica) e quindi conservati negli appositi contenitori, in soluzione Celsior a 4°.

Il TF viene preferenzialmente eseguito preservando la vena cava retro-epatica (tecnica piggy-back) e senza l'uso della bio-pump. Ai pazienti trapiantati viene somministrato un protocollo immunosoppressivo caratterizzato dall'associazione di due o tre farmaci, che includono ciclosporina o tacrolimus combinati con steroidi, con o senza micofenolato mofetil. Una biopsia epatica viene eseguita di routine a 6 e 12 mesi dal TF o quando clinicamente indicata.

#### *Valutazione dell'outcome post-TF*

I pazienti arruolati hanno visite prefissate a 1,2,3,5,7 giorni dopo il trapianto e quindi a 1, 3, 6 e 12 mesi. Le visite prevedono esami ematochimici completi ed esame clinico.

La definizione di PDF è quella di Ploeg che comprende il concetto di initial poor function (AST > 2000 e PT > 16 sec tra la 2° e 7° gpo) e PNF (IPF che porta a morte o re-trapianto entro 7 giorni)

## **ANALISI STATISTICA**

### ***Dimensione del campione***

La numerosità del campione è definita sulla base del confronto di equivalenza tra le sopravvivenze del graft a 3 mesi post-TF nei due gruppi, assumendo una distribuzione dei due gruppi in rapporto di 1:1 nei 24 mesi di arruolamento. Definendo una probabilità di errore di I tipo  $\alpha = 5\%$ , una sopravvivenza del graft a 3 mesi dell'80%, e accettando un limite di equivalenza del 20%, 60 pazienti nel Gruppo di Studio e 60 pazienti nel Gruppo di Controllo assicurano una potenza superiore all'80%. La numerosità di 60 pazienti nel Gruppo di studio assicura la stima intervallare della sopravvivenza di quella popolazione con una precisione dell'8,9%, con un grado di fiducia del 95%.

### ***Piano di analisi dei dati.***

Le caratteristiche basali dei pazienti (gruppo di studio e controlli) verranno espresse mediante media  $\pm$  deviazione standard (DS) o mediana (range) a seconda delle esigenze descrittive per le variabili continue, e come frequenze (%) per le variabili categoriche - nominali. Il test del chi-quadrato ( $\chi^2$ ), il test esatto di Fisher e la regressione logistica verranno utilizzati dove appropriato per i confronti tra gruppi. La lunghezza del follow – up, i tempi di attesa in lista e la sopravvivenza verranno espressi come mediana (range). Le curve di sopravvivenza del paziente e del graft verranno costruite con il metodo di Kaplan-Meier e confrontate con il test Log rank. Per le variabili continue analizzate, il livello di cut-off verrà considerato il loro valore mediano. Le variabili che risulteranno significative all'analisi univariata, verranno inserite in un modello di Cox per l'analisi multivariata di sopravvivenza. La significatività statistica verrà posta con  $P < .05$ . I calcoli statistici saranno effettuati con il software JMP (1989-2003 SAS Institute Inc.).

## RISULTATI

### CONFRONTO TRA I DUE GRUPPI

Tra Dicembre 2006 e Marzo 2008 abbiamo trapiantato 36 pazienti nel gruppo NAC e 38 nel non NAC. Comparando le caratteristiche del donatore nei due gruppi non abbiamo trovato differenze statisticamente significative, in particolare il Donor Risk Index by Feng calcolato nei due gruppi era rispettivamente 1,8 nel controllo e 1,6 nel gruppo di studio.

Analogamente non sono state trovate differenze, paragonando le caratteristiche del ricevente e gli aspetti tecnici.

*Tabella 3: Confronto fra le caratteristiche del donatore nei due gruppi NAC e non NAC*

VARIABLES	No NAC (No=38)	NAC (No=36)
Age (years)	59 (18-81)	<b>52 (19-76)</b>
Partial	4 (11%)	5 (14%)
BMI	24.5(19.1-29.4)	24.8 (16.7-32.0)
Hemodynamics instability	11 (32%)	6 (19%)
US steatosis	13 (39%)	8 (25%)
Sodium (mmol/l)	150 (122-161)	145 (135-188)
AST (U/l)	36 (14-271)	38 (12-1700)
ALT (U/l)	23 (4-227)	33 (6-310)
NAC infusion-cross clamp (min)	165 (75-355)	162 (80-265)
DRI	1.8 (1.0-3.0)	1.6 (1.0-2.6)
Suboptimal	27 (60%)	20 (50%)

**Tabella 4:** Confronto tra le caratteristiche del ricevente nei due gruppi NAC e non NAC

VARIABLES	No NAC (No=38)	NAC (No=36)
Age (years)	56 (32-68)	53 (27-66)
Sex (female)	9 (24%)	7 (19%)
Aetiology		
HCV	7 (18%)	13 (35%)
HBV	3 (8%)	2 (6%)
Alcol	3 (8%)	2 (6%)
HCC	19 (50%)	17 (47%)
Other	6 (16%)	2 (6%)
CPT	8 (6-14)	9 (6-14)
MELD	17 (8-39)	16 (7-34)
Classical technique	1 (3%)	1 (3%)
CIT (min.)	492 (253-595)	505 (281-605)
WIT (min.)	30 (22-42)	34 (22-85)
LTtotal time (min.)	462 (315-600)	420 (340-615)
Cell saver (ml)	925 (276-7000)	721 (224-6000)
RIS (ml)	9024 (850-63033)	10132 (6000-28000)
Blood RC (ml)	1200 (0-5400)	1500 (0-4500)
Plasma (ml)	1200 (0-5400)	1800 (0-4750)

## OUTCOME POST TRAPIANTO

Considerando gli obiettivi primari, guardando l'incidenza di Initial Poor Function, abbiamo osservato che e' stata del 26% nel gruppo di controllo contro l'8% nel gruppo di studio con  $p < 0.04$ .

Analogamente per l'early graft lost : 21% a 3 mesi ( 8 pazienti ) nel gruppo di controllo, contro il 6% ( 2 ) nel gruppo di studio con  $p < 0.05$ .

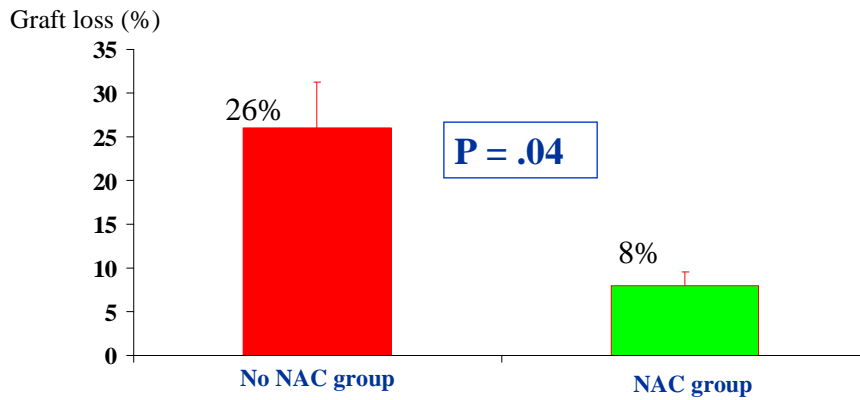
Fra i pazienti deceduti, 5 di 8 fra i controlli ebbero un IPF mentre solo 1 di 2 nel gruppo di studio.

Valutando il graft e patients survival abbiamo osservato una migliore sopravvivenza nel gruppo NAC, ma questo non ha raggiunto la significativita' statistica.

Abbiamo allora comparato la sopravvivenza osservata in base al DRI di Feng e abbiamo trovato che nel gruppo di controllo, dove la media del DRI era 1.8, la sopravvivenza a 3 mesi era uguale a quella riportata da Feng; al contrario nel gruppo di studio, dove la media DRI era 1.6, la sopravvivenza era del 97% ( nettamente maggiore ). Analogamente a 1 anno, 78% nel controllo 94 % nello studio .

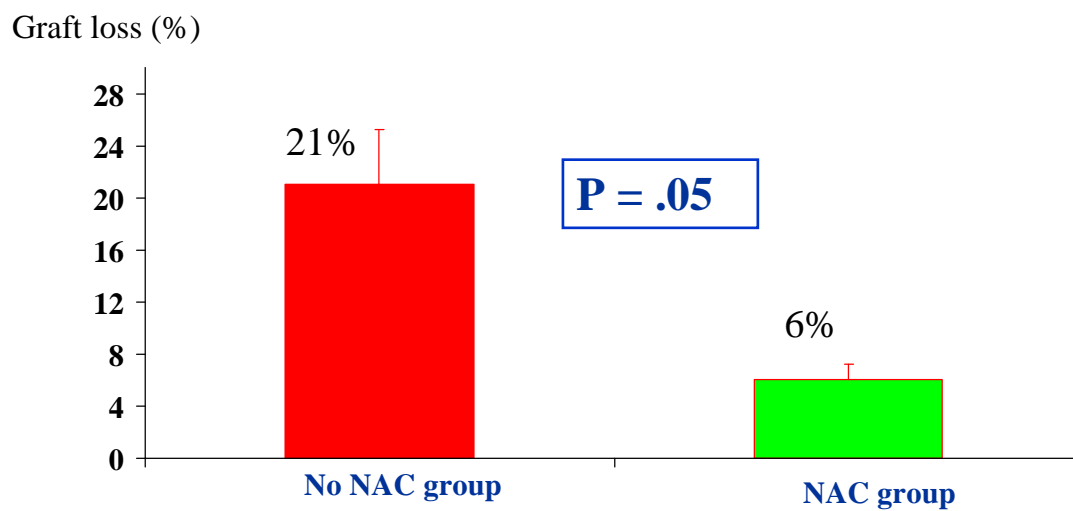
Per quanto riguarda gli end points secondari, abbiamo osservato nel gruppo NAC una minore prevalenza di pazienti con alto livello di AST nel POD 2; migliore INR nel POD 7 e una piu' bassa ospitalizzazione post OLTx. Tutti statisticamente significativi.

IPF: 10 (26%) in the no NAC group, and 3 (8%) in the NAC group



**Figura n. 9.** Incidenza di *IPF* nei due gruppi

Early graft losses: 8 (21%) in the no NAC group, and 2 (6%) in the NAC group

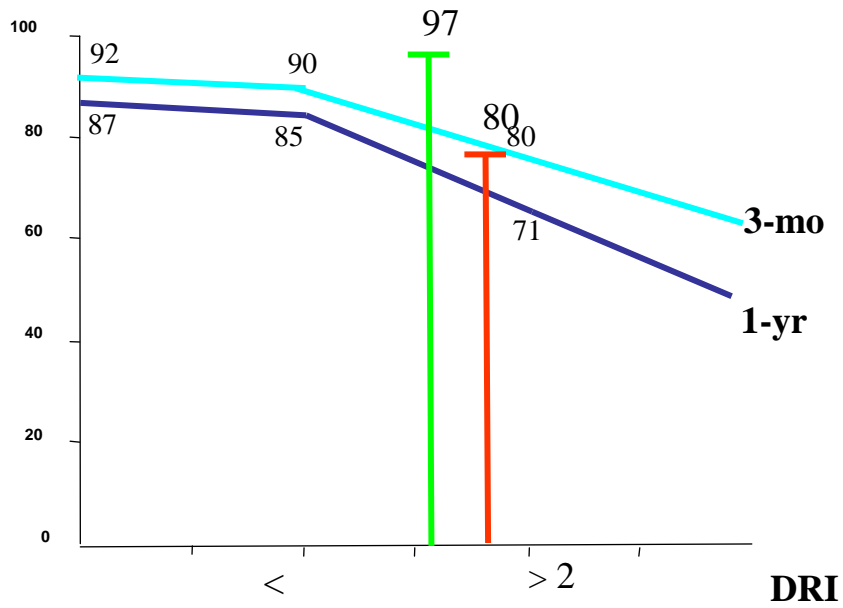


**Figura 10:** Incidenza di *Early graft losses*.

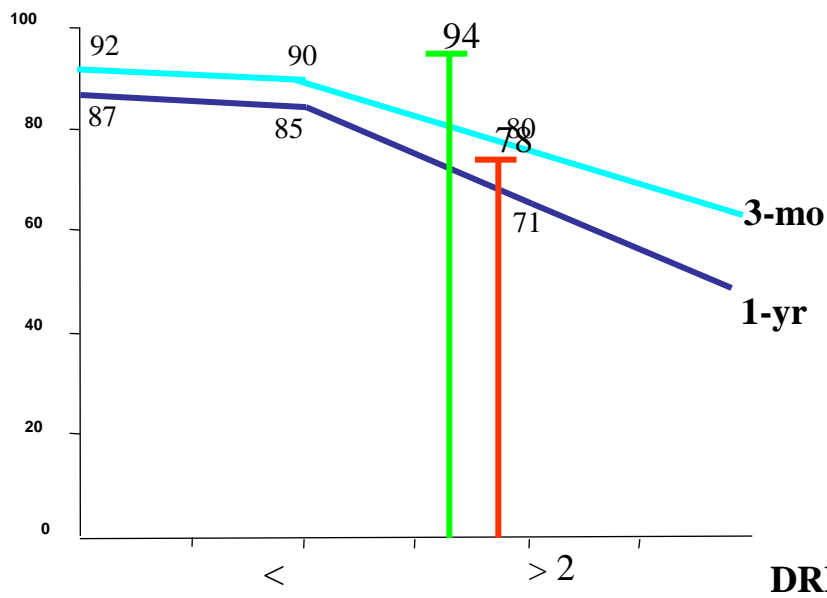
**Tabella 5:** Cause di *Early graft losses*.

PATIENTS	IPF	Cause of graft loss
1	No	IMA
2	No	IMA
3	No	Massive Trombosis
4	Yes	Sepsis
5	Yes	IPF, sepsis
6	Yes	IPF, sepsis
7	Yes	PNF, sepsis
8	Yes	IPF, sepsis
9	Yes	PNF
10	No	Sepsis

### Graft Survival (%)



### Graft Survival (%)



Feng S. Am J Transpl 2006; 6: 783-90

**Figura n. 11.** Sopravvivenza a 3 mesi (sopra) e ad 1 anno del gruppo NAC ( linea verde sx ) e del non NAC ( linea rossa dx ) rispetto alla curva di Feng che considera l'outcome del trapianto rispetto il Donor Risk Index

## DISCUSSIONE

Nell'ultimo decennio la letteratura internazionale , in particolare nella realta' americana, ha evidenziato come pur aumentando il pool di donatori multiorgano implementandoli con quelli di eta' superiore ai 50 anni, i risultati dell' outcome nel trapianto non si modificasse.

Tutto cio' sottolineando che la percentuale di PDF si stabilizzasse intorno al 36 % con donatori marginali e 10 – 20% considerando l'intero pool.

Naturalmente si e' assistito anche ad una modifica della tecnica chirurgica nell'attivita' di prelievo ( con perfusione solo aortica ), che probabilmente legata alla maggiore richiesta di organi quali pancreas e intestino e' andata via via prendendo sempre piu' piede ed ha raggiunto la sua completa standardizzazione negli ultimi 10 anni. Non ultimo le modifiche delle soluzioni di perfusione.

Attualmente, come si e' assistito nel 2008, bisogna far fronte ad un calo del pool dei donatori di circa 3% con una riduzione in particolare nella fase di consenso alla donazione; a questo si deve aggiungere l'aumento progressivo nel pool di donatori , di quelli che sottendono i criteri per definirsi marginali.

Come far fronte quindi alla necessita' di preservare gli organi cosi' definiti ed insultati da lunghi tempi di ricovero in ICU per renderli utilizzabili a scopo di trapianto ?

Per questo l'idea di incrementare le riserve di glutatione prima del prelievo infondendone il precursore NAC visto il  $T_{1/2}$  tra circa 2 e 5 ore.

Questa operazione non comporta ne problemi di approvvigionamento del farmaco , visto l'uso comune in clinica, ne probelmi di costi ( circa 8 Euro 10 fiale da 300 mg ) con un utilizzo medio di circa 2700 mg per donatore, ne problemi logistici durante la fase di prelievo, visto il tipo e il modo di somministrazione.

Pertanto questa procedura si puo' considerare molto favorevole dal punto di vista costi/beneficio per una logica di economia ospedaliera. ( ripresa funzionale dell'organo, tempi di ricovero )

Un recente lavoro sperimentale uscito a Novembre 2008 su Liver Transplantation, ha considerato il livello di glutatione nel fegato di maiale

prelevato da un non heart beating donor e autotraspiantato a 0-60-90 minuti. La sopravvivenza e' passata da 100% a 0 minuti fino a 57 % a 90 minuti e in base ad un calcolo stastico si e' raggiunto un livello soglia di glutatione sopra il quale la sopravvivenza era del 100% in tutti i tempi di ischemia.

Questa e' un'altra conferma sperimentale al nostro studio in un caso limite e che mette in evidenza l'idea di provare ad analizzare le biopsie dei fegati espantati per calcolarne il livello di glutatione tissutale.

Inoltre anche se il fegato e' l'organo maggior produttore nel nostro organismo di glutatione anche l'intestino non e' da meno in quanto hanno entrambi un metabolismo rapido ed esteso; sappiamo anche che l'infusione ev porta ad un legame con proteine circolanti che in base alla dose puo' aumentare fino al 50% in 4h prima di diminuire del 20% ogni 12h.

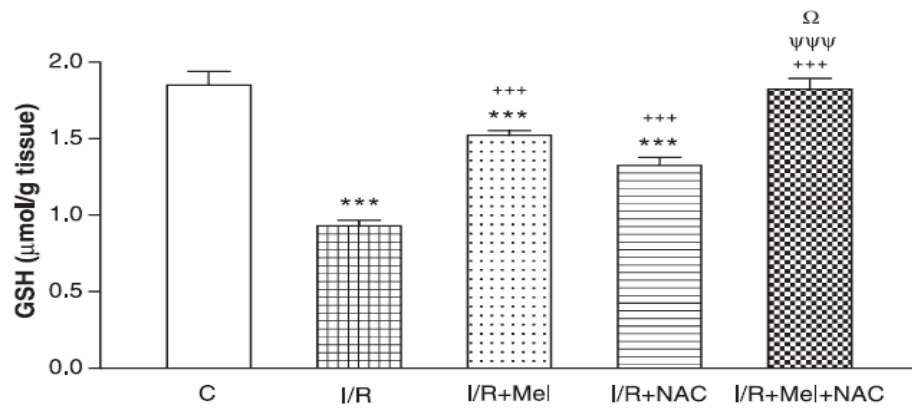
La CL renale e' appunto del 30% ma dopo somministrazione x os circa il 48% del farmaco si riscontra anche nei polmoni e circa il 20% nel pancreas.

Queste considerazioni farmacocinetiche e farmacodinamiche ci hanno fatto prendere in considerazione che anche altri organi addominali e toracici possono beneficiare di un aumento del livello del glutatione in particolare nei casi marginali, per implementare il pool dei donatori, e questo sara' il successivo studio che compiremo al compimento del nostro protocollo.

Quindi possiamo dire che questa interym analysis ha confermato sull'uomo gli studi sperimentali compiuti sugli animali fino dagli anni '70.

Alla fine di questo protocollo che dovra' essere validato esternamente per maggiore rilevanza scientifica, si potra' considerare anche la possibilita' dell'utilizzo anche di altri antiossidanti o produttori di glutatione ma non credo con lo stesso rapporto qualita' / prezzo che nell'era attuale e' diventato parte integrante delle decisioni a livello direttivo soprattutto nella realta' americana.

**Tabella** : Valutazione delle concentrazioni di GSH nella cavia; Controllo ( C ), durante la fase Ischemia/Riperfusione ( I/R ) e dopo l'aggiunta rispettivamente di NAC e Melatonina in varie combinazioni.



## **CONCLUSIONI**

Questo studio prospettico randomizzato sta mettendo in luce gli indiscutibili vantaggi della tecnica chirurgica da noi modificata associata all'utilizzo di NAC quale precursore del glutatione.

Utilizzata in modo stabile a livello mondiale permetterebbe di aumentare il pool di donatori ridefinendo i criteri di marginalita' e permettendo di ridurre in modo drastico la mortalita' in lista e i drop out nei pazienti neoplastici per mancanza dell'organo in tempi utili, a causa dell'evoluzione della malattia.

### ***Ringraziamenti:***

Questo manoscritto non e' merito di una mia intuizione, ma il frutto di un lungo e duro lavoro di squadra iniziato il 15 Novembre del 1999, giorno del mio ingresso in Clinica Chirurgica 1\* come specializzando al 1\* anno di Chirurgia Generale; rinviato di 1 anno in quanto ottemperante al Servizio Militare obbligatorio, da me tuttavia desiderato , in qualita' di Sottotenente dell'Arma Aeronautica presso il 2\* Stormo Caccia Bombardieri di Rivolto.

Vista la premessa, questa tesi la considero pertanto la risultante dell'insegnamento di una scuola che considero una grande famiglia.

L'insegnamento di un mestiere, l'arte medica e chirurgica;

dall'arte della relazione con il paziente, da vedere come uomo e non come numero di letto, al modo con cui presentarsi alla persona per farla sentire sicura di una competenza clinica e a suo agio dal punto di vista assistenziale.

Quindi ringrazio mio Zio Davide, responsabile in primis di questa mia crescita, scienziato nell'arte chirurgica e medica, oratore eccezionale e gran maestro di una scuola e di una filosofia di vita, di cui ho avuto l'onore di far parte.

Lui mi ha dato l'imprinting, facendomi vedere come la forza di volonta' puo' trasformare ogni cosa e come e' possibile con l'impegno e lo studio superare gli ostacoli che si incontrano ogni giorno.

La sua suprema conoscenza nell'arte chirurgica ha cominciato a plasmare le mie mani che erano come creta inerte ed aspettavano solo la sua guida per iniziare ad aiutare le persone bisognose del nostro aiuto.

Un grazie ad Umberto, mio mentor, che ritengo un fratello maggiore, e che pur tra alti e bassi, considerando la mia testardagine, mi ha sostenuto con affetto in questo lungo percorso; spronandomi a migliorarmi ogni giorno e non facendomi perdere la strada maestra tortuosa, per quella sbagliata in discesa. Lui mi ha dato fiducia, affidandomi ruoli essenziali nel Suo gruppo in particolare nella fase di prelievo d'organi, da cui e' scaturita questa idea, imperniata sulla tecnica chirurgica ma anche sulla fisiopatologia e sulla Clinica.

Alberto e Giacomo ( in ordine alfabetico ) o Giacomo e Alberto ( per eta' ) , grazie!

Mi piaciono cosi' come sono e li considero indivisibili , non ci sarebbe un gruppo senza di loro, insieme. Loro mi hanno insegnato i segreti della tecnica chirurgica e mi hanno trasferito tutti i loro segreti ( o quasi tutti ) per risolvere problemi chirurgici e clinici.

La loro porta e' sempre aperta per un consiglio e grazie alle loro scarpe impolverate sotto la scrivania so' che sono sempre presenti.

Patrizia e' la cometa del nostro sistema solare. Il suo affetto non sempre e' facilmente comprensibile visto il Suo modo di relazionarsi , ma per me e' stata molto importante . Mi ha aperto gli occhi al mondo Clinico e alla gestione del paziente e mi ha insegnato molto sulla gestione delle sue necessita' come essere umano ( sempre con molta calma e tranquillita' come e' Sua consuetudine ). Il Suo lavoro e' immenso considerando che e' sulle spalle di una sola persona e di Lei ho sempre avuto massima fiducia e rispetto.

Daniele e' l'ultimo arrivato dei 'grandi', ma con Lui siamo andati subito d'accordo. La Sua vita lavorativa travagliata , mi ha fatto vedere realmente che quello che conta e' la volonta', e la sua assoluta disponibilita' nel sostenermi e nel consigliarmi per il meglio nonche' le sue peripezie chirurgiche operative endoscopiche me lo hanno fatto salire su un piedistallo.

Ultimi ma primi nel mio cuore, i compagni di 1000 notti in piedi, di 1000 sofferenze , 1000 discussioni nonche' 1000 littigate legate esclusivamente al duro lavoro che ci metteva sotto pressione e che poi si risolvevano davanti ad un buon the' alla pesca al bar tra una parolaccia ed una risata.

Di questi ringrazio in particolare Alessandro, che negli anni ho imparato a conoscere. All'inizio, nel 2000 non ci consideravamo molto ed eravamo in competizione, ma successivamente le nostre esperienze comuni ci hanno unito ed ora siamo indivisibili.

Il suo stile 'arancione' mi ha affascinato e la sua calma, con le sue massime buddiste, mi hanno fatto vedere un altro aspetto della vita, ' il rispetto per il prossimo '.

Enrico e Michele, punti di riferimento nell'eleganza e lo stile del nostro gruppo, adesso che sono insieme in ufficio penso si scambieranno anche note di tecnica sull'accostamento dei colori camicia-cravatta e scarpa-calzini.

Li ho sempre invidiati per la loro bassa percentuale di prelievi rispetto ai turni di reperibilità' e ho qualche sospetto su come ci siano riusciti...ma ci siamo aiutati reciprocamente in molte situazioni e li ricordo sempre con affetto.

Amedeo, Umberto M, Marco B, Francesco C, Gianluca C, Duilio, Alberto, Monica, Paola, Pasquale, Domenico, Francesco, Marina, Michele, Riccardo B, Daniela, Cesare, Matteo B, Marco S, Teresa, Silvia, Myron, Gabriel, Manuel, Manos, Parissa, e tutti i ' ' ' piccoli ', non ci sono parole per sottolineare la vostra amicizia, perciò'

Grazie a tutti



## Bibliografia

1. D'Amico F. et al. Liver Transplantation Using Sub Optimal grafts: Impact of donor Harvesting Technique. *Liver Transpl.* 13:1444-1450,2007
2. MARTINDALE The complete drug reference 34\* edition , edited by Sean C Sweetman
3. Feng et al. Characteristics Associated with Liver Graft Failure: The Concept of Donor Risk Index. *Am. J Transpl.* 6: 783-790 2006
4. Golling et al. Reduced Glutathione in the Liver as a Potential Viability Marker in non hearth beating donors. *Liver Transpl.* 14:1637-1647,2008
5. Busuttil RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2003: 9: 651.
6. Briceno J, Marchal T, Padillo J et al. Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation* 2002: 74: 522.
7. Mirza DF, Gunson BK, Da Silva RF et al. Policies in Europe on marginal quality donor livers. *Lancet* 1994: 26:1480.
8. De Carlis L, Sansalone CV, Rondinara GF et al. Is the use of marginal donors justified in liver transplantation? Analysis of results and proposal of modern criteria. *Transpl Int* 1996: 9: 414.
9. Loinaz C, Gonzalez EM. Marginal donors in liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2000: 47: 256.
10. Rocha MB, Boin IF, Escanhoela CA et al. Can the use of marginal liver donors change recipient survival rate? *Transplant Proc* 2004: 36: 914.
11. Tisone G, Manzia TM, Zazza S et al. Marginal donors in liver transplantation. *Transplant Proc* 2004: 36: 525.
12. Gruenberger T, Steininger R, Sautner T et al. Influence of donor criteria on postoperative graft function after orthotopic liver transplantation. *Transpl Int* 1994: 7: 672.

13. Pokorny H, Gruenberger T, Soliman T et al. Organ survival after primary dysfunction of liver grafts in clinical orthotopic liver transplantation. *Transpl Int* 2000; 13: 154.
14. Rinella ME, Alonso E, Rao S et al. Body mass index as a predictor of hepatic steatosis in living liver donors. *Liver Transpl* 2001; 7: 409.
15. Schindl MJ, Redhead DN, Fearon KCH et al. The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection. *Gut* 2005; 54: 289.
16. Mor E, Klintmalm GB, Gonwa TA et al. The use of marginal donors for liver transplantation. *Transplantation* 1992; 53: 383.
17. Takeda Y, Arii S, Kaido T et al. 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; 67: 820.
18. Fukumori T, Ohkohchi N, Tsukamoto S et al. Why is fatty liver unsuitable for transplantation? Deterioration of mitochondrial ATP synthesis and sinusoidal structure during cold preservation of a liver with steatosis. *Transplant Proc* 1997; 29: 412.
19. Lemasters JJ, Peng XX, Bachmann S et al. Dual role of Kupffer cell activation and endothelial cell damage in reperfusion injury to livers stored for transplantation surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 84.
20. Adam R, Reynes M, Johann M et al. The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23: 1538.
21. D'Allessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW et al. The predictive value of donor liver biopsies for the development of PNF after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991; 51: 157.
22. Todo S, Demetris AJ, Makowka L et al. Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation* 1989; 47: 903.
23. Urena MA, Ruiz-Delgado FC, Gonzalez EM et al. Assessing risk of the use of livers with macro and microsteatosis in a liver transplant program. *Transplant Proc* 1998; 30: 3288.

24. Fishbein TM, Fiel MI, Emre S et al. Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool. *Transplantation* 1997; 64: 248.
25. Briceno J, Solorzano G, Pera C et al. A proposal for scoring marginal liver grafts. *Transpl Int* 2000; 13: 249.
26. Rossi M, De Simone P, Peritore D et al. Liver transplantation: expanding the donor pool. *Transplant Proc* 2001; 33: 1307.
27. Ploeg RJ, D\_Allessandro AM, Knechtle SJ et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation. A multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55: 807.
28. Hoofnagle JH, Lombardero M, Zetterman RK et al. Donor age and outcome of liver transplantation. *Hepatology* 1996; 24: 89.
29. Piratvisuth T, Tredger JM, Hayllar KA et al. Contribution of true cold and rewarming ischemia times to factors determining outcome after orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl Surg* 1995; 1: 296.
30. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 53:957.
31. Pokorny H, Gruenberger T, Rockenschaub S et al. Preservation of the liver: is it possible to extend the time of storage? *Transplant Proc* 1999; 31: 2074.
32. Serafin A, Fernandez-Zabalegui L, Prats N, et al. Ischemic preconditioning: tolerance to hepatic ischemia-reperfusion injury. *Histol Histopathol.* 2004 Jan;19(1):281-9.
33. Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology.* 2003 Nov;125(5):1480-91.
34. Chen T, Zamora R, Zuckerbraun B, Billiar TR. Role of nitric oxide in liver injury. *Curr Mol Med.* 2003 Sep;3(6):519-26.
35. Teoh NC, Farrel GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003 Aug;18(8):891-902.

36. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg*. 2003;20(5):383-96. Epub 2003 Jul 02.
37. Okaya T, Lentsch AB. Cytokine cascades and the hepatic inflammatory response to ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*. 2003 May-Jun;16(3):141-7.
38. Shah V, Kamath PS. Nitric oxide in liver transplantation: pathobiology and clinical implications. *Liver Transpl*. 2003 Jan;9(1):1-11.
39. Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2002 Nov;34(7):2659-61.
40. Fondevila C, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol*. 2003 Apr; 74(2):86-93.