

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Pediatria

Scuola di Dottorato in Medicina dello Sviluppo e Scienze della Programmazione

Indirizzo: Malattie rare; genetica, biologia e biochimica

Ciclo XXIV

***Near-Infrared Spectroscopy e monitoraggio continuo
real-time della perfusione renale post-trapianto***

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Perilongo

Supervisore: Dott.ssa Luisa Murer

Dottorando: Enrico Vidal

INDICE

	Pag
RIASSUNTO	1
SUMMARY	3
LISTA ABBREVIAZIONI	5
1. INTRODUZIONE	6
1.1 Gli indicatori biochimici di perfusione renale: la lipocalina associata alla gelatinasi dei neutrofilo (NGAL)	7
1.2 Gli indicatori strumentali di perfusione renale: il ruolo dell'ecografia	10
1.3 L'applicazione biomedica della <i>near-infrared spectroscopy</i>	14
2. SCOPO DELLO STUDIO	19
3. MATERIALI E METODI	20
3.1 Protocollo di studio	20
3.2 Raccolta ed analisi dei dati	23
4. RISULTATI	24
4.1 Descrizione del campione ed analisi del <i>trend</i> di rSO ₂	24
4.2 Correlazione rSO ₂ -creatinina e rSO ₂ -diuresi	27
4.3 Correlazione rSO ₂ -NGAL urinario	29
5. DISCUSSIONE	32
6. CONCLUSIONI	38
Bibliografia	40

RIASSUNTO

Introduzione. La *near-infrared spectroscopy* è una tecnica non invasiva che misura in modo continuo la saturazione regionale (rSO₂) analizzando lo stato di ossigenazione dei cromofori (emoglobina e citocromo ossidasi). Il suo utilizzo è stato validato nel monitoraggio della perfusione cerebrale specie nei bambini sottoposti a interventi cardiocirurgici, mentre sono scarse le applicazioni nella valutazione della perfusione degli organi splanchnici.

Scopo dello studio. Lo scopo di questo studio prospettico è stato di valutare il ruolo della NIRS nel monitoraggio della perfusione del rene trapiantato nelle prime 72 ore dal trapianto stesso, una fase critica in cui la precoce identificazione di complicanze vascolari può consentire l'attuazione di un tempestivo intervento medico e/o chirurgico.

Materiali e metodi. Sono stati inclusi tutti i pazienti pediatrici sottoposti a trapianto renale da donatore vivente o non-vivente nel periodo compreso tra aprile 2010 ed agosto 2011, cui il sensore NIRS è stato applicato già in sala operatoria in corrispondenza della proiezione cutanea del rene trapiantato. Sono stati analizzati i *trend* di rSO₂ e la loro correlazione con *markers* di perfusione/ossigenazione renale:

- clinici: diuresi oraria;
- biochimici: creatininemia ed *urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (U-NGAL);
- strumentali: ecografia color e *power* Doppler per la valutazione della perfusione renale globale e Doppler pulsato per il calcolo degli indici resistivi intraparenchimali.

I parametri clinici e biochimici sono stati analizzati ogni 12 ore, mentre i rilievi strumentali sono stati eseguiti ogni 24 ore per 3 giorni consecutivi.

Risultati. Nello studio sono stati inclusi 24 pazienti, 6 sottoposti a trapianto da vivente e 18 da donatore non-vivente. Al momento del trapianto, la mediana dell'età era di 12.5 anni (*range* 1.0-17.8) e la mediana del peso era di 37 kg (*range* 9.5-72). L'immunosoppressione è stata indotta con steroidi e basiliximab, e proseguita nel mantenimento con steroidi, tacrolimus e micofenolato mofetile. Quattro pazienti hanno mostrato una ritardata ripresa di funzione dell'organo trapiantato. In tutti i pazienti, l'ecografia renale eseguita quotidianamente ha mostrato vascolarizzazione ed

indici di resistività normali (valore mediano: 0.63). La rSO₂ basale media è risultata di 69.84±11.95%, significativamente più bassa rispetto al valore rilevato al termine del periodo di monitoraggio (82.92±8.17%; p<0.0001). Nonostante i diversi tempi di ischemia fredda, non sono emerse rilevanti differenze tra i *pattern* di ossigenazione documentati dalla NIRS nei trapianti da donatore vivente e non-vivente. Durante le 72 ore di monitoraggio, l'andamento della rSO₂ ha mostrato una correlazione significativa con creatininemia (r=-0.58; p<0.05) e *clearance* della creatinina (r=0.54; p <0.05), mentre non è stata dimostrato un'associazione con la diuresi. Nei 4 pazienti con ritardata ripresa di funzione dell'organo trapiantato, la NIRS ha consentito di dimostrare un *trend* in aumento della rSO₂ indipendentemente da mancata ripresa della diuresi e mancato calo della creatininemia. In tutti i casi, l'U-NGAL ha mostrato un *trend* in riduzione dal valore basale, correlando in modo significativo con la rSO₂ sia nei trapianti da donatore non-vivente (r=-0.96; p<0.05) che in quelli da donatore vivente (r=-0.89; p<0.05).

Conclusioni. I nostri risultati indicano che la NIRS rappresenta un metodo adeguato ed affidabile di monitoraggio continuo della perfusione renale nelle prime ore post-trapianto d'organo, quando è fondamentale assicurare al *graft* un apporto ematico regolare e soddisfacente.

SUMMARY

Introduction. Near-infrared spectroscopy (NIRS) is a non-invasive technique designed to study regional oxygenation (rSO₂) by measuring absorption of chromophores (hemoglobin, cytochrome c oxidase). It has been validated for cerebral perfusion monitoring in neonates but few data exist on splanchnic perfusion evaluation. The assessment of adequate organ perfusion both in children and in adults is commonly based on clinical parameters, as well as invasive measures requiring central venous and/or arterial catheter access. Additionally, most of these data are acquired intermittently, and thus may only represent a delayed picture of oxygen delivery and consumption.

Aim of the study. The purpose of our study was to investigate the role of NIRS in real-time monitoring for kidney graft perfusion in the first 72 hrs post-transplantation, a vulnerable phase when a significant risk of ischemic insult exists.

Materials and Methods. Consecutive children undergoing living related or deceased donor kidney transplantation were prospectively enrolled between April 2010 and August 2011. NIRS probe was applied in operatory room upon surgical suture. Renal rSO₂ values have been continuously registered for 3 days and were correlated with the following markers of perfusion:

- hourly urine output;
- serum creatinine and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (U-NGAL), both collected every 12 hrs;
- daily color flow and power Doppler ultrasound to assess global renal perfusion and intra-renal resistive index.

Results. Twenty-four children were included, 6 underwent living related kidney transplantation and 18 deceased donor kidney transplantation. Median age was 12.5 yrs (range 1.0-17.8) and median weight was 37 kg (range 9.5-72). Immunosuppression was induced with basiliximab; thereafter, the immunosuppressive regimen consisted of prednisone with tacrolimus and mycophenolate mofetil. Four patients experienced delayed graft function. Power and color Doppler US showed normal vascularisation patterns and normal intra-renal resistive indexes (median value 0.63) in all children.

Mean basal renal rSO₂ value was 69.84±11.95%, significantly lower than the end-of-period result (82.92±8.17%; p<0.0001). The oxygenation pattern revealed by NIRS was similar both in living related or deceased donor kidney transplants, in spite of different ischemia times. During the whole post-transplant NIRS monitoring, renal rSO₂ values showed a significant correlation with both serum creatinine (r=-0.58; p<0.05) and creatinine clearance (r=0.54; p<0.05). It has not shown an association between rSO₂ and diuresis. An increase in renal oxygenation was found also in the patients who experienced a delayed graft function. U-NGAL exhibited a trend of decrease from baseline and a significant negative correlation with rSO₂ occurred both in deceased donor (r=-0.96; p<0.05) and living related (r=-0.89; p<0.05) kidney transplantations.

Conclusions. Our results suggest that NIRS monitoring could become a useful non-invasive tool for a real-time evaluation of kidney graft perfusion during the first hours after transplantation, a tricky phase when an ischemic insult could benefit from prompt medical or surgical treatment.

LISTA ABBREVIAZIONI

NIRS – *Near-Infrared Spectroscopy*

rSO₂ – Saturazione regionale di ossigeno

NGAL – *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*

U-NGAL – *Urinary NGAL*

AKI – *Acute Kidney Injury*, danno renale acuto

IR – Indice resistivo intraparenchimale

LRD – *Living Related Donor*, donatore vivente

CAD – *Cadaveric Donor*, donatore non-vivente

DGF – *Delayed Graft Function*, ritardata ripresa di funzione dell'organo trapiantato

1. Introduzione

Assicurare un'adeguata perfusione ematica al rene trapiantato rappresenta la fase più critica dell'immediato post-trapianto, per cui sono fondamentali un'attenta gestione dell'emodinamica, un monitoraggio regolare degli indici di funzionalità e l'utilizzo costante di esami strumentali specifici. Questo principio è particolarmente valido in ambito pediatrico, in cui il ridotto calibro dei vasi sanguigni arteriosi e venosi di donatore e ricevente aumenta le difficoltà tecniche di anastomosi vascolare e, di conseguenza, il rischio di mancata ripresa funzionale del *graft* da lesioni vascolari acute (trombosi). L'insorgenza di questa temibile complicanza è gravata da un elevato rischio di *primary graft failure* e la tempestività diagnostica è fondamentale potendo consentire l'immediato inizio di uno specifico trattamento medico e/o chirurgico e determinare la sopravvivenza dell'organo.

Ad oggi, il monitoraggio della perfusione renale nell'immediato post-trapianto è realizzato attraverso la valutazione di:

- indicatori clinici: diuresi;
- indicatori biochimici: creatinina ematica, *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL) urinaria e/o sierica;
- indicatori strumentali: eco-color Doppler, Doppler pulsato e *power* Doppler.

1.1 Gli indicatori biochimici di perfusione renale: la lipocalina associata alla gelatinasi dei neutrofili (NGAL)

Gli indicatori clinici e biochimici di perfusione renale nell'immediato post-trapianto sono caratterizzati da un elevato valore predittivo positivo, mentre il loro valore predittivo negativo è molto basso. Infatti, mentre una poliuria post-trapianto e la conseguente rapida discesa della creatinina presagiscono una normale perfusione del *graft*, una mancata ripresa della diuresi e/o un inefficace calo della creatinina non riflettono necessariamente un problema di vascolarizzazione renale, potendo riscontrarsi frequentemente anche come conseguenza di lesioni tubulari di natura ischemica o tossica.

A tutt'oggi la creatinina plasmatica resta comunque il principale *marker* per il monitoraggio della funzionalità renale. Il valore di tale indicatore biochimico è però condizionato da numerosi fattori extrarenali (età, sesso, massa e metabolismo muscolare, farmaci, stato di idratazione e nutrizione, secrezione tubulare) ed è tardivo rispetto all'epoca di insorgenza del danno renale; per tale motivo sono sempre più numerosi gli studi volti ad individuare nuovi indici di danno renale precoce (AKI – *Acute Kidney Injury*), tra i quali emerge la lipocalina associata alla gelatinasi neutrofila o NGAL (Figura 1) [1-4].

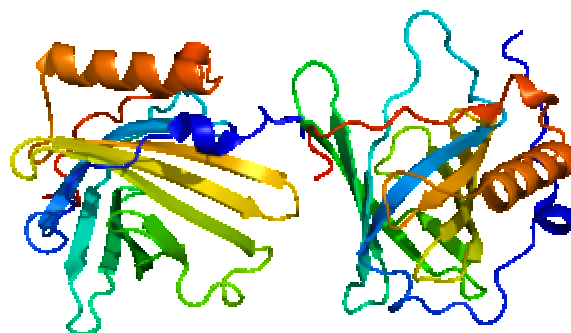


Figura 1. Struttura secondaria della proteina NGAL.

La NGAL, nota anche come Lipocalina 2 (*lcn2*) o Siderocalina, è una proteina di 178 aminoacidi e 25 kD espressa dai neutrofilari (contenuta nei cosiddetti granuli terziari) e da diverse cellule epiteliali. A livello renale, si è inizialmente ritenuto che la produzione di NGAL derivasse dalle cellule del tubulo prossimale [5,6]. Studi successivi hanno invece chiarito come le principali sedi renali per la sintesi di questa proteina sono in realtà rappresentate dal tratto sottile del ramo ascendente dell'ansa di Henle e dai dotti collettori [7] e la presenza di NGAL a livello del lume tubulare prossimale, a seguito di un insulto renale di varia natura deriva invece dalla filtrazione glomerulare della lipocalina sintetizzata in altri organi. Devarajan et al. [8,9] hanno studiato modelli animali di insufficienza renale acuta al fine di comprendere i meccanismi molecolari del danno renale ed individuare *biomarkers* utili nel contesto clinico. Un'elevata espressione del mRNA di NGAL è stata dimostrata a distanza di poche ore da un insulto renale acuto, come ad esempio il danno da ischemia-riperfusion e l'esposizione a dosi elevate di cisplatino. A seguito di tali eventi, l'induzione di NGAL precede l'aumento dei classici *markers* di danno renale, quali creatinina sierica, N-Acetil glucosaminidasi urinaria (NAG) e β 2-microglobulina urinaria. Il significato della precoce espressione di NGAL da parte delle cellule tubulari è da attribuire all'azione protettiva esercitata da questa proteina nei confronti dello stress ossidativo, nonché alla capacità di attivazione di sistemi di riparo/rigenerazione epiteliale [10], ed è strettamente connesso alla possibilità di indurre vie di attivazione intracellulari ferro-dipendenti. La principale funzione biologica di NGAL è, infatti, quella di chelare i complessi siderofori e di trasportare il ferro all'interno della cellula, aumentandone i livelli intracitoplasmatici che mediano il danno ossidativo [11].

L'espressione del gene NGAL è stata dimostrata in vari tessuti umani (polmone, trachea, ghiandole salivari, prostata, utero, stomaco, colon, rene) [12] ed in caso di infiammazione o danno epiteliale la sua concentrazione aumenta in maniera significativa sia nel sangue che nelle urine [13]. L'immediata trasposizione "*from bench to the bedside*" delle osservazioni sperimentali ha permesso di scoprire che NGAL può rappresentare un formidabile strumento per la diagnosi di AKI in condizioni ad alto rischio, come somministrazione di mezzi di contrasto iodato, dopo trapianto renale [14], in corso di shock, e dopo interventi di cardiocirurgia con l'impiego di *bypass*

cardio-polmonare [15]. L'aumento dei livelli sierici e/o urinari di NGAL (valore *cutoff* > 150 ng/ml), individuabile già a due ore dall'insulto solo nei pazienti che svilupperanno AKI, colma i principali limiti conosciuti di sensibilità della creatinina sierica.

1.2 Gli indicatori strumentali di perfusione renale: il ruolo dell'ecografia

Nel monitoraggio strumentale della perfusione del rene trapiantato, la tecnica ecografica mediante valutazione della distribuzione del segnale vascolare (color e *power* Doppler) e calcolo degli indici resistivi intraparenchimali (Doppler pulsato) rappresenta a tutt'oggi uno strumento di *follow-up* essenziale [16-18]. Grazie all'alloggiamento superficiale, in fossa iliaca, al di sotto di muscoli larghi dell'addome, il rene trapiantato ben si presta all'indagine ecografica.

Il color Doppler consente l'analisi dello *shift* delle frequenze riflesse dal flusso ematico in movimento e fornisce una descrizione globale della vascolarizzazione in una zona (Figura 2); è solitamente usato come indagine preliminare per la successiva analisi dettagliata con il Doppler pulsato in una regione potenzialmente critica.

Il *power* Doppler mostra l'ampiezza o potenza del segnale Doppler, invece dello *shift* di frequenza: ciò consente una migliore visualizzazione dei vasi piccoli, a scapito però di informazioni direzionali e di velocità (Figura 3).

Il Doppler pulsato consente di rilevare con precisione il tracciato velocitometrico dei vasi renali, dall'arteria principale fino alle interlobulari, e permette di misurare l'indice di resistenza (IR) all'interno di questi vasi. L'IR rivela il grado di impedenza dei tessuti a valle dei vasi esaminati ed è un rapporto tra il *surplus* di velocità in sistole e la velocità telediastolica. La formula matematica che esprime l'IR è data da $(S-D)/S$, dove S è la velocità telesistolica e D la velocità telediastolica. L'IR, essendo un rapporto tra velocità misurate con il medesimo angolo di incidenza del fascio di ultrasuoni sul vaso esaminato, risulta angolo indipendente e quindi fornisce con precisione il grado di resistenza al flusso offerto dai tessuti e le sue modificazioni al variare delle condizioni del rene. Gli IR devono essere studiati già in condizioni basali, cioè nelle prime 24 ore post-trapianto, per poterne valutare le modificazioni: nel rene trapiantato sono ritenuti normali fino a 0.78. Il valore degli IR decresce al diminuire del calibro del vaso esaminato ed all'approssimarsi del parenchima, essendo più elevato nell'arteria renale principale, con valori invece più bassi a livello delle arterie interlobulari. Nel caso drammatico di trombosi acuta dell'arteria renale, l'eco-color o *power* Doppler sono dotati di elevata accuratezza, in quanto consentono in tempi brevi di valutare la

vascolarizzazione del rene colpito, che invece non presenta una significativa alterazione ecostrutturale all'analisi in B-mode. In caso di occlusione del ramo principale, l'analisi eco-Doppler documenta un'assenza di flusso nel rene (Figura 4), mentre in caso di occlusione segmentale mostrerà un'area cuneiforme avascolare con relativa ipoecogenicità, che si rende evidente dopo 8-24 ore (Figura 5). Più impegnativa è invece la diagnostica ecografica della trombosi venosa, che si manifesta in modo più subdolo. Nelle prime ore dopo la cessazione del flusso all'interno delle vene, la vascolarizzazione del rene permane, ma all'interno dei vasi arteriosi il Doppler pulsato potrà rivelare un tracciato velocitometrico con un'importante onda di reflusso. Tra le indagini di I livello attualmente a disposizione, l'ecografia riveste un ruolo centrale nel monitoraggio post-trapianto di rene; purtroppo però questa metodica non è una tecnica continua e consente una valutazione quotidiana ma solo puntiforme della perfusione renale.

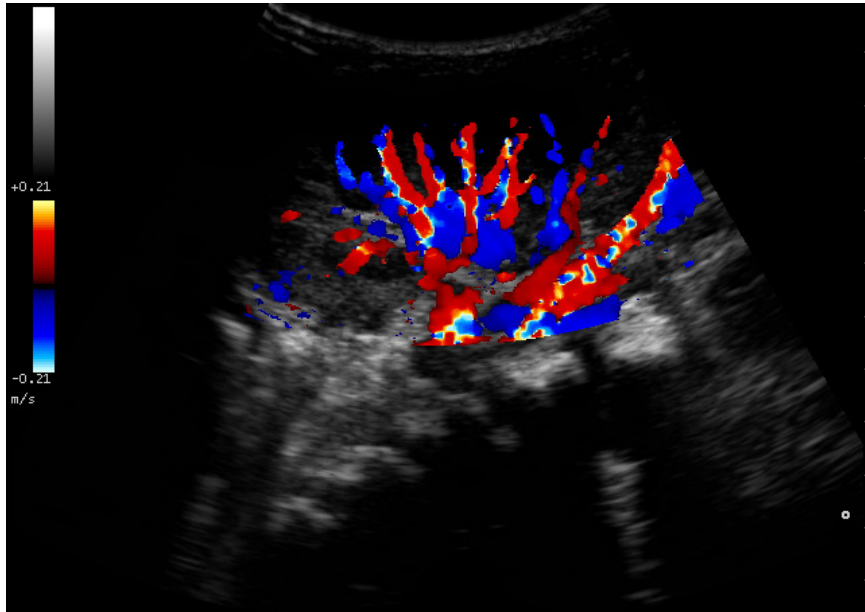


Figura 2. Immagine ecografica color Doppler di rene trapiantato (casistica personale).



Figura 3. Immagine ecografica *power* Doppler di rene trapiantato (casistica personale).

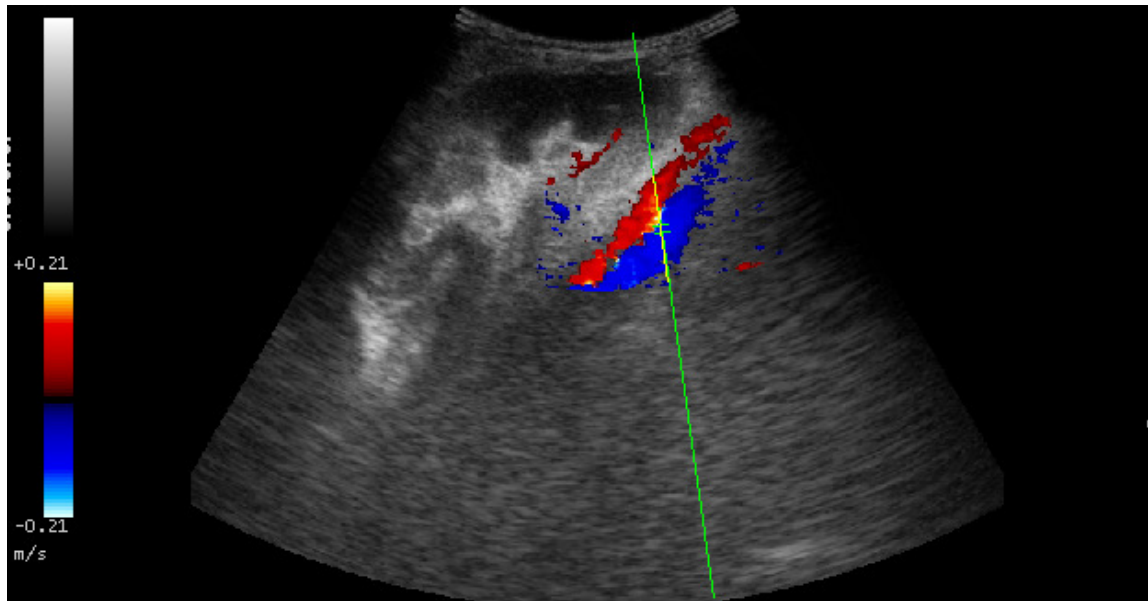


Figura 4. Assenza di flusso ematico campionabile in caso di occlusione completa dell'arteria renale (casistica personale).

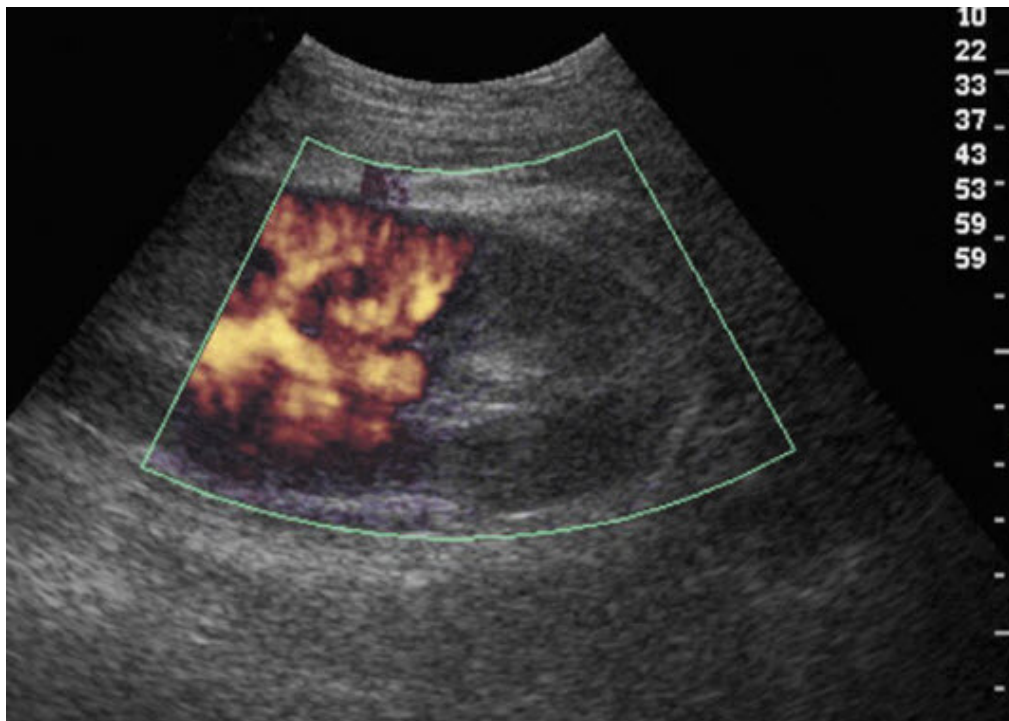


Figura 5. Evidenza *power* Doppler di infarto renale polare inferiore (casistica personale).

1.3 L'applicazione biomedica della *near-infrared spectroscopy*

La NIRS (*near-infrared spectroscopy*) è una metodica non invasiva per il monitoraggio continuo dell'ossigenazione tissutale regionale attraverso l'impiego di strumentazioni portatili relativamente a basso costo.

Questa tecnica è stata introdotta per la prima volta da Jobsis nel 1977 [19] e si basa su tre principi fondamentali:

- 1) tutti i tessuti biologici sono relativamente trasparenti alla luce nello spettro elettromagnetico del vicino infrarosso (700-1000 nm);
- 2) la legge di Lambert-Beer, secondo cui la trasmissione della luce attraverso una soluzione è una funzione logaritmica di concentrazione delle molecole assorbenti presenti nella soluzione (cromofori), lunghezza del percorso della luce attraverso la soluzione e coefficiente di estinzione specifico del materiale per quella determinata lunghezza d'onda;
- 3) nel caso specifico dell'applicazione biologica della NIRS, il grado di assorbimento luminoso dell'emoglobina esposta ad un fotone NIR dipende dal suo stato di ossigenazione (l'emoglobina deossigenata assorbe meno raggi infrarossi rispetto a quella ossigenata) (Figura 6).

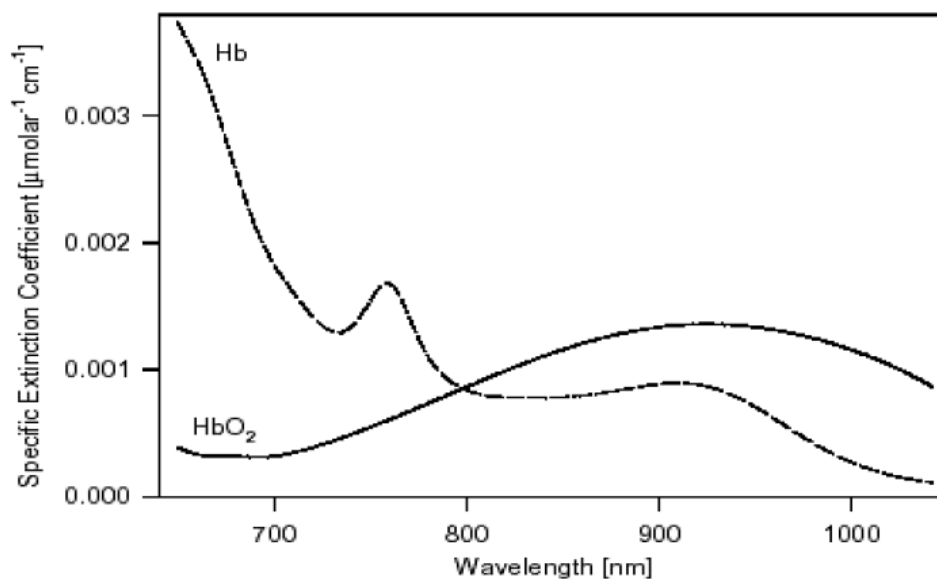


Figura 6. Confronto fra lo spettro di assorbimento dell'emoglobina ossigenata (HbO₂) e quella deossigenata (Hb) per lunghezze d'onda del vicino infrarosso.

Il fotone NIR lanciato nel tessuto biologico non lo attraversa secondo un percorso rettilineo tra sorgente e rilevatore, bensì esegue un percorso più o meno complesso a seconda del numero di eventi di *scattering* (diffusione) a cui va incontro, che si conclude con l'assorbimento totale del fotone da parte del tessuto (evento raro nella banda spettrale NIR) o con la sua fuoriuscita dal tessuto (fotoni “trasmessi” e “riflessi”). Le sonde NIR sfruttano la spettroscopia in riflettanza, poiché la sorgente luminosa che emette fotoni è vicina alla sorgente rivelatrice in cui le fibre ottiche captano la radiazione luminosa fuoriuscita dal tessuto biologico dopo aver percorso un tragitto di profondità variabile e di forma paragonabile ad una “banana” (*banana-shape*) (Figura 7).

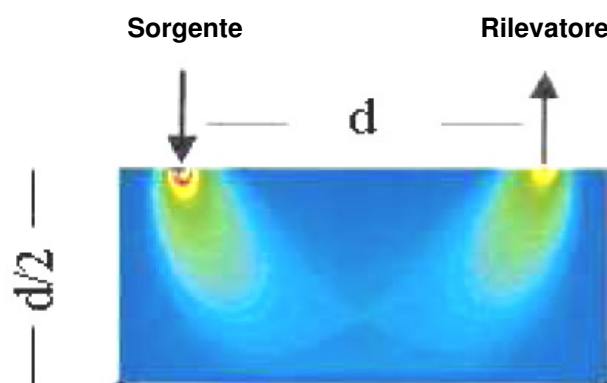


Figura 7. Rappresentazione del tragitto percorso in un tessuto biologico da fotoni NIR, emessi da una sorgente, che giungono al rilevatore dopo essere stati in parte assorbiti e sottoposti ad eventi di *scattering*.

La NIRS riesce quindi per una determinata lunghezza d'onda ad identificare e quantificare le sostanze come l'emoglobina e l'enzima mitocondriale citocromo ossidasi, il cui grado di assorbimento e la variazione di intensità della luce riflessa dipendono dallo stato di ossigenazione e quindi di perfusione del tessuto. La citocromo ossidasi (o citocromo aa3) è l'enzima terminale della catena respiratoria mitocondriale ed è necessario per la conversione dell'ADP ad ATP. Possiede elevata affinità per l'ossigeno, pertanto una riduzione della sua espressione si verifica solo quando la saturazione dell'ossigeno scende al di sotto di valori piuttosto bassi e quindi la maggior parte dell'emoglobina è deossigenata.

La distanza massima tra l'estremità della fibra rivelatrice e quella della fibra che emette la radiazione ottica è di solito 3.5-4 cm, permettendo ai fotoni NIR di penetrare nel tessuto biologico sottostante fino ad una profondità massima di 3-3.5 cm. La NIRS, misurando in modo continuo la saturazione emoglobinica del letto venoso-capillare basale (espressa da un numero compreso tra 0% e 100% e denominata rSO₂) nei distretti in cui è disposto lo specifico sensore, esprime lo stato di perfusione tissutale con un numero assoluto, le cui variazioni nel tempo riflettono altrettante modifiche emodinamiche. L'ossimetro fornisce inoltre un trend di ossigenazione, il cui andamento permette di stimare l'evoluzione della vascolarizzazione in un determinato organo. Ad esempio, per quanto riguarda la perfusione cerebrale, vengono considerati indicativi di un possibile danno ipossico su base ischemica valori di rSO₂ <40-50% o ridotti di almeno il 20% rispetto al valore basale.

I limiti che si possono riscontrare nell'applicazione biomedica della NIRS sono rappresentati da:

- 1) presenza di iperbilirubinemia, edema severo, fistole artero-venose o un eccesso di luce esterna, che possono modificare la capacità assorbente dei cromofori inficiando le rilevazioni dello strumento;
- 2) possibilità che i cromofori contenuti nei tessuti "extra-regionali" possano contribuire alla determinazione del valore di rSO₂.

A quest'ultimo problema si è ovviato attraverso l'utilizzo di un sensore dotato di due fonti per la rilevazione del segnale: una fonte prossimale che misura lo stato di ossigenazione dei cromofori presenti nei tessuti "regionali" e un'altra, distale, che misura il segnale "globale", raccolto nei tessuti regionali e non (Figura 8); sottraendo al valore fornito dal rilevatore distale quello letto dal rilevatore prossimale si ottiene un valore di rSO₂ più vicino al reale, in cui il contributo dei tessuti "extra-regionali" è minimizzato.

Sul mercato sono attualmente disponibili 4 ossimetri NIRS:

- FORE-SIGHT (CAS Medical Systems Inc., Branford, Connecticut, USA);
- INVOS (Somanetics Corporation, Troy, Michigan, USA) (Figura 9);
- NIRO (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan);
- NONIN (Nonin Medical Inc., Plymouth, Michigan, USA).

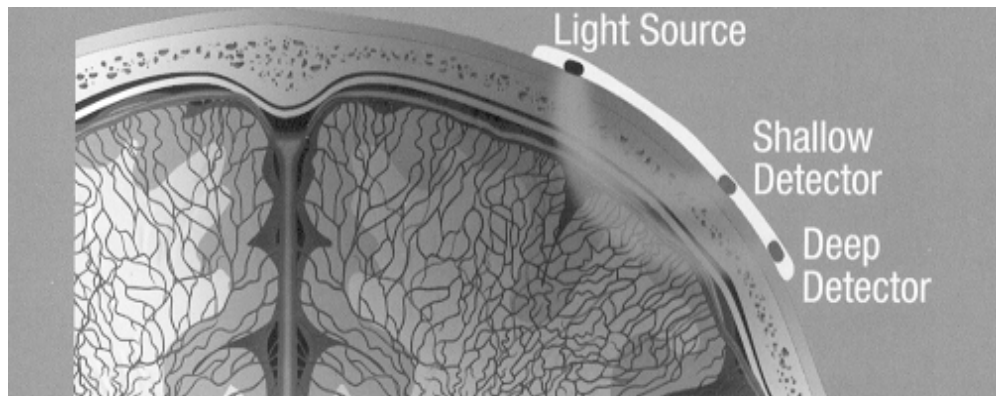


Figura 8. Sensore NIRS per la rilevazione della rSO₂.



Figura 9. INVOS[®] 5100C Cerebral – Somatic Oximeter (Somanetics)

Negli ultimi trent'anni la NIRS ha trovato applicazione nella popolazione adulta e pediatrica, in particolare in ambito neonatale, soprattutto per il monitoraggio dell'emodinamica cerebrale; sono stati condotti numerosi studi che hanno permesso di individuare una relazione tra le alterazioni della perfusione/ossigenazione cerebrale e l'insorgenza di un danno neurologico su base ischemica [20-22] e di verificare gli effetti della cardiocirurgia intra- e post-operatoria sul metabolismo cerebrale [23-25].

Per quanto riguarda lo studio di altri distretti corporei, in particolare quello splancnico, la letteratura si sta arricchendo di lavori che cercano una correlazione tra la NIRS transcutanea e la perfusione viscerale o muscolo-scheletrica nel tentativo di

identificare precocemente alterazioni emodinamiche che precedono il danno d'organo; il circolo splancnico è il primo ad essere posto in regime di bassa perfusione durante gli stati di stress ed identificare precocemente un calo della rSO_2 a questo livello può aiutare a ristabilire un'adeguata gittata sistolica e di conseguenza una migliore ossigenazione tissutale, come confermato dalla letteratura in ambito cardochirurgico [26,27] ed intensivistico [28-30]. A nostra conoscenza, non sono invece disponibili esperienze in merito all'impiego della NIRS in ambito trapiantologico, al fine di valutare l'andamento della perfusione dell'organo trapiantato nelle ore immediatamente successive all'intervento. Il monitoraggio continuo della vascolarizzazione d'organo in tale fase è strategico, consentendo l'identificazione precoce di possibili danni ischemici che possono compromettere irrimediabilmente la ripresa funzionale del *graft*.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo del progetto di studio è consistito nel valutare l'ipotesi che la *near-infrared spectroscopy* possa rappresentare uno strumento utile per definire la perfusione nel rene trapiantato durante l'immediato periodo post-operatorio.

È stato considerato come obiettivo primario la valutazione dell'attendibilità della rSO₂, espressa dalla NIRS, paragonandola ai convenzionali *markers* clinici, biochimici e strumentali di perfusione renale. Lo studio degli indicatori biochimici è stato completato attraverso il dosaggio sperimentale di NGAL urinario.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Protocollo di studio

Previo consenso informato, sono stati inclusi in modo prospettico tutti i pazienti pediatrici sottoposti a trapianto renale, da donatore vivente (LRD) o non-vivente (CAD), da aprile 2010 ad agosto 2011 presso la SS di Nefrologia Pediatrica, Dialisi e Trapianto afferente al Dipartimento di Pediatria di Padova.

Sono stati considerati come criteri di esclusione:

- rifiuto all'arruolamento nello studio anche dopo adeguato consenso informato;
- non attendibilità al monitoraggio NIRS per posizione profonda del rene trapiantato, interposizione di organi cavi o parenchimosi tra il trapianto e la sua proiezione cutanea;
- pazienti con episodi ipossici e di desaturazione nell'immediato post-trapianto.

Per la rilevazione della rSO_2 è stato utilizzato, in tutti i pazienti, l'ossimetro INVOS® 5100C *Cerebral-Somatic* (Somanetics Corporation, Troy, Michigan, USA) a due canali, con sensori pediatrici (SPFB) per pazienti < 40 kg di peso e sensori per adulti (SAFB) per pazienti > 40 kg di peso.

In tutti i pazienti, la rSO_2 è stata registrata mediante un sensore NIRS R (renale), posizionato direttamente in sala operatoria al termine dell'intervento di trapianto (fase di chiusura della cute) in corrispondenza della proiezione cutanea del rene trapiantato (Figura 10). Un secondo sensore NIRS M (muscolare) è stato inoltre posizionato sulla superficie estensoria della coscia controlaterale al rene trapiantato ed è stato utilizzato come indicatore dello stato di ossigenazione del paziente.

I sensori sono stati mantenuti in sede per 72 ore consecutive ed i valori di rSO_2 espressi sono stati registrati informaticamente ogni 30 secondi. Per l'analisi dei dati è stato in seguito selezionato, come costante temporale di rilevazione di rSO_2 , un intervallo di 20 minuti poiché tale misura ha consentito di individuare tutte le variazioni significative (> 20%, come indicato dalla letteratura) tra un valore ed il successivo.



Figura 10. Sensore NIRS renale applicato sopra la ferita chirurgica, in corrispondenza della proiezione cutanea del rene trapiantato.

Durante le prime 72 ore dal trapianto sono stati monitorati:

- i parametri vitali (temperatura corporea, frequenza respiratoria, saturazione di O₂ mediante pulsossimetro, frequenza cardiaca, pressione arteriosa sistolica e diastolica), con frequenza oraria nelle prime 24 ore e bioraria in seguito;
- la diuresi oraria, con registrazione differenziale tra diuresi da catetere vescicale (monitoraggio diuresi residua) e da tutore ureterale (urina dal rene trapiantato);
- gli indici biochimici convenzionali di funzionalità renale (creatininemia) ogni 12 ore.

A cadenza di 12 ore sono stati inoltre raccolti 2 ml di urina prelevandoli direttamente dal tutore ureterale per l'analisi sperimentale del valore di lipocalina associata alla gelatinasi neutrofila. Come riportato in letteratura [31], per consentire la stabilità del materiale biologico, i campioni di urine sono stati conservati alla temperatura di -80°C ed in seguito processati presso il Laboratorio Centrale dell'Azienda Ospedaliera di Padova. La determinazione quantitativa di NGAL sulle

urine prelevate è stata realizzata mediante metodo CMIA (*chemiluminescent microparticle immunoassay*), utilizzando l'analizzatore ARCHITECT® (Abbott Diagnostics Europe, Wiesbaden, Germany).

Dalle 24 ore post-trapianto, tutti i pazienti sono stati sottoposti quotidianamente a valutazione eco-color Doppler del rene trapiantato per verificare la presenza e l'aspetto della vascolarizzazione intraparenchimale (omogenea, rarefatta in periferia, diffusamente rarefatta, assente), e per il calcolo degli indici resistivi intraparenchimali (Doppler pulsato). In occasione della prima ecografia è stata inoltre misurata la distanza tra la superficie cutanea e la capsula del rene trapiantato, verificando che il valore fosse <4 cm (limite di esplorazione NIRS). L'indagine ecografica è stata condotta da un singolo operatore, impiegando l'ecografo ESAOTE MyLab™ 5 (Esaote Italia, Genova).

Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico per la Sperimentazione dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

3.2 Raccolta ed analisi dei dati

Per ogni paziente arruolato è stata costruita una tabella Excel per la registrazione cronologica uniforme (confrontabile) dei parametri studiati (creatinina, pressione arteriosa sistolica, pressione arteriosa diastolica, saturimetria pulsatile di ossigeno, diuresi oraria, NIRS R, NIRS M, NGAL urinario).

Per il calcolo della numerosità campionaria sono stati assunti: α pari a 0.05, $1-\beta$ pari a 0.9, differenza media di saturazione regionale di ossigeno del 5% tra tempo 0 e tempo 72 ore (meno dell'atteso) per campioni appaiati, con deviazione standard pari a 5. In tal modo, la numerosità richiesta del campione è risultata di 22 soggetti.

I valori registrati per ciascun soggetto sono stati studiati mediante statistica descrittiva. Il grado di variazione congiunta tra la rSO₂ renale e gli altri parametri clinici (diuresi) e laboratoristici (creatinina, NGAL urinario) è stato ricercato mediante l'indice di correlazione di Pearson. Il raffronto statistico tra il valore medio delle variabili analizzate nei riceventi da donatore vivente/non-vivente e nei pazienti con/senza DGF è stato eseguito ricorrendo al test t per campioni indipendenti, previa analisi della varianza mediante test F. È stato scelto come livello di significatività $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Decrizione del campione ed analisi del *trend* di rSO₂

Durante il periodo considerato 24 pazienti sono stati sottoposti a trapianto renale, di cui 18 da donatore non-vivente (2 *pre-emptive*) e 6 da donatore vivente (3 *pre-emptive*). Al momento del trapianto, la mediana dell'età era di 12.5 anni (*range* 1.0-17.8) e la mediana del peso era di 37 kg (*range* 9.5-72 kg) (Tabella 1).

	n	Età (anni) Mediana (<i>range</i>)	Peso (kg) Mediana (<i>range</i>)	Peso D/Peso R (kg/kg) Mediana (<i>range</i>)
Tx da donatore non-vivente	18	14.7 (1-17.8)	40.4 (9.5-72)	1.15 (0.44-3.82)
Tx da donatore vivente	6	6.1 (2.8-17.8)	21.2 (11.1-49)	3.67 (1.41-6.30)
Totale	24	12.5 (1-17.8)	37 (9.5-72)	1.37 (0.44-6.30)

Tabella 1. Confronto tra età, peso e rapporto di peso donatore [D]/ricevente [R] nei bambini sottoposti a trapianto (Tx) renale da CAD e da LRD.

Come atteso, i tempi di ischemia fredda (fase in cui l'organo espantato viene posto e conservato al freddo) e quelli di ischemia calda II (fase in cui l'organo espantato è ancora privato dell'apporto ematico ma è a temperatura corporea) sono risultati significativamente superiori nei trapianti da CAD rispetto a quelli da LRD (Tabella 2).

	n	Tx da donatore non-vivente	Tx da donatore vivente	p
Ischemia calda II (minuti) Media±d.s.	18	54.41±8.97	47.20±4.81	0.027
Ischemia fredda (ore) Media±d.s.	6	13.27±4.82	1.60±0.54	<0.05

Tabella 2. Confronto tra i tempi di ischemia calda (II) e fredda nei trapianti da LRD e da CAD.

In tutti i casi, l'immunosoppressione è stata indotta con steroidi e basiliximab, poi proseguita con tacrolimus e micofenolato mofetile. Quattro pazienti (tutti riceventi da CAD) hanno mostrato una *delayed graft function* (DGF), definita come mancato calo della creatinina sierica per le prime 72 ore post-trapianto, con consensuale oligo-anuria, pur senza necessità di eseguire trattamento renale sostitutivo mediante dialisi.

Come da protocollo, l'ecografia renale è stata eseguita quotidianamente per le prime 72 ore. Le indagini *power* Doppler hanno mostrato un segnale vascolare sempre omogeneo in tutti i trapianti renali. Analogamente, gli indici di resistività intraparenchimali sono risultati normali in tutti i casi, con valore mediano di 0.63 (*range* 0.56-0.78). Non si è verificato nessun caso di trombosi dei vasi renali arteriosi o venosi.

Durante l'intero periodo di studio, la rSO₂ rilevata dal sensore NIRS muscolare è risultata >90% in tutti i pazienti analizzati, così come l'ossigenazione rilevata mediante pulsossimetro è sempre risultata >95%, senza necessità di somministrazione di ossigeno.

La media del valore basale di rSO₂ rilevata mediante NIRS è risultata di 69.84±11.95%, significativamente più bassa rispetto al valore medio rilevato al termine del periodo di osservazione (72 ore), risultato pari a 82.92±8.17% (p<0.0001; test t per campioni appaiati) (Figura 11). Il *trend* dei valori medi nei casi di trapianti da CAD non è risultato significativamente diverso rispetto a quello dei trapianti da LRD (Figura 12).

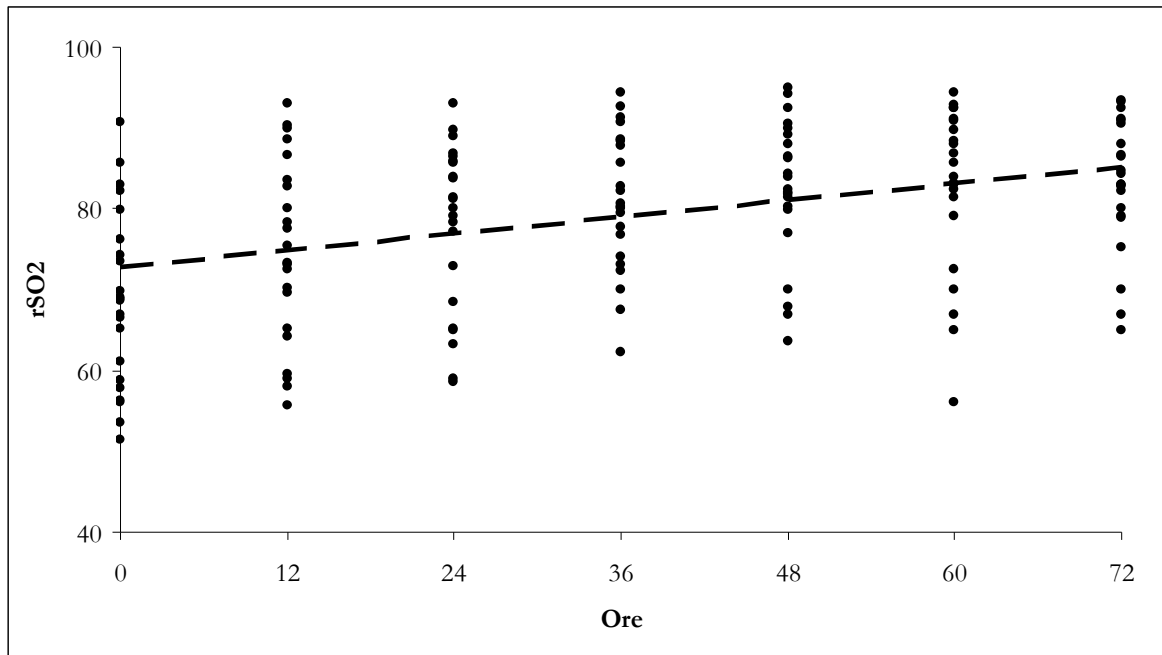


Figura 11. Valori di rSO_2 nel campione di bambini studiato: la linea tratteggiata mostra l'andamento medio della saturazione regionale renale.

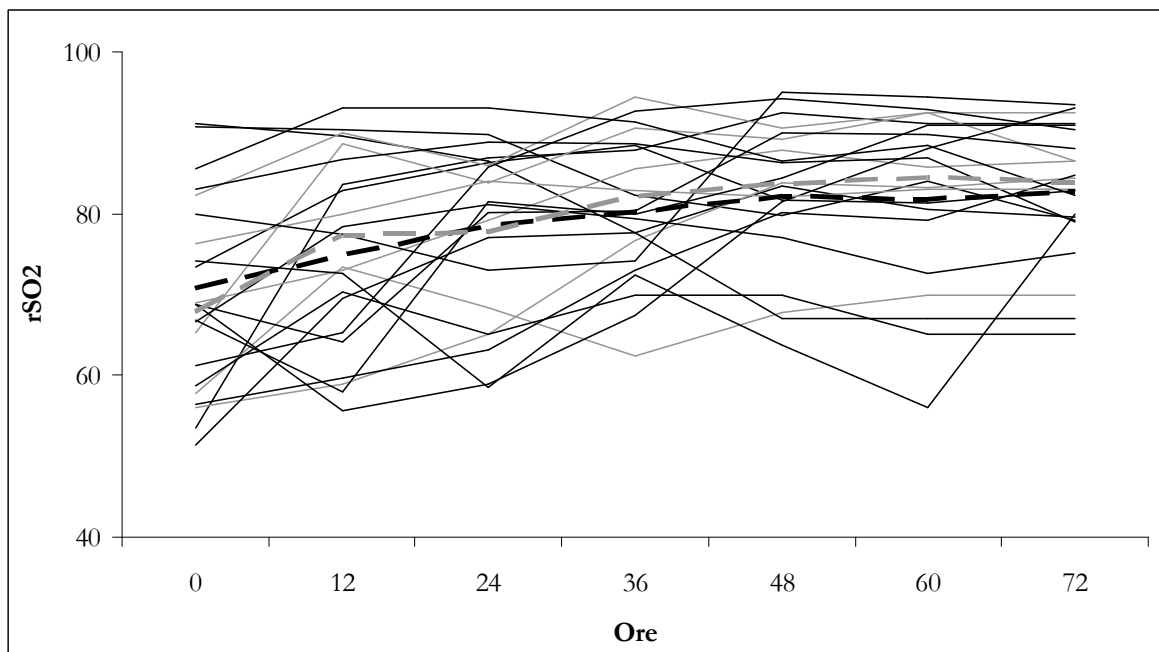


Figura 12. Confronto fra l'andamento della rSO_2 nei trapianti di rene da CAD (in nero), rispetto a quelli da LRD (in grigio). Le linee tratteggiate rappresentano il *trend* dei valori medi (da 70.62% a 82.59% nei trapianti da CAD; da 67.75% a 83.81% in quelli da LRD).

4.2. Correlazione rSO₂-creatinina e rSO₂-diuresi

L'andamento della rSO₂ dal tempo 0 al tempo 72 ore ha mostrato una correlazione statisticamente significativa con il progressivo calo della creatinina ($r=-0.58$; $p<0.05$) e l'aumento della *clearance* della creatinina ($r=0.54$; $p<0.05$) registrati in 20/24 trapianti (Figura 13).

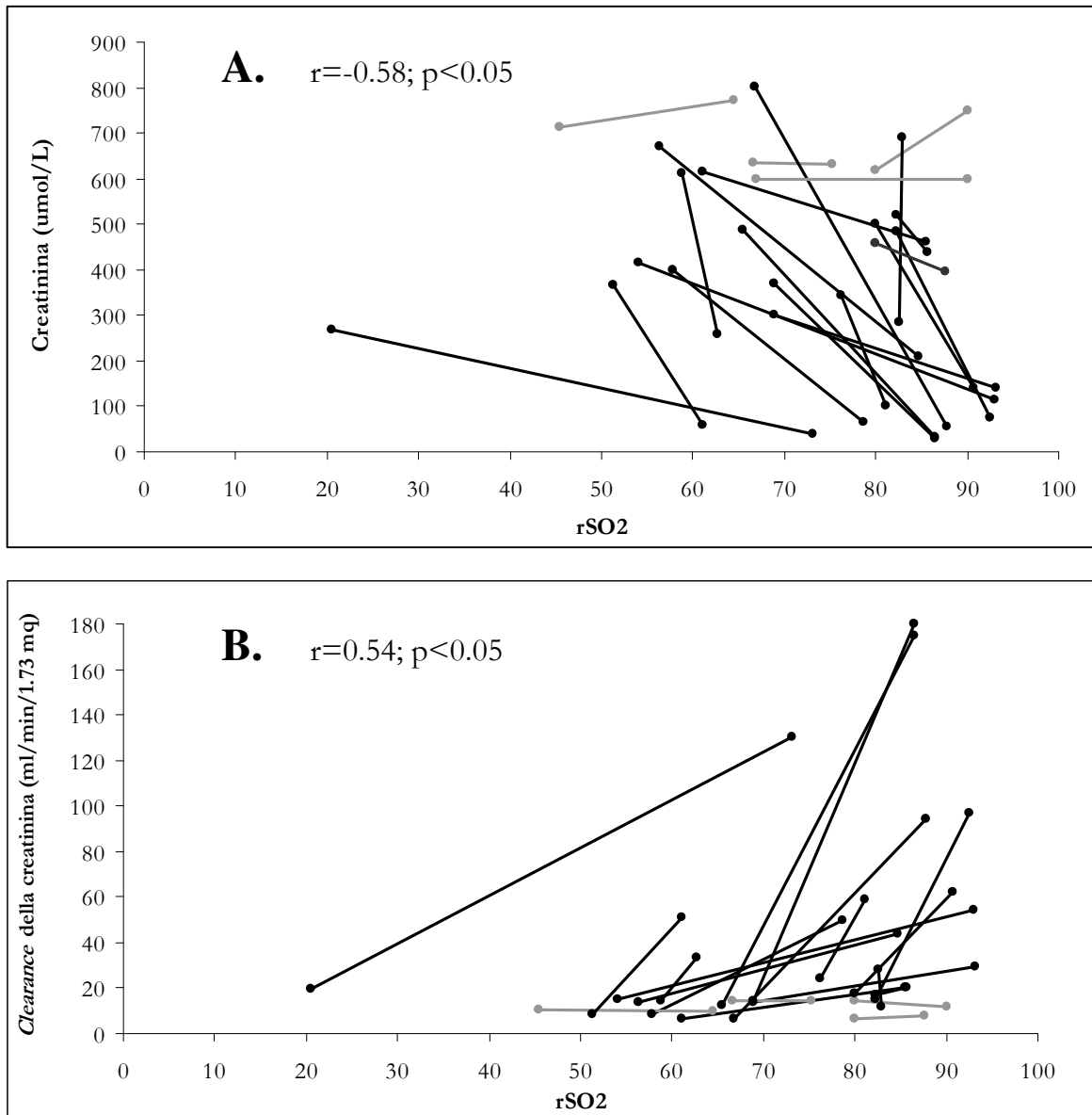


Figura 13. Andamento della rSO₂ renale durante il periodo di osservazione in rapporto alla creatininemia (A) ed alla *clearance* della creatinina (B) nei pazienti con (linee grigie) e senza DGF (linee nere).

Non è invece risultata nessuna correlazione significativa tra l'andamento della rSO₂ e la diuresi, considerando sia l'intero periodo di osservazione (72 h; r=0.10) che le prime 24 ore post-rivascolarizzazione (r=0.24), quando è più probabile il verificarsi della fase poliurica.

Nei 4 casi di DGF, la NIRS ha permesso di dimostrare un *trend* in aumento della rSO₂ (+11.25 dal tempo 0 al tempo 72), indipendentemente da mancata ripresa della diuresi e mancato calo della creatinina (Tabella 3; Figura 13), in sintonia con la normalità della vascolarizzazione intraparenchimale rilevata all'eco-color Doppler in tutti gli organi trapiantati.

		n	Diuresi (cc/kg/h)	Δ creatinina (umol/l)	Δ <i>clearance</i> creatinina (ml/min/1.73 mq)	Δ rSO ₂ renale (%)
DGF	SI	4	0.78±0.48	-50.71±34.14	+1.68±1.23	+11.25±8.65
	NO	20	3.39±1.57	-379±187.94	+72.35±52.25	+14.89±8.65
			p<0.05	p<0.05	p<0.05	p n.s.

Tabella 3. Confronto dei parametri tra i trapianti complicati da DGF e quelli a decorso regolare. Il Δ esprime la differenza tra tempo 0 (inizio osservazione) e tempo 72 ore (fine osservazione). La diuresi si riferisce all'intero periodo di osservazione (72 ore).

4.3 Correlazione rSO₂-NGAL urinario

La determinazione di NGAL urinario (U-NGAL) è stata eseguita in tutti i riceventi da CAD (6/6 casi) ed in 16/18 riceventi da LRD (Figura 14); a causa di anuria protratta, in 2 pazienti che hanno sviluppato DGF non è stato possibile raccogliere i campioni di urine agli intervalli prestabiliti.

Il 100% dei pazienti sottoposti a trapianto da LRD ha mostrato un valore di U-NGAL normale (<150 ng/ml) già entro 12 ore dalla rivascolarizzazione. Viceversa, il 71% dei riceventi un trapianto da CAD presentava a 12 ore un valore di U-NGAL ancora patologico; la percentuale è discesa al 28% al termine del periodo di osservazione (72 ore post-rivascolarizzazione) (Tabella 4).

Tempo post-rivascolarizzazione (ore)	Tx da donatore non vivente U-NGAL (ng/ml)	Tx da donatore vivente U-NGAL (ng/ml)	P
	Media±d.s.	Media±d.s.	
0	765.82±931.73	301.88±363.49	<0.05
12	729.63±721.18	47.08±50.94	
24	359.58±449.58	30.98±12.94	
36	260.78±301.07	23.46±16.47	
48	161.17±201.06	18.95±8.60	
60	126.80±152.13	29.42±22.97	
72	121.36±124.99	32.23±23.51	

Tabella 4. Andamento dei valori medi di U-NGAL nei trapianti da LRD e CAD.

Nella nostra casistica, il *trend* di ossigenazione renale rilevata mediante NIRS ha mostrato una correlazione negativa molto forte con l'andamento di U-NGAL sia nei trapianti renali da CAD ($r=-0.96$; $p<0.05$) che da LRD ($r=-0.89$; $p<0.05$) (Figure 14-15).

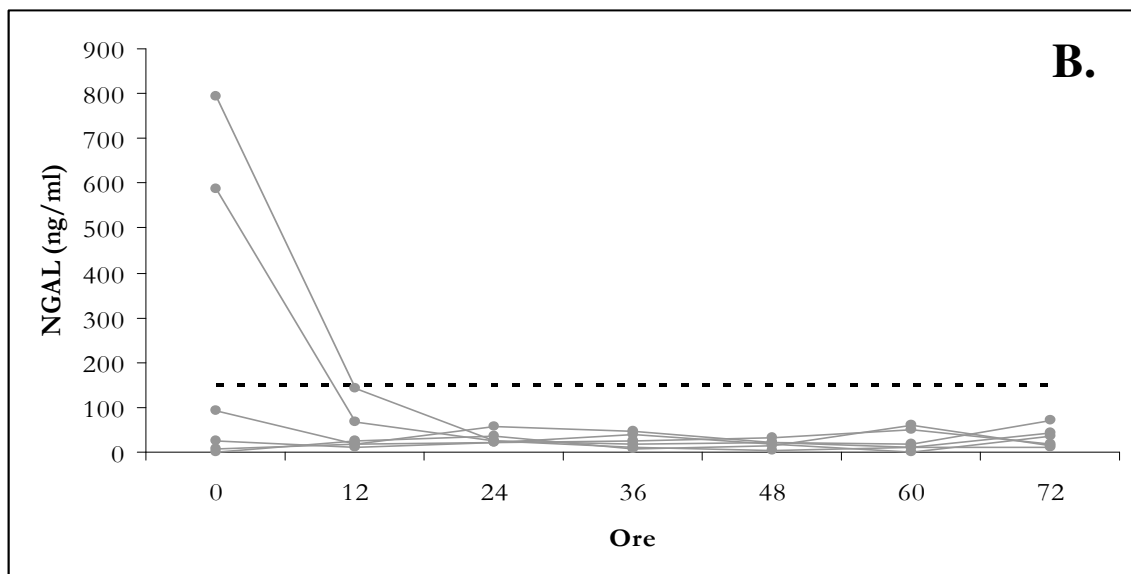
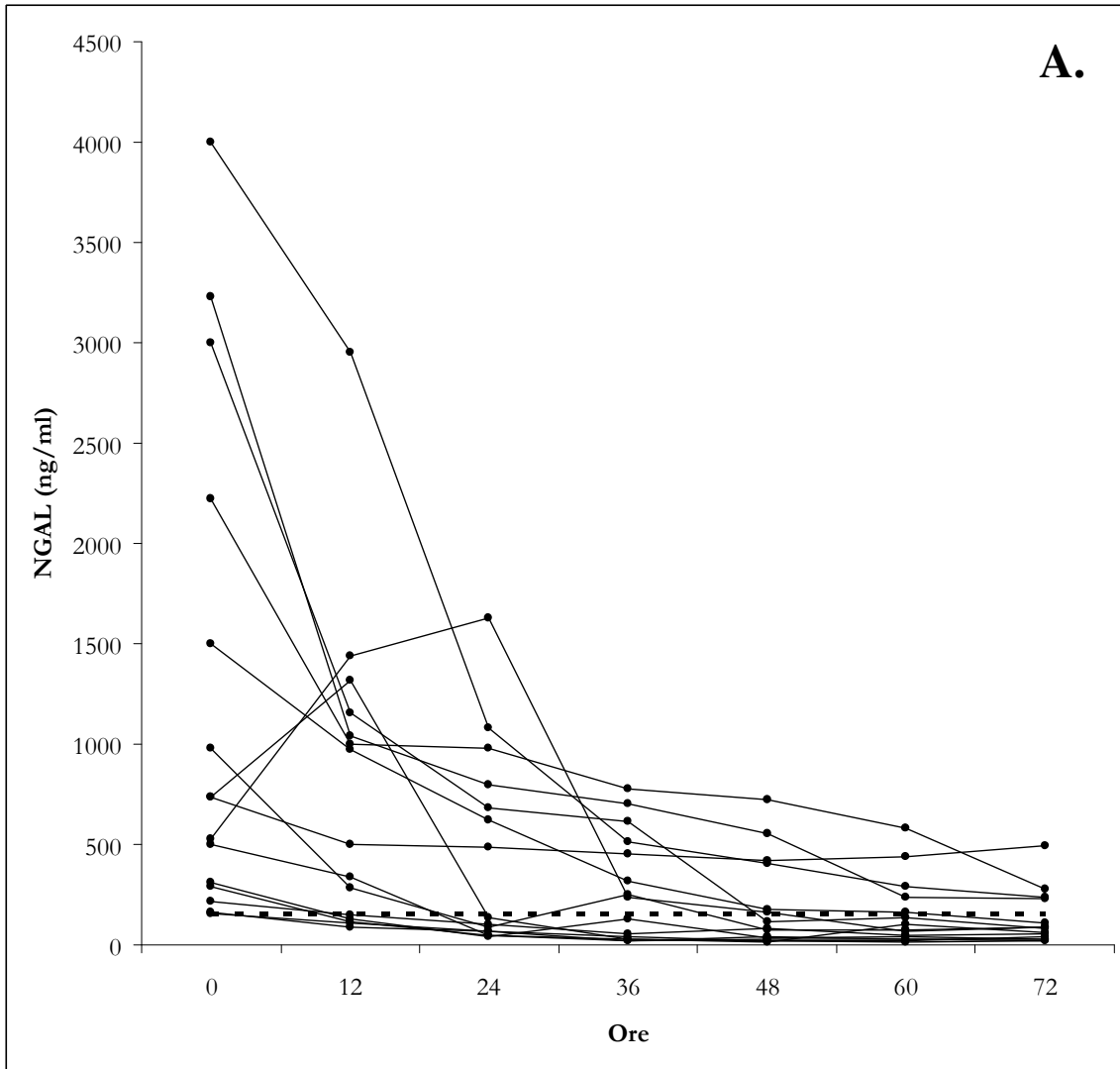


Figura 14. Trend di NGAL urinario nei trapianti da CAD (A) e da LRD (B). La linea tratteggiata rappresenta il *cut-off* di normalità (150 ng/ml).

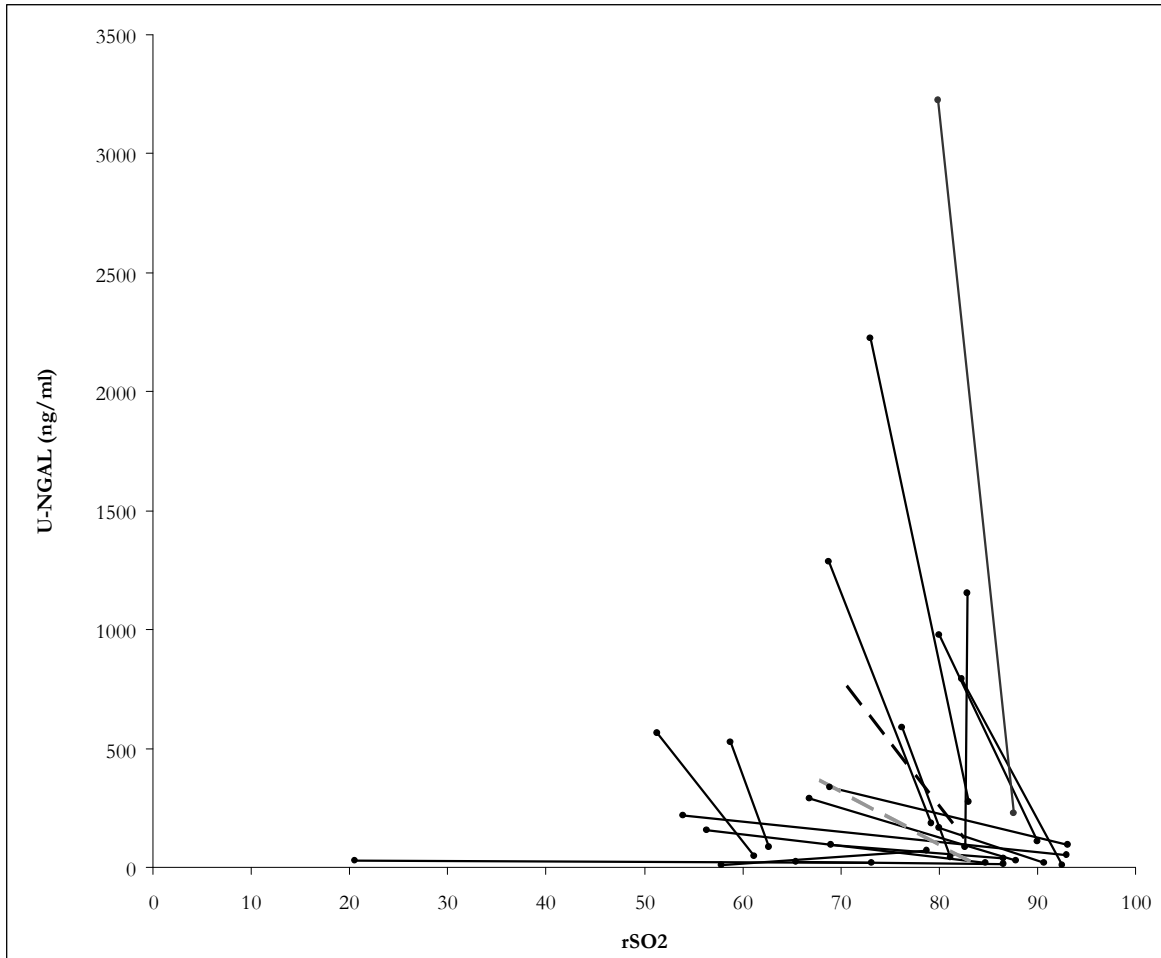


Figura 15. Andamento della rSO_2 durante il periodo di osservazione in rapporto al NGAL urinario. La linea tratteggiata nera rappresenta l'andamento della correlazione lineare nei trapianti da CAD ($r=-0.96$); la linea tratteggiata grigia rappresenta l'andamento della correlazione lineare nei trapianti da LRD ($r=-0.89$).

5. DISCUSSIONE

La valutazione di un'adeguata perfusione renale post-trapianto è comunemente basata su parametri clinici ed ecografici. Questi dati sono necessariamente acquisiti in modo intermittente e forniscono pertanto una visione ritardata circa il rilascio ed il consumo di ossigeno da parte di un parenchima. La ricerca più recente è stata indirizzata ad applicare in ambito clinico una modalità di monitoraggio della perfusione basata su un metodo ottico che sfrutta lo spettro elettromagnetico del vicino infrarosso (NIRS). Tale metodica si caratterizza per essere non invasiva e soprattutto per consentire una valutazione in *real-time* dell'ossigenazione tissutale.

Negli ultimi anni, l'applicazione della NIRS in campo medico sta trovando ampi consensi in ambito intensivistico e cardiocirurgico [26-30], in particolare per valutare l'andamento della perfusione cerebrale e splancnica dopo insulti acuti di natura ischemica. Non sono invece ancora state studiate le potenzialità di questa tecnica per la valutazione dell'andamento della perfusione d'organo nell'immediato post-trapianto, una fase critica di gestione medica, in cui un insulto acuto di natura ischemica – legato a un problema di anastomosi vascolare – deve essere riconosciuto il più precocemente possibile per cercare di evitare la perdita irreversibile dell'organo. L'impiego della NIRS in questo settore assume rilevanza specie in ambito pediatrico, in cui le dimensioni più contenute del ricevente e la ridotta impedenza offerta dai piani cutanei e muscolari permettono di superare il limite legato alla ridotta profondità di esplorazione dei sensori (3.5-4 cm).

Nel nostro studio abbiamo inteso valutare l'applicabilità della NIRS nella definizione della vascolarizzazione del rene trapiantato, verificando in un campione di bambini l'andamento della SrO_2 nelle fasi immediatamente successive al trapianto. Per esplorare l'organo nel modo più accurato possibile, vista anche la sua posizione superficiale, il sensore renale è stato applicato dal chirurgo già in sala operatoria. In occasione della prima ecografia renale si è inoltre confermato che la distanza tra la cute e la capsula renale fosse idonea all'applicazione della NIRS.

Nel 1994, Thorniley e coll. [32] hanno studiato *in vivo* la funzione della catena respiratoria mitocondriale nel tessuto renale di cavie dopo danno ischemico. I ratti

sono stati sottoposti ad espianto renale e successivo allotrapianto in tempo immediato o dopo un periodo di ischemia di 72 ore, in cui il rene prelevato è stato conservato a 1-2°C. I complessi enzimatici della catena respiratoria mitocondriale sono stati misurati mediante fluorescenza di superficie (complesso I – NADH ubiquinone reduttasi) e NIRS (complesso IV – citocromo aa3). Nei reni sottoposti ad allotrapianto immediato, dopo ri-perfusione si è osservato un cambiamento nello stato di ossido-riduzione del citocromo aa3 che ha mostrato una correlazione statisticamente significativa con la vitalità degli organi e l'aumento del tasso di ossidazione da NADH a NAD⁺; in questi casi, l'esame istologico ha dimostrato un edema interstiziale di lieve entità. Nei reni impiegati per allotrapianto dopo una fase di ischemia prolungata, non si è invece osservata nessuna variazione nello stato di ossido-riduzione del citocromo aa3 rispetto al valore basale e ciò ha mostrato una correlazione con la mancata ripresa di funzionalità dell'organo trapiantato, ridotta ossidazione di NADH ed edema interstiziale severo all'esame istologico. Questo studio ha consentito di giungere a 2 conclusioni fondamentali: 1. la rivascularizzazione di un organo è seguita da una potenziale ripresa della respirazione aerobica cellulare in modo inversamente proporzionale alla durata dell'evento ischemico; 2. misurazioni non invasive della disfunzione della catena respiratoria mitocondriale consentono di predire la vitalità dell'organo e le sue variazioni istologiche.

Nel 1995, Vaughan e coll. [33] hanno pionieristicamente utilizzato la NIRS su cavie per monitorare l'andamento dell'ossigenazione ematica (HbO₂, Hb) e tissutale (citocromo aa3) in reni di ratto sottoposti *in vivo* ad insulto ischemico di 45 o 80 minuti, seguito da una ri-perfusione per 4.5 ore. La metodica permise di evidenziare come nel rene sinistro – sottoposto ad ischemia – la NIRS rilevasse un calo significativo della concentrazione di emoglobina ossigenata (HbO₂) ed un aumento di quella deossigenata (Hb) rispetto al rene controlaterale (usato come controllo). La concentrazione di HbO₂ nel rene di sinistra risultò paragonabile a quella del controllo dopo 1 ora dalla ripresa della perfusione ematica. Dopo ri-perfusione, il tasso di cambiamento nella concentrazione dell'HbO₂ e l'aumento della concentrazione tissutale di citocromo aa3 risultarono dipendenti dalla durata dell'ischemia ($p < 0.05$), mostrando una variazione più lenta nei casi sottoposti a danno ischemico prolungato (80 minuti).

Nel trapianto di rene, la maggior parte dei casi di ritardata ripresa funzionale (*delayed graft function* – DGF) è dovuta a necrosi tubulare acuta, che occorre a seguito di un insulto ischemico avvenuto nel donatore prima del prelievo dell'organo, come conseguenza di un lungo periodo di ischemia fredda, di una prolungata ischemia calda durante l'intervento chirurgico o di episodi ipotensivi che si verificano sul ricevente dopo il reimpianto dell'organo [34]. La ripresa della vascolarizzazione renale dopo ischemia (danno da ischemia-riperfusione) è seguita da un'attivazione precoce di specifici geni a livello delle cellule tubulari ed endoteliali renali [9]; a quest'attivazione genica consegue una complessa sequela di eventi caratterizzata da aumentata produzione di radicali liberi dell'ossigeno, sintesi di citochine e molecole di adesione cellulari e reclutamento di leucociti nelle aree interessate dalla lesione. Tutto ciò è responsabile di un'intensa risposta infiammatoria in grado di attivare meccanismi di apoptosi e necrosi cellulare a carico dell'epitelio tubulare renale [35-37], accanto a fasi di proliferazione e de-differenziazione delle cellule vitali.

Oltre che ad un'alterazione del *setting* tubulare, la rivascularizzazione del rene trapiantato è seguita dal rilascio di sostanze vasoattive, di cui - dai primi anni 1990 - è stato studiato il ruolo depressivo sul microcircolo renale [38-41]. La disfunzione endoteliale secondaria all'ischemia induce la secrezione di mediatori vasoattivi, quali endotelina 1, trombossano A2 e prostaglandina A2 che determinano una contrazione dell'arteriola afferente e delle cellule mesangiali [42]. Il danno endoteliale causa, a sua volta, una perdita della produzione di molecole vasodilatatrici locali, quali ossido nitrico e prostaciclina. Nella prima fase di riperfusione di un rene trapiantato, gli eventi biochimici realizzano una vasocostrizione intrarenale che determina infine una riduzione della perfusione del viscere.

La sequela di eventi biochimici che accadono nel danno da ischemia-riperfusione giustifica il *trend* della rSO₂ fisiologicamente osservato nella nostra casistica. Dopo riperfusione, la rSO₂ ha mostrato un valore basale medio di 69.84% con successivo progressivo aumento, raggiungendo – alla fine del periodo di osservazione – un valore medio di 82.92%. Nel gruppo di bambini sottoposti a trapianto da CAD, l'andamento della rSO₂ non ha mostrato differenze rilevanti rispetto ai trapianti da LRD, in cui il periodo d'ischemia fredda dell'organo è ovviamente inferiore. Viceversa, il valore

basale di NGAL urinario è risultato decisamente più elevato nei trapianti da CAD, mostrando poi un andamento in netto calo ed una forte correlazione negativa con il miglioramento di rSO₂ osservato dalla NIRS renale. Nell'interpretare il *pattern* simile di ossigenazione renale post-rivascolarizzazione osservato nei trapianti di rene da LRD e in quelli da CAD, si deve però tenere conto del diverso rapporto di peso D/R, significativamente superiore nel primo gruppo di bambini (3.67 vs 1.15 kg/kg). Ciò può certamente influenzare un'adeguata distribuzione del flusso ematico intraparenchimale nelle prime fasi di riperfusione dell'organo, quando è necessario fornire al bambino un carico parenterale di liquidi, la cui quantità è direttamente proporzionale al *mismatch* di peso. Nella nostra casistica, il *bias* legato al diverso rapporto di peso D/R fra trapianti da LRD e da CAD condiziona probabilmente l'interpretazione dell'andamento della rSO₂ rispetto ai diversi tempi d'ischemia.

Nei trapianti con rapida ripresa funzionale (20/24), l'andamento della rSO₂ ha mostrato una buona correlazione con il calo della creatinina plasmatica e l'aumento della *clearance*. L'associazione con la diuresi è invece stata debole, considerandone l'entità sia a 24 che a 72 ore post-rivascolarizzazione. Questo risultato è atteso, poiché, nelle prime fasi post-trapianto, la ripresa della diuresi è influenzata da numerose variabili strettamente dipendenti. In molti pazienti, nelle prime ore dopo l'intervento chirurgico, l'*output* urinario è piuttosto elevato come conseguenza di uno stato di circolo ipervolemico e di una poliuria osmotica indotta da mannitolo (spesso somministrato in sala operatoria) o dagli elevati valori di urea plasmatica. A questa fase, segue poi una transitoria contrazione della diuresi, in parte legata alla ripresa della capacità di concentrazione tubulare renale, in cui diviene necessaria la somministrazione di diuretico dell'ansa. Tra i risultati certamente più rilevanti deve essere considerato il positivo andamento dell'ossigenazione tissutale renale documentata dalla NIRS anche nei 4 casi che hanno sviluppato DGF (16% della casistica) e che hanno mostrato, durante le 72 ore di monitoraggio, un mancato calo della creatininemia in associazione ad una fase di oligo-anuria. Questi pazienti non hanno presentato nessuna alterazione macroscopica della vascolarizzazione (il reperto ecografico è apparso normale in tutti i pazienti) e la DGF è stata verosimilmente il risultato di una necrosi tubulare acuta. In tutti i casi, infatti, l'evoluzione è stata

positiva, con ripresa nei giorni seguenti di diuresi valida e normalizzazione degli indici biochimici di funzionalità renale.

Il danno renale acuto da DGF complica circa il 4-10% dei trapianti da donatore vivente ed il 5-50% di quelli da donatore cadavere, predisponendo l'organo anche a complicanze di natura immuno-mediata (rigetto renale acuto e *chronic allograft nephropathy*) [43,44]. Sebbene i risultati della ricerca di base abbiano consentito, nei modelli animali, l'identificazione di potenziali *target* di intervento (p21 Ras, MAP-Kinasi e PI3-Kinasi, ROS scavengers) [45,46], nell'uomo, la mancanza di segni precoci e sicuri di AKI impedisce l'inizio tempestivo di una terapia specifica. Diversi algoritmi clinici, basati su fattori di rischio preoperatori, sono stati proposti per cercare di predire l'insorgenza di DGF [47,48], tuttavia ad oggi la ricerca traslazionale non ha ancora permesso di disporre di strumenti oggettivi per la diagnosi precoce.

In questo contesto, i risultati ottenuti dal nostro studio mettono in risalto l'utilità della NIRS: al fine di ridurre il rischio di DGF conseguente a necrosi tubulare acuta o consentire una più rapida remissione del danno tubulare, i pazienti che nelle prime ore post-trapianto presentano oligo-anuria, associata però ad un normale *pattern* di progressione dell'ossigenazione tissutale renale, devono essere inseriti in un protocollo di nefroprotezione, che preveda il contenimento dell'esposizione a farmaci nefrotossici (inibitori della calcineurina) ed il mantenimento di stabili volemia e stato pressorio. È proprio in questi casi, inoltre, che il monitoraggio *real-time* dell'ossigenazione renale consente di intervenire tempestivamente, correggendo eventuali insulti o fattori di rischio che possono essere identificati precocemente solo dal rilievo di un calo transitorio della rSO₂.

L'aumentata espressione di NGAL che si osserva a livello renale dopo un insulto ischemico è dovuta alla capacità di questa molecola di proteggere dallo stress ossidativo e di indurre riepitelizzazione. Questa ipotesi è suffragata sia dalla dimostrazione *in vitro* che NGAL regola la morfogenesi dell'epitelio tubulare [10], sia dalla scoperta del suo ruolo di trasportatore del ferro con azione complementare alla transferrina durante la nefrogenesi [49]. È noto che se da un lato il ferro è cruciale per la crescita e lo sviluppo delle cellule (e perciò presumibilmente anche per la loro rigenerazione post-ischemica), dall'altro può essere tossico per l'epitelio tubulare. È dunque verosimile che NGAL

possa fungere in questo contesto anche da chelante del ferro perso dalle cellule danneggiate, limitandone così gli effetti citotossici; poichè NGAL viene poi endocitato dal tubulo prossimale, può cedere il ferro precedentemente chelato alle cellule vitali stimolandone la crescita e lo sviluppo.

Partendo da queste osservazioni sperimentali, Mishra et al. [50] hanno verificato l'ipotesi che NGAL potesse rappresentare un *marker* di AKI in una popolazione pediatrica di bambini trapiantati. Lo studio ha coinvolto 25 pazienti, 13 dei quali sottoposti ad un trapianto di rene singolo da CAD e 12 da LRD. Dopo circa un'ora dalla ri-perfusione, in tutti i soggetti sono stati prelevati dei campioni bioptici. L'indagine istologica è risultata normale in tutti i casi di trapianto da LRD, mentre nei trapianti da CAD sono stati dimostrati vari gradi di danno da ischemia-ri-perfusione, tra cui apoptosi e necrosi parcellare. In un secondo tempo, i preparati istologici sono stati incubati con anticorpi policlonali diretti contro NGAL. Nei campioni prelevati da riceventi un trapianto da LRD, NGAL è risultato espresso in minime tracce o addirittura assente, mentre – in caso di trapianto da CAD – NGAL è risultato facilmente identificabile, soprattutto nei tubuli prossimali ma anche nei segmenti distali del nefrone; i glomeruli e l'interstizio non hanno invece mostrato reattività verso NGAL. Il grado di *staining intensity* di NGAL rilevato nelle biopsie dei pazienti ha mostrato una forte correlazione con il tempo di ischemia fredda, il picco di creatinina sierica post-intervento e la richiesta di dialisi post-operatoria a distanza di 2-3 giorni dal trapianto.

In tutti i soggetti studiati nella nostra casistica, è stato rilevato un progressivo calo nell'eliminazione urinaria di NGAL a seguito della ri-perfusione post-trapianto. L'escrezione di lipocalina è stata significativamente più elevata nei trapianti da CAD, come conseguenza di un maggior tempo d'ischemia (calda e fredda) cui l'organo è stato soggetto. Il *trend* di U-NGAL ha mostrato una forte correlazione negativa con il miglioramento dell'ossigenazione renale post-rivascolarizzazione rilevato dalla NIRS. Questo risultato trova giustificazione nella fisiopatologia, per cui il miglioramento della perfusione renale si associa a una riduzione dell'espressione renale di NGAL, e conferma l'affidabilità della NIRS quale *monitor* di ossigenazione renale.

6. CONCLUSIONI

Questo studio rappresenta, a nostra conoscenza, la prima esperienza circa l'impiego clinico della NIRS in ambito trapiantologico.

Nel corso del periodo di arruolamento, non si sono verificati casi di trombosi acute dei vasi renali venosi e/o arteriosi, per cui non è stato possibile definire l'effettivo ruolo della NIRS nell'identificazione precoce di un grave insulto ischemico.

Assumono però grande rilevanza i risultati conseguiti nei casi che hanno sviluppato DGF, per i quali non sono al momento disponibili altri indicatori che consentano una valutazione continua della perfusione renale (conservata) e disgiunta dalla funzionalità tubulare (transitoriamente compromessa).

I risultati raggiunti in termini di definizione della progressione della rSO_2 post-trapianto e la rilevante correlazione emersa tra ossigenazione renale ed i *markers* laboratoristici studiati trovano un'ampia giustificazione dal punto di vista fisiopatologico e consentono di validare la NIRS, in questo contesto, come un affidabile strumento di monitoraggio.

Bibliografia

1. Mussap M, Degrandi R, Fravega M, Fanos V. Acute kidney injury in critically ill infants: the role of urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL). *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2010; 23(S3):70-72.
2. Devarajan P. Review: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton)* 2010;15:419-428.
3. Haase M, Bellomo R, Devarajan P, Schlattmann P, Hasse-Fielitz A. Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases* 2009;54(6):1012-1024.
4. Ronco C. NGAL: diagnosing AKI as soon as possible. *Critical Care* 2007;11:173.
5. Mishra J, Ma Q, Prada A, Mitsnefes M, Zahedi K, Yang J, Boros CHJ, Devarajan P. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2534-2543.
6. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol* 2004;24:307-315.
7. Schmidt-Ott KM, Mori K, Kalandadze A, Li JY, Paragas N, Nicholas T, Devarajan P, Barasch J. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006 Jul;15(4):442-9.
8. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1503-1520.

9. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapali R, Kasel FJ, Moore LC, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2003;63:1714-1724.
10. Gwira JA, Wei F, Ishibe S, Ueland JM, Barasch J, Cantley LG. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates epithelial morphogenesis in vitro. *J Biol Chem* 2005 Mar 4;280(9):7875-8.
11. Borregaard N, Cowland JB. Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, a siderophore-binding eukaryotic protein. *Biometals* 2006;19:211-215.
12. Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin from humans. *Genomics* 1997;45:17-23.
13. Soni SS, Cruz D, Bobek I, Chionh CY, Nalesso F, Lentini P, de Cal M, Corradi V, Virzi G, Ronco C. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int Urol Nephrol* 2010;42:141-150.
14. Hollmen ME, Kyllonen LE, Inkinen KA, Lalla MLT, Salmela KT. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a marker of graft recovery after kidney transplantation. *Kidney Int* 2011;79:89-98.
15. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005;365:1231-1238.
16. Baxter GM. Ultrasound of renal transplantation. *Clin Radiol* 2001 Oct;56(10):802-18.

17. Burgos Revilla FJ, Marcen Letosa R, Pascual Santos J, López Fando L. The usefulness of ultrasonography and Doppler ultrasound in renal transplantation. *Arch Esp Urol* 2006 May;59(4):343-52.
18. Cosgrove DO, Chan KE. Renal transplants: what ultrasound can and cannot do. *Ultrasound Q* 2008 Jun;24(2):77-87.
19. Jobsis FF. Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 1977;198:1264-1267.
20. Brazy JE, Lewis DV. Changes in cerebral blood volume and cytochrome aa3 during hypertensive peaks in preterm infants. *J Pediatr* 1986;108:983-987.
21. Austin EH 3rd, Edmonds HL Jr, Auden SM, Seremet V, Niznik G, Sehic A, Sowell MK, Cheppo CD, Corlett KM. Benefit of neurophysiologic monitoring for pediatric cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997;114:707-715; discussion 715-716.
22. Meek JH, Tyszczyk L, Elwell CE, Wyatt JS. Low cerebral blood flow is a risk factor for severe intraventricular haemorrhage. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999;81:F15-F18.
23. Pichler G, Urlesberger B, Muller W. Impact of bradycardia on cerebral oxygenation and cerebral blood volume during apnea in preterm infants. *Physiol Meas* 2003;24:671-680.
24. Greeley WJ, Bracey VA, Ungerleider RM, Greibel JA, Kern FH, Boyd JL, Reves JG, Piantadosi CA. Recovery of cerebral metabolism and mitochondrial oxidation state is delayed after hypothermic circulatory arrest. *Circulation* 1991;84(5 Suppl):III 400-406.

25. Daubeney PE, Smith DC, Pilkington SN, Lamb RS, Monro JL, Tsang VT, Livesey SA, Webber SA. Cerebral oxygenation during pediatric cardiac surgery: identification of vulnerable periods using near infrared spectroscopy. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;13:370-377.
26. Hoffman GM, Stuth EA, Jaquiss RD, Vanderwal PL, Staudt SR, Troshynski TJ, Ghanayem NS, Tweddell JS. Changes in cerebral and somatic oxygenation during stage 1 palliation of hypoplastic left heart syndrome using continuous regional cerebral perfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:223-233.
27. Amigoni A, Mozzo E, Brugnaro L, Tiberio I, Pittarello D, Stellin G, Bonato R. Four-side near-infrared spectroscopy measured in a paediatric population during surgery for congenital heart disease. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2011 May;12(5):707-12. Epub 2011 Feb 19.
28. Marimón GA, Dockery WK, Sheridan MJ, Agarwal S. Near-infrared spectroscopy cerebral and somatic (renal) oxygen saturation correlation to continuous venous oxygen saturation via intravenous oximetry catheter. *J Crit Care* 2011 Dec 13 [Epub ahead of print].
29. Možina H, Podbregar M. Near-infrared spectroscopy for evaluation of global and skeletal muscle tissue oxygenation. *World J Cardiol* 2011 Dec 26;3(12):377-82.
30. Hoffman GM, Ghanayem NS, Mussatto KA, Musa N. Perioperative perfusion assessed by somatic NIRS predicts postoperative renal dysfunction. *Anesthesiology* 2005;103:A1327.
31. Haase-Fielitz A, Haase M, Bellomo R. Instability of urinary NGAL during long-term storage. *Am J Kid Dis* 2009;53(3):564-565.

32. Thorniley MS, Lane NJ, Manek S, Green CJ. Non-invasive measurement of respiratory chain dysfunction following hypothermic renal storage and transplantation. *Kidney Int* 1994;45(5):1489-96.
33. Vaughan DL, Wickramasinghe YA, Russell GI, Thorniley MS, Houston RF, Ruban E, Rolfe P. Near Infrared Spectroscopy: blood and tissue oxygenation in renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Int J Angiology* 1995;4:25-30.
34. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004;364:1814-1827.
35. Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1984;74:1156-1164
36. Sabbatini M, Sansone G, Uccello F, De Nicola L, Giliberti A, Sepe V, Magri P, Conte G, Andreucci VE. Functional versus structural changes in the pathophysiology of acute ischemic renal failure in aging rats. *Kidney Int* 1994;45:1355-1361.
37. Daemen MA, van't Veer C, Denecker G, Heemskerk VH, Wolfs TG, Clauss M, Vandenabeele P, Buurman WA. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J Clin Invest* 1999;104: 541-549.
38. Gianello P, Fishbein J, Besse T, Gustin T, Chatzopoulos C, Ketelslegers JM, Lambotte L, Squifflet JP. Measurement of vasoconstrictive substances endothelin, angiotensin II, and thromboxane B₂, in cold storage solution can reveal previous renal ischemic insults. *Transplant Int* 1994;7:11.
39. Alejandro VS, Nelson WJ, Huie P, Sibley RK, Dafoe D, Kuo P, Scandling JD, Meyers BD. Postischemic injury, delayed function and Na⁺/K⁺-ATPase distribution in the transplanted kidney. *Kidney Int* 1995;48:1308.

40. Yamada K, Gunji Y, Hishikawa E, Kashiwabara H, Sakamoto K, Arita S, Yokoyama T. Possible involvement of endothelin in post-transplant acute tubular necrosis. I: studies in renal transplant patients. *Transplantation* 1994;57:1137.
41. Bretan PN, Lobo E, Chang JA, Dumitrescu O, Miller B, Yen TSB. Assessment of preservation induced reperfusion injury via intraoperative renal transplant blood flow and endothelin concentration studies. *J Urol* 1997;158:714-718.
42. Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ, Hoover RL, Badr KF. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest* 1992;90(1):136–141.
43. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63:1620-1628.
44. Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vasquez MA, Jeyarajah DR. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury during the transplant process? *Kidney Int* 1999;51:2157-2163.
45. Sabbatini M, Santillo M, Pisani A, Paternò R, Uccello F, Serù R, Matrone G, Spagnuolo G, Andreucci M, Serio V, Esposito P, Cianciaruso B, Fuiano G, Avvedimento EV. Inhibition of Ras/ERK1/2 signaling protects against post-ischemic renal injury. *AJP-Renal Physiol* 2006;290(6):F1408-1415.
46. Doi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Noiri E. Radical scavenger edaravone developed for clinical use ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Kidney Int* 2004;65:1714-1723.

47. Liano F, Pascual J. Predictive factors and scoring. In: Acute renal failure, edited by Molitoris BA and Finn WA, Philadelphia, WB Saunders, 2001, pp507-518.
48. Molitoris BA. Transitioning to therapy in ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:265-267.
49. Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, Du T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Strong R, Barasch J. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell* 2002 Nov;10(5):1045-56.
50. Mishra J, Ma Q, Kelly C, Mitsnefes M, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatr Nephrol* 2006;21:856-863.