

Davide Ghinolfi, Maria Franzini, Erion Rreka, Daniele Pezzati, Laura Caponi, Paolo De Simone, Lorella Marselli, Vanna Fierabracci, Matilde Masini, Andrea Cacciato Insilla, Maria Bindi, Gianni Biancofiore, Piero Marchetti, Vincenzo DeTata, Daniela Campani, Aldo Paolicchi, Franco Filippini e "Liver Transplant Hub Study Group"

Introduzione

L'introduzione della perfusione normotermica ex-vivo (NMP) come metodica per la conservazione d'organo nel trapianto epatico ha aperto a nuove prospettive e potenziali applicazioni. Ciononostante, la maggior parte delle esperienze al momento riportate in letteratura si sono focalizzate sul ruolo della NMP nel promuovere l'utilizzo di donatori non ritenuti idonei a priori, ma quando questa è stata confrontata con la usuale metodica di conservazione statica ipotermica (CS) i vantaggi presunti non si sono rivelati tali. Inoltre, i risultati di studi prospettici randomizzati che hanno confrontato la NMP alla CS non hanno dato risultati univoci.

Metodi e risultati

Nella fase pilota del progetto "Liver Transplant Hub" abbiamo sottoposto 3 organi prelevati secondo metodiche tradizionali (DBD, en-bloc, dual perfusion) a conservazione normotermica ex-vivo prima dell'impianto nel ricevente. Per i 3 casi è stata utilizzata la macchina LiverAssist® della OrganAssist® e una soluzione a base di emazie concentrate e soluzione colloidale.

DONATORE		RICEVENTE		TRAPIANTO	
Età	Problematica	Indicazione	MELD	CIT (min)	NMP (min)
83	Severa ipoperfusione	HCC	15		
74	-	HCV	16	226	325
33	30' arresto cardiaco	ETOH	23	285	240

Nel primo caso abbiamo valutato la capacità dell'organo di produrre fattori di coagulazione e trigliceridi (TG) durante la fase di NMP. Durante la perfusione non abbiamo rilevato alcuna produzione di fattore V (HemosIL Factor V, Werfen, Austria), nè proteina C (HemosIL Protein C, Werfen, Austria). Fibrinogeno e proteina C reattiva (entrambe proteine di fase acuta) venivano invece prodotte, mentre non lo era l'albumina, suggerendo che il fibrinogeno fosse prodotto nel contesto di una risposta di fase acuta, che include solo alcuni selezionati fattori della coagulazione e che questa sia correlata al danno da ischemia-riperfusione epatico. Relativamente alla produzione di TG, abbiamo notato che quando le analisi vengono eseguite con metodiche di laboratorio basate sulla reazione combinata di glicerolo-ossidasi e perossidasi (SGMitalia, Roma, Italia) i risultati sono in accordo alla letteratura vigente (4), ma quando questi vengono ripetuti dopo aver separato le lipoproteine dagli altri componenti del plasma per cromatografia di esclusione molecolare (figura sotto) i TG associati alle VLDL diminuiscono da un valore di 159,50 a 3,46 mg/dl, in quanto la maggior parte della reattività ai TG si rileva al peso molecolare dell'emoglobina (Hb), che sicuramente ha attività di perossidasi e il cui spettro di assorbimento si sovrappone a quello dei TG.

Time (min)	FBG (mg/dL)	CRP (mg/dL)	Alb (mg/dL)	TG (mg/dL)
60	<16.4	0.265	899	n.d.
120	21.40	0.864	834	2.39
180	26.10	1.360	922	2.71
240	34.70	1.970	824	3.26
300	42.80	2.400	918	3.46

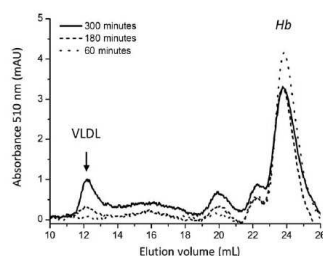


FIG. 1. The table reports the levels of FBG, CRP, VLDL-associated TG, and Alb determined during machine perfusion. FBG, CRP, and Alb concentration were determined using nephelometric assays on BNI1 analyzer (Siemens Healthcare, GmbH, Erlangen, Germany). Elution profile of TGs were obtained by gel filtration chromatography (Supersore 6 HR 10/300 GL; GE Healthcare Europe, Little Chalfonts, UK) associated with the postcolumn injection of the reagent for TG determination. TG-specific elution profile obtained after 60 minutes (dotted line), 180 minutes (dashed line), and 300 minutes (continuous line) are shown on the right. The peak eluting at 12.2 mL corresponds to TGs associated with the VLDLs. n.d.: not detectable.

Negli altri due casi abbiamo confrontato il consumo di glucosio, riscontrando livelli stabilmente elevati di glicemia del perfusato nel secondo caso, non responsivi alla somministrazione di ulteriori 500U di insulina (figura sotto), mentre il terzo mostrava livelli progressivamente decrescenti di glicemia. Analizzando i livelli di citochine nel perfusato, abbiamo evidenziato come, nonostante i livelli di IL-6 fossero simili, i livelli di citochina pro-infiammatoria IL-10 fosse molto più bassa e quello di citochina pro-infiammatoria TNF- α fosse molto più elevato nel secondo caso che nel terzo. Le colorazioni PAS per il glicogeno mostravano una equivalente e consistente diminuzione in entrambi i casi. Questi risultati preliminari sembrano suggerire che un profilo citochinico sfavorevole possa precludere un ottimale ricondizionamento energetico.

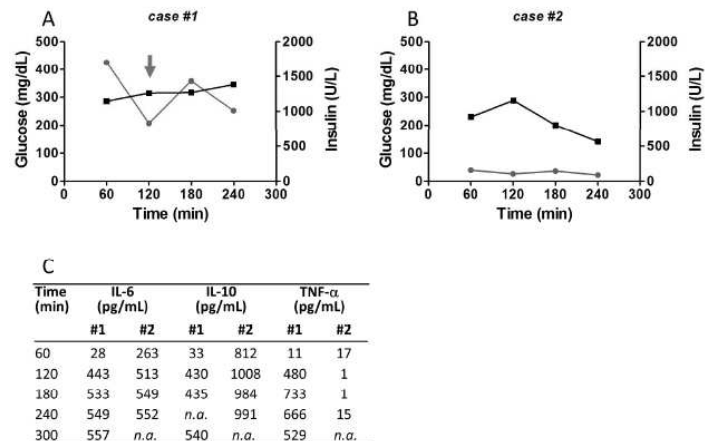


Figure 1. The graphs show the glycemia (black squares) and insulinemia (grey dots) levels in perfusate samples obtained at the indicated time points during NMP. Panel A: case #1; the grey arrow corresponds to the administration of additional fast acting insulin (500 U). Panel B: case #2. Insulinemia was measured by immunoradiometric assay using the Insulin(e) IRMA kit (Beckman Coulter, Brea, CA). In the table (C), the perfusate levels of IL-6, IL-10 and TNF- α during NMP are reported. Cytokines concentrations were determined by specific ELISA assays (IL-10 and IL-6: eBiosciences; TNF- α : R&D System). n.a.: data not available.

Conclusioni

Nonostante la perfusione normotermica d'organo ex-vivo sia sempre più utilizzata nella pratica clinica, le corrette metodiche per la valutazione della funzione d'organo e i meccanismi che permettono il controllo della risposta infiammatoria e l'ottimizzazione del metabolismo epatico durante la fase di perfusione ex-vivo devono essere approfonditi.

Un efficace ricondizionamento del graft dovrebbe promuovere un efficiente metabolismo cellulare, ma al momento non esistono strategie cliniche che agiscano nell'ottimizzare il micro-ambiente infiammatorio e le conseguenti risposte metaboliche. Il controllo della risposta citochinica potrebbe costituire un presidio fondamentale per lo sviluppo di questa tecnologia.

Bibliografia

- Ghinolfi D, Caponi L, Marselli L, et al. Considerations about the importance of cytokines expression for optimizing liver graft metabolism during normothermic machine perfusion. *Liver Transpl.* 2016 Nov 24
- Franzini M, Ghinolfi D, Pezzati D, et al. Development of a normothermic extracorporeal liver perfusion system toward improving viability and function of human extended criteria donor livers. *Liver Transpl.* 2016 Nov;22(11):1615-1616
- Goldaracena N, Echeverri J, Spetzler VN, et al. Anti-inflammatory signaling during ex vivo liver perfusion improves the preservation of pig liver grafts before transplantation. *Liver Transpl.* 2016 Nov;22(11):1573-1583
- Banan B, Watson R, Xu M, et al. Development of a normothermic extracorporeal liver perfusion system toward improving viability and function of human extended criteria donor livers. *Liver Transpl.* 2016 Jul;22(7):979-93