

SOCIETÀ ITALIANA
DI RICERCHE
IN CHIRURGIA

SOCIETÀ ITALIANA
DI FISIOPATOLOGIA
CHIRURGICA

COMUNICAZIONI

TOMO I

A CURA DI

D. MARRANO
O. CAMPIONE

Comunicazioni presentate al Congresso Congiunto

XV Congresso Nazionale SIRC
V Congresso Nazionale SIFIPAC

Bologna, 13-15 maggio 1990

MONDUZZI EDITORE

Studio sperimentale sul prelievo di reni da donatore con arresto cardiocircolatorio

P. RIGOTTI, E. MORPURGO, M. FERRARESSO,
M.G. COMANDELLA, M. CAPALBO,
G. PITTONI *, M.L. VALENTE **, A. BINDOLI ***,
M.P. RIGOBELLO *** e E. ANCONA

Istituto di Semeiotica Chirurgica, Padova

* *Istituto di Anestesia e Rianimazione, Padova*

** *Istituto di Anatomia Patologica, Padova*

*** *Dipartimento di Chimica Biologica, Padova*

SOMMARIO

In questo studio sperimentale sul maiale e' stata valutata la funzionalita', il danno istologico e biochimico di trapiantati di reni prelevati dopo vari tempi di ischemia calda da donatori con arresto cardiocircolatorio (DCAC). I risultati ottenuti hanno evidenziato come trapianti effettuati con reni prelevati dopo anche 120 minuti di ischemia calda abbiano avuto una ripresa funzionale e come i livelli di glutazione dei campioni di rene ischemici siano diminuiti con l' aumentare del tempo di ischemia calda (TIC).

INTRODUZIONE

Attualmente il fattore che maggiormente limita l' attivita' di trapianto renale e' la scarsita' delle donazioni. Per il prelievo di organi da donatore cadavere vengono utilizzati i soggetti con morte cerebrale e attivita' cardiocircolatoria conservata; in tal modo viene ridotto al massimo il periodo di ischemia calda degli organi all' atto del prelievo. L' immediata ripresa funzionale dopo il trapianto e' fondamentale per il cuore ed il fegato mentre non lo e' per il trapianto di rene. Pertanto e' stato da alcuni prospettato anche l' impiego di reni prelevati da DCAC. Nonostante vi siano gia' alcuni dati sperimentali (1-4) e clinici (5,6), permangono dubbi sulla reale

XV Congresso
della Societa' Italiana
di Ricerche in Chirurgia

V Congresso
della Societa' Italiana
di Fisiopatologia
Chirurgica

Congresso Congiunto

Bologna
13-15 maggio 1990

XV Congresso
della Società Italiana
di Ricerche in Chirurgia

V Congresso
della Società Italiana
di Fisiopatologia
Chirurgica

Congresso Congiunto

Bologna
13-15 maggio 1990



applicabilità di tale metodico e soprattutto non è noto il TIC massimo compatibile con la ripresa funzionale dopo il trapianto.

In questo lavoro sperimentale sono stati valutati la ripresa funzionale, le modificazioni istologiche e alcuni parametri biochimici di danno ossidativo (malondialdeide e glutatione) di trapianti di reni prelevati dopo TIC crescenti.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 8 coppie di maiali fratelli (ibridi Large-White Landrace) di circa 30 kg l'uno. Gli animali sono stati anestetizzati con Pentothal sodico 8 mg/kg, seguito da atropina 0,02 mg/kg e l'anestesia è stata mantenuta, previa intubazione endotracheale, con miscela di O₂ e NO₂ in rapporto 3:6 e Forane in percentuale variabile tra 1 e 1,5%. Nei donatori si è proceduto quindi ad un'incisione inguinale bilaterale con isolamento dei vasi femorali. Dopo somministrazione di 15000 U di Eparina è stata incannulata l'arteria femorale destra, mentre la controlaterale è stata utilizzata per monitorare la pressione arteriosa e di perfusione. L'arresto cardiocircolatorio è stato indotto mediante clampaggio del tubo orotracheale e dissanguamento dall'arteria femorale destra. Il conteggio del TIC è stato iniziato da quando la pressione arteriosa era scesa al di sotto di 10 mm Hg. Al termine del TIC programmato, si è proceduto ad una rapida laparotomia ed al clampaggio dell'aorta a livello dello jato diaframmatico. La perfusione in situ è stata iniziata dopo TIC rispettivamente di 0, 2, 15, 45, 60, 90, e 120 minuti attraverso la cannula in arteria femorale destra con 3000 ml di Eurocollins a 4°C mantenendo la pressione di perfusione attorno a 70 mm Hg. I reni sono stati quindi prelevati in blocco e preparati al banco. Il rene sinistro è stato trapiantato nel ricevente in sede extraperitoneale anastomizzando i vasi renali all'aorta e alla cava in terminolaterale ed eseguendo una pielouretero anastomosi con l'uretere del ricevente. Gli animali sono stati immuno-soppressi con ciclosporina 5 mg/kg die e metilprednisolone 40 mg die. È stata effettuata una profilassi anti-trombotica con defibrotide 32 mg/kg/h per 6 h durante l'intervento e 400 mg x 2 nelle giornate successive. Sul rene contro-laterale del donatore sono state effettuate indagini istologiche e sono stati dosati la malondialdeide con il metodo di Yagi modificato ed il glutatione totale secondo il metodo di Lietze.

La nefrectomia bilaterale è stata effettuata in 7ª giornata post-trapianto, per dar tempo sufficiente al recupero funzionale del rene trapiantato.

La funzionalità del trapianto è stata valutata mediante dosaggi quotidiani della creatininemia e della azotemia fino al sacrificio dell'animale in 14ª giornata post-trapianto. Studi istologici sono stati anche effettuati su biopsie in 7ª giornata post-operatoria e al momento dell'autopsia.

RISULTATI

Tutti i reni hanno avuto una ripresa funzionale dopo il trapianto. La diuresi era presente

in tutti gli animali dopo la nefrectomia bilaterale. La creatininemia e l'azotemia hanno evidenziato un iniziale innalzamento cui è seguito un lento ritorno verso la norma iniziato verso la terza giornata dopo la nefrectomia. Al momento del sacrificio i valori erano discesi anche nel maiale che ha ricevuto un rene prelevato dopo 90 minuti di TIC (130 $\mu\text{mol/l}$ e 9.3 mmol/l rispettivamente). Dopo 120 minuti di TIC l'abbassamento dell'azotemia e della creatininemia è risultato più lento ed al sacrificio i valori erano ancora elevati (415 $\mu\text{mol/l}$ e 27.9 mmol/l). Le indagini istologiche hanno evidenziato in tutti gli animali un rigonfiamento epiteliale delle cellule dei tubuli renali prossimali, con vacuolizzazioni evidenziabili dopo TIC a partire da 15 minuti e sfaldamento endoluminale a partire da 30 minuti di TIC. Tale sfaldamento è risultato particolarmente importante nel rene trapiantato dopo 60 minuti di TIC che peraltro non ha avuto una buona ripresa funzionale dopo la nefrectomia. Le osservazioni microscopiche hanno inoltre evidenziato come il danno tubulare fosse già riparato in 6ª giornata post-trapianto nei reni prelevati dopo TIC inferiore a 45 minuti mentre il rigonfiamento epiteliale persisteva negli organi ottenuti dopo TIC maggiori. Una lieve alterazione tubulare è risultata ancora evidente in 14ª giornata post-trapianto nei reni ottenuti dopo TIC di 90 e 120 minuti.

Tra gli indici di danno ossidativo, la malondialdeide, uno dei prodotti terminali della perossidazione lipidica di membrana, pur essendo risultata sempre lievemente più elevata nei campioni ischemici rispetto ai controlli, non ha dimostrato incrementi significativi con l'aumentare del TIC. Ciò indica che un innalzamento significativo di tale parametro non si verifica in reni con danno ischemico ancora reversibile. Green e Coll.(7) hanno evidenziato come nei reni di coniglio un innalzamento dei livelli di malondialdeide si verificò solo dopo 2 ore di ischemia calda. Il glutatione totale (coenzima della glutatione reduttasi) ha dimostrato una riduzione con l'aumentare del TIC rispetto ai reni di controllo. Tale calo si è verificato già dopo tempi brevi di ischemia calda, raggiungendo un plateau dopo un TIC di 30 minuti (Fig 1). Il rene prelevato dopo TIC di 60 minuti, che ha avuto la ripresa funzionale peggiore e quello che ha evidenziato livelli minori di glutatione totale (60% rispetto ai controlli). Correlando i dati biochimici con le alterazioni istologiche è apparso come la diminuzione di questo tripeptide si sia verificata parallelamente al rigonfiamento delle cellule tubulari che è risultato evidente già dopo tempi brevi di ischemia calda. Il glutatione sembra quindi essere un indice di danno ischemico molto precoce comparso ancor prima della desquamazione endoluminale delle cellule tubulari. Inoltre nei campioni ischemici il rapporto glutatione ridotto / glutatione totale è risultato minore rispetto ai reni di controllo evidenziando una tendenza all'ossidazione che si verifica durante il periodo ischemico. La riduzione del patrimonio di glutatione, e di conseguenza della glutatione reduttasi, rende la cellula più sensibile all'insulto ossidativo che si verificherebbe alla rivascolarizzazione dell'organo (8). L'azione protettiva del glutatione sul danno da ischemia è nota

XV Congresso
della Società Italiana
di Ricerche in Chirurgia

V Congresso
della Società Italiana
di Fisiopatologia
Chirurgica

Congresso Congiunto

Bologna
13-15 maggio 1990

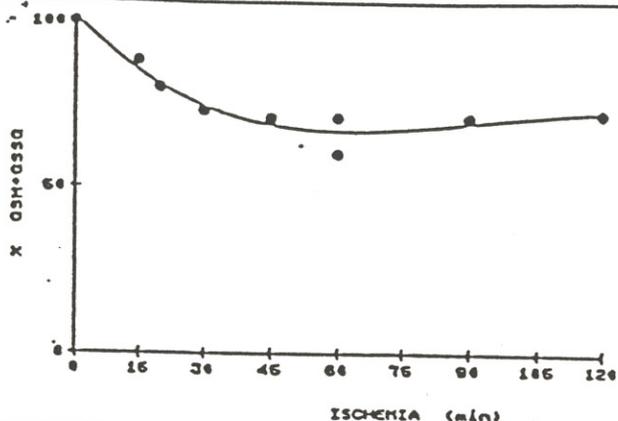


Fig.1: Percentuale rispetto ai controlli di glutatione nei reni dopo TIC crescente

da tempo e segnalata da numerosi autori (9). Il glutatione cellulare potrebbe diminuire in corso di ischemia innanzitutto per il fatto che il mancato apporto glucidico porta ad una diminuzione della attivita' della glucosio-6-fosfato-deidrogenasi che determina un calo dell' NADPH con mancato ripristino del glutatione ridotto ed aumento percentuale della quota di glutatione ossidato che fuoriesce facilmente dalle cellule danneggiate dall' ischemia. La fuoriuscita del glutatione durante l' ischemia e' stata descritta da Ishikawa nel cuore, Sies e Bartoli nel fegato (10,11,12).

CONCLUSIONI

Da i risultati ottenuti risulta come nel maiale vi sia una ripresa funzionale dei reni trapiantati prelevati anche dopo un TIC di 120 minuti. Le indagini istologiche hanno evidenziato come il danno microscopico sia reversibile anche dopo tempi lunghi di ischemia calda non essendo evidenziabile una discontinuazione della membrana basale dei tubuli. Da questi dati emerge la possibilita' di poter prospettare anche in campo clinico l' utilizzo per il trapianto renale dei DCAC.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ANAISE D. et all.: An approach to organ salvage from non-heart beating cadaver donors under existing legal and ethical requirements for transplantation. *Transplantation*, 49: 290-294, 1990.
- 2) ANAISE D. et all: A new perfusion tube for multiple organ procurement. *Transplant. Proc.*, 19: 4129-4136, 1987.
- 3) GARCIA-RINALDI R. et all. : In situ preservation of cadaver kidneys for transplantation: laboratory observation and clinical application. *Ann. Surg.*, 182: 576-584, 1975.

- 4) SCHWEIZER R.T. et all: In situ cadaver kidney perfusion:experimental and clinical studies. Transplantation, 32; 482-484, 1981.
- 5) RUERS T.J.M. et all. : Nonheart-beating donors: a successful contribution to organ procurement. Transplant Proc., 18: 408-410, 1986.
- 6) VROEMEN M.A.M. et all.: Short-and long-term results with adult non-heart-beating donor kidney. Transplant. Proc., 20: 743-745, 1988.
- 7) GREEN C.G.et all.: Allopurinol inhibits lipid peroxidation in warm ischemic and reperfused rabbit kidneys. Free Rad Res Comms, 6:329-337, 1989.
- 8) HAGEN T.M.et all: Glutathione uptake and protection against oxidative injury in isolated kidney cells. Kidney Int., 34: 74-81, 1988.
- 9) PALLER M.S. et all: Hypotiroidism protects against free radical damage in ischemic acute renal failure. Kidney Int., 29: 1162-1166, 1986.
- 10) SIES H. et all.: Hepatic thiol and glutathione effluxa under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. Biochem. J., 226, 545-549, 1985.
- 12) BARTOLI G.W. et all.: Reduced and oxidized glutathione efflux from liver. Febs letter, 86: 89-91, 1978.
- 13) ISHIKAWA T. et all.: Cardiac transport of glutathione disulfide and S-coniugate J. Biol. Chem., 259: 3838-3843, 1984.

XV Congresso
della Società Italiana
di Ricerche in Chirurgia

V Congresso
della Società Italiana
di Fisiopatologia
Chirurgica

Congresso Congiunto

Bologna
13-15 maggio 1990