

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIRURGICHE

Ciclo 34

Settore Concorsuale: 06/C1 - CHIRURGIA GENERALE

Settore Scientifico Disciplinare: MED/18 - CHIRURGIA GENERALE

PERFUSIONE IPOTERMICA OSSIGENATA NEL TRAPIANTO DI FEGATO DA
DONATORE A CRITERI ESTESI – STUDIO RANDOMIZZATO

Presentata da: Lorenzo Maroni

Coordinatore Dottorato

Bianca Maria Piraccini

Supervisore

Matteo Cescon

Co-supervisore

Pietro Andreone

Esame finale anno 2022

Abstract

I fegati provenienti dai donatori a criteri estesi sono associati a un rischio elevato di *dysfunction* dopo trapianto. La HOPE potrebbe ridurre l'incidenza di tale complicanza, benché i dati emersi da studi prospettici siano carenti.

In questo studio monocentrico randomizzato i pazienti da sottoporre a trapianto di fegato con *graft* proveniente da donatore marginale sono stati randomizzati a ricevere un fegato dopo HOPE o a riceverne uno conservato in statica ipotermica (gruppo SCS). L'*endpoint* primario era la valutazione dell'incidenza dell'*early allograft dysfunction*. Gli *endpoint* secondari includevano la valutazione della sopravvivenza del ricevente e del *graft*, così come le complicanze post-trapianto. I pazienti del gruppo HOPE avevano un tasso significativamente più basso di EAD. L'analisi di sopravvivenza confermava che quei pazienti avevano una sopravvivenza del *graft* superiore, con inferiori tassi di re-ricovero e di complicanze post-operatorie, in particolare di natura cardio-vascolare.

Introduzione

Il trapianto di fegato (OLT) è il trattamento di scelta dei pazienti con insufficienza epatica terminale o con epatopatia complicata [1]. Tale opzione terapeutica è tuttavia ostacolata dalla scarsità di organi disponibili. Nonostante un incremento del numero di trapianti osservato negli ultimi anni, il numero dei pazienti in lista d'attesa è sostanzialmente stabile [2]. La scarsità di donatori rende l'offerta di organi disponibili a trapianto inferiore della domanda, facendo sì che questa terapia non sia garantita a tutti i pazienti.

L'utilizzo di organi provenienti da donatori "marginali" – detti anche donatori a criteri estesi (*Extended Criteria Donors* – ECD) – è stata proposta e applicata per fronteggiare tale problema. Questi organi sono più vulnerabili agli effetti dannosi intracellulari dell'ischemia, come la deplezione delle riserve di adenosina trifosfato (ATP), la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), e alterazioni della struttura e della funzione cellulare [3]. Tutti questi eventi

possono condurre a danni morfologici e funzionali di severa entità che facilitano il verificarsi di disfunzione d'organo dopo trapianto (*graft dysfunction*).

La preservazione degli organi diventa pertanto un elemento cruciale quando sono utilizzati organi provenienti da ECD. Fino a oggi, la preservazione statica fredda (*static cold storage* – SCS) è il metodo di conservazione più largamente utilizzato, a causa della sua semplicità ed efficacia nel ridurre il metabolismo e le richieste di ossigeno [4]. La SCS applicata agli organi ECD è tuttavia associata a tassi più elevati di *early allograft dysfunction* (EAD) e di ridotta sopravvivenza a lungo termine dell'organo [5].

Nel corso dell'ultima decade i ricercatori che si occupano di tale dominio hanno concentrato l'attenzione sullo studio di nuove strategie alternative per la preservazione degli organi. Alcuni studi clinici e preclinici hanno esplorato il ruolo della preservazione dinamica – con o senza ossigeno – mediante perfusione normotermica (35-37°C), sub-normotermica (20-25°C) e ipotermica (4-10°C) [6]. Tra queste la perfusione ipotermica ossigenata (*Hypothermic Oxygenated Perfusion* – HOPE) si è dimostrata associata a migliori risultati a breve e lungo termine nei riceventi di OLT [7-9].

Questa tesi è uno studio randomizzato monocentrico in aperto che si propone di confrontare il ruolo della HOPE e della SCS nel trapianto di fegati provenienti da ECD.

Materiali e metodi

Disegno di studio e supervisione

Questo studio è stato disegnato come *trial* clinico randomizzato monocentrico *open-label*. Lo studio è stato condotto all'interno dell'U. O. C. Chirurgia epatobiliare e dei trapianti dell'IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Policlinico di S. Orsola. I pazienti sono stati stratificati sulla base della contemporanea presenza di criteri ECD (fino a 5 vs più di 5) e randomizzati con un *ratio* di 1:1, così da ricevere un fegato preservato o con HOPE dopo il

trasporto in SCS dalla sede del prelievo fino alla sede del trapianto (gruppo HOPE) o con sola SCS (gruppo SCS).

Il protocollo di studio è stato approvato dal comitato etico locale ed è già stato pubblicato [10].

Selezione dei donatori e dei riceventi

Sono stati inclusi pazienti maggiorenni candidati a ricevere trapianto di fegato isolato con *graft* provenienti da ECD. Tutti i riceventi hanno firmato un consenso informato scritto per essere inclusi nello studio.

I donatori considerati eleggibili per il *trial* sono quelli che soddisfacevano i criteri per ECD proposti dall'*United Network for Organ Sharing* (UNOS), che includevano instabilità emodinamica con la necessità di utilizzo di amine vasoattive, età superiore a 65 anni, BMI superiore di 30 kg/m², bilirubina sierica superiore a 3 mg/dl, transaminasi (AST o ALT) superiori a 3 volte la soglia di riferimento, sodiemia superiore a 165 mmol/l, ricovero in terapia intensiva superiore a 7 giorni, riscontro istopatologico di steatosi macrovescicolare superiore al 40%, ischemia fredda superiore a 12 ore [11].

I criteri di esclusione includevano l'età del donatore inferiore a 18 anni, i riceventi di *split-liver*, i trapianti di fegato per insufficienza epatica acuta/fulminante e i candidati ad OLT che sviluppavano complicanze chirurgiche intra-operatorie prima dell'impianto. Anche i donatori deceduti accertati con criteri cardiologici ("*donors after circulatory death*" – DCD) sono stati esclusi, a causa di un periodo necessario all'accertamento di morte di 20 minuti imposto dalla legge italiana, con conseguente prolungato periodo di ischemia calda.

Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion

La perfusione degli organi è stata effettuata con l'ausilio della macchina Vitasmart (Medica, Bologna, Italia), espressamente elaborata per la perfusione *ex-vivo* degli organi addominali. Durante la perfusione venivano monitorati e registrati in continuo i parametri fisici (flusso, pressione e temperatura) in una

memoria esterna. Veniva inoltre effettuata una emogas-analisi del perfusato effluente all'inizio della perfusione (T0) e successivamente ogni 30 minuti, così da monitorare la pressione parziale di anidride carbonica (pCO₂), quella dell'ossigeno (pO₂), il pH, e le concentrazioni di glucosio e lattati. Sono stati inoltre prelevati due campioni di perfusato all'inizio e alla fine della perfusione per valutare l'eventuale contaminazione batterica e/o fungina.

La perfusione degli organi veniva effettuata in sala operatoria, dall'inizio della chirurgia da banco (*back-table surgery*) fino al momento dell'impianto. La HOPE iniziava con un periodo di lavaggio (*flushing*) dell'organo a bassi flussi (30 ml/min) con un fluido da perfusione (nuovo rispetto a quello con cui l'organo arriva dal prelievo) durante la preparazione a banco, con lo scopo di rimuovere prodotti di scarto e microtrombi residui. Successivamente gli organi venivano trattati con una perfusione continua con ricircolo fino al trapianto. Il periodo minimo di perfusione era di un'ora. Il liquido di perfusione utilizzato era la Belzer UW *Cold Storage Solution*, a temperatura di 4-10°C e pO₂ di 500-600 mmHg. L'algoritmo del protocollo di trattamento del gruppo HOPE è riportato in figura 1.

Misure di endpoint

Le misure di *endpoint* primari erano l'incidenza di *early allograft dysfunction* (EAD) e l'*Early Allograft Failure Simplified Estimation* (EASE) *score*. L'EAD è stata definita come la presenza di almeno uno dei seguenti criteri: bilirubina sierica maggiore di 10 mg/dl in 7° giornata post-operatoria (g. p. o.), un INR maggiore di 1.6 in 7° g. p. o., AST o ALT maggiori di 2000 UI/ml entro le prime 7 g. p. o. [12]. L'EASE *score* è calcolato sulla base della cinetica di AST, bilirubina sierica, conta piastrinica e INR nei prime 7 g. p. o, così come recentemente descritto da Avolio et. al. [13]. La decisione di utilizzare l'EASE *score* piuttosto che l'L-GrAFT [14], *score* che veniva utilizzato nel protocollo originale, è stata fatta dopo l'introduzione dell'EASE *score* stesso, che appariva

un metodo più semplice e più accurato nel predire una *graft failure* precoce a causa della carenza di chiarezza nel corretto calcolo dello *score* L-GrAFT [15].

Gli *endpoint* secondari includevano l'incidenza della *primary graft non-function* (PNF), definita come morte del paziente o necessità di ri-trapianto (re-OLT) entro le prime 7 g. p. o., escludendo le complicanze vascolari acute [16]; l'incidenza e la severità della sindrome da riperfusione, definita come un decremento di più del 30% della pressione arteriosa media o la necessità di supporto aminico per mantenere la stabilità emodinamica; la durata dell'ospedalizzazione; le complicanze biliari e vascolari entro i primi 6 mesi dal trapianto; la sopravvivenza del graft (*graft survival* – GS) e la sopravvivenza del paziente (*overall survival* – OS).

Analisi statistica

Il *sample size* è stato calcolato utilizzando come *outcome* primario e secondario la EAD e la PNF rispettivamente [8, 17]. Ci si aspettava che i tassi di EAD e di PNF fossero ridotti nel gruppo HOPE, migliorando conseguentemente il decorso post-operatorio; le riduzioni attese erano: EAD, 10% (HOPE) vs 20% (SCS) e PNF, 5% (HOPE) vs 10% (SCS). È stato stimato un *sample size* di 110 pazienti ($\alpha=0.05$, *two-sided test*, potenza dell'80%, calcolata con *nQuery Advisor 7.0*, *Statsols*, Cork, Irlanda), tenendo conto di un rischio di *drop-out* del 5-10% l'anno.

Tutte le misure di *endpoint* sono state specificate nel protocollo originale [10]. Il test del Chi-quadro è stato utilizzato per confrontare le variabili categoriche, mentre test parametrici (ANOVA) e non-parametrici (Kruskal-Willis) sono stati utilizzati per le variabili continue. L'analisi multivariata è stata effettuata utilizzando l'analisi di regressione logistica *forward stepwise*. I risultati *time-to-event* sono stati analizzati con il test *log-rank*. Sono stati considerati statisticamente significativi solo valori di p inferiori a 0.05.

Risultati

Pazienti

Dal dicembre 2018 al gennaio 2021 sono stati randomizzati 135 potenziali ECD e di questi 110 sono stati utilizzati per OLT. 25 *graft* sono stati esclusi: 4 a causa di un rischio inaccettabile del donatore, 10 a causa della non idoneità macroscopicamente rilevata, 11 a causa della non idoneità alla valutazione istopatologica. Le caratteristiche *baseline* dei riceventi e dei donatori inclusi nello studio sono mostrati nella tabella 1.

Endpoint primari

La EAD si è verificata in 7 dei 55 pazienti nel gruppo HOPE (13%) e in 19 dei 55 pazienti del gruppo SCS (35%) ($p=0.007$, differenza di rischio aggiustata (*adjusted risk difference* – ARD) 0.218, intervallo di confidenza (CI) al 95% 0.065-0.372). Questo risultato è stato confermato anche dopo l'aggiustamento per il MELD *score* al trapianto, il *Donor Risk Index* (DRI) [5] e il tempo di ischemia fredda ($p=0.01$, ARD 0.220, 95% CI 0.065-0.375). Il *number needed to treat* (NNT) necessario a prevenire un evento addizionale era 4.6.

L'EASE *score* mediano era -3.300 nel gruppo HOPE e -3.500 nel gruppo SCS ($p=0.64$). I *graft* sono stati poi categorizzati sulla base dello score di rischio: quelli classificati a rischio intermedio o elevato di *graft failure* a 90 giorni erano meno frequentemente presenti nel gruppo HOPE (1 vs 6 casi, $p=0.005$, ARD 0.091, 95% CI 0.001 – 0.181). Le analisi delle misure di *endpoint* primari e secondari sono mostrate nella tabella 2.

Endpoint secondari

Il tasso di re-OLT era significativamente più basso nel gruppo HOPE (0% vs 11%, $p=0.0$, NNT di 9). La lunghezza dell'ospedalizzazione era simile tra i due gruppi (mediana rispettivamente di 18 e 17 giorni, $p=0.66$), benché i pazienti nel gruppo HOPE fossero associati a un rischio inferiore di re-ricovero a 6 mesi (20% vs 38%, $p=0.04$).

L'incidenza di complicanze sia vascolari che biliari a 6 mesi era simile tra i due gruppi. I pazienti nel gruppo HOPE erano associati a tassi più esigui di rigetto acuto e/o cronico (4 vs 9 casi, $p=0.24$) e di complicanze cardiovascolari (3 vs 11 casi, $p=0.04$).

Un elenco dettagliato degli eventi avversi/complicanze a 6 mesi dopo OLT è mostrato nella tabella 3.

Il periodo di *follow-up* mediano è stato di 473 giorni (*range* interquartile [IQR] 236 – 618). Il tasso di *graft failure* a un anno era più alta nel gruppo SCS (2% vs 13%, $p=0.03$, ARD 0.109, 95% CI 0.014 – 0.204). Il test *log-rank* confermava che i pazienti del gruppo HOPE avevano una GS più alta a un anno ($p=0.03$), senza tuttavia identificare differenze tra i due gruppi per quanto riguarda la OS ($p=0.52$, test *log-rank*).

Variabili indicative di qualità dell'organo

Abbiamo analizzato i fattori associati con lo sviluppo di EAD. Variabili come l'utilizzo di HOPE, la macrosteatosi del *graft* e la durata intra-operatoria del trapianto sono risultati fattori predittori significativi all'analisi univariata; tra questi solo il primo e l'ultimo rimanevano significativamente associati allo sviluppo di EAD nel modello di regressione multivariato *stepwise* ($p=0.005$, ARD 0.234, 95% CI 0.087 – 0.382 e $p=0.009$, ARD -0.001, 95% CI -0.0001 – 0.001). I dettagli delle analisi univariata e multivariata sono mostrati nella tabella 4.

Abbiamo inoltre analizzato il ruolo dei parametri del perfusato, come pH, pO_2 , pCO_2 , glucosio e lattati all'inizio (T0) e alla fine (T1) del periodo di *flushing* e di perfusione del *graft* nel predire lo sviluppo di EAD nel gruppo HOPE. Solo il livello di lattati all'inizio e alla fine del *flushing* risultava essere un fattore indipendente di EAD all'analisi multivariata ($p=0.01$, ARD -0.011, 95% CI -0.285 – -0.007). I dettagli dell'analisi univariata e multivariata sono mostrati nella tabella 5.

Discussione

Questo studio è il primo *trial* randomizzato che dimostra un *outcome* migliore grazie alla HOPE dopo un periodo di SCS nei fegati provenienti da ECD.

Il *trial* ha raggiunto il suo *endpoint* primario, dimostrando una riduzione dell'EAD nel gruppo di studio e di conseguenza una migliore GS, cosa che non è ancora mai stata riportata in altri studi.

Un precedente studio randomizzato dimostrava una riduzione del picco delle transaminasi e una riduzione del tasso di EAD utilizzando la perfusione normotermica ossigenata, ma non erano state osservate differenze della GS tra i gruppi [17]. Un altro recente *trial* randomizzato mostrava una riduzione del tasso di complicanze biliari utilizzando la HOPE nei DCD, ma anche questa volta la GS non raggiungeva una differenza statisticamente significativa nei gruppi [9].

Questo *trial* introduce l'utilizzo di un sistema di macchina da perfusione ossigenata molto semplice attraverso la vena porta, applicato dopo un periodo di SCS convenzionale; la preservazione dinamica viene garantita inizialmente attraverso un periodo di *flushing* del *graft* durante la preparazione a banco e successivamente attraverso un periodo di ricircolo, così come già riportato precedentemente [10, 18]. Proprio grazie all'inizio della HOPE durante il *back-table*, senza la necessità di un trattamento HOPE ulteriore successivo, questa strategia riduce al minimo il tempo di ischemia fredda, fattore che è già stato correlato all'*outcome* del *graft* in molti studi precedenti [19-22] e probabilmente la combinazione tra brevi periodi di ischemia fredda e HOPE è il motivo di un inferiore tasso di EAD e una migliore GS, come riportato in questo *trial*.

Il miglioramento della funzione del *graft* nel gruppo di studio può portare a un ridotto tasso di complicanze post-operatorie e un tasso significativamente ridotto di re-ricovero del paziente dopo OLT, come osservato nella nostra coorte. Differentemente rispetto a quanto riportato in precedenti esperienze [6-9, 23], il tasso di complicanze biliari non differiva tra i due gruppi. Questo potrebbe essere spiegato dal tasso davvero basso di tali complicanze in entrambi i bracci di studio (13%) e dal fatto che nello studio non venivano inclusi i DCD. Per questo tipo di

donatore in Italia i centri trapianti effettuano sempre una perfusione *ex-situ* [19, 24] per mitigare il tempo di ischemia calda prolungato causato dai 20 minuti di *no-touch period* imposto dalla Legge, e per questo motivo non è possibile progettare un *trial* randomizzato in questo contesto.

I pazienti nella nostra coorte non avevano un MELD *score* elevato, poiché il *match* tra un fegato da ECD e riceventi particolarmente gravi è di solito evitato, così da ridurre il rischio di *failure* del trapianto [25]. Anche altri studi simili riportano questa evidenza, dove il MELD *score* mediano era da 13 a 16 [9, 17]. L'*outcome* eccellente del gruppo di studio potrebbe indurre a esplorare l'utilizzo di *graft* ECD anche in riceventi con MELD *score* elevati seguendo questo protocollo, al di fuori di una randomizzazione.

La strategia di effettuare un *flushing* durante il *back-table*, così da rimuovere citochine, è già stata riportata dal nostro gruppo in una serie di 10 fegati e 11 reni [18], mentre altri studi clinici e pre-clinici recentemente pubblicati hanno mostrato l'effetto protettivo del perfusato e dell'assorbimento di citochine durante la perfusione di rene e polmone [26, 27]. Differentemente da questi studi, in questo non viene utilizzato un filtro per molecole, ma effettuiamo un lavaggio del *graft* per una durata variabile tra i 30 e i 60 minuti (durata del *back-table*). Abbiamo visto come alcuni analiti del fluido perfusato siano associati all'EAD e una eventuale futura analisi di altre molecole potrebbe valutare la funzione del *graft* durante la perfusione ipotermica, come suggerito da altri studi [28].

Questo *trial* mostra una migliore GS; il costo delle procedure dello studio stesso quindi potrebbe essere giustificato dal migliore *outcome*. Inoltre la riduzione del tasso di re-OLT e di re-ricovero [29, 30] potrebbe confermare questo beneficio di analisi dei costi.

All'atto pratico la procedura dello studio è facile e riproducibile, come dimostrato dall'assenza di eventi avversi correlati direttamente alla perfusione; altri sistemi di perfusione *ex-vivo* presentano invece alcuni rischi di *graft failure* correlati alla procedura [31].

Una preoccupazione potrebbe essere destata dalla qualità dei donatori. Alcuni autori sostengono che un buon *outcome* trapiantologico possa essere raggiunto anche in assenza di un sistema di perfusione. Il DRI mediano nella nostra coorte è tuttavia più alto che in altri studi randomizzati simili [9, 17] e il migliore *outcome* riportato può giustificare anche un numero più elevato di organi da trattare per ottenere tale beneficio.

Questo ultimo concetto potrebbe essere la ragione per la quale la *end*-HOPE non è stata correlata a un miglioramento della funzione del *graft* e della GS in due recenti *trial* randomizzati per il trapianto di rene [32, 33]. Un aspetto importante che emerge da questi studi è la riduzione del tasso di rigetto acuto nel gruppo HOPE, cosa osservata anche nella nostra coorte (7% vs 14%), benché non sia raggiunta la significatività statistica.

Non è stata effettuata una biopsia protocollare nel periodo post-operatorio, ma tale tipo di monitoraggio – benché a rischio di sanguinamento – dovrebbe essere incluso in uno studio futuro, così da valutare eventuali cambiamenti istologici post-operatori.

Un ulteriore aspetto interessante è il potenziale effetto protettivo della HOPE nei confronti della recidiva tumorale per quanto riguarda i pazienti con HCC, come recentemente riportato [34]. In questa serie è stata osservata recidiva tumorale di HCC in un paziente su 30 nel gruppo di studio e in 4 su 35 nel gruppo di controllo, ma per qualsiasi analisi in tal senso è necessario un *follow-up* minimo di 2 anni e un *sample size* maggiore.

In conclusione, in questo studio viene riportato il primo *trial* randomizzato dell'applicazione della HOPE, erogata utilizzando un semplice *device*, con *flushing* e ricircolo, capace di ottenere un miglioramento della funzione del *graft* e della sua sopravvivenza, nel contesto degli ECD.

Bibliografia

1. Cucchetti A, Vitale A, Cescon M, *et al.* Can liver transplantation provide the statistical cure? *Liver Transpl.* 2014;20(2):210-217
2. Sistema Informativo Trapianti (SIT), <https://trapianti.sanita.it>
3. Schlegel A, Rougemont O De, Graf R, Clavien PA, Dutkowski P. Protective mechanisms of end-ischemic cold machine perfusion in DCD liver grafts. *J Hepatol.* 2013;58(2):278-286.
4. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988;45(4):673-676.
5. Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, *et al.* Characteristics associated with liver graft failure: The concept of a donor risk index. *Am J Transplant.* 2006;6(4):783-790.
6. Schlegel A, Muller X, Dutkowski P. Machine perfusion strategies in liver transplantation. *HepatoBiliary Surg Nutr.* 2019;8(5):490-501.
7. Schlegel A, Muller X, Dutkowski P. Hypothermic Machine Preservation of the Liver: State of the Art. *Curr Transplant Reports.* 2018;5(1):93-102.
8. Dutkowski P, Polak WG, Muiesan P, *et al.* First comparison of hypothermic oxygenated perfusion versus static cold storage of human donation after cardiac death liver transplants. *Ann Surg.* 2015;262(5):764-771.
9. van Rijn R, Schurink IJ, de Vries Y, *et al.* Hypothermic Machine Perfusion in Liver Transplantation — A Randomized Trial. *N Engl J Med.* 2021;384(15):1391-1401.
10. Ravaioli M, Maroni L, Angeletti A, *et al.* Hypothermic oxygenated perfusion versus static cold storage for expanded criteria donors in liver and kidney transplantation: Protocol for a single-center randomized controlled trial. *JMIR Res Protoc.* 2020;9(3):e13922.
11. Attia M, Silva MA, Mirza DF. The marginal liver donor - an update. *Transpl Int.* 2008;21(8):713-724.

12. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, *et al.* Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver Transplant.* 2010;16(8):943-949.
13. Avolio AW, Franco A, Schlegel A, *et al.* Development and Validation of a Comprehensive Model to Estimate Early Allograft Failure among Patients Requiring Early Liver Retransplant. *JAMA Surg.* 2020;155(12).
14. Agopian VG, Harlander-Locke MP, Markovic D, *et al.* Evaluation of early allograft function using the liver graft assessment following transplantation risk score model. *JAMA Surgery.* 2018;153(5):436-444. Erratum in *JAMA Surg* 2018;153(5):498.
15. Eerola V, Åberg F, Sallinen V. An unequivocal formula to calculate L-GrAFT-score is needed. *J Hepatol.* 2021; S0168-8278(21)00222-1.
16. Hartog H, Hann A, Perera MTPR. Primary Non-Function of the Liver Allograft. *Transplantation.* 2021. doi:10.1097/TP.0000000000003682.
17. Nasralla D, Coussios CC, Mergental H, *et al.* A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation. *Nature.* 2018;557(7703):50-56.
18. Ravaioli M, De Pace V, Angeletti A, *et al.* Hypothermic Oxygenated New Machine Perfusion System in Liver and Kidney Transplantation of Extended Criteria Donors: First Italian Clinical Trial. *Sci Rep.* 2020;10(1):6063. Erratum in: *Sci Rep.*2020;10(1):14658.
19. Dondossola D, Ravaioli M, Lonati C, *et al.* The role of ex-situ hypothermic oxygenated machine perfusion and cold preservation time in extended criteria DCD and DBD. *Liver Transpl.* Published online April 9, 2021. doi:10.1002/lt.26067.
20. Lozanovski VJ, Döhler B, Weiss KH, Mehrabi A, Süsal C. The Differential Influence of Cold Ischemia Time on Outcome After Liver Transplantation for Different Indications—Who Is at Risk? A Collaborative Transplant Study Report. *Front Immunol.* 2020;11:892.
21. Adam R, Bismuth H, Diamond T, *et al.* Effect of extended cold ischaemia

- with UW solution on graft function after liver transplantation. *Lancet*. 1992;340(8832):1373-1376.
22. Ravaioli M, Grande G, Di Gioia P, *et al*. Risk avoidance and liver transplantation a single-center experience in a national network. *Ann Surg*. 2016;264(5):778-786.
 23. Zhang Y, Zhang Y, Zhang M, Ma Z, Wu S, Tarantino G. Hypothermic machine perfusion reduces the incidences of early allograft dysfunction and biliary complications and improves 1-year graft survival after human liver transplantation: A meta-analysis. *Med (Baltimore)*. 2019;98(23):e16033.
 24. De Carlis R, Schlegel A, Frassoni S, *et al*. How to Preserve Liver Grafts From Circulatory Death With Long Warm Ischemia? A Retrospective Italian Cohort Study With Normothermic Regional Perfusion and Hypothermic Oxygenated Perfusion. *Transplantation*. Published online January 2021. doi:10.1097/TP.0000000000003595.
 25. Trapero-Marugán M, Little EC, Berenguer M. Stretching the boundaries for liver transplant in the 21st century. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2018;3(11):803-811.
 26. Ferdinand JR, Hosgood SA, Moore T, *et al*. Cytokine absorption during human kidney perfusion reduces delayed graft function–associated inflammatory gene signature. *Am J Transplant*. 2021;21(6):2188-2199.
 27. Iskender I, Arni S, Maeyashiki T, *et al*. Perfusate adsorption during ex vivo lung perfusion improves early post-transplant lung function. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2021;161(2):e109-e121.
 28. Muller X, Schlegel A, Kron P, *et al*. Novel Real-time Prediction of Liver Graft Function During Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion Before Liver Transplantation. *Ann Surg*. 2019;270(5):783-790.
 29. Paterno F, Wilson GC, Wima K, *et al*. Hospital utilization and consequences of readmissions after liver transplantation. *Surg*. 2014;156(4):871-878.

30. Webb AN, Izquierdo DL, Eurich DT, Shapiro AMJ, Bigam DL. The Actual Operative Costs of Liver Transplantation and Normothermic Machine Perfusion in a Canadian Setting. *Pharmacoecon Open*. 2021;5(2):311-318.
31. Bral M, Gala-Lopez B, Bigam D, *et al*. Preliminary Single-Center Canadian Experience of Human Normothermic Ex Vivo Liver Perfusion: Results of a Clinical Trial. *Am J Transplant*. 2017;17(4):1071-1080.
32. Husen P, Boffa C, Jochmans I, *et al*. Oxygenated End-Hypothermic Machine Perfusion in Expanded Criteria Donor Kidney Transplant: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Surg*. 2021; 1;156(6):517-525
33. Jochmans I, Brat A, Davies L, *et al*. Oxygenated versus standard cold perfusion preservation in kidney transplantation (COMPARE): a randomised, double-blind, paired, phase 3 trial. *Lancet*. 2020;396(10263):1653-1662.
34. Mueller M, Kalisvaart M, O'Rourke J, *et al*. Hypothermic Oxygenated Liver Perfusion (HOPE) Prevents Tumor Recurrence in Liver Transplantation From Donation After Circulatory Death. *Ann Surg*. 2020;272(5):759-765.

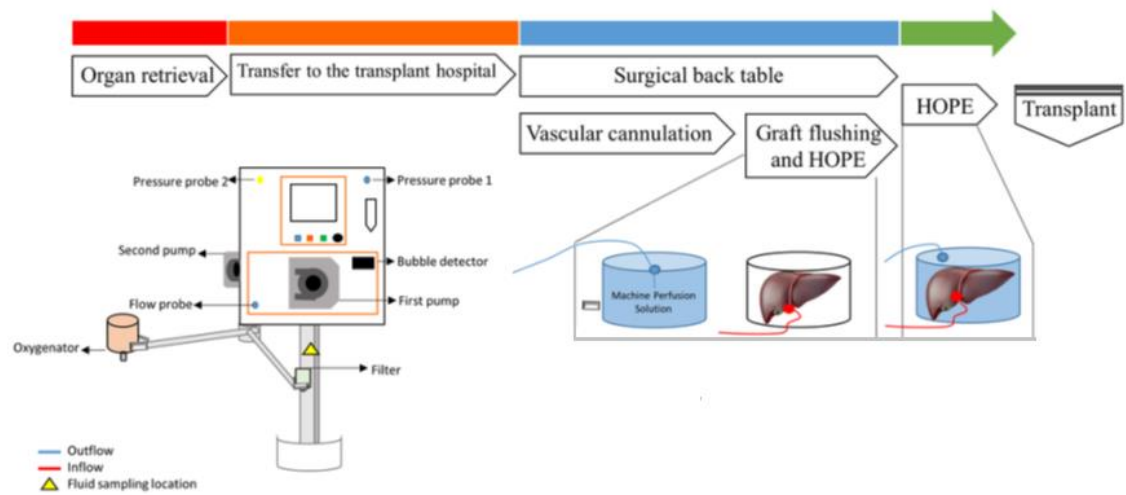


Figura 1. Algoritmo del protocollo di trattamento per il gruppo di studio, sottoposto a preservazione con perfusione ipotermica ossigenata (HOPE).

Tabella 1. Caratteristiche *baseline* dei donatori e dei riceventi

| | | gruppo HOPE (n=55) | gruppo SCS (n=55) |
|---|----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| <u>Riceventi</u> | | | |
| Età | Mediana | 57 | 60 |
| | IQR | 47-65 | 53-66 |
| Sesso maschile – n. (%) | | 41 (74%) | 39 (71%) |
| BMI | Mediana | 25.4 | 25.3 |
| | IQR | 22.9 – 28.7 | 22.5 – 28.4 |
| Eziologia | | | |
| <i>Epatopatia colestatica</i> | | 7 | 2 |
| <i>Virale</i> | | 7 | 10 |
| <i>Alcoolica</i> | | 2 | 5 |
| <i>Dismetabolica</i> | | 3 | 0 |
| <i>Autoimmune</i> | | 2 | 1 |
| <i>Tumori</i> | | | |
| | Cirrosi complicata da HCC | 30 | 35 |
| | Altri tumori | 2 | 0 |
| <i>Altro</i> | | 2 | 2 |
| MELD score | Mediana | 15 | 14 |
| | IQR | 10 - 18 | 9 - 20 |
| Pregressa chirurgia addominale – n. (%) | | 38 (69%) | 31 (56%) |
| Trombosi portale – n. (%) | | 13 (24%) | 12 (22%) |
| HCC | | 30 (55%) | 35 (64%) |
| <u>Caratteristiche della preservazione</u> | | | |
| Tempo di ischemia fredda (min) | Mediana | 400 | 480 |
| | IQR | 435 – 530 | 430-525 |
| Tempo di trattamento in macchina da perfusione (min) | Mediana | 145 | - |
| | IQR | 120 - 185 | |
| <u>Donatori</u> | | | |
| Età | Mediana | 76 | 72 |
| | IQR | 64 – 81 | 59 – 77 |
| Sesso maschile – n. (%) | | 31 (56%) | 33 (60%) |
| BMI | Mediana | 26.0 | 26.0 |
| | IQR | 23.7 – 29.3 | 24.0 – 27.8 |
| Macrosteatosi (%) – mediana (IQR) | | 2 (0 – 10) | 2 (0 – 10) |
| Microsteatosi (%) – mediana (IQR) | | 5 (0 – 10) | 5 (0-10) |
| Fibrosi (Metavir) – mediana (IQR) | | 1 (1 – 1) | 1 (1 – 1) |
| Fibrosi (stadio di Ishak) – mediana (IQR) | | 2 (1 – 2) | 1 (1 – 2) |
| Donor Risk Index (DRI) | Mediana | 1.846 | 1.766 |
| | IQR | 1.719 – 1.908 | 1.545 – 1.908 |

Tabella 2. Endpoint primari e secondari

| | Gruppo HOPE (n=55) | Gruppo SCS (n=55) | Adjusted Risk Difference (95% CI) | p |
|---|---------------------------|--------------------------|--|----------|
| EAD – n. (%) | 7 (13%) | 19 (35%) | 0.218 (0.065 – 0.372) | 0.007 |
| <i>Unadjusted</i> ARD | | | | 0.005 |
| <i>Adjusted</i> ARD | | | 0.220 (0.065 – 0.375) | 0.006 |
| EASE score | | | | |
| Mediana | -3.300 | -3.500 | - | 0.63 |
| IQR | -3.80 – -2.80 | -4.10 – -2.60 | | |
| <i>Extremely low/Low Risk</i> | 54 (98%) | 49 (89%) | | 0.05 |
| <i>Intermediate or higher Risk</i> | 1 (2%) | 6 (11%) | | 0.05 |
| ARD | | | 0.091 (0.001 – 0.181) | |
| PNF – n. (%) | 0 (0%) | 2 (4%) | - | 0.49 |
| Re-OLT – n. (%) | 0 (0%) | 6 (11%) | - | 0.03 |
| Sindrome da riperfusione – n. (%) | 30 (55%) | 26 (47%) | - | 0.45 |
| Durata degenza post-OLT (giorni) | | | | |
| Median | 18 | 17 | - | 0.66 |
| IQR | 15 – 28 | 11 – 41 | | |
| Durata degenza in terapia intensiva (giorni) | | | | |
| Median | 4 | 4 | - | 0.50 |
| IQR | 3 – 8 | 3 – 6 | | |
| Complicanze biliari o vascolari – n. (%) | 9 (16%) | 12 (22%) | - | 0.47 |
| <i>Graft failure</i> a 1 anno – n. (%) | 1 (2%) | 7 (13%) | 0.110 (0.014 – 0.204) | 0.05 |
| CCI ≥3b – n. (%) | 12 (22%) | 18 (33%) | - | 0.20 |

Tabella 3. Elenco dettagliato degli eventi avversi/complicanze a 6 mesi dopo OLT

| | Gruppo HOPE (n=55) | Gruppo SCS (n=55) | p |
|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------|
| Epatiche | | | |
| <i>fistola biliare</i> | 2 (4%) | 1 (2%) | <i>n. s.</i> |
| <i>stenosi biliare</i> | 2 (4%) | 2 (4%) | <i>n. s.</i> |
| <i>altre complicanze biliari</i> | 3 (5%) | 4 (7%) | <i>n. s.</i> |
| <i>aneurisma arteria epatica</i> | 1 (2%) | 0 (0%) | <i>n. s.</i> |
| <i>trombosi arteria epatica</i> | 1 (2%) | 0 (0%) | <i>n. s.</i> |
| <i>trombosi vene sovra-epatiche</i> | 0 (0%) | 2 (4%) | <i>n. s.</i> |
| <i>stenosi cavale</i> | 0 (0%) | 2 (4%) | <i>n. s.</i> |
| <i>trombosi portale</i> | 0 (0%) | 1 (2%) | <i>n. s.</i> |
| <i>dysfunction</i> | 9 (16%) | 21 (38%) | <i>0.01</i> |
| <i>rigetto</i> | 4 (7%) | 9 (16%) | <i>n. s.</i> |
| Infettive | 35 (64%) | 35 (64%) | |
| <i>batteriemie</i> | 16 (14%) | 10 (18%) | |
| <i>polmonari</i> | 5 (9%) | 10 (18%) | |
| <i>biliari</i> | 1 (2%) | 5 (9%) | <i>n. s.</i> |
| <i>addominali</i> | 4 (7%) | 1 (2%) | |
| <i>vie urinarie</i> | 2 (4%) | 1 (2%) | |
| <i>ferita</i> | 2 (4%) | 2 (4%) | |
| <i>altro</i> | 6 (10%) | 6 (10%) | |
| Cardio-vascolari | 3 (5%) | 11 (20%) | |
| <i>aritmia</i> | 1 (2%) | 6 (10%) | |
| <i>embolia polmonare</i> | 0 (0%) | 3 (5%) | <i>0.04</i> |
| <i>trombosi venosa profonda</i> | 2 (4%) | 1 (2%) | |
| <i>altro</i> | 0 (0%) | 1 (2%) | |
| Gastro-intestinali – n. | 4 (7%) | 4 (7%) | <i>n. s.</i> |
| Urinarie | 16 (29%) | 23 (42%) | |
| <i>insufficienza renale</i> | 15 (27%) | 20 (37%) | <i>n. s.</i> |
| <i>altro</i> | 1 (2%) | 3 (5%) | |
| Respiratorie – n. | 2 (4%) | 5 (9%) | <i>n. s.</i> |
| Raccolte | 20 (36%) | 22 (40%) | |
| <i>addominali</i> | 11 (20%) | 11 (20%) | <i>n. s.</i> |
| <i>pleuriche</i> | 9 (16%) | 11 (20%) | |
| Emorragiche – n. | 13 (24%) | 10 (18%) | <i>n. s.</i> |
| Altre | 10 (18%) | 8 (13%) | <i>n. s.</i> |
| Re-intervento | 6 (10%) | 7 (12%) | <i>n. s.</i> |
| Re-ricovero | 11 (20%) | 21 (38%) | <i>0.04</i> |

Tabella 4. Analisi univariata e multivariate delle variabili predittive lo sviluppo di EAD

| Variabile | Regressione logistica univariata | | Regressione multivariata <i>stepwise</i> | |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------|--|-------|
| | ARD (CI 95%) | p | ARD (CI 95%) | p |
| HOPE | 0.22 (0.07-0.37) | 0.009 | 0.23 (0.09 – 0.38) | 0.005 |
| Età | - | <i>n. s.</i> | | |
| Sesso | - | <i>n. s.</i> | | |
| BMI | - | <i>n. s.</i> | | |
| Trombosi portale | - | <i>n. s.</i> | | |
| MELD score | - | <i>n. s.</i> | | |
| Macrosteatosi | -0.01 (-0.15 - -0.01) | 0.033 | <i>n. s.</i> | |
| Microsteatosi | -0.06 (-0.01 - -0.01) | 0.078 | <i>n. s.</i> | |
| Fibrosi (Metavir) | - | <i>n. s.</i> | | |
| Fibrosi (stadio di Ishak) | - | <i>n. s.</i> | | |
| DRI | 0.33 (0.21 – 0.46) | 0.079 | <i>n. s.</i> | |
| CIT | - | <i>n. s.</i> | | |
| Durata operatoria | -0.01 (-0.003 - 0.01) | 0.02 | -0.01 (-0.01 - 0.001) | 0.009 |

Tabella 5. Analisi univariata e multivariata delle variabili di perfusione predittive lo sviluppo di EAD

| Variabile | | Regressione logistica univariata | | Regressione multivariata <i>stepwise</i> | |
|------------------|--------------|----------------------------------|-----------------------|--|---------|
| | | ARD (CI 95%) | P value | ARD (CI 95%) | P value |
| Flushing | | | | | |
| pH | a T0 a T1 | - | <i>n. s.</i> | | |
| pCO ₂ | a T0 a T1 | -0.001 (-0.004 – 0.002) | <i>n. s.</i> 0.009 | <i>n. s.</i> | |
| pO ₂ | a T0 a T1 | - | <i>n. s.</i> | | |
| Glucosio | a T0 a T1 | -0.002 (-0.005 – 0.001) | <i>n. s.</i> 0.053 | <i>n. s.</i> | |
| Lattati | a T0 a T1 | -0.011 (-0.285 – 0.007) | <i>n. s.</i> 0.012 | -0.011 (-0.285 – 0.007) | 0.012 |
| Ricircolo | | | | | |
| pH | a T0 a T1 | - | <i>n. s.</i> | | |
| pCO ₂ | a T0 a T1 | - | <i>n. s.</i> | | |
| pO ₂ | a T0 a T1 | - | <i>n. s.</i> | | |
| Glucosio | a T0 a T1 | - | <i>n. s.</i> | | |
| Lattati | a T0 a T1 | 0.011 (-0.025 – 0.003) | <i>n. s.</i> 0.014 | <i>n. s.</i> | |