

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI BOLOGNA
ALMA MATER STUDIORUM

Dottorato in Scienze Cardio-Nefro-Toraciche

Direttore: Prof. Gaetano Domenico Gargiulo

Milano, 03/11/2022

Oggetto:

Relazione finale del candidato Dr.ssa Ilaria Righi

III anno del Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Cardio-Nefro-Toraciche XXXIV
ciclo

e-mail: ilaria.righi78@gmail.com

tel: 3470556707

Curriculum: Malattie dell'apparato respiratorio/chirurgia toracica

Titolo del Progetto

Effetto dell' ormone tiroideo (T3) durante ex vivo lung perfusion (EVLP) sul polmone di ratto: valutazione dell'azione protettiva nel danno da ischemia-riperfusion.

Stato finale del Progetto

Background

Il trapianto di polmone è l'unico trattamento dell'end-stage lung disease. La carenza di organi limita il numero di trapianti, causando un tasso di mortalità in lista del 15%, e il danno ischemico del donatore condiziona la funzione dell'organo trapiantato. La perfusione polmonare extra corporea (EVLP, ex vivo lung perfusion) è una tecnica in uso dal 2010 atta a valutare e migliorare la qualità dell'organo da trapiantare (graft) e il danno da ischemia-riperfusion (IRI, ischemia reperfusion injury) del graft. Tale perfusione avviene utilizzando la soluzione di Steen, protetta da brevetto, la cui composizione è solo parzialmente conosciuta (elettroliti, albumina umana, destrano). Precedenti studi hanno evidenziato il ruolo protettivo della tri-iodotironina (T3) sul tessuto polmonare danneggiato (i.e. in caso di stress respiratorio acuto), ma il beneficio sul polmone del donatore è poco conosciuto.

Scopo

Lo scopo di questo progetto è di identificare gli effetti del T3 sul danno da ischemia-riperfusion polmonare ex vivo, in un modello di ratto di donatore a cuore non battente, tramite la sua titolazione all'interno della soluzione di Steen. L'effetto del T3 verrà testato sul metabolismo cellulare mitocondriale e sulla funzione polmonare.

Materiali e metodi

Gli animali (40) sono stati randomizzati in otto gruppi (n°5 animali/gruppo, Tab.1). La composizione del circuito di perfusione ed il protocollo EVLP utilizzato sono stati precedentemente descritti e standardizzati presso il nostro centro. Effetto sulla funzione polmonare: è stato valutato tramite compliance polmonare, pressione arteriosa polmonare media, pressione positiva di fine espirazione (PEEP), pressione di picco inspiratoria, resistenze vascolari polmonari totali.

Campioni di soluzione di perfusione vengono raccolti a 45, 60, 120 e 180 minuti di EVLP per eseguire gas analisi, dosaggio dei mediatori dell'inflammatione, DNA mitocondriale libero, freeT3 e freeT4. Al termine dell'EVLP campioni di tessuto polmonare sono stati prelevati e congelati per dosaggio ATP, perossidasi lipidica ROS-indotta, espressione genica, DNA mitocondriale (QIAamp® DNA Mini Kit.), T3. Non venendo fornite le concentrazioni dal produttore, abbiamo analizzato acidi grassi liberi, vitamine, ormoni e composizione chimico-fisica della soluzione di Steen prima di ogni manipolazione e nel perfusato a 60', 120',180'.

Gruppi Fase Preclinica	
Nativi	Polmoni prelevati dopo induzione anestesia
Ischemia	60' ischemia calda + flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 60' ischemia fredda
EVLP (Sham)	Flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 180' EVLP
EVLP-1 T3 (Sham-1T3)	Flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 180' EVLP con aggiunta ormone T3 con supplemento di 650 mcg/l di ormone tiroideo nella soluzione di perfusione (corrispondente a una concentrazione 1 µM)
EVLP-1,5 T3 (Sham-1,5T3)	Flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 180' EVLP con aggiunta ormone T3 con supplemento di 650 mcg/l di ormone tiroideo nella soluzione di perfusione (corrispondente a una concentrazione 1,5 µM)
EVLP ischemia	60' ischemia calda + flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 60' ischemia fredda + 180' EVLP
EVLP ischemia-1T3	60' ischemia calda + flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 60' ischemia fredda + 180' EVLP con supplemento di 650 mcg/l di ormone tiroideo nella soluzione di perfusione (corrispondente a una concentrazione 1 µM)
EVLP ischemia-1,5T3	60' ischemia calda + flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 60' ischemia fredda + 180' EVLP con supplemento di 975 mcg/l di ormone tiroideo nel perfusato (corrispondente a una concentrazione 1,5 µM)

Tab.1

Risultati

La soluzione di Steen commerciale contiene albumina umana a concentrazione doppia rispetto al siero umano (7.5-8 g/dl): le concentrazioni di fT4 e fT3 sono il doppio ed il triplo di quelle nel siero umano e derivano dal displacement degli ormoni dall'albumina. La concentrazione di fT4 ed fT3 non si sono modificate in modo significativo durante l'EVLP.

La concentrazione di FMN (flavin-mononucleotide), marcatore di danno mitocondriale, aumenta nel gruppo ischemico dimostrando la validità del modello. La Steen ha elevata fluorescenza a causa della alta concentrazione di molecole aromatiche al suo interno (ormoni), mai precedentemente descritti in letteratura. La concentrazione di NADH nel perfusato aumenta con il danno ischemico e nel gruppo trattato con T3 a maggior titolazione.

L'analisi del numero di copie di mtDNA mostra nei gruppi EVLP e EVLP T3, un accumulo progressivo di mtDNA nei campioni di perfusato in modo tempo dipendente.

Conclusioni

Il modello EVLP è già validato nella perfusione del graft polmonare, ma risulta necessario approfondire l'effetto della Steen in termini di ormoni e analiti presenti nella soluzione. Dai nostri risultati l'effetto sul IRI dell'EVLP sembra essere influenzato negativamente dal ruolo di carrier ormonale dell'albumina e dalla concentrazione di ormone tiroideo (T3) presenti nella Steen, dato che descriviamo per la prima volta in letteratura. L'ulteriore aggiunta di T3 provoca un aumento di NADH e ATP che correla con maggiore disfunzione mitocondriale e infiammazione. Il progressivo aumento del numero di copie di mtDNA è indotto dall'IRI in modo tempo-dipendente. Questa osservazione è in accordo con le misurazioni funzionali effettuate sul polmone, che suggeriscono un danno polmonare indotto dall'ischemia che non migliora durante EVLP. E' necessario proseguire l'esperimento utilizzando una soluzione di Steen costumizzata, che usa albumina ricombinante priva di sostanze chelate, in modo da poter titolare la T3 partendo dalla concentrazione minima efficace e valutarne l'effetto senza l'influenza di altri ormoni.

Attività di Ricerca

Articoli pubblicati

1° Anno (2019-2020)

1) Impact of Cold Ischemic Time on Airway Complications After Lung Transplantation: A Single-center Cohort Study

Mendogni P, Pieropan S, Rosso L, Tosi D, Carrinola R, Righi I, Damarco F, Musso V, Bonitta G, Morlacchi LC, Rossetti V, Nosotti M.

Transplant Proc. 2019 Oct 10. pii: S0041-1345(19)30579-2. [Epub ahead of print]
doi: 10.1016/j.transproceed.2019.04.092 - PMID: 31611126

2) Adaptation of lung, chest wall and respiratory muscles during pregnancy: preparing for birth

LoMauro A, Aliverti A, Frykholm P, Alberico D, Persico N, Boschetti G, DeBellis M, Briganti F, Nosotti M, Righi I.

J Appl Physiol (1985). 2019 Nov 7. [Epub ahead of print]
doi: 10.1152/jappphysiol.00035.2019 - PMID: 31697596

3) Transbronchial Cryobiopsies in Lung Allograft Recipients for Surveillance Purposes: Initial Results.

Mohamed S, Mendogni P, Tosi D, Carrinola R, Palleschi A, Righi I, Vaira V, Ferrero S, Daffrè E, Bonitta G, Diotti C, Pieropan S, Nosotti M, Rosso L.

Transplant Proc. 2020 Jun;52(5):1601-1604 Epub 2020 Mar 26
doi: 10.1016/j.transproceed.2020.02.052 - PMID: 32224013

4) Extracorporeal photopheresis as induction therapy after lung transplantation for cystic fibrosis: interim analysis

Righi I, Clerici M, Trabattoni D, Rosso L, Fenizia C, Magistrelli E, Diotti C, Prati D, Tarsia P, Torretta L, Nosotti M

The Journal of Heart and Lung Transplantation, 2020, vol. 39, issue 4, suppl aprile 2020 , pag. S107

doi: 10.1016/j.healun.2020.01.969

5) Sympatho–Vagal Dysfunction in Patients with End-Stage Lung Disease Awaiting Lung Transplantation

Tobaldini E, Rodrigues GD, Mantoan G, Monti A, Coti Zelati G, Cirelli C, Tarsia P, Morlacchi LC, Rossetti V, Righi I, Nosotti M, Da S. Soares PP, Montano N, Aliberti S, Blasi F

J. Clin. Med. 2020, 9(4), 1146;

doi: 10.3390/jcm9041146 - PMID: 32316428

6) The impaired diaphragmatic function after bilateral lung transplantation: A multifactorial longitudinal study.

LoMauro A, Righi I, Privitera E, Vergari M, Nigro M, Aliverti A, Frykholm P, Tarsia P, Morlacchi L, Nosotti M, Palleschi A.

J Heart Lung Transplant. 2020 Aug;39(8):795-804 Epub 2020 Apr 21.

doi: 10.1016/j.healun.2020.04.010 - PMID: 32362476

7) The Series on "How to Deal with Early Stage Lung Cancer: Sublobar Resections as A Possible Choice (Report of the 2019 Spring Meeting of Italian Society of Thoracic Surgery)?

Righi I, Rosso L, Nosotti M

J Thorac Dis 2020 Jun;12(6):3341-3342. (editorial)

doi: 10.21037/jtd-2020-eslc-11 - PMID: 32642257

8) Fine needle aspiration wash out for thyroglobulin determination in the differential diagnosis of lung lesions

Righi I, Rosso L, Grosorio G, Fugazzola L

Endocrine 2020 Jun 6. Online ahead of print.

doi: 10.1007/s12020-020-02363-9 - PMID: 32506193

9) Characterization of the immune microenvironment in malignant pleural mesothelioma reveals prognostic subgroups of patients

N. Fusco, V. Vaira, I. Righi, E. Sajjadi, K. Venetis, G. Lopez, M. Castellani, L. Rosso, M. Nosotti, M. Clerici, S. Ferrero.

ISSN 2218-6751. - (2020). [Epub ahead of print]

2° Anno (2020-2021)

1) Usefulness of autofluorescence bronchoscopy in early diagnosis of airway complications after lung transplantation.

Mendogni P, Carrinola R, Gherzi L, Tosi D, Palleschi A, Righi I, Damarco F, Morlacchi LC, Bonitta G, Vaira V, Nosotti M, Rosso L. Sci Rep. 2020 Dec 18;10(1):22316.

doi: 10.1038/s41598-020-79442-4

PMID: 33339959

2) Evidence of Air Trapping During Ex Vivo Lung Perfusion: A Swine Experimental Lung Imaging and Mechanics Study.

Santini A, Fumagalli J, Merrino A, Protti I, Paleari MC, Montoli M, Dondossola D, Gori F, Righi I, Rosso L, Gatti S, Pesenti A, Grasselli G, Zanella A.

Transplant Proc. 2021 Jan-Feb;53(1):457-465. Epub 2020 Dec 16.

doi: 10.1016/j.transproceed.2020.10.016.

PMID: 33339649

3) Fine needle aspiration wash out for thyroglobulin determination in the differential diagnosis of lung lesions.

Righi I, Rosso L, Grisorio G, Fugazzola L.

Endocrine. 2021 Jan;71(1):253-255. Epub 2020 Jun 6.

doi: 10.1007/s12020-020-02363-9. PMID: 32506193

4) Uniportal and three-portal video-assisted thoracic surgery pulmonary lobectomy for early-stage lung cancer (UNIT trial): study protocol of a single-center randomized trial.

Mendogni P, Mazzucco A, Palleschi A, Rosso L, Righi I, Carrinola R, Damarco F, Privitera E, Fumagalli J, Bonitta G, Nosotti M, Tosi D.

Trials. 2021 Feb 25;22(1):163.

doi: 10.1186/s13063-021-05115-w

PMID: 33632284

5) Lung Transplantation for Acute Respiratory Distress Syndrome Related to COVID-19: The Lesson Learned from the First Two Cases

A. Palleschi, L. Rosso, D. Tosi, I. Righi, P. Mendogni, V. Musso, L. Morlacchi, V. Vaira, A. Muscatello, A. Bandera, E. Privitera, A. Scandroglio, T. De Feo, M. Cardillo, G. Grasselli, A. Pesenti, S. Ferrero, A. Gori, F. Blasi, A. Zangrillo, M. Nosotti

J Heart Lung Transplant. 2021 Apr; 40(4): S143–S144. Published online 2021 Mar 20

Abstract congresso ISHLT 2021

doi: 10.1016/j.healun.2021.01.441

PMCID PMC7979363

6) Effects of bilateral lung transplantation on cardiac autonomic modulation and cardiorespiratory coupling: a prospective study.

Tobaldini E, Rodrigues GD, Mantoan G, Monti A, Zelati GC, Furlan L, Tarsia P, Morlacchi LC, Rossetti V, Righi I, Rosso L, Nosotti M, Soares PPS, Montano N, Aliberti S, Blasi F.

Respir Res. 2021 May 21;22(1):156. Free PMC article.

doi: 10.1186/s12931-021-01752-6

PMID: 34020646

7) Perioperative identifications of non-palpable pulmonary nodules: a narrative review.

Imperatori A, Nardecchia E, Cattoni M, Mohamed S, Di Natale D, Righi I, Mendogni P, Diotti C, Rotolo N, Dominioni L, Rosso L.

J Thorac Dis. 2021 Apr;13(4):2524-2531. Free PMC article. Review.

doi: 10.21037/jtd-20-1712

PMID: 34012598

8) Immune Checkpoints Expression in Chronic Lung Allograft Rejection

Righi I, Vaira V, Morlacchi LC, Croci GA, Rossetti V, Blasi F, Ferrero S, Nosotti M, Rosso L, Clerici M

Front. Immunol., 13 August 2021

doi: 10.3389/fimmu.2021.714132

3° Anno (2021-2022)

1) Lung Biomolecular Profile and Function of Grafts from Donors after Cardiocirculatory Death with Prolonged Donor Warm Ischemia Time

Gori F, Fumagalli J, Lonati C, Carlin A, Leonardi P, Biancolilli O, Rossetti A, Righi I, Tosi D, Palleschi A, Rosso L, Morlacchi LC, Blasi F, Vivona L, Florio G, Scaravilli V, Valenza F, Zanella A, Grasselli G.

J Clin Med. 2022 May 29; 11(11): 3066. doi: 10.3390/jcm11113066
PMID: 35683455

2) Robotic Surgery Ergonomics Challenge.

How surgical robotic systems can help to reduce the physical toll experienced by surgeons and provide a more comfortable quality of working life for surgical teams.

Lorenzo Rosso, Margherita Cattaneo, Ilaria Righi, Margherita Brivio, Mario Nosotti – In press

Partecipazione a meetings internazionali, seminari e corsi nei tre anni di dottorato
Abstracts e partecipazione a congressi come relatore

1) The use of sub-xiphoid uniportal lobectomy in large lung lesions

S. Mohamed, L. Rosso, I. Righi, M. Nosotti

XIX Congresso Nazionale SICE (Società Italiana Chirurgia Endoscopica e Nuove Tecnologie) Chirurgia Mininvasiva e Nuove Tecnologie al servizio dell'uomo – Ancona, 30 settembre / 1 ottobre 2019 - *poster*

2) L'utilizzo del navigatore endobronchiale per la marcatura preoperatoria dei noduli polmonari non palpabili: un'esperienza preliminare monocentrica

I. Righi, A. Palleschi, D. Tosi, P. Mendogni, S. Mohamed, C. Diotti, M. Nosotti, L. Rosso

XIX Congresso Nazionale SICE (Società Italiana Chirurgia Endoscopica e Nuove Tecnologie) Chirurgia Mininvasiva e Nuove Tecnologie al servizio dell'uomo – Ancona, 30 settembre / 1 ottobre 2019 - *poster*

3) Extracellular vesicles and lung transplantation: new prospective in the evaluation of injury and function of the graft

I. Righi, L. Lazzari, M. Barilani, G. Buono, C. Diotti, F. Damarco, M. Nosotti, L. Rosso

19th ESOT Congress – Copenhagen, 15/18 settembre 2019

Transplantation International, vol. 32, suppl. 2, ottobre 2019 (abstract 19th ESOT Congress)

Poster BOS419 – pag. 247

4) Biopsie transbronchiali con criosonda per la sorveglianza del rigetto nel trapianto polmonare: risultati iniziali

S. Mohamed, L. Rosso, D. Tosi, P. Mendogni, R. Carrinola, A. Palleschi, I. Righi, S. Ferrero, E. Daffre', C. Diotti, S. Pieropan, M. Nosotti

XX Congresso Nazionale SIET Società Italiana Chirurgia Toracica

Pisa, 10/12 ottobre 2019 (abstract book, pag. 15)

5) Biopsie transbronchiali con criosonda per la sorveglianza del rigetto nel trapianto polmonare: risultati iniziali

S. Mohamed, L. Rosso, D. Tosi, P. Mendogni, R. Carrinola, A. Palleschi, I. Righi, S. Ferrero, E. Daffre', C. Diotti, S. Pieropan, M. Nosotti

43° Congresso Nazionale SITO Società Italiana Trapianti d'Organo e di Tessuti

Roma, 21/23 novembre 2019

Abstract book pag. 1

6) Trapianto di polmone da donatore a cuore fermo controllato e non controllato. Esperienza monocentrica

A. Palleschi, L. Rosso, D. Tosi, I. Righi, P. Mendogni, F. Damarco, V. Musso, P. Tarsia, A.

Zanella, M. Nosotti, S. Passamonti

43° Congresso Nazionale SITO Società Italiana Trapianti d'Organo e di Tessuti

Roma, 21/23 novembre 2019

Abstract book pag. 31

7) Valutazione regionale della funzionalità polmonare durante ex-vivo-lung-perfusion (EVLP): studio preclinico

E. Chiodaroli, G.M. Ruggeri, M. Montoli, S. Pieropan, L. Vivona, M. Battistin, M. Rossetti, O. Biancolilli, I. Protti, I. Righi, L. Rosso, A.M. Pesenti, A. Zanella

43° Congresso Nazionale SITO Società Italiana Trapianti d'Organo e di Tessuti

Abstract book pag. 33

Roma, 21/23 novembre 2019

8) Immune Checkpoints In Lung Transplantation: A Preliminary Study

1st ESTS Virtual Congress 2-3 October 2020

Ilaria Righi, Valentina Vaira, Lorenzo Rosso, Stefano Ferrero, Cristina Diotti, Letizia Morlacchi, Margherita Cattaneo, Mario Nosotti, Francesco Blasi, Mario Clerici

9) Prospective Study of Comparison between Transbronchial Forceps Biopsy and Cryoprobe in the Diagnosis of Acute Rejection after Lung Transplantation

E. Daffrè, D. Tosi, R. Carrinola, I. Righi, F. Damarco, P. Mendogni, A. Palleschi, M. Nosotti, A. Mazzucco, C. Diotti, L. Rosso

ISHLT 2021 Annual Meeting and Scientific Sessions – Virtual Experience

Congresso online, 24/28 aprile 2021

10) Immune Checkpoint Expression Associates with Rejection in Lung Transplant Recipients

I. Righi, V. Vaira, L. Rosso, L. Morlacchi, M. Cattaneo, S. Ferrero, F. Blasi, M. Nosotti, M. Clerici

ISHLT 2021 Annual Meeting and Scientific Sessions – Virtual Experience

Congresso online, 24/28 aprile 2021

11) Lung Transplantation after Covid-9: first italian experience

A. Palleschi, L. Rosso, D. Tosi, M. Mendogni, I. Righi, V. Musso, L.C. Morlacchi, V. Vaira, A. Bandera, E. Privitera, M. Scandroglio, T. De Feo, M. Cardillo, A. Pesenti, G. Grasselli, A. Gori, S. Ferrero, F. Blasi, A. Zangrillo, M. Nosotti

ESOT Congress 2021 (European Society for Organ Transplantation)

Milano, 29 agosto/1 settembre 2021

Abstract n. 1639

12) Valutazione del dolore postoperatorio dopo lobectomia VATS uniportale e triportale: risultati di uno studio randomizzato controllato

D. Tosi, A. Mazzucco, G. Bonitta, L. Rosso, A. Palleschi, I. Righi, P. Mendogni, R. Carrinola, F. Damarco, M. Nosotti

37° Congresso SICT 2021

L'Aquila, 30 settembre/2 ottobre 2021

13) Bilateral lung transplantation in severe chest asymmetry: case series from a single center

Rosso L, Mendogni P, Palleschi A, Tosi D, Righi I, Grasselli G, Zanella A, Rossetti V,

Damarco F, Mazzucco A, Nosotti M

42nd ISHLT Annual Meeting and Scientific Sessions – Boston, 27/0 aprile 2022

The Journal of Heart and Lung Transplantation, Vol 41, No 4S, April 2022 (pag
s266)

Doi: 10.1016/j.healun.2022.01.653

14) Altered lipid metabolism in the follow up of cystic fibrosis lung transplant patients

Rosso L, Alessandra M, Pivari F, Zululeta A, Caretti A, Signorelli P, Paroni RC,
Righi I, Vaira V, Morlacchi L, Dei Cas M, Nosotti M

42nd ISHLT Annual Meeting and Scientific Sessions – Boston, 27/0 aprile 2022

The Journal of Heart and Lung Transplantation, Vol 41, No 4S, April 2022 (pag
s486)

Doi: 10.1016/j.healun.2022.01.1230

15) Lung Transplantation and Extracorporeal Photopheresis as Induction Therapy in Cystic Fibrosis Patients: Immune System Profile Changes

Righi I, Trabattoni D, Fenizia C, Morlacchi L, Rossetti V, Rosso L, Diotti C,
Nosotti M,

Torretta L, Clerici M

42nd ISHLT Annual Meeting and Scientific Sessions – Boston, 27/0 aprile 2022

The Journal of Heart and Lung Transplantation, Vol 41, No 4S, April 2022 (pag
s125)

Doi: 10.1016/j.healun.2022.01.293

16) Triportal anatomical pulmonary resection with a new robotic platform: early experience

Rosso L, Cattaneo M, Righi I, Tosi D, Diotti C, Mendogni P, Nosotti M

30th ESTS Meeting – L’Aia, 19/21 giugno 2022

17) Case report and management of bilateral pneumothoraces following single cryoprobe transbronchial lung biopsy in lung transplant recipient

Cattaneo M, Damarco F, Righi I, Rosso L, Nosotti M

30th ESTS Meeting – L’Aia, 19/21 giugno 2022

18) Lung transplantation from controlled and uncontrolled donation after circulatory death donors with prolonged ischemic times managed with ventilation

Palleschi A, Musso V, Tosi D, Morlacchi L, Rossetti V, Vaira V, Zanella A, Rosso L, Righi I, Mendogni P, Nosotti M

15th International Congress on Lung Transplantation – Parigi, 8/9 settembre 2022

19) Bilateral lung transplantation in severe chest asymmetry

Rosso L, Mendogni P, Palleschi A, Tosi D, Righi I, Grasselli G, Morlacchi L, Diotti C,

Mazzucco A, Nosotti M

15th International Congress on Lung Transplantation – Parigi, 8/9 settembre 2022

20) Altered Lipid Metabolism in the Follow Up of Cystic Fibrosis Lung Transplant

Patients

Righi I, Rosso L, Alessandra M, Pivari F, Zulueta A, Barcella M, Loretelli C, Caretti A,

Paroni R, Vaira V, Morlacchi L, Fiorina M, Folli F, Signorelli P, Nosotti M

15th International Congress on Lung Transplantation – Parigi, 8/9 settembre 2022

21) Immune checkpoints in lung transplantation: a preliminary study

Righi I, Vaira V, Rosso L, Ferrero S, Morlacchi L, Rossetti V, Nosotti M, Cattaneo M,

Musso V, Clerici M

15th International Congress on Lung Transplantation – Parigi, 8/9 settembre 2022

Ricerche sperimentali in corso

Progetti di ricerca in cui la dottoranda risulta coinvolta:

- co-PI del progetto (comitato etico del 15/09/2018, reclutamento terminato) dal titolo: *Extracorporeal photopheresis as induction therapy to prevent acute rejection after lung transplantation in cystic fibrosis patients*. Studio interventistico non farmacologico.

L'obiettivo dello studio è verificare, nei pazienti affetti da fibrosi cistica sottoposti a trapianto di polmone, se la fotoferesi extracorporea usata come terapia di induzione faccia diminuire il tasso di rigetto acuto e cronico (end points primari: sopravvivenza, rigetto; end points secondari: sicurezza, efficacia della procedura proposta e tasso di infezioni). I risultati attesi sono la riduzione degli episodi di rigetto acuto nelle sue manifestazioni cliniche, istopatologiche e umorali.

- co-PI del progetto (comitato etico del 02/07/2019) dal titolo: *Generazione di nuovi modelli in vitro e in vivo di tumore del polmone non a piccole cellule per identificare nuove strategie terapeutiche per i pazienti affetti da queste patologie (GEMPOL)*. Studio non farmacologico biologico, prospettico di coorte, no profit

End-point primario: generare presso il Laboratorio di Biologia Molecolare dell'Istituto Mario Negri modelli *in vivo (PDX)* e *in vitro* (culture primarie e/o organoidi) di tumori del polmone non-microcitoma prelevati presso la UOC di Chirurgia toracica. End point secondario: trovare possibili determinanti di risposta alla terapia che potrebbero successivamente essere utilizzati in clinica.

- co-PI del progetto (comitato etico del 20/02/2020) dal titolo: *Studio del coinvolgimento del metabolismo lipidico nel rigetto del trapianto polmonare in pazienti affetti da Fibrosi Cistica (LIPOCIR)*. Studio interventistico non farmacologico.

L'endpoint primario è l'identificazione e quantificazione di markers associabili al rigetto del trapianto in pazienti affetti da Fibrosi Cistica. L'endpoint secondario è rappresentato dal confronto del regime alimentare seguito dai pazienti appartenenti allo stesso gruppo e successivamente, dal confronto tra pazienti dei due gruppi e quindi dall'associazione tra regime alimentare e le alterazioni lipidiche sistemiche/periferiche (polmonari).

Altre Pubblicazioni

Dionigi Chirurgia – settima edizione CHIRURGIA TORACICA

Autrice dei capitoli “Patologia non neoplastica”, “Altri tumori polmonari”, “Neoplasie secondarie del polmone”

Attività Societaria

- Active Member - European Society of Thoracic Surgery (ESTS)
- Active Member – International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT)
- Membro della Società Italiana di Chirurgia Toracica (SICT)

Attività di tutoraggio in ambito universitario:

- Tutore dei tirocini post laurea dell'Università degli Studi di Milano presso il Policlinico di Milano
- Professore a contratto della Scuola di Specialità di Chirurgia Toracica dell'Università degli Studi di Milano
- Tutor sul simulatore Lap-Sim per gli Specializzandi della Scuola di Specialità in Chirurgia Toracica
- Correlatore di Tesi di Laurea in Medicina e Chirurgia
- Panelist per la valutazione dei progetti di ricerca della Fondazione per la Scienza e la Tecnologia del governo portoghese (da Settembre 2020)

Attività Assistenziale

Dal 01/01/2013 contratto individuale di lavoro a tempo indeterminato e a rapporto esclusivo con posizione di Dirigente Medico in Chirurgia Toracica e dei Trapianti di Polmone presso la S.C. di Chirurgia Toracica, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

Dr.ssa Ilaria Righi

U.O. di Chirurgia Toracica e dei Trapianti di Polmone

Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

Prof. Niccolò Daddi

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

Alma Mater Studiorum Università degli Studi di Bologna

Tutor del Dottorando

Prof. Lorenzo Rosso

Dipartimento di Fisiopatologia Chirurgica e dei Trapianti

Università degli Studi di Milano

Co-Tutor

EFFETTO DELL'ORMONE TIROIDEO
(T3) DURANTE EX VIVO LUNG
PERFUSION (EVLP) SUL POLMONE DI
RATTO: VALUTAZIONE DELL'AZIONE
PROTETTIVA SUL DANNO DA
ISCHEMIA RIPERFUSIONE

CANDIDATO: Dr.ssa Ilaria Righi

U.O. di Chirurgia Toracica e dei Trapianti di Polmone

Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

Prof. Niccolò Daddi

Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche

Alma Mater Studiorum Università degli Studi di Bologna

Tutor del Dottorando

INDICE

1	INTRODUZIONE	22
2	PROGETTO DI RICERCA.....	24
2.1	BACKGROUND	25
2.2	IPOTESI	28
2.3	OBIETTIVI DELLO STUDIO	29
2.4	DISEGNO DELLO STUDIO	30
2.5	DATI PRELIMINARI.....	33
2.6	ANALISI STATISTICHE.....	34
3	MATERIALI E METODI.....	35
4	EVLP COME EVALUATION: LA FUNZIONE DEL GRAFT	51
4.1	RISULTATI	52
4.1.1	PARAMETRI VENTILATORI	53
4.1.2	PARAMETRI VASCOLARI	59
4.1.3	EDEMA POLMONARE	63
4.1.4	GAS ANALISI.....	64
5	VALUTAZIONE RISULTATI AD INTERIM.....	68
5.1	DNA MITOCONDRIALE.....	69
5.2	ANALISI BIOLOGICHE	70
5.3	ANALISI DELLA SOLUZIONE DI STEEN	73
5.4	TRANSCRITTOMICA	77
6	DISCUSSIONE	78
7	CONCLUSIONI E FUTURO DEL PROGETTO.....	85
	BIBLIOGRAFIA.....	87

1 INTRODUZIONE

Nell'ambito del trapianto degli organi solidi, il trapianto di polmone è la tipologia d'intervento chirurgico più recentemente sviluppata. Il primo trapianto di polmone è stato, infatti, effettuato nel 1963 da James Hardy; tuttavia, i primi tentativi in quest'ambito ebbero esito infausto e solo nel 1983 Frank Veith riuscì ad ottenere i primi successi terapeutici grazie all'introduzione di un nuovo immunosoppressore: la ciclosporina.

Oggi, la carenza di organi idonei al trapianto è il maggior fattore limitante per l'esecuzione ed il successo clinico di questa procedura chirurgica. Si stima, infatti, che solo il 15-20% dei potenziali polmoni provenienti da donatori multiorgano sia considerato idoneo al trapianto, ad una prima valutazione [1]. La perfusione polmonare ex vivo (Ex Vivo Lung Perfusion, EVLP) è una possibile e promettente strategia per far fronte a questo problema. La tecnica dell'EVLP è stata inizialmente sviluppata da Stig Steen e dai suoi collaboratori per valutare polmoni provenienti da donazioni dopo morte cardiaca [2]. Successivamente questa tecnica è stata implementata come metodo di preservazione e ricondizionamento di organi marginali prima di un possibile trapianto [3] [4] [5].

Il nostro Centro Trapianti, presso la U.O. di Chirurgia Toracica e Trapianti di Polmone della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, è stato il primo Centro italiano ad aver introdotto nella pratica clinica, a partire dal 2011, un protocollo di prelievo, valutazione e ricondizionamento mediante EVLP di polmoni marginali [6]. Da allora abbiamo prelevato 51 organi rifiutati da altri Centri Trapianti italiani perché considerati non idonei; di questi, 29 hanno migliorato la loro funzionalità durante il periodo di EVLP e sono stati trapiantati con successo in 30 pazienti, con un tasso di idoneità del 56.8%.

Per poter sviluppare adeguatamente tale protocollo e supportare l'uso clinico di questa procedura, presso il nostro Centro di Ricerca Chirurgica e Preclinica sono stati sviluppati modelli preclinici di EVLP, sia su grandi che su piccoli animali. Il modello suino (grandi animali), ampiamente usato in tutto il Mondo, ci permette di consolidare e migliorare le capacità tecniche, chirurgiche ed anestesologiche, grazie alle dimensioni anatomiche simili a quelle umane. Invece, lo sviluppo di un modello su piccoli animali (ratti) semplice e riproducibile [7] ci offre un sistema di studio e valutazione dei cambiamenti biomolecolari patofisiologici associati alla perfusione polmonare ex vivo [8].

2 PROGETTO DI RICERCA

2.1 BACKGROUND

Attualmente, il trapianto polmonare è ancora considerato il più problematico tra i trapianti d'organo solido dato il rapido deterioramento funzionale dell'organo, l'esigua disponibilità di organi a scopo trapiantologico, l'elevata mortalità in lista d'attesa (circa 15%) e percentuali di sopravvivenza a lungo termine non soddisfacenti (meno del 60% a 5 anni) [9].

Secondo i dati analizzati a livello mondiale, solo il 15-20% dei donatori multiorgano sono idonei per il prelievo ed il trapianto e questa bassa percentuale è dovuta soprattutto al rapido declino della funzione polmonare prima del prelievo [9] [10]. Inoltre, il danno da ischemia-riperfusion ha un ruolo fondamentale nello sviluppo della disfunzione primaria d'organo (Primary Graft Dysfunction, PGD) e nella disfunzione cronica dell'allograft polmonare (Chronic Lung Allograft Dysfunction, CLAD) [11]. In quest'ottica, uno degli strumenti sviluppati per superare le problematiche relative al danno da ischemia-riperfusion, all'esiguità del pool di donatori ed alla ridotta funzione polmonare, è la perfusione polmonare ex-vivo (Ex-Vivo Lung Perfusion, EVLP) che permette di preservare, valutare e ricondizionare i graft polmonari [12] [6].

In letteratura sono riportate numerose evidenze che l'ormone tiroideo (ovvero la 3,5,3'-triiodotironina T3 e la tiroxina T4) influenzi la fisiologia polmonare, sia animale (ad esempio nei ratti) [13] sia umana, in quanto è dimostrata la presenza a livello del tessuto polmonare di recettori per l'ormone tiroideo e di deiodinasi, ovvero enzimi in grado di convertire l'ormone T4 nella forma attiva T3. In uno studio è stato evidenziato come, durante stati settici, vi sia una riduzione dei livelli sierici di triiodotironina, associata ad un peggioramento della funzione polmonare [14]. È noto, infatti, che un danno d'organo severo a livello polmonare è associato ad una riduzione o assenza di triiodotironina a livello del parenchima polmonare. Inoltre, questo può associarsi ad un aumento del livello di deiodinasi a livello parenchimale polmonare, sia negli uomini che nei ratti, e portare ad un'incrementata produzione locale di ormone T3 in risposta a bassi livelli sierici circolanti dello stesso ormone [15].

Un gruppo di ricercatori ha dimostrato che l'ormone T3, instillato localmente all'interno delle vie aeree, in un modello murino, stimola una rapida clearance dei fluidi alveolari in polmoni con o senza danno polmonare [16].

La somministrazione di triiodotironina durante la perfusione ex-vivo cardiaca ha mostrato, durante ulteriori studi, di avere una chiara azione protettiva nei confronti del danno da ischemia-riperfusion [17]. È infatti noto che una disfunzione mitocondriale ha un ruolo chiave nella patogenesi del danno da ischemia-riperfusion e nella PGD [18] e la 3,5,3'-triiodotironina ha la capacità di bloccare il danno mitocondriale ed assicurare la sopravvivenza cellulare [19]. Infatti, la privazione di ossigeno durante il periodo ischemico arresta la fosforilazione ossidativa, facendo decrescere l'adenosina trifosfato (ATP) intracellulare, favorendo la glicolisi anaerobica e l'aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Durante la ri-perfusione, la presenza dell'ossigeno fa aumentare lo stress ossidativo che a sua volta peggiora il danno mitocondriale alterando la permeabilità della loro membrana esterna e portando all'apoptosi cellulare. Il danno culmina con l'attivazione della cascata necrotica. L'ormone tiroideo T3 agisce sulla funzione mitocondriale e sulla produzione energetica aumentando la sopravvivenza cellulare al danno da ischemia-riperfusion. Questi effetti della triiodotironina sono documentati anche in studi in vivo su modelli murini di fegato e reni [20] [21]. Da questa evidenza è nata l'ipotesi che il preconditionamento con l'ormone T3 riduca il danno da ischemia-riperfusion grazie alle proprietà anti-ossidative ed anti-infiammatorie dell'ormone stesso [21] [22].

Tuttavia, i dati sull'effetto terapeutico della somministrazione di 3-5-3'-triiodotironina in donatori multiorgano, in un setting clinico, è contraddittoria: studi retrospettivi hanno descritto effetti positivi sul numero di organi prelevati per donatore e sul tasso di sopravvivenza post-trapianto, mentre meta-analisi e studi prospettici hanno fornito dati opposti [23]. Nell'ultima consensus statement (2020) della International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT) sul prelievo di organi da donatore, la terapia ormonale sostitutiva con T3 è consigliata in caso di ridotta frazione di eiezione cardiaca, ma non viene menzionato in caso di ridotta funzione polmonare, cosa che invece sussiste con l'utilizzo di corticosteroidi.

Ciò che ancora non è stato indagato in studi precedenti, è l'effetto della somministrazione di ormone tiroideo T3 al graft polmonare isolato, durante EVLP. Questo potrebbe portare ad un aumento di graft polmonari idonei al trapianto e di conseguenza una riduzione di mortalità dei pazienti in lista d'attesa per trapianto polmonare. A tale scopo, gli effetti degli ormoni tiroidei devono essere studiati su modelli preclinici, in setting controllati, con team multidisciplinare, per poter poi avviare uno studio clinico che testi e confermi gli effetti positivi dell'ormone tiroideo sul ricondizionamento di polmoni a scopo trapiantologico nella pratica clinica quotidiana.

2.2 IPOTESI

Presso l'U.O. di Chirurgia Toracica e Trapianti di Polmone della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano è stato progettato uno studio preclinico prospettico randomizzato che testerà l'ipotesi iniziale per cui la somministrazione di ormone tiroideo, durante EVLP migliorerà la funzione del graft polmonare, riducendo il danno cellulare correlato al processo di ischemia-riperfusionazione.

Questa ipotesi è stata formulata basandosi sull'evidenza fornita da numerosi studi preclinici precedenti che hanno dimostrato il ruolo protettivo degli ormoni tiroidei in modelli animali con danni polmonari acuti da polmonite, sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS), ischemia miocardica e traumi toracici [24] [25]. Inoltre, ulteriori studi sperimentali hanno rivelato che gli ormoni tiroidei possono riattivare il metabolismo energetico mitocondriale a livello del miocardio stordito, migliorando la funzionalità dell'organo [26]. Tuttavia, c'è un importante gap nella conoscenza degli effetti della triiodotironina sul danno da ischemia-riperfusionazione durante il prelievo di polmone, a causa della mancanza di dati provenienti sia da modelli preclinici che da trials clinici. Infatti, non è descritto in letteratura l'effetto bioenergetico dell'ormone tiroideo su pneumociti con questo specifico danno cellulare e non sono riportati trials clinici che testino l'ormone T3 durante il ricondizionamento di graft polmonari marginali.

Per testare l'ipotesi centrale verrà utilizzato il modello di EVLP su ratto sviluppato presso il Centro di Ricerca Chirurgica e Preclinica della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico. Pertanto, lo scopo di questo studio è quello di stabilire quale sia il ruolo della 3-5-3'-triiodotironina (T3) nel danno da ischemia-riperfusionazione del graft polmonare, sia in termini di scambi gassosi che di compliance dell'organo. In secondo luogo verrà chiarito l'impatto dell'ormone tiroideo T3 nella riparazione del DNA mitocondriale (mtDNA) e nella riduzione del danno tissutale da stress ossidativo. Infine, questo studio è volto a dimostrare l'efficacia e la fattibilità clinica della somministrazione di triiodotironina durante EVLP.

2.3 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Il nostro studio si prefigge l'obiettivo di verificare l'effetto positivo degli ormoni tiroidei in un modello di ischemia-riperfusion in polmone di ratto. Questa ipotesi iniziale si testa somministrando la triiodotironina (T3) nella soluzione di perfusione durante EVLP e comparando i polmoni così ricondizionati con un gruppo controllo. Quindi, analizziamo l'effetto dell'ormone tiroideo sul danno del DNA mitocondriale, sullo stato infiammatorio, sulla produzione di ROS, sul contenuto di ATP, sui metaboliti, l'apoptosi e l'espressione genica e proteica.

Inoltre, nel medesimo modello animale, valutiamo l'effetto positivo dell'ormone tiroideo T3 sulla funzione respiratoria.

Infine, è nostro obiettivo verificare nella pratica clinica la fattibilità e la sicurezza della somministrazione degli ormoni tiroidei durante EVLP, valutandone il possibile effetto positivo sulla funzione polmonare ed il setting biologico al termine del periodo di ricondizionamento d'organo.

2.4 DISEGNO DELLO STUDIO

Tutti gli esperimenti preclinici sono eseguiti nel completo rispetto delle raccomandazioni della Guida per la Cura e il Benessere degli Animali da Laboratorio dell'Istituto Nazionale di Salute presso il nostro Centro di Ricerca Chirurgica e Preclinica. Inoltre, ogni provvedimento è stato preso per rispettare il principio delle 3R (Replacement, Refinement e Reduction, ovvero sostituzione, affinamento e riduzione) ed utilizzare il minor numero possibile di ratti per la fase sperimentale.

Gli animali sono assegnati secondo randomizzazione ad uno dei otto gruppi dello studio, 5 ratti per gruppo, per un totale di 40 animali.

I gruppi sono così progettati (Tabella 1):

1. Nativi: dopo l'induzione dell'anestesia, i polmoni vengono prelevati;
2. Ischemia: gli animali vengono sacrificati per dissanguamento. L'ischemia calda ha una durata di 60 minuti. Quindi, i polmoni vengono prelevati e sottoposti ad ulteriori 60 minuti di ischemia fredda;
3. EVLP (Sham): gli animali vengono sacrificati e immediatamente dopo la morte i polmoni vengono prelevati e ricondizionati mediante EVLP per 180 minuti;
4. EVLP-T3 (Sham 1T3): gli animali vengono sacrificati e immediatamente dopo la morte i polmoni vengono prelevati e sottoposti ad EVLP per 180 minuti, aggiungendo all'interno della soluzione di perfusione 650 mcg/l di 3-5-3'-triiodotironina [27].
5. EVLP-T3 (Sham 1,5T3): gli animali vengono sacrificati e immediatamente dopo la morte i polmoni vengono prelevati e sottoposti ad EVLP per 180 minuti, aggiungendo all'interno della soluzione di perfusione 975 mcg/l di 3-5-3'-triiodotironina.
6. EVLP ischemia: gli animali vengono sacrificati; dopo la morte i polmoni vengono sottoposti ad ischemia calda e fredda (come il gruppo Ischemia) e successivamente ricondizionati mediante EVLP per 180 minuti.
7. EVLP ischemia-1T3: gli animali vengono sacrificati e, dopo la morte, i polmoni vengono sottoposti ad ischemia calda e fredda (come il gruppo Ischemia) e,

successivamente, a 180 minuti di EVLP con supplemento di 650 mcg/l di ormone tiroideo nella soluzione di perfusione (corrispondente a una concentrazione 1 microMolare).

8. EVLP ischemia-1,5 T3-50%: gli animali vengono sacrificati e, dopo la morte, i polmoni vengono sottoposto ad ischemia calda e fredda (come il gruppo 2) e, successivamente, a 180 minuti di EVLP con supplemento di 975 mcg/l di ormone tiroideo nel perfusato (corrispondente a una concentrazione 1,5 microMolare).

Gruppi Fase Preclinica	
Nativi	Polmoni prelevati dopo induzione anestesia
Ischemia	60' ischemia calda + flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 60' ischemia fredda
EVLP (Sham)	Flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 180' EVLP
EVLP-1 T3 (Sham-1T3)	Flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 180' EVLP con aggiunta ormone T3 con supplemento di 650 mcg/l di ormone tiroideo nella soluzione di perfusione (corrispondente a una concentrazione 1 μ M)
EVLP-1,5 T3 (Sham-1,5T3)	Flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 180' EVLP con aggiunta ormone T3 con supplemento di 650 mcg/l di ormone tiroideo nella soluzione di perfusione (corrispondente a una concentrazione 1,5 μ M)
EVLP ischemia	60' ischemia calda + flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 60' ischemia fredda + 180' EVLP
EVLP ischemia-1T3	60' ischemia calda + flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 60' ischemia fredda + 180' EVLP con supplemento di 650 mcg/l di ormone tiroideo nella soluzione di perfusione (corrispondente a una concentrazione 1 μ M)
EVLP ischemia-1,5T3	60' ischemia calda + flushing con soluzione di perfusione + prelievo polmoni + 60' ischemia fredda + 180' EVLP con supplemento di 975 mcg/l di ormone tiroideo nel perfusato (corrispondente a una concentrazione 1,5 μ M)

Tabella 1 Progettazione dei Gruppi per la Fase Preclinica del progetto

La titolazione del T3 nel perfusato è stata stabilita in base a quanto riportato da Bhargava et al. [25], dove la concentrazione 1mcM di T3 risultava essere quella efficace per determinare l'aumento della clearance alveolare (somministrata tramite instillazione endobronchiale in un modello murino di danno alveolare). Quest'ultimo è l'unico modello presente in letteratura a cui fosse possibile fare riferimento per individuare la concentrazione di farmaco per il nostro studio. La concentrazione ematica di T3 totale nel ratto è uguale a quella dell'umano, ovvero 7.1 picoM/L.

La valutazione di fattibilità e sicurezza nella pratica clinica, se la fase di sperimentazione preclinica avrà dato esiti positivi, verrà eseguita avviando presso il nostro Centro Trapianti un trial clinico sui graft polmonari candidati a ricondizionamento mediante EVLP. Saranno eseguite complessivamente ventiquattro procedure di EVLP; pertanto, dodici organi da ricondizionare saranno assegnati, in seguito a randomizzazione, a ciascuno dei due gruppi dello studio (Tabella 2):

1. EVLP-Controllo: si esegue il ricondizionamento con EVLP secondo il protocollo attualmente validato presso il nostro Centro [6];
2. EVLP-T3: si esegue il ricondizionamento con EVLP, secondo il protocollo attualmente validato presso il nostro Centro, con supplemento nel liquido di perfusione di ormone tiroideo T3 nella dose adeguata per l'uomo, proporzionale alla concentrazione identificata nelle fasi precliniche dello studio [6].

Gruppi fase clinica	
EVLP-controllo	Ricondizionamento EVLP secondo protocollo del nostro Centro
EVLP-T3	Ricondizionamento EVLP con somministrazione ormone T3 nel liquido di perfusione

Tabella 2 Progettazione dei Gruppi per la Fase Clinica del progetto

Le caratteristiche dei donatori d'organo e la funzionalità polmonare prima del prelievo verranno raccolti in un database dedicato, così come i dati chirurgici intraoperatori ed i tempi di ischemia (calda, fredda e totale). La funzione polmonare del graft verrà valutata durante la procedura di EVLP, considerando i dati meccanici di ventilazione, lo scambio dei gas, le resistenze polmonari vascolari totali ed il peso stesso dei polmoni. Inoltre, verranno eseguite le medesime analisi biomolecolari, effettuate durante lo studio preclinico, sulla soluzione di perfusione dell'EVLP e biopsie di tessuto polmonare.

2.5 DATI PRELIMINARI

Il nostro Centro Trapianti effettua studi sperimentali su EVLP in modelli suini dal 2010. Con un primo modello si è dimostrato che peggiore è la funzione polmonare, maggiore è il consumo di glucosio durante EVLP; questa osservazione ha suggerito la necessità di studiare il metabolismo polmonare durante il ricondizionamento d'organo [28]. Successivamente si è dimostrato il ruolo, con possibile effetto protettivo, della somministrazione di salbutamolo in glucosata attraverso la soluzione di perfusione durante EVLP [29]. Per semplificare il modello e l'attività sperimentale è stato inoltre implementato un modello di EVLP su ratto [7]. Con questo modello sono stati investigati i cambiamenti biomolecolari, del tessuto polmonare, indotti dall'EVLP, su 15 ratti. Durante l'esperimento i polmoni erano assegnati ad uno di tre differenti gruppi: nativi; pre-EVLP (polmoni lavati con soluzione di perfusione e prelevati); post- EVLP (polmoni lavati con soluzione di perfusione, prelevati e perfusi ex vivo per 180 minuti). Il tessuto polmonare è stato studiato per quanto riguarda gli ambiti di espressione genica, pathway di signaling e contenuto di ATP. Si è quindi potuto osservare che l'EVLP ha indotto il rilascio di acido ialuronico a medio-alto peso molecolare e la trascrizione di sintetasi per l'acido ialuronico ($p < 0.001$) e l'aumento di rilascio di mediatori dell'infiammazione nel liquido di perfusione ($p < 0.001$). I polmoni perfusi hanno mostrato caratteristiche trascrizionali distintive rispetto ad organi analizzati prima o dopo il prelievo ($p = 0.003$). Infine, si è evidenziata un'up-regolazione di geni coinvolti nel processo infiammatorio e nella sua regolazione, nell'apoptosi, nello shock termico e nella risposta allo stress ossidativo [30].

2.6 ANALISI STATISTICHE

Sulla base della precedente letteratura, la minima differenza attesa, tra i gruppi, a livello di concentrazione media di mtDNA è di 50 ± 25 ng/ml. Pertanto, è necessario un totale di cinque animali per gruppo per individuare una differenza statisticamente significativa con un livello di significatività di 0.05 (two sided) e una potenza dell'80%.

Analogamente, attendiamo un parziale miglioramento della funzione polmonare, in seguito alla somministrazione di ormone tiroideo durante EVLP, tale da permetterci di riscontrare una differenza minima tra i gruppi di 40 ± 30 mmHg nella media di PaO₂/FiO₂.

Nella pratica clinica, il ricondizionamento mediante EVLP eseguito con il protocollo del nostro dipartimento ha mostrato un tasso di non idoneità dell'organo del 40% con un rapporto PaO₂/FiO₂ medio di 408 ± 109 mmHg. In seguito alla somministrazione di ormone tiroideo durante l'EVLP ci aspettiamo un miglioramento della funzione polmonare con una differenza minima nel PaO₂/FiO₂ medio, tra i due gruppi, di 50 ± 40 mmHg. Un totale di 12 procedure cliniche di EVLP per ogni gruppo sono necessarie per poter identificare una differenza statisticamente significativa tra i due gruppo (con p 0.05 two sided e potenza pari all'80%). L'assegnazione del graft di polmone a uno dei due gruppi sarà randomizzata e stratificata a seconda della tipologia di donatore multiorgano (donatore dopo morte cerebrale o cardiaca).

I risultati saranno presentati come medie o mediane, quando appropriato. Le differenze tra i gruppi sperimentali verranno investigate utilizzando un'analisi della varianza a due vie per misure ripetute o un'ANOVA ad una via, seguite dal test di comparazione multipla di Tukey. Si considera significativo un valore di probabilità < 0.05. I dati verranno analizzati mediante il software dedicato Sigma Stat 11.0.

3 MATERIALI E METODI

3.1 ANIMALI

Per l'esecuzione della fase preclinica del nostro studio utilizziamo ratti maschi adulti Sprague-Dawley (Charles River), di peso compreso tra i 270 ed i 400 g. Gli animali sono collocati presso un apposito stabulario all'interno del nostro Centro di Ricerca Chirurgica e Preclinica e mantenuti in gabbie ventilate con temperatura e livelli di umidità costanti ($22 \pm 1^\circ\text{C}$; $55 \pm 5\%$ di umidità), ciclo circadiano di 12 ore di luce e libero accesso a cibo ed acqua.

3.2 ANESTESIA E PREPARAZIONE PRE-OPERATORIA

Tutte le procedure vengono eseguite in condizioni di sterilità. L'anestesia viene indotta con l'utilizzo di gas isofluorano (4-5% in 1 litro di O₂) all'interno di un'apposita camera di induzione (Figura 1). Quindi, il ratto viene posizionato supino su un campo operatorio sterile e l'anestesia viene mantenuta sia tramite gas inalatorio che mediante iniezione intraperitoneale di sodio tiopentale (80 mg/Kg). Si esegue inoltre un'iniezione intravenosa di 600 UI di eparina. Al momento della cavotomia (sezione della vena cava inferiore), un campione di sangue viene prelevato per eseguire un controllo del tempo di coagulazione attivato (ACT) che deve risultare maggiore di 350 secondi.



Figura 1 Induzione dell'anestesia con isofluorano all'interno della camera d'induzione dedicata.

3.3 PROCEDURA CHIRURGICA

La procedura chirurgica ed il prelievo del blocco cuore-polmoni vengono eseguiti come precedentemente descritto dal nostro gruppo [7].

Innanzitutto, si esegue un'incisione cervicale attraverso cui si isola la trachea e si posiziona la cannula tracheale, necessaria per il controllo delle vie aeree e l'inizio della ventilazione meccanica invasiva.

Quindi, si accede alla cavità addominale mediante un'incisione xifo-pubica. Si identifica la vena cava inferiore e si seziona (cavotomia), provocando il decesso per dissanguamento dell'animale. Nel mentre, i polmoni vengono ventilati con ossigeno 100% (0.3 l/min) e pressione positiva continua (CPAP) con pressione positiva di fine espirazione (PEEP) di 3 cmH₂O.

L'accesso al torace avviene attraverso un'incisione mediana, sternotomica; si procede quindi con la rimozione del timo e la sezione degli emidiaframmi, dei legamenti polmonari e del pericardio, per ottenere la massima esposizione possibile dei polmoni. Quindi, si esegue una manovra di reclutamento del parenchima polmonare (Figura 2).

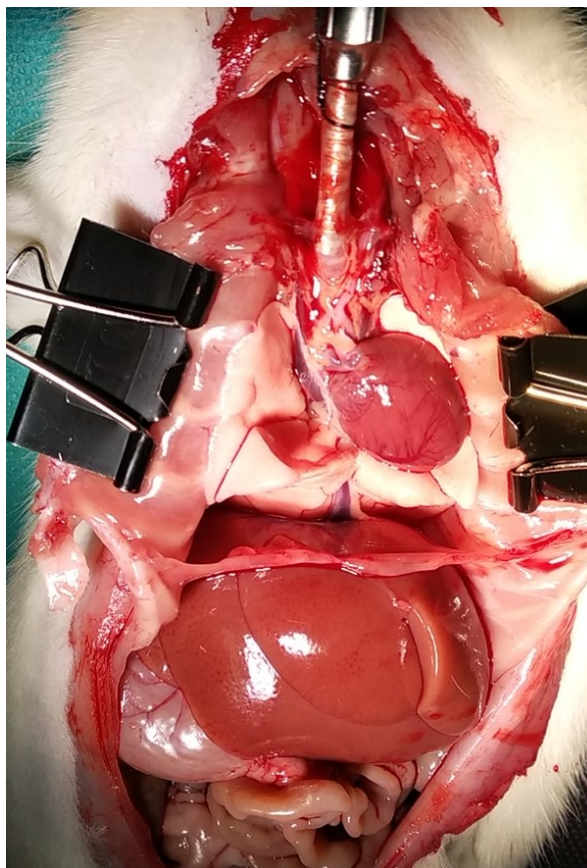


Figura 2 Visione della cavità toracica dopo accesso per via sternotomica mediana e timectomica.

Si circondano, successivamente, l'aorta ascendente e l'arteria polmonare; attraverso un'incisione a livello del ventricolo destro si posiziona una cannula dedicata, la cui estremità termina in arteria polmonare. La cannula è collegata ad un sistema di perfusione e nel momento del suo posizionamento in arteria polmonare si deve prestare attenzione affinché non entrino bolle d'aria nel circuito. Si sezionano quindi le auricole e l'apice del cuore in modo tale da creare un sistema di vent nella circolazione polmonare.

A questo punto, i polmoni vengono perfusi con 60 ml/Kg di Perfadex fredda, campione chiamato "Perfadex warm" (circa 20 ml negli animali di questo studio), con una pressione di 25 cmH₂O; inizia inoltre una fase di ventilazione a volume controllato con aria ambiente, mantenendo la medesima PEEP (3 cmH₂O) ed una frequenza respiratoria di 10 atti/min.

Si considera come ischemia calda il tempo intercorso tra il decesso dell'animale e l'inizio della perfusione polmonare; nel nostro esperimento, ha una durata standard di 60 minuti durante i quali gli organi restano in un range di temperatura compreso tra i 35.5 ed i 29 °C. L'ischemia fredda, invece, è il tempo (sempre 60 minuti nella nostra procedura) che intercorre tra la perfusione polmonare e l'inizio dell'EVLP; durante il periodo di ischemia fredda i polmoni vengono mantenuti a temperatura costante tra gli 11 ed i 4 °C. Durante i periodi di ischemia, sia calda che fredda, non vengono eseguite manovre invasive sul graft.

Infine, il blocco cuore-polmoni viene prelevato, mantenendo in sede sia la cannula tracheale che quella polmonare.

3.5 PROCEDURA DI EVLP

La composizione del circuito di perfusione (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus, Germany) ed il protocollo EVLP sono stati precedentemente descritti e standardizzati, attraverso studi dedicati, presso il nostro Centro di Ricerca Chirurgica e Preclinica [7].

Il circuito di perfusione per EVLP consiste in una camera di vetro, una pompa peristaltica, un reservoir, un membrane lung, uno scambiatore di calore per il controllo della temperatura del liquido di perfusione ed un ventilatore dedicato, per la ventilazione meccanica nei piccoli animali (Figura 3).

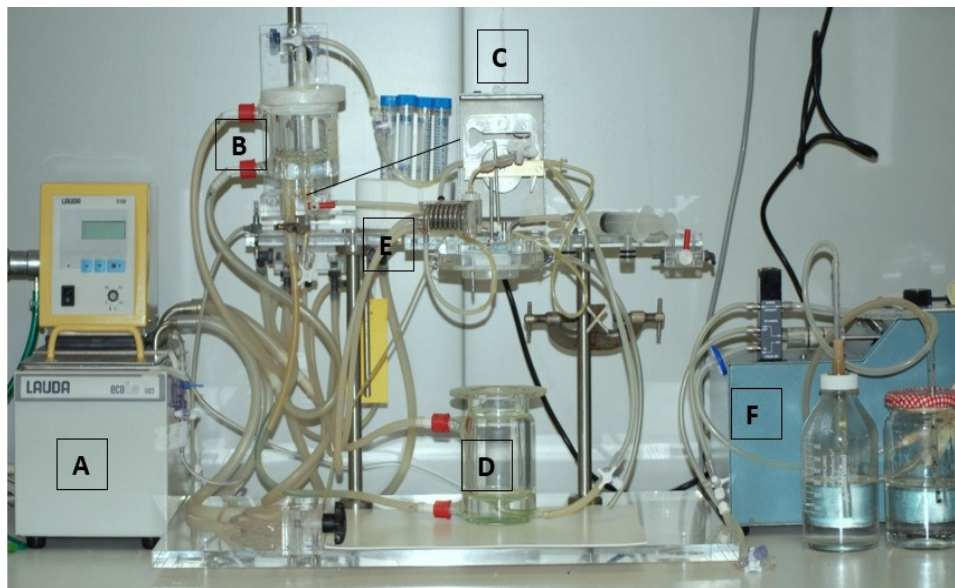


Figura 3 Sistema di EVLP per piccoli animali. A: scambiatore di calore; B: reservoir; C: pompa peristaltica; D: camera di vetro; E: vent per bolle gassose; F: ventilatore per roditori.

La soluzione di perfusione utilizzata secondo il nostro protocollo è composta da soluzione di Steen fredda con aggiunta, sempre sterilmente, di cefazolina, eparina ed elettroliti (CaCl_2 , KCl , K_3PO_4 , MgSO_4 , NaHCO_3).

Il blocco cuore-polmoni viene quindi collocato sulla camera di vetro modificata e connesso al circuito attraverso la cannula polmonare, mentre la cannula tracheale viene connessa al ventilatore. Si posiziona, inoltre, una sonda di temperatura a livello dell'atrio destro per il controllo della temperatura dell'organo nel corso dell'intera procedura.

Si esegue, quindi, un priming del circuito con 110-140 ml di liquido di perfusione (a seconda del peso del ratto), in modo tale da evitare episodi embolici nel circuito.

Infine, si avvia la perfusione ex vivo dei polmoni da mantenere per 180 minuti (Figura 4).

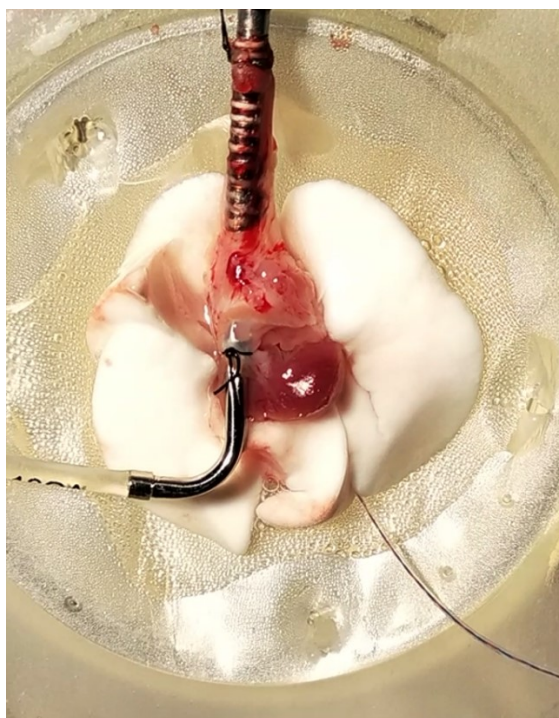


Figura 4 Perfusione ex vivo di polmoni di ratto; si riconoscono in sede la cannula tracheale, la cannula polmonare e la sonda termica.

La procedura di EVLP è suddivisa in due fasi. La prima fase ha una durata di circa 45 minuti ed è chiamata fase di riperfusione; durante questa fase si incrementa gradualmente il flusso in arteria polmonare (PAF), la temperatura ed il tidal volume (VT). Nei gruppi trattati con l'ormone tiroideo il farmaco (Liotir 20mcg/ml) viene aggiunto alla soluzione di Steen all'inizio della procedura EVLP, nelle concentrazioni precedentemente descritte.

Il PAF finale, raggiunto a 45 minuti, corrisponde a 6 ml/min/g di peso polmonare predetto (PLW); il valore di PLW viene a sua volta calcolato mediante la seguente formula: $PLW(g) = 0.0053 \times \text{peso dell'animale (g)} - 0.48$ [31].

La temperatura viene gradualmente incrementata fino a raggiungere la normotermia; a questo punto inizia anche una ventilazione a volume costante utilizzando una miscela di CO₂ (5%), O₂ (21%) a N₂ (74%), una frequenza respiratoria di 30 atti/minuto, una PEEP di 3 cmH₂O ed un TV iniziale di 5 ml/Kg da aumentare fino a 7 ml/Kg.

La seconda fase dell'EVLP, la fase di ricondizionamento (o steady-state), inizia quando tutti i parametri raggiungono i loro valori target. Inoltre, a 45 e 180 minuti, vengono eseguite due manovre di reclutamento insufflando i polmoni con aria ambiente a 20 cmH₂O e dimezzando il PAF per il tempo della manovra.

3.6 RILEVAZIONE PARAMETRI E CAMPIONAMENTO

La funzione polmonare è valutata sulla base della compliance polmonare all'apertura della cavità toracica (valore basale), a 45 minuti ed a 180 minuti dall'inizio della procedura di EVLP. Il modello animale e il campionamento sono più fedeli possibile a quanto avviene nella pratica clinica.

Durante l'intera durata dell'esperimento sono costantemente registrati e monitorati i valori di pressione arteriosa polmonare media (PAPm), di pressione positiva di fine espirazione (PEEP) e la pressione di picco inspiratoria (Ppeak). Inoltre vengono calcolate le resistenze vascolari polmonari totali (TPVR) usando la formula $((80 \times \text{PAP} - \text{WP}) / \text{PAF})$, dove PAF è il flusso arterioso polmonare e WP la pressione di cuneo (impostata su 0).

Appena il polmone viene connesso al circuito EVLP, i primi 20 ml di Steen vengono raccolti (Wash-out) e analizzati. In questo campione è rilevabile Perfadex in tracce, essendo presente nel circolo polmonare. Campioni dei 100ml di Steen che circolano nel circuito vengono raccolti a 60, 120 e 180 minuti di EVLP ed utilizzati per eseguire gas analisi (sia del liquido di perfusione in afflusso al polmone, prelevato dopo il passaggio nel membrane lung, che in deflusso, prelevato a livello dell'auricola sinistra) e valutare i mediatori dell'infiammazione, i metaboliti, il DNA mitocondriale libero e la concentrazione di ormone tiroideo T3.

Al termine dell'esperimento, il tessuto polmonare viene sezionato e suddiviso in campioni biotici per le differenti analisi biomolecolari; in particolare i campioni per valutare il contenuto di ATP, l'apoptosi, la perossidasi lipidica ROS-indotta, l'espressione genica e proteica, il danno al DNA mitocondriale e la concentrazione di ormone tiroideo T3 vengono congelati immediatamente in azoto liquido. Ulteriori campioni vengono prelevati per l'esame istologico (in formalina e gluteraldeide) e la valutazione dell'edema polmonare (wet to dry ratio). Per permettere la riproducibilità dell'esperimento e ridurre la variabilità dei dati bio-umorali, inoltre, tutti gli organi sono

stati campionati con la medesima tecnica e ogni singola sezione parenchimale destinata alle medesime analisi biomolecolari, come descritto nella figura seguente (Figura 5). La soluzione di Steen è

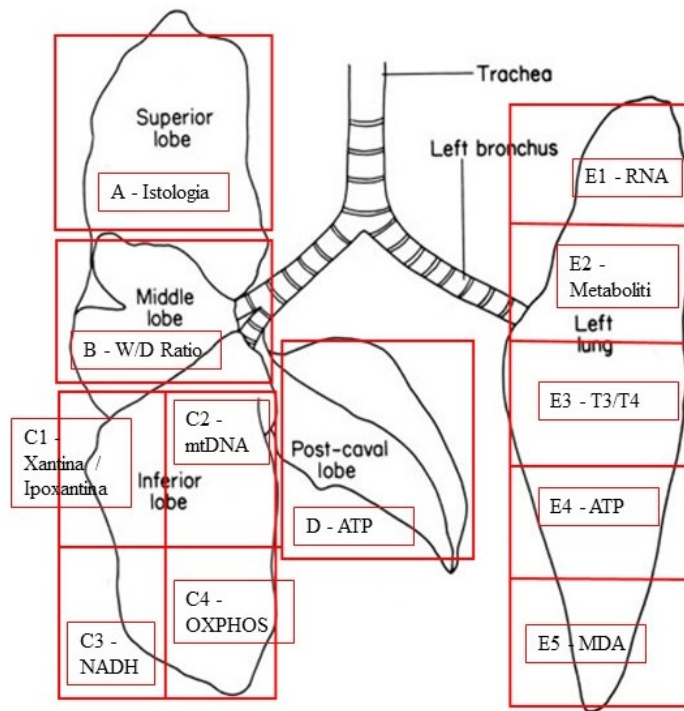


Figura 5 Rappresentazione del modello di campionamento del parenchima polmonare destinato a specifiche analisi biomolecolari

3.7 MATERIALI E METODI: ANALISI BIOLOGICHE E TRANSCRITTOMICA

3.7.1 ANALISI BIOLOGICHE ED ENDOCRINOLOGICHE

FMN

Riboflavin 5'-monofosfato (FMN) è stato dosato in campioni di perfusato prelevati ai tempi previsti. FMN sodium salt hydrate (Sigma- Aldrick, United States) è stato diluito in soluzione fisiologica per ottenere una serie di soluzioni standard con concentrazioni nel range da 1000 a 31.25 ng/mL. Cento microlitri di ciascuna di queste sono state caricate in un black 96-well microplate (Nunc, Denmark). La fluorescenza è stata determinata utilizzando un 460/440 nm excitation filter e un 528/20 nm emission filter con 100% di gain, utilizzando un lettore a fluorescenza (Synergy HTX, Biotek U.S, Winooski, VT, USA).

NADH

La concentrazione di NADH nei campioni di perfusato è stata analizzata attraverso l'intensità della fluorescenza. Un flacone pre-dosato di NADH è stato acquistato dalla Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), e abbiamo preparato una soluzione di 10 mg/ml utilizzando come tampone del sodio bicarbonato a pH 9. E' stata inoltre preparata una curva standard con range da 250 a 2.5 ng/ml utilizzando un medium di perfusato filtrato. 75 µL di ciascun campione sono stati poi aggiunti in doppio ai pozzetti. La fluorescenza è stata determinate usando un excitation filter a 340 nm e un emission filter a 440 nm con autogain (Synergy HTX).

ATP

Le biopsie polmonari congelate sono state omogenate nell'acido tricloroacetico (MilliporeSigma, Frankfurter, Germany) a una concentrazione di 50 mg/mL, quindi centrifugate dieci minuti a 14000 rpm a 4°C. E' stato quindi raccolto il surnatante e diluito a 1:30 utilizzando 0.1 M Tris-acetato a pH 7.75 (Millipore Sigma, Frankfurter, Germany). Successivamente, 10 µL di ciascun campione sono stati collocati in un 96-well plate vuoto e 90 µL di luciferase (Enliten ATP Assay System; Promega, Madison, WI, USA) sono stati aggiunti direttamente nei pozzetti con il luminometro (Glomax Luminometer;

Promega, Madison, WI, USA) durante le analisi. I segnali bioluminescenti sono stati rilevati immediatamente. La concentrazione di ATP è stata espressa in medie di una curva standard che aveva un range da 10^{-4} M a 10^{-10} M (rATP 10 mM; Promega, Madison, WI, USA).

ENDOCRINOLOGIA

Data l'analogia tra ratto e uomo, sono stati utilizzati dei kit commerciali per diagnostica umana, in particolare: la tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) totali (TT4 e TT3) con metodo competitivo fluoroimmunometrico (FIA) (DELFLIA, Time-resolved fluoroimmunoassay, PerkinElmer), mentre le frazioni libere (fT4 e fT3), con saggio immunometrico competitivo in elettrochemiluminescenza (ECLIA) (Elecsys, Roche).

3.7.2 ANALISI DEL DNA MITOCONDRIALE

Estrazione di DNA da tessuto polmonare, plasma e perfusato

Il DNA totale è stato estratto da 25 mg di tessuto congelato, 200 μ l di plasma e 200 μ l di perfusato tramite QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germania) seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Il DNA è stato poi quantificato usando NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Quantificazione del DNA mitocondriale (mtDNA)

Il mtDNA è stato quantificato tramite droplet digital PCR (ddPCR). La mix di reazione, dal volume finale di 20 μ l, si compone di: 20 ng di campione di DNA, 11 μ l di 2X ddPCR Supermix per Probes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 1,1 μ L di PrimePCR™ ddPCR™ Expression Probe Assay ND2 (fluorescenza in FAM, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), 1,1 μ L di PrimePCR™ ddPCR™ Expression Probe Assay Actb (fluorescenza in HEX, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Le condizioni termiche usate per la reazione di PCR sono le seguenti: 95°C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli composti da 94°C per 30 secondi e 55°C per 1 minuto, poi 98°C per 10 minuti. Per ogni step di reazione è stata impostata una ramp rate di 2°C/secondo.

La lettura delle droplet generate è avvenuta utilizzando QX200 ddPCR droplet reader (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) e la successiva analisi è stata eseguita mediante QuantaSoft Analysis software (version 1.7.4.0917, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA). I dati sono espressi come numero di copie normalizzate al volume, nel caso dei campioni di plasma, e di numero di copie per cellula, nel caso dei campioni di tessuto.

3.7.3 ESTRAZIONE DEL RNA E TRASCRIZIONE GENICA

L'estrazione di RNA totale è stata eseguita utilizzando il kit RNeasy Kits (Qiagen, cat n° 74104). Brevemente, il tessuto omogeneizzato è stato lisato in Buffer RLT e successivamente centrifugato a 20000 x g per 3 minuti. Al surnatante ottenuto è stato aggiunto un volume di etanolo al 70% e quindi caricato sulla RNeasy spin column e centrifugato per 15 secondi a ≥ 8000 x g. Dopo un lavaggio con 700 μ l di Buffer RW1 e due con 500 μ l di Buffer RPE, l'RNA è stato eluito con 50 μ l di H₂O RNase-free.

L'RNA estratto è stato quantificato mediante analisi spettrofotometrica al NanoDrop ND-1000. Lo strumento misura l'assorbanza alle diverse lunghezze d'onda e calcola automaticamente il rapporto concentrazione/purezza del campione sulla base della legge di Lambert-Beer. L'RNA presenta un picco di assorbimento alla lunghezza d'onda di 260 nm ed è da questo valore di assorbanza che viene ricavata la sua concentrazione (ng/ μ L). La purezza dell'RNA estratto viene indicata dal rapporto tra le due assorbanze 260/280 il quale deve essere circa 2,0 e tra altre due assorbanze 260/230 il quale deve essere compreso tra 1,8 e 2,2.

500 ng di RNA totale sono stati retrotrascritti a cDNA utilizzando il kit SuperScript IV VILO Master Mix (Invitrogen, cat n° 11766050).

Inizialmente è stata preparata la mix di reazione composta da:

- 10X ezDNase Buffer 1 μ L
- ezDNase enzyme 1 μ L
- RNA 500 ng
- H₂O Nuclease-free fino ad un volume di 5 μ L

Dopo aver incubato la mix è stata quindi incubata a 37°C per due minuti sono stati aggiunti:

- SuperScript IV VILO Master Mix (5X) 2 µL
- H2O Nuclease-free fino ad un volume di 10 µL

La reazione di retrotrascrizione consiste di un unico ciclo alle seguenti condizioni:

1. 25°C per 10 minuti (step di annealing dei primers)
2. Incubare a 50°C per 10 minuti (retrotrascrizione)
3. Incubare a 85°C per 5 minuti (step di inattivazione dell'enzima)
4. Raffreddare a 4°C (tempo indefinito)

Il cDNA ottenuto è poi stato diluito in 90 µL di H2O Nuclease-free.

Al fine di analizzare l'espressione dei geni di interesse è stata eseguita un'analisi di Real time PCR. La quantificazione del prodotto di reazione avviene mediante l'impiego di molecole fluorescenti intercalanti le quali legano la struttura interna del DNA ed emettono fluorescenza solo quando quest'ultimo si trova nella conformazione a doppio filamento. All'aumentare del numero di cicli di amplificazione si avrà un aumento dell'intensità di fluorescenza direttamente proporzionale alla quantità di materiale genetico prodotto. Il numero di cicli necessario per entrare in fase esponenziale dell'amplificazione sarà inversamente proporzionale alla quantità del template di partenza, di conseguenza più un gene è espresso in un dato campione e minore sarà il numero di cicli richiesti per la sua amplificazione.

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il kit PowerUP Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, cat n° 4385610).

Per ogni reazione sono stati utilizzati:

- | | |
|-------------------------------|------|
| 1. SYBR Green Master Mix (2X) | 5 µL |
| 2. Primer Forward (10 µM) | 1 µL |
| 3. Primer Reverse (10 µM) | 1 µL |
| 4. cDNA stampo | 1 µL |
| 5. H2O nuclease-free | 2 µL |

Le reazioni sono state condotte in triplicato e sono state eseguite utilizzando la 7500 Real-Time Fast System (Applied Biosystems). La media dei cicli soglia dei geni di interesse (CT) è stata confrontata con quella ottenuta per il gene housekeeping, ottenendo quindi il valore ΔCT . Il livello relativo di espressione genica è stato espresso come $2^{-\Delta\Delta CT}$, dove $\Delta\Delta CT$ è la differenza tra il ΔCT del controllo e quello del trattato.

4 EVLP COME EVALUATION: LA FUNZIONE DEL GRAFT

4.1 RISULTATI

Il progetto di ricerca è stato notevolmente rallentato dalla pandemia Covid 19 per cui gli esperimenti sono stati interrotti per mesi. Presso il nostro Centro di Ricerca Chirurgica e Preclinica, abbiamo applicato il protocollo sperimentale sopra descritto su 26 ratti. Di questi, quattro animali sono stati esclusi dallo studio prima del prelievo del blocco cuore-polmoni: due per arresto cardio-circolatorio e decesso non controllato in seguito all'iniezione intraperitoneale di tiopentale; uno per una scorretta somministrazione di eparina e conseguente ACT troppo basso (114 secondi), uno per barotrauma polmonare durante le manovre di reclutamento basali. Abbiamo quindi completato il protocollo sperimentale su un totale di 22 animali, assegnati secondo randomizzazione ai differenti gruppi di studio ed inclusi in sei differenti gruppi di studio: cinque graft al gruppo Nativi; cinque al gruppo Ischemia; cinque al gruppo EVLP (Sham); cinque al gruppo EVLP ischemia; uno al gruppo EVLP-1 T3 (Sham-1T3) ed uno al gruppo EVLP-1,5 T3 (Sham-1,5T3). Questi bassi numeri dei gruppi trattamento con T3 sono legati al fatto che lo studio è stato interrotto a causa del peggioramento funzionale del graft durante gli esperimenti (si veda paragrafo analisi ad interim). Il gruppo di ricerca si è pertanto fermato e ha deciso di procedere con delle analisi ad interim sugli animali già eseguiti per comprendere la causa di tale esito.

Di seguito vengono riportati i dati relativi ai parametri funzionali, durante ed al termine del ricondizionamento mediante EVLP, degli organi prelevati ed inseriti nel nostro studio. I gruppi EVLP con aggiunta di T3 (Sham T3 1 e Sham T3 1,5) sono stati analizzati a parte e confrontati di seguito con i gruppi EVLP (Sham) e EVLP ischemia (EVLP) sia per la ristrettezza del campione sia per il loro comportamento in termini di ventilazione e perfusione nel tempo.

Nei paragrafi successivi si analizzeranno i risultati parziali delle analisi biologiche.

4.1.1 PARAMETRI VENTILATORI

I parametri ventilatori polmonari sono stati misurati negli animali randomizzati nei gruppi per cui, secondo protocollo, è prevista l'esecuzione della procedura di EVLP, ovvero il gruppo EVLP (Sham), il gruppo ISCHEMIA EVLP ed il gruppi EVLP T3 1 e EVLP T3 1,5. La compliance polmonare è misurata in tre momenti ben distinti del protocollo: al momento dell'apertura della cavità toracica (valore basale), a 45 minuti dall'inizio dell'EVLP (che corrisponde al termine della prima fase di riperfusione dell'organo) ed a 180 minuti di EVLP (che corrisponde al termine della procedura stessa). Inoltre, un valore di compliance è stato valutato al termine del periodo di ischemia (WI, warm ischemia), per i gruppi Ischemia ed EVLP ischemia.

La compliance polmonare nel gruppo EVLP (Sham) ha un valore medio di 0.214 ± 0.042 ml/cmH₂O al basale, 0.180 ± 0.049 ml/cmH₂O a 45 minuti di EVLP e 0.169 ± 0.060 ml/cmH₂O a 180 minuti dall'inizio dell'EVLP. Per il gruppo EVLP ischemia, invece, i valori medi di compliance sono: 0.285 ± 0.021 , $0,112 \pm 0,034$, 0.149 ± 0.052 e 0.154 ± 0.050 ml/cmH₂O rispettivamente all'apertura del torace (basale), dopo ischemia, a 45 ed a 180 minuti di EVLP. Inoltre, la compliance registrati per i gruppi EVLP-1T3 ed EVLP-1,5 T3 sono rispettivamente 0,293 e 0,270 al basale, 0,134 e 0,155 a 45 minuti, 0,135 e 0,164 a 180 minuti di EVLP (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**).

GRUPPO	COMPL (ml/cmH ₂ O)							
	BASALE		POST WI		45		180	
	Media	Dev std	Media	Dev std	Media	Dev std	Media	Dev std
SHAM	0,214	0,042	.	.	0,180	0,049	0,169	0,060
ISCHEMIA	0,258	0,048	0,131	0,025
ISCHEMIA+EVLP	0,285	0,021	0,112	0,034	0,149	0,052	0,154	0,050
T3 1	0,293	.	.	.	0,134	.	0,135	.
T3 1,5	0,270	.	.	.	0,155	.	0,164	.

Tabella 3 Compliance polmonare media nei differenti gruppi, nei tempi basale, dopo ischemia, 45' e 180' di EVLP

Nella rappresentazione grafica delle compliance polmonari possiamo ben distinguere l'uniformità delle curve all'interno dei due gruppi EVLP (Sham) ed EVLP ischemia

(Grafico 1); l'eccezione rappresentata dall'animale numero 17 potrebbe essere giustificata dal fatto che al termine della procedura di EVLP sono state riscontrate perdite aeree parenchimali. Confrontando, invece, le curve della compliance polmonare media (Grafico 2) si osserva in tutti i gruppi EVLP un peggioramento della compliance a 45 minuti, sebbene maggiore nei gruppi EVLP ischemia ed entrambi i gruppi EVLP T3, con curve quasi sovrapponibili; a 180 minuti, poi, si evidenzia un lieve peggioramento nel gruppo EVLP (Sham), diversamente dalla compliance polmonare dei gruppi EVLP ischemia che mostrano un miglioramento al termine del processo di EVLP.

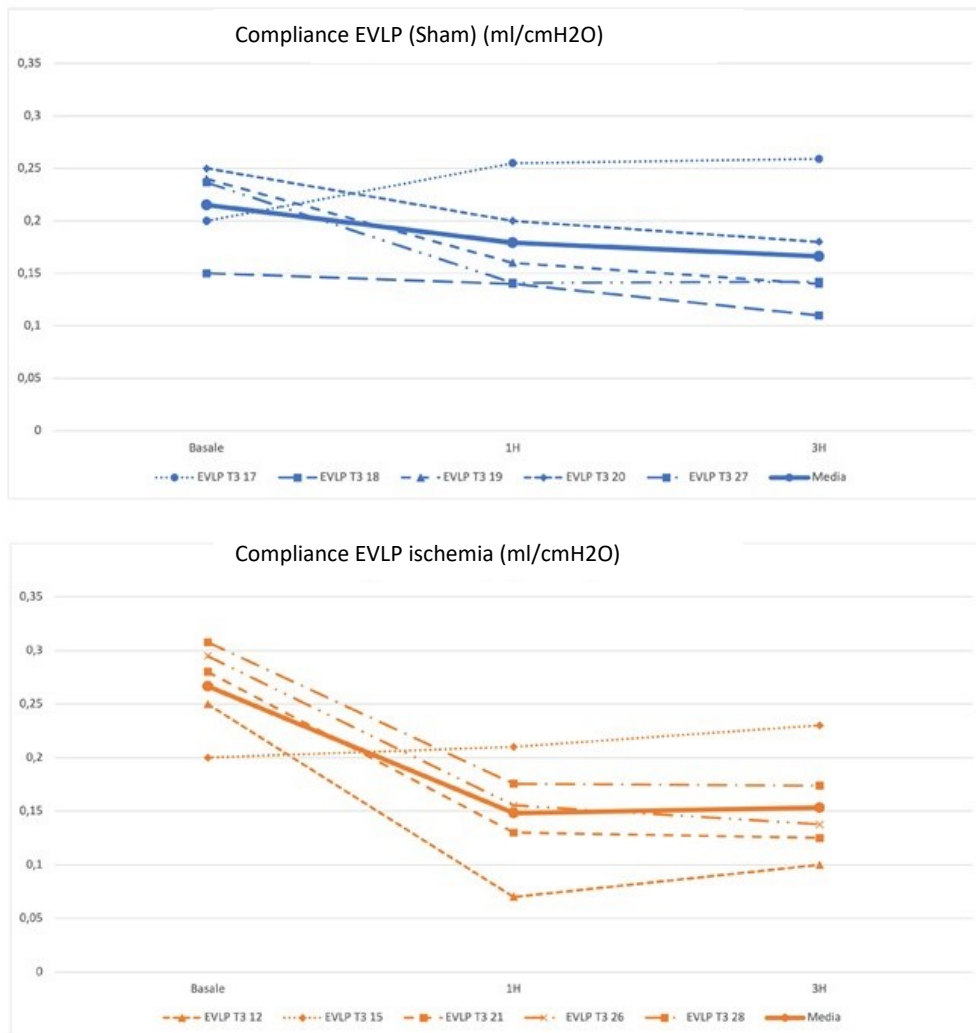


Grafico 1 Curve di compliance polmonare dei gruppi EVLP (Sham) ed EVLP ischemia basale, a 45' e 180' di EVLP

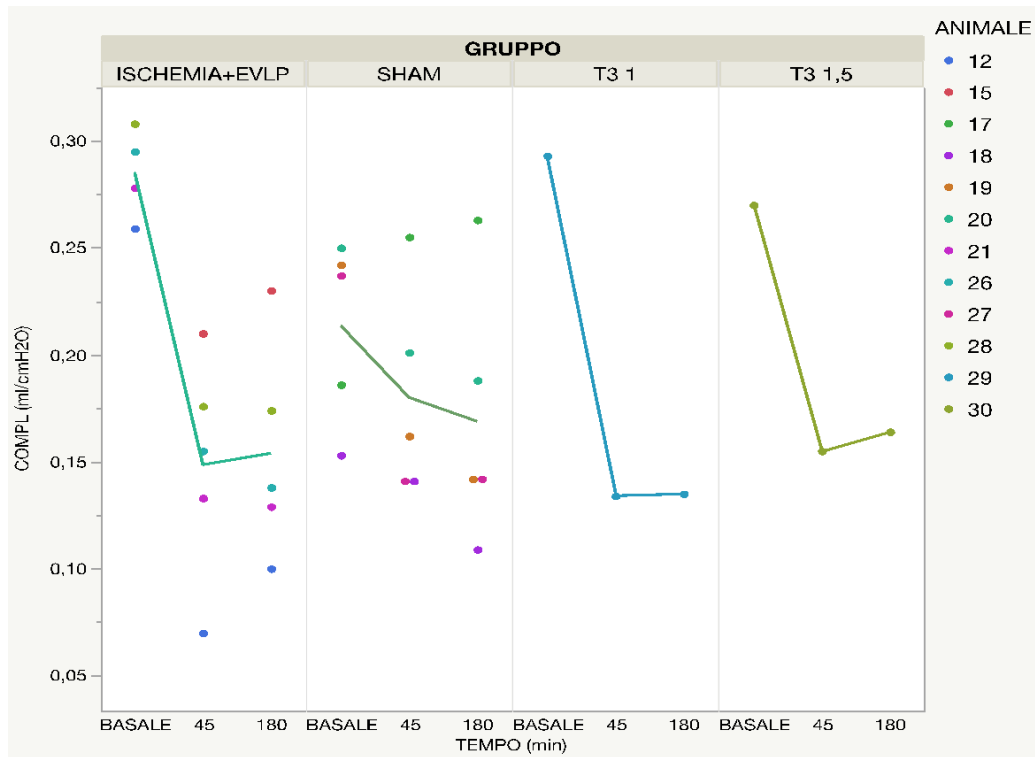


Grafico 2 Curve di compliance polmonare media: gruppi EVLP (Sham), EVLP ischemia, EVLP-1 T3 e EVLP-1,5 T3

I polmoni di ratto sottoposti ad EVLP più trattamento hanno riportato i seguenti valori basali di compliance: 0,29 e 0,27 ml/cmH₂O rispettivamente per il gruppo T1 e T1,5. Inoltre, la compliance misurata nei tempi T45 e T180 è stata di 0,134 e 0,135 ml/H₂O per il ratto del gruppo T3 1, e di 0,155 e di 0,164 ml/H₂O per il ratto del gruppo T3 1,5. Come riportato in tabella:

Compliance (ml/cmH ₂ O)			
	Basale	T 45	T180
Sham T3 1	0,293	0,134	0,135
Sham T3 1,5	0,27	0,155	0,164

La pressione di picco dei graft dei gruppi EVLP (Sham), EVLP ischemia, EVLP-1 T3 ed EVLP-1,5 T3 è stata registrata in continuo per l'intera durata della procedura di EVLP. La rappresentazione visiva di tali dati, ovvero la curva delle pressioni di picco durante

l'EVLP, è fornita nel grafico seguente (Grafico 3). Si evince facilmente come le pressioni di picco nei EVLP (Sham) ed EVLP ischemia gruppi tendono ad aumentare tra l'inizio e la fine dell'EVLP, restando comunque all'interno di un range di valori piuttosto ristretto e sovrapponibile tra i due gruppi. I gruppi trattati con ormone tiroideo (EVLP-1 T3 ed EVLP-1,5 T3), invece, mostrano una curva che aumenta costantemente durante il corso dell'EVLP.

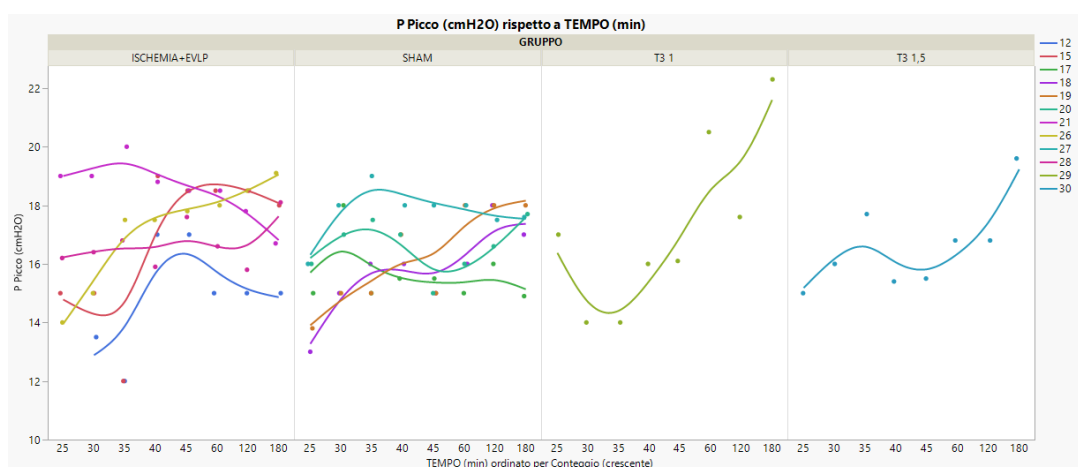


Grafico 3 Curva delle pressioni di picco registrate durante procedura di EVLP

Nella curva continua delle pressioni di picco abbiamo considerato dei checkpoints principali (a 25, 30, 35, 40, 45, 60, 120 e 180 minuti di EVLP) ed abbiamo calcolato i valori medi nei due gruppi (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**). Il valore medio minimo si registra, sia per il gruppo EVLP (Sham) che EVLP ischemia, all'inizio della procedura ed è rispettivamente di $14,8 \pm 1,3$ cmH₂O e $15,8 \pm 2,1$ cmH₂O. Quindi, le pressioni di picco incrementano, in entrambi i gruppi, fino al quarantacinquesimo minuti di EVLP (termine della fase di riperfusione), arrivando al valore medio massimo per il gruppo EVLP ischemia di $17,9 \pm 0,6$ cm H₂O. A questo punto, come evidente anche dal Grafico 4, le curve convergono: i valori medi del gruppo EVLP (Sham) continuano ad aumentare fino ad un massimo di $17,2 \pm 0,9$ cmH₂O, mentre per il gruppo EVLP ischemia diminuiscono lievemente fino ad un valore medio di $17,4 \pm 1,6$ cmH₂O al termine della procedura. Resta comunque evidente come le pressioni

partano da valori maggiori nel gruppo EVLP con una differenza che va riducendosi al 180° minuto; inoltre, si conferma che in entrambi i gruppi i valori finali risultano più elevati rispetto a quelli di partenza. Per quanto riguarda invece i gruppi EVLP T3, entrambi inizialmente hanno valori di pressioni di picco sostanzialmente sovrapponibili agli altri gruppi, ma successivamente nel corso dell'EVLP i valori pressori continuano ad aumentare fino a raggiungere a 180' i valori massimi rilevati di 22,3 cmH2O per il gruppo EVLP-1 T3 e 19,6 cmH2O per il gruppo EVLP-1,5 T3.

TEMPO (min)	P Picco (cmH2O)			
	SHAM		EVLP	
	Media	Dev std	Media	Dev std
25	14,8	1,3	16,1	2,2
30	16,6	1,5	15,8	2,1
35	16,5	1,7	15,7	3,5
40	16,7	1,0	17,6	1,3
45	15,7	1,3	17,9	0,6
60	16,6	1,3	17,3	1,5
120	17,2	0,9	17,1	1,6
180	17,0	1,3	17,4	1,6

Tabella 4 Pressione di picco media nei gruppi Sham ed EVLP registrata durante procedura di EVLP

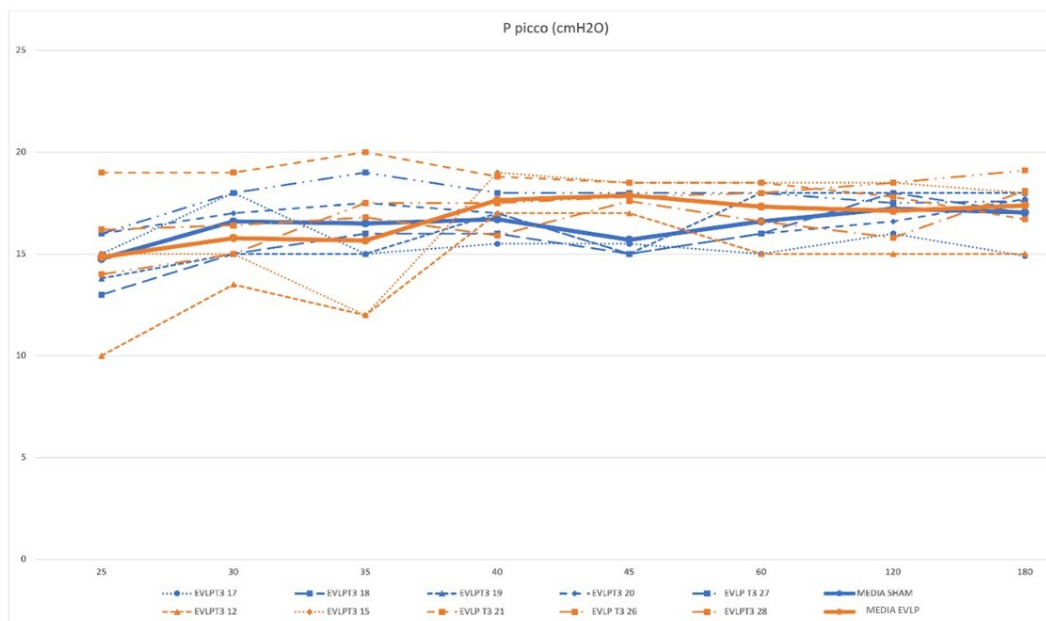


Grafico 4 Curva delle pressioni di picco, con evidenza della media delle pressioni, nei gruppi Sham ed EVLP registrate durante procedura di EVLP

Come per i precedenti gruppi, la pressione di picco è stata registrata in continuo anche per i polmoni di ratto sottoposti alla EVLP più trattamento con ormone tiroideo. La pressione di picco è aumentata nel tempo una volta che la ventilazione e la temperatura erano arrivate allo steady state. Si è partiti infatti con una pressione di Picco di 17 e di 15 cmH₂O rispettivamente per i 2 gruppi T3 1 e T31,5, terminando con valori di gran lunga superiori a quelli medi registrati nel gruppo EVLP (Ischemia + EVLP): 22,3 cmH₂O per il ratto Sham T31 e di 19,6 cmH₂O per il ratto Sham T31,5. I valori in dettaglio sono riportati nella tabella:

	P picco cmH ₂ O							
Sham T3 1	17	14	14	16	16,1	20,5	17,6	22,3
Sham T3 1,5	15	16	17,7	15,4	15,5	16,8	16,8	19,6
TEMPO (min)	25	30	35	40	45	60	120	180

4.1.2 PARAMETRI VASCOLARI

Analogamente alla pressione di picco, anche la pressione media in arteria polmonare (PAPm) dei differenti gruppi è stata registrata in continuo per l'intera durata della procedura di EVLP. Per l'analisi dei dati sono stati inseriti nel nostro database ed analizzati i valori di PAPm corrispondenti ai minuti 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60, 120 e 180 minuti di EVLP.

Il confronto della media di questi valori nei gruppi EVLP (Sham) ed EVLP ischemia, agli intervalli di tempo prescelti, mostra dei valori di partenza simili ($4,2 \pm 1,1$ mmHg per il gruppo Sham e $4,8 \pm 0,4$ mmHg per il gruppo EVLP) ed un successivo graduale incremento fino al minuto 45 della procedura (EVLP (Sham): $5,6 \pm 0,5$ mmHg; EVLP ischemia: $6,0 \pm 1,0$ mmHg). Dopo questo checkpoint le curve divergono: i valori medi di PAPm nel gruppo EVLP (Sham) restano pressochè costanti, mentre quelli del gruppo EVLP ischemia continuano ad incrementare fino al valore massimo di $7 \pm 1,2$ mmHg a 180 minuti di procedura.

I dati ottenuti da tale registrazione sono riportanti nella tabella (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**) e nel grafico sottostanti (Grafico 5).

TEMPO (min)	PAPm (mmHg)			
	SHAM		EVLP	
	Media	Dev std	Media	Dev std
0	4,2	1,1	4,8	0,4
5	4,2	1,3	4,3	1,0
10	4,0	1,2	4,3	1,0
15	4,0	1,6	4,8	1,1
20	4,6	1,9	5,1	0,9
25	4,4	1,7	5,5	1,2
30	5,0	1,4	6,0	1,0
35	4,8	1,3	5,8	1,1
40	4,8	1,3	5,8	1,1
45	5,6	0,5	6,0	1,0
60	5,4	0,9	6,2	1,3
120	5,8	1,3	7,0	1,0
180	5,6	1,1	7,0	1,2

Tabella 5 Pressione polmonare media (PAPm) nei gruppi Sham ed EVLP registrata durante procedura di EVLP

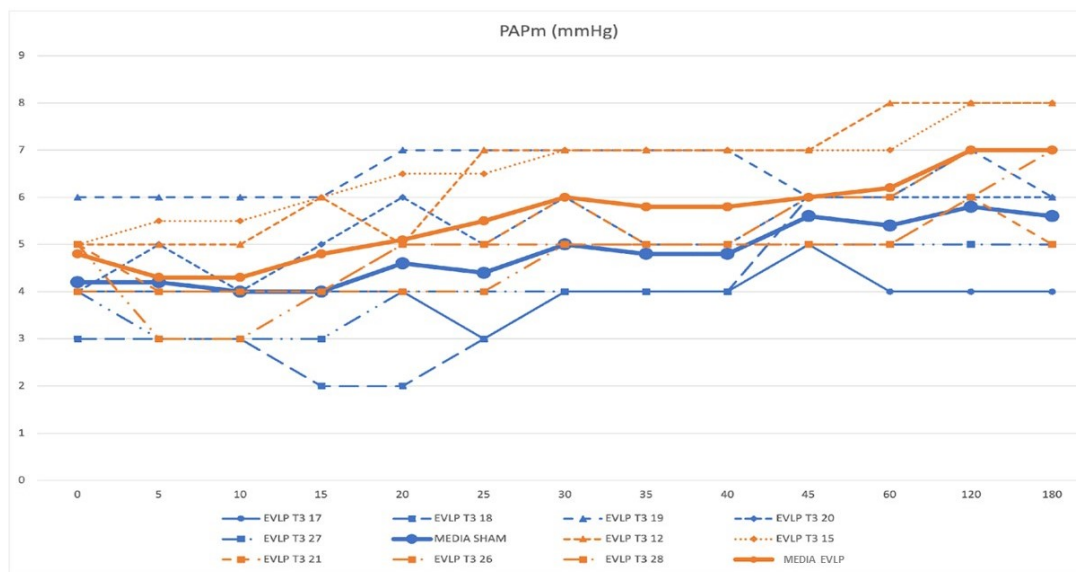


Grafico 5 Curva delle PAPm, con evidenza della media dei valori, nei gruppi Sham ed EVLP registrate durante procedura di EVLP

Nei polmoni che hanno ricevuto terapia con ormone tiroideo (EVLP-1 T3 ed EVLP-1,5 T3) si è registrato un aumento nel tempo, come per il gruppo EVLP ischemia di PAPm. I valori iniziali erano in entrambi i gruppi più bassi rispetto ad i gruppi studiati finora, 3mmHg a tempo 0, ma con l'inizio della ventilazione (a 25 minuti), i valori sono incrementati fino a 6 mmHg, per poi raggiungere il valore di 7 mmHg a 180 minuti di

perfusione. I valori pressori riscontrati sono sovrapponibili a quelli medi registrati nel gruppo EVLP ischemia.

I polmoni, prima di essere prelevati, vengono perfusi attraverso la cannula polmonare con 25 ml di soluzione Perfadex fredda a 4°C. Il flushing è stato effettuato in tutti i gruppi con le medesime modalità; rispetto ai gruppo Sham (EVLP Sham, EVLP-1 T3 ed EVLP-1,5 T3), nel quale il blocco cuore-polmoni viene prelevato e sottoposto ad EVLP senza tempi di ischemia, nei gruppi Ischemia ed EVLP ischemia questa perfusione è stata effettuata dopo 60 minuti di ischemia calda.

Durante il nostro esperimento abbiamo rilevato i tempi di perfusione dei diversi gruppi, mantenendo costante la pressione di perfusione stessa. Questi tempi possono essere, teoricamente, rapportati direttamente ai valori delle resistenze vascolari polmonari.

I dati relativi ai tempi medi di perfusione per i cinque gruppi (EVLP Sham, Ischemia, EVLP ischemia, EVLP-1 T3 ed EVLP-1,5 T3) sono riportati in **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**, mentre le curve corrispondenti sono rappresentate nel **Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.** È evidente come le curve abbiano un incremento lineare, costante e sovrapponibile nei gruppi. La differenza fondamentale si identifica nei gruppi Sham (EVLP Sham, EVLP-1 T3 ed EVLP-1,5 T3), dove la media dei tempi di perfusione è sensibilmente e costantemente inferiore, soprattutto nei valori di partenza del primo checkpoint a 5 ml: i tempi medi sono infatti $29 \pm 4,9$ secondi per il gruppo EVLP Sham, 32 secondi per il gruppo EVLP-1 T3, 31 secondi per il gruppo EVLP-1,5 T3, $46 \pm 11,3$ per il gruppo Ischemia e $52,4 \pm 4,5$ per quello EVLP.

PERFADEX (ml)	TEMPO (sec)									
	SHAM		ISCHEMIA		ISCHEMIA+EVLP		T3 1		T3 1,5	
	Media	Dev std	Media	Dev std	Media	Dev std	Media	Dev std	Media	Dev std
5	29,0	4,9	66,0	35,6	52,4	4,5	32,0	.	31,0	.
10	58,6	6,3	108,3	45,7	90,2	9,7	61,0	.	66,0	.
15	87,2	7,3	156,3	62,2	130,6	15,3	92,0	.	95,0	.
20	118,2	11,5	202,0	70,7	168,8	20,7	120,0	.	120,0	.
25	137,0	8,5	251,3	79,6	207,2	26,5	149,0	.	146,0	.

Tabella 6 Tempi medi di perfusione di Perfadex

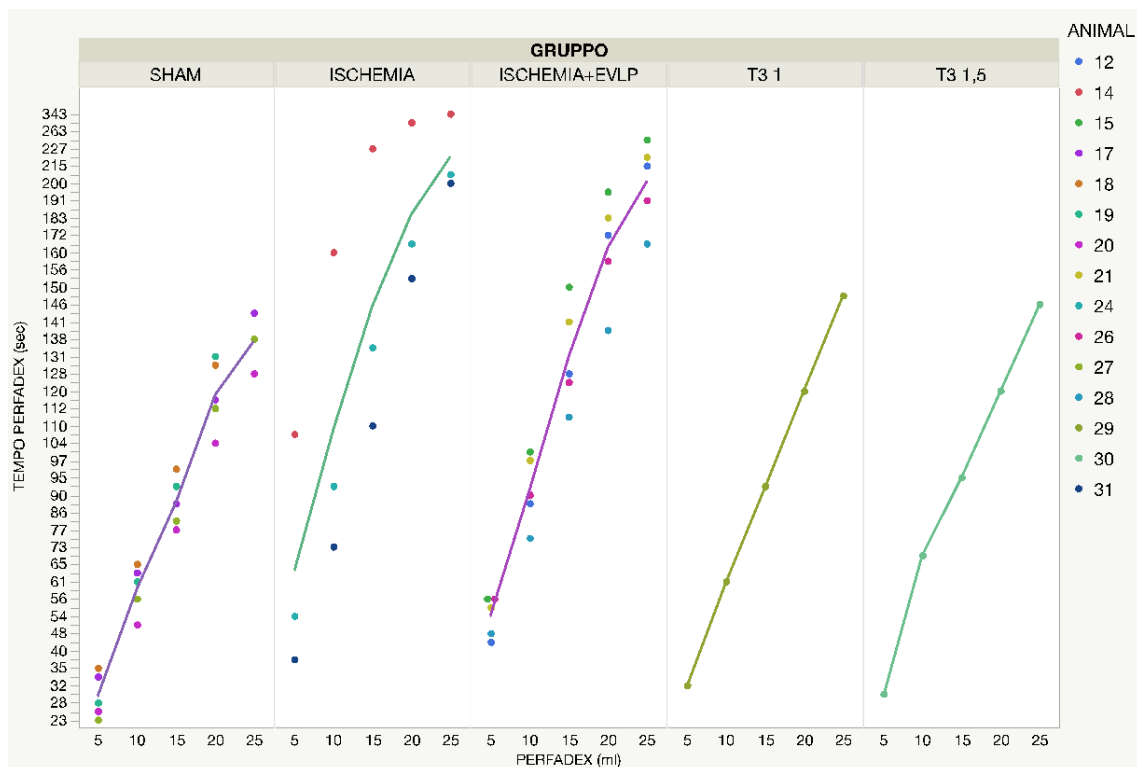


Grafico 6 Curve dei tempi medi di perfusione di Perfadex nei gruppi Sham, Ischemia ed EVLP

Confrontando i gruppi Sham tra loro, si evince come i polmoni perfusi senza attendere il tempo di ischemia hanno tempi di perfusione simili tra loro. La nostra analisi non presenta valori medi per i gruppi con trattamento, data l'esigua popolazione arruolata finora:

PERFADEX (ml)	TEMPO (sec)					
	SHAM		T3 1		T3 1,5	
	Media	Dev std	Media	Dev std	Media	Dev std
5	29,0	4,9	32,0	.	31,0	.
10	58,6	6,3	61,0	.	66,0	.
15	87,2	7,3	92,0	.	95,0	.
20	118,2	11,5	120,0	.	120,0	.
25	137,0	8,5	149,0	.	146,0	.

4.1.3 EDEMA POLMONARE

Il Wet/Dry Ratio è utilizzato, secondo letteratura, come indice dell'accumulo di liquidi a livello del parenchima polmonare; può pertanto essere considerato un metodo di valutazione dell'edema polmonare al termine della procedura effettuata. Il Wet/Dry Ratio consiste nel rapporto tra il peso del polmone al termine della procedura ed il peso del polmone disidratato dopo cinque giorni in forno a 60° C.

I dati inerenti al Wet/Dry Ratio sono stati analizzati in tutti i gruppi dell'esperimento e sono riportati nella tabella (**Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.**) e nel grafico (Grafico 7) seguenti. In particolare, si evidenzia come il gruppo Nativi abbia il minor valore di mediana (4,4) ed il gruppo EVLP Sham il minor valore di media ($4,5 \pm 0,5$) con un valore minimo di 4 e massimo di 5. I dati mostrano un valore di Wet/Dry lievemente maggiore per i gruppi sottoposti ad ischemia (Ischemia ed EVLP ischemia) e minore per quelli sottoposti ad EVLP senza precedente danno ischemico (EVLP Sham, EVLP-1 T3 ed EVLP-1,5 T3).

GRUPPO	Wet/Dry				
	Media	Dev std	Mediana	Min	Max
NATIVO	4,8	0,9	4,4	4,2	6,4
SHAM	4,5	0,5	4,6	4,0	5,0
ISCHEMIA	5,0	0,2	5,0	4,8	5,2
ISCHEMIA+EVLP	4,9	0,1	4,9	4,8	5,1
T3 1	4,6	.	4,6	4,6	4,6
T3 1,5	4,3	.	4,3	4,3	4,3

Tabella 7 Valori statistici del W/D Ratio nei gruppi di studio

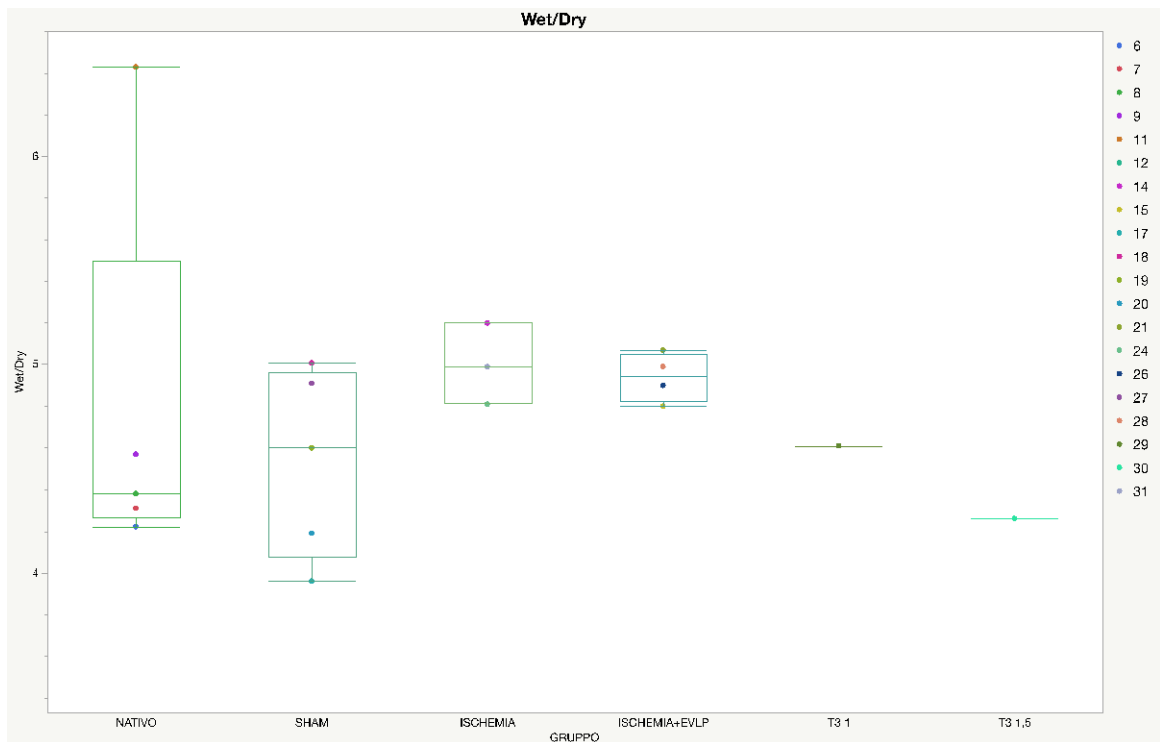


Grafico 7 Confronto del W/D Ratio nei differenti gruppi di studio

4.1.4 GAS ANALISI

La funzione polmonare in corso di EVLP viene primariamente valutata sulla base degli scambi gassosi del graft polmonare durante la procedura. L'esame più accurato per eseguire questo tipo di valutazione è la gas-analisi. Durante il nostro esperimento, vengono sottoposti a gas analisi campioni di liquido di perfusione prelevati, dopo manovra di reclutamento, a 60 minuti e 180 minuti dall'inizio della procedura di EVLP. Il liquido di perfusione, inoltre, ad ogni checkpoint (60 e 180 minuti di EVLP) viene prelevato sia prima del suo afflusso nel circolo polmonare che dopo il suo deflusso.

Il primo dato valutato, per quanto riguarda la funzione polmonare, è la capacità del polmone di scambiare ossigeno con l'ambiente. Innanzitutto, i dati provenienti da tutti i graft hanno dimostrato un notevole incremento di pO₂ tra il liquido di perfusione

prelevato pre-circolo polmonare e quello post-circolo polmonare, sia dopo la prima che la terza ora di EVLP. Inoltre, abbiamo analizzato la differenza di pO₂ tra il pre- ed il post-circolo polmonare a 60 e 180 minuti, come si può osservare dalla Tabella 8 e dal Grafico 8. Per il gruppo EVLP Sham la differenza di pO₂ è sostanzialmente stabile durante il processo di perfusione ex vivo; nel gruppo EVLP ischemia si può osservare un incremento di questa differenza: da 380,4 ± 73,9 mmHg a 400,8 ± 48,3 mmHg a 180 minuti. Nei gruppo trattati con ormone tiroideo (EVLP-1 T3, EVLP-1,5 T3), invece, la differenza di pO₂ tra i 60 ed i 180 minuti di EVLP è negativa: questo trend è altresì comune ai tre gruppi che non sono stati sottoposti a danno ischemico.

TIMING	DeltaPO2 (mmHg)							
	SHAM		ISCHEMIA+EVLP		T3 1		T3 1,5	
	Media	Dev std	Media	Dev std	Media	Dev std	Media	Dev std
1H	405,5	53,1	380,4	73,9	434,6	.	417,7	.
3H	399,6	31,3	400,8	48,3	391,9	.	384,6	.

Tabella 8 Valori medi di ΔpO₂ tra i gruppi di studio dopo 60 e 180 minuti di EVLP

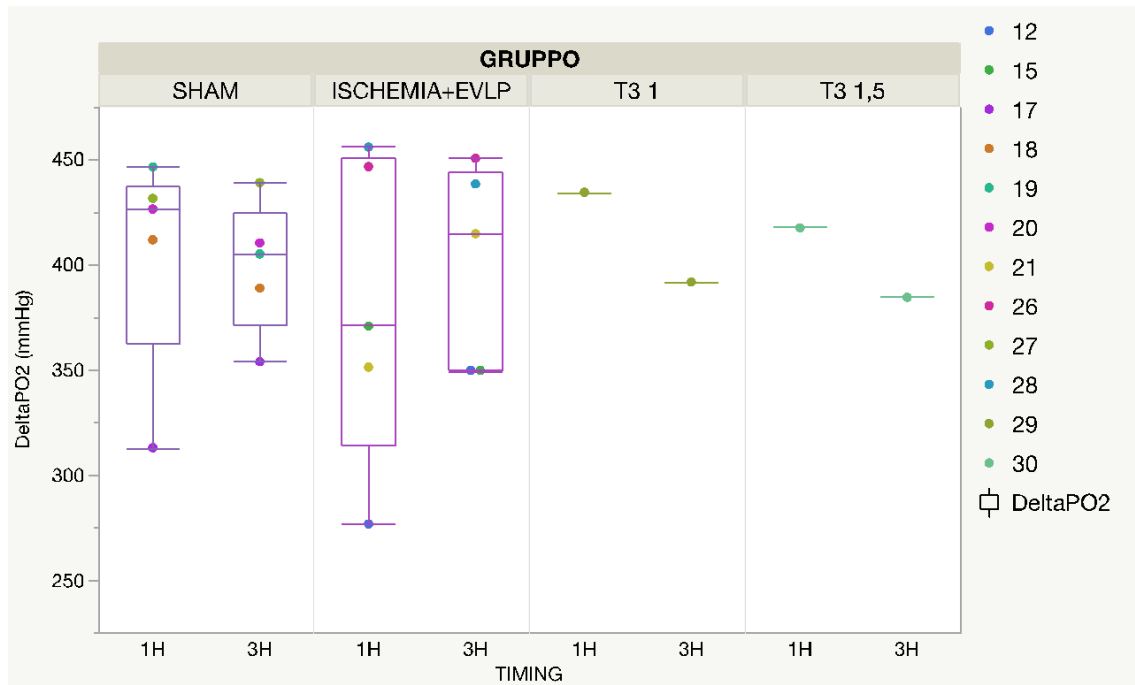


Grafico 8 ΔpO₂ (differenza tra la pO₂ pre- e post-polmone) tra i gruppi di studio dopo 60 e 180 minuti di EVLP

Analoga valutazione viene eseguita anche per i valori di pCO₂ nel liquido di perfusione prelevato in afflusso e deflusso dal circolo polmonare a 60 e 180 minuti di EVLP, nei gruppi Sham ed EVLP. Tutti i valori di pCO₂ registrati sul liquido di perfusione in deflusso risultano sensibilmente inferiori rispetto ai rispettivi dati sul liquido in afflusso, indipendentemente dal timing dell'EVLP. L'analisi della differenza di pCO₂ (Δ pCO₂) nella soluzione di perfusione pre- e post-circolo polmonare mostra una lieve riduzione di questa differenza tra i 60 ed i 180 minuti di EVLP nel gruppo EVLP Sham e nel gruppo EVLP-1,5 T3, appare lievemente incrementata nel gruppo EVLP ischemia ed infine resta sostanzialmente sovrapponibile nel gruppo EVLP-1 T3 (Grafico 9). Le medie del Δ pCO₂ sono riportate nella Tabella 9 e supportano chiaramente i dati rilevati dal grafico precedente; infatti, le medie per il gruppo EVLP Sham sono di $11,4 \pm 1,7$ e $8,7 \pm 0,5$ mmHG a 60 e 180 minuti rispettivamente, per il gruppo EVLP ischemia sono $7,3 \pm 2,3$ e $8,1 \pm 3,5$ mmHg; mentre i valori dei gruppi EVLP-1 T3 ed EVLP-1,5 T3 sono rispettivamente $8,5$ e $12,2$ a 60 minuti, $8,4$ e $8,6$ a 180 minuti.

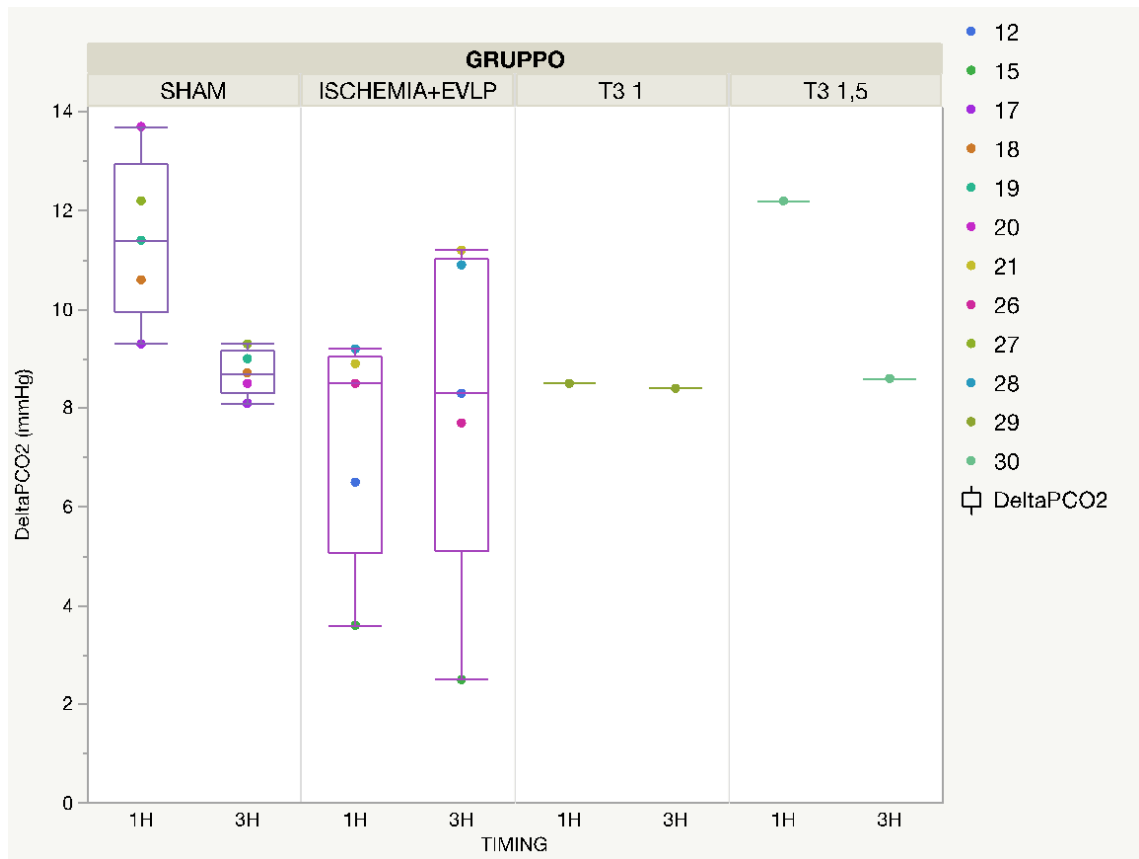


Grafico 9 ΔpCO_2 tra i gruppi di studio dopo 60 e 180 minuti di EVLP

	DeltaPCO2 (mmHg)							
	SHAM		ISCHEMIA+EVLP		T3 1		T3 1,5	
TIMING	Media	Dev std	Media	Dev std	Media	Dev std	Media	Dev std
1H	11,4	1,7	7,3	2,3	8,5	.	12,2	.
3H	8,7	0,5	8,1	3,5	8,4	.	8,6	.

Tabella 9 Valori medi di ΔpCO_2 tra i gruppi di studio dopo 60 e 180 minuti di EVLP

5 VALUTAZIONE RISULTATI AD INTERIM

5.1 DNA MITOCONDRIALE

L'analisi del contenuto di mtDNA nei campioni EVLP Sham, EVLP Ischemia e EVLP Sham T3 mostra un progressivo incremento di tale parametro nel tempo, pur con un certo grado di variabilità da ratto a ratto. La tendenza alla crescita è presente anche in assenza di ischemia. Va osservato comunque che la crescita di mtDNA circolante appare più marcata nei campioni provenienti da animali sottoposti ad ischemia (Grafico 10).

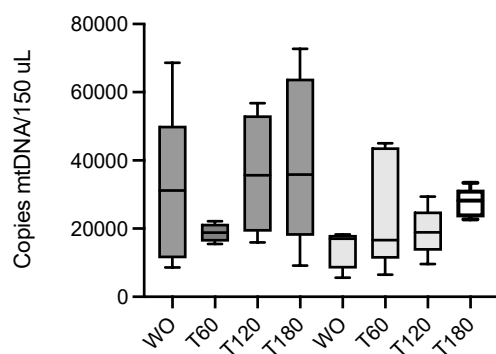


Grafico 10 In grigio scuro i ratti del gruppo EVLP Sham, in grigio chiaro il gruppo EVLP ischemia

L'analisi del numero di copie di mtDNA mostra nei modelli EVLP Ischemia e EVLP Sham T3, un accumulo progressivo di mtDNA quantificato in tre campioni prelevati a tempi diversi (T0, ovvero wash out, T60, T120, T180) dallo stesso perfusato che circola continuamente. Non abbiamo osservato differenze significative tra i campioni EVLP Ischemia e EVLP Sham addizionato con T3, per via del ridotto numero di campioni (n=2) che è stato possibile analizzare nel gruppo EVLP Sham T3. Lo stesso trend di aumento tempo dipendente è osservabile nei campioni EVLP Sham; il contenuto di mtDNA appare comunque costantemente più alto, ad ognuno dei tempi considerati, nei campioni provenienti da ratti ischemici rispetto a quelli non ischemici.

5.2 ANALISI BIOLOGICHE

FMN è un marker di danno mitocondriale valutabile durante le perfusioni ex vivo [32][33].

Il grafico 11 riporta tre curve standard preparate aggiungendo concentrazioni note di FMN in fisiologica (azzurro), Perfadex (arancione) e Steen (grigio), la valutazione del FMN nella Steen è inficiata dalla considerevole fluorescenza emessa dalla soluzione stessa. Pertanto, la molecola FMN è misurabile solamente nei campioni raccolti durante il lavaggio in Perfadex.

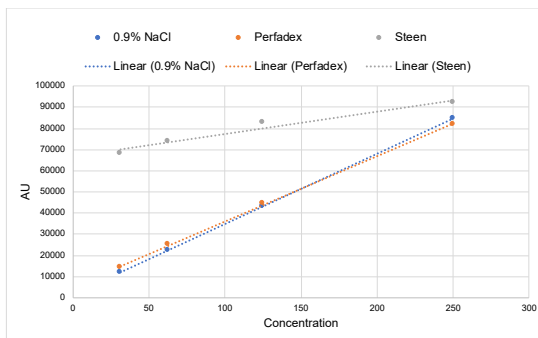


Grafico 11

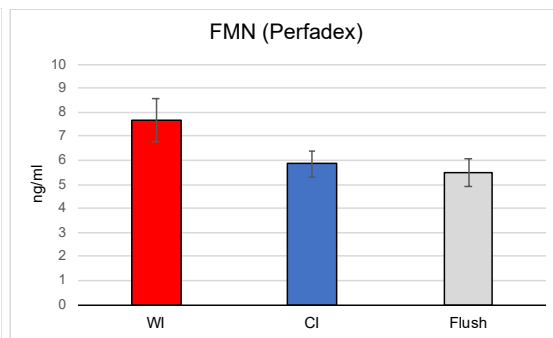


Grafico 12

Il grafico 12 mostra la valutazione di FMN nella Perfadex: si osserva un maggior rilascio nel lavaggio effettuato immediatamente dopo ischemia calda (WI) rispetto ai lavaggi effettuati dopo ischemia fredda (CI) o in assenza di ischemia (Flush) ($p=0.036$). Si osserva un maggior rilascio di NADH nel perfusato del gruppo EVLP+T3 1.5mM (statistica non applicabile causa scarsa numerosità) (Grafico 13).

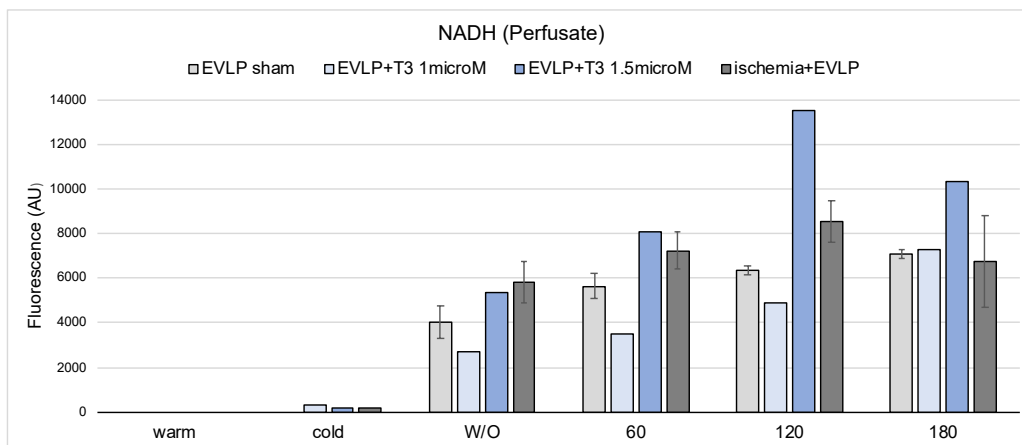


Grafico 13

Per quanto riguarda l'analisi dell'ATP, considerando tutti i dati raccolti negli anni (archive), abbiamo stabilito che il gruppo Nativo del 2022 ($570,64 \pm 55,14$ pmoles/mg) ha un contenuto di ATP inferiore rispetto a quanto osservato in precedenza ($673,97 \pm 69,36$ pmoles/mg). Anche considerando il Nativo del 2014, si rivela un aumento di ATP nei polmoni sottoposti a EVLP-sham ($1093 \pm 66,5$ pmoles/mg, $p=0.033$), cosa che invece non era stata osservata nei precedenti esperimenti ($533,74 \pm 61,77$ pmoles/mg). Questo dato è interessante, in quanto l'unica differenza fra EVLP-sham del 2022 e EVLP-sham del 2014 è la presenza della Steen (noi avevamo utilizzato una in-house solution). Infine, è stato osservato un ulteriore decremento di ATP durante l'EVLP degli organi sottoposti a ischemia calda (WI3h: $487,43 \pm 60,25$ vs WI3h+EVLP: $83,22 \pm 32,58$), confermando il dato già presente in letteratura che la deplezione di ATP non è recuperata durante l'EVLP; non vi è differenza, invece, fra i gruppi ischemia ($673,62 \pm 129,9$) e EVLP con ischemia ($608,52 \pm 142,4$) (Grafico 14). I gruppi trattamento (azzurro e blu nel grafico 14), pur se costituiti da un solo ratto, mostrano una deplezione di ATP maggiore che nel gruppo EVLP-Sham (grigio chiaro nel grafico 14).

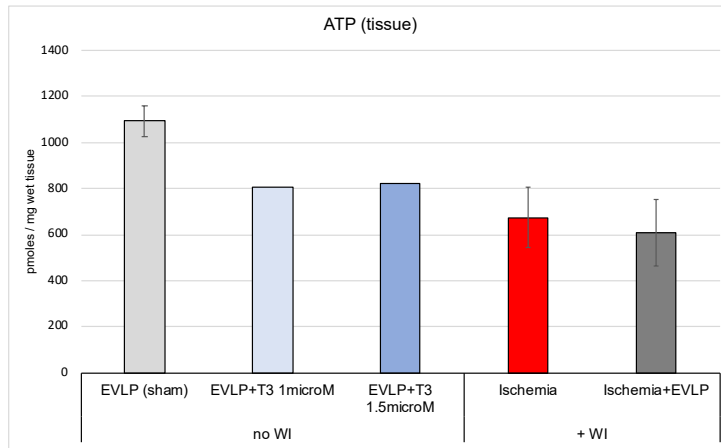


Grafico 14

5.3 ANALISI DELLA SOLUZIONE DI STEEN

La formula della soluzione di Steen è protetta da brevetto e solo alcuni componenti vengono dichiarati dal produttore, tra cui albumina da plasma umano (7,5/8 gr/dL), destrano (<https://www.xvivoperfusion.com/products/steen-solution/>) e una soluzione idro-elettrolitica che abbia le stesse concentrazioni del plasma umano. Nel testo del brevetto registrato in USA, l'autore dimostra come la soluzione di Steen sia la migliore per limitare l'imbibizione dell'organo durante la perfusione eutermica, ovvero l'edema polmonare, e che la molecola che principalmente determina questo effetto protettivo è l'albumina e la pressione oncotica che essa determina a una concentrazione di 70gr/L (<https://patentimages.storage.googleapis.com/0c/8f/46/a46ddc36164eed/US7255983.pdf>). Inoltre l'inventore enuncia una serie di sostanze che "potrebbero essere presenti" nella soluzione: "...The Solution according to the present invention may also contain a vasodilator, preferably papaverin, antibiotics, fibrinolytic components, such as Actilyse,.....and thrombocyte receptor blockers, such as Reopro, also called abciximab. For long-term perfusion the solution according to the present invention may contain hormones, e.g.tyroXin/triodotyronin, insulin, cortison, growth hormone, and anabolic steroids, in physiological concentrations".

Non vengono forniti dettagli in merito ad eventuali procedimenti di stripping con resina a scambio ionico o carbone dell'emoderivato per eliminare acidi grassi liberi, vitamine, steroidi ed altri ormoni [34] e pertanto è stato necessario, alla luce dei risultati ottenuti nei due ratti trattati, misurare le concentrazioni anche di tali analiti nella soluzione di Steen:

Hormones/analytes	Concentration	human serum reference range
Total bilirubin mg/dL	0.10	0.10 - 1.15
Unconjugated bilirubin mg/dL	0.01	0.10 - 0.85
Conjugated bilirubin	0.09 mg/dL	0.01 - 0.30
aldosterone ng/dL	4.7	3.7 - 12.0
IGF1 µg/L	Undetectable (<10)	Age dependent 66 - 185
Total T4 nmol/l	61.7	68-141*
Total T3 nmol/l	3,2	1.3-2.5
estradiol pmol/L	83	Male 41 - 159 follicular phase 45.4-854 ovulatory phase 151-1461 luteal phase 81.9-1251 menopause 18.4-505

progesterone nmol/L	0.72	Male follicular phase 0.18-2.84 ovulatory phase 0.38-38.1 luteal phase 5.82-75.9 menopause < 0.40
testosterone nmol/L	3.14	Male 9.90 - 27.80 Female 0.20 - 2.86
cortisol µg/dL	Undetectable (<0.05)	5.00 - 25.00
1.25-OH vitamin D	11.0	15.2 - 90.1
25-OH vitamin D µg/L	Undetectable (<3.0)	20-100
Vitamin B12 ng/L	162	211 - 911
Folic acid µg/L	0.9	3.9 - 26.8
Vitamin A µg/dL	6	30-80
Vitamin E mg/L	105	500-1800
Vitamin C µg/L	<0.5	4.6-14.9
insulin mU/L	Undetectable (<0.4)	2.0 - 25.0
GH µg/L	Undetectable (<0.05)	< 4.00
ft3 (pmol/l)	21.1	2.9-7.1
ft4 (pmol/l)	42.1	11.5-24.5
TSH (mU/L)	0.016	0.270 - 4.500
prolactin µg/L	0.1	3.0 - 20.0
pH	7.42	7.32 - 7.42
Ionized calcium mmol/l	0.72	2-3
Chloride mmol/l	117	95-105
Sodium mmol/l	148	135-147
Potassium mmol/l	4.7	3.5-5
Glucose mg/dl	188	70-100
Lactate mg/dl	<3	<4
Bicarbonates mmol/l	11.7	22-26

Come definito nei metodi, abbiamo utilizzato dei kit commerciali per diagnostica umana per il dosaggio della tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) totali (TT4 e TT3) e le frazioni libere (ft4 e ft3), il testosterone totale, il progesterone, l'estradiolo, il cortisolo, la 25-OH vitamina D, la vitamina B12 e l'acido folico con saggio immunometrico competitivo in elettrochemiluminescenza (ECLIA) (Elecsys, Roche). Le vitamine A, B e C sono state invece misurate con metodica High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Infine è stata analizzata la composizione chimico-fisica della soluzione mediante apparecchiatura per emogas analisi di sangue arterioso (pH, bicarbonati, glucosio, elettroliti, lattato, calcio ionizzato).

Gli ormoni steroidei sono stati misurati nella soluzione commerciale (Lotto 8164835) prima di qualsiasi manipolazione e a vari tempi durante la procedura di EVLP. Tutte le analisi sono state riprodotte in cieco da un altro laboratorio (Prof. F. D'Ovidio, Columbia University) e su un altro lotto di Steen, confermando i medesimi risultati. La soluzione di Steen commerciale contiene albumina umana a concentrazione doppia rispetto al siero umano (7.5-8 g/dl) verosimilmente non trattata in quanto mantiene un significativo contenuto ormonale, inclusi androgeni ed estrogeni. Dal momento che il nostro obiettivo erano gli ormoni tiroidei, ci siamo focalizzati su questi ultimi. Le concentrazioni di fT4 e fT3 della Steen solution sono approssimativamente il doppio ed il triplo, rispettivamente, di quelle presenti nel siero umano e derivano verosimilmente da “displacement” degli ormoni dall’albumina. Per dimostrare ciò abbiamo diluito un campione di albumina ad uso farmacologico (20%), ottenendo una correlazione lineare. Inoltre, il campione contenente 7 g/dL di albumina presenta livelli di fT4 e fT3 sovrapponibili a quelli contenuti nella Soluzione di Steen (Grafico 15). E’ stata analizzata anche la soluzione di Perfadex, utilizzata per il campione flush, che ha dimostrato non contenere albumina e avere una concentrazione di TT3 e fT3 irrilevante.

La concentrazione di fT4 e fT3 non si sono modificate in modo significativo durante la EVLP (Grafico 16) tranne un lieve incremento del displacement verosimilmente per fenomeni di evaporazione della frazione liquida della Steen durante la procedura.

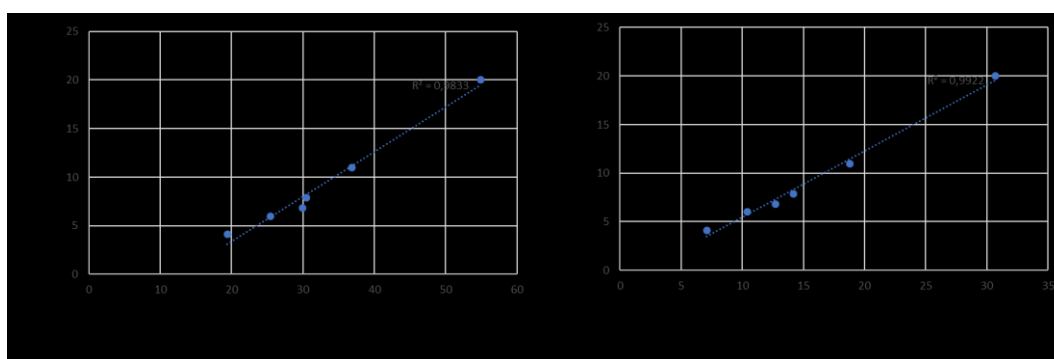


Grafico 15

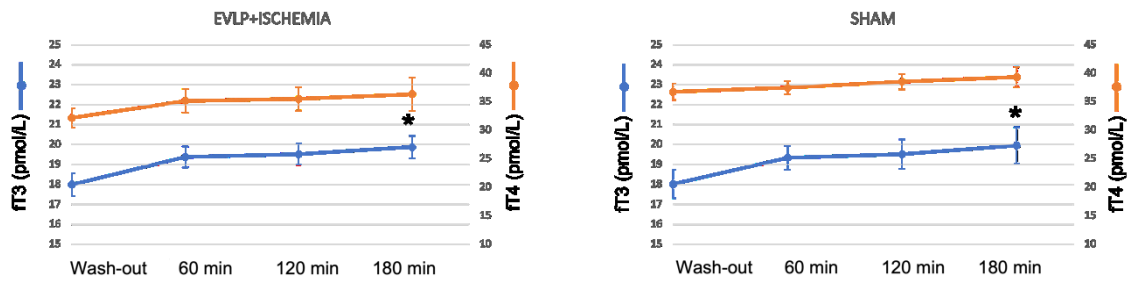


Grafico 16 La concentrazione di fT4 e fT3 non si sono modificate in modo significativo durante la EVLP. Il valore di concentrazione a 180min è significativamente più alto rispetto al WO verosimilmente per la riduzione del volume totale circolante (evaporazione/prelievi seriati per campionamento)

5.4 TRANSCRITTOMICA

Le analisi di genomica sui campioni dei ratti fino ad ora eseguiti sono in corso. IL ritardo è legato allo stop di mesi subito dal centro di ricerche precliniche a causa della pandemia Covid19.

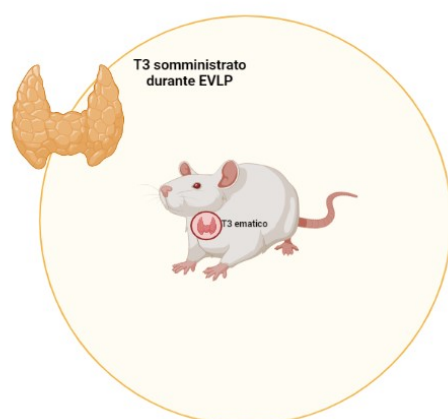
6 DISCUSSIONE

Il presente studio è stato caratterizzato dalla comparsa “in itinere” di risultati funzionali polmonari nel gruppo trattamento contrari a quanto ipotizzato. Il modello preclinico è risultato efficace nel creare un danno ischemico polmonare reversibile, come mostrato dalle analisi funzionali, biologiche e metaboliche. L’analisi dei tempi chirurgici ha dimostrato una omogeneità nei gruppi presi in esame, escludendo bias da abilità tecniche-chirurgiche dell’operatore. In particolare, si è dimostrata corretta la scelta di sottoporre il graft ad un’ora di ischemia calda e successivamente un’ora di ischemia fredda. In letteratura sono descritti modelli sperimentali che utilizzano tempi di ischemia molto variabili e discordanti tra loro e, in quest’ottica, il nostro studio può essere un modello di riferimento ripetibile e validato.

Anche in questa casistica come in letteratura sono stati confermati gli effetti positivi della procedura di EVLP sull’organo da ricondizionare.

L’ipotesi iniziale, secondo la quale la somministrazione di ormone tiroideo in corso di procedura di EVLP migliora la funzione d’organo e riduce il danno da ischemia-riperfusione, è stata apparentemente smentita dai risultati ottenuti nei due ratti trattati con ormone tiroideo. Parzialmente smentita perché la vera “scoperta” è stato riscontrare che la soluzione considerata il gold-standard per la perfusione eutermica d’organo, la Steen solution, è per le cellule del graft un milieu metabolico paragonabile alla tiretossicosi del morbo di Basedow (Fig. 6).

Fig. 6



In uno dei diversi brevetti registrati sulla Steen è contemplata la possibilità della presenza di ormone tiroideo e di altri ormoni, che però vengono dichiarati in “concentrazione fisiologica” (ref. nei risultati ad interim). In base a quanto riportato in letteratura dagli anni duemila (quando queste soluzioni di perfusione sono state messe a punto) ad oggi, non ci sono studi sull’impatto della composizione ormonale della Steen sul metabolismo cellulare polmonare. Le nostre analisi hanno permesso di descrivere, per la prima volta, l’effettiva composizione della soluzione stessa, evidenziando il ruolo “chelante” dell’albumina su svariati ormoni e vitamine. A nostro parere è impensabile ritenere che questo stato di tireotossicosi e di stimolo ormonale indotto dalla Steen non abbia un influsso sulle cellule di un organo che si trova in condizione di “stunning” parziale come dopo il danno ischemico. Questo è, se pur in fase iniziale, confermato dal nostro studio in cui la concentrazione di ormone tiroideo nella soluzione non diminuisce nel tempo durante l’EVLP: gli ormoni dosati nella Steen nelle diverse tempistiche hanno concentrazioni uniformi nei diversi gruppi. Questo può essere legato all’eccessiva concentrazione di T3 nel perfusato che rende l’ambiente sovrassaturo per cui le modifiche di concentrazione indotte da un effetto metabolico intrapolmonare non verrebbero misurate. Pertanto, risulta fondamentale procedere con le analisi di trascrittomica al fine di evidenziare differenze di attivazione dei pathways controllati dalla T3 (mediate dal recettore Tr- α , recettore nucleare della cellula polmonare). Gli ormoni tiroidei hanno una azione prevalentemente intracellulare aumentando la trascrizione genica, quindi la trascrittomica ha un valore cruciale in questo studio. Cypel et al. nel 2009 hanno dimostrato come, in un modello porcino, l’EVLP attenua il danno ischemico associato a una prolungata ischemia [35]. La preservazione ipotermica del graft nella soluzione di Perfadex è stata tradizionalmente il requisito per un buon outcome del trapianto: tuttavia l’inibizione del metabolismo cellulare indotta dall’ipotermia protettiva impedisce l’attivazione di processi di riparazione cellulare che invece avvengono durante l’organ-preservation eutermica. L’EVLP non è un concetto nuovo, e il suo sviluppo ha permesso nella pratica clinica la valutazione di organi “marginali” permettendo l’incremento del tasso di accettazione di donatori multiorgano. L’EVLP dovrebbe, tuttavia, essere una piattaforma atta non solo all’evaluation dell’organo, ma anche al suo ricondizionamento, ovvero la riparazione del danno da ischemia riperfusione e dello stress ossidativo. Diversi trattamenti somministrati durante EVLP quali antibiotici, agenti fibrinolitici, steroidi si

sono dimostrati efficaci nel migliorare la qualità dell'organo. Tuttavia attualmente l'EVLP non ha raggiunto un esteso impiego nella pratica clinica proprio per la mancanza di un suo provato effetto ricostitutivo cellulare [36]. Una chiave per ottimizzare la metodica è approfondire quanto emerso per la prima volta in questo studio, ovvero la composizione della Steen effettiva in termini di ormoni e vitamine. La finalità sarebbe riuscire a individuare la concentrazione "ideale" di molecole biologicamente attive che a dosaggi eccessivi possono sovrastimolare una cellula la quale, per le condizioni di intenso stress in cui si trova, ne risulta danneggiata.

Analizzando il nostro modello preclinico in termini di danno ischemico e capacità dell'EVLP di agire come "reconditioning", i risultati confermano la validità e la reversibilità del danno che recupera parzialmente durante EVLP.

Il confronto della compliance polmonare tra il gruppo EVLP Sham ed EVLP Ischemia ha evidenziato una serie di importanti differenze: una peggiore compliance nel gruppo EVLP Ischemia dopo 45 minuti di ricondizionamento, che però tende a migliorare e raggiungere valori sovrapponibili a quelli del gruppo EVLP Sham dopo 180 minuti; invece la curva della compliance del gruppo EVLP Sham risulta in lieve peggioramento o stabile nel secondo intervallo di tempo analizzato (tra i 45 ed i 180 minuti di EVLP). Queste caratteristiche della curva di compliance del gruppo EVLP Ischemia sono correlate al periodo ischemico (per cui la compliance diminuisce al secondo checkpoint ovvero a 45 minuti di EVLP). Risulta evidente, per questo parametro, la presenza di un danno ischemico parzialmente invertito dalla procedura di perfusione ex vivo che ricondiziona l'organo migliorandone la compliance.

La pressione di picco registrata in corso di EVLP si dimostra in aumento in entrambi i gruppi, EVLP Sham ed EVLP Ischemia, fino al 45° minuto di procedura; questo è spiegato dal fatto che in questo intervallo di tempo ci troviamo ancora nella prima fase della perfusione ex vivo (che termina dopo circa 45 minuti), chiamata fase di riperfusione, dove il volume corrente polmonare viene aumentato gradualmente fino a raggiungere il suo valore finale di 7 ml/Kg. Le maggiori pressioni iniziali registrate nel gruppo EVLP possono essere spiegate, anche in questo caso, come un danno ischemico che però risponde al processo di EVLP cui viene sottoposto il graft con un miglioramento nel trend pressorio.

Riguardo le pressioni polmonari medie, invece, possiamo ritenere normale l'incremento del trend pressorio nei primi 45 minuti di EVLP, in quanto corrisponde effettivamente ad un incremento del flusso di soluzione di Steen in arteria polmonare. Tale flusso varia, nei primi 45 minuti, dal 20 al 100% del valore previsto (ovvero 6 ml/min/g di peso polmonare predetto). L'ulteriore incremento delle PAPm medie fino al 180° minuto può essere causato dal danno ischemico subito dai polmoni del gruppo EVLP ischemia, poiché nel gruppo EVLP Sham le PAPm raggiungono un valore di plateau senza aumentare.

L'impatto negativo del periodo ischemico sull'apparato vascolare si identifica anche con l'analisi dei tempi di perfusione dei polmoni con soluzione Perfadex prima del loro prelievo, che risultano direttamente proporzionali alle resistenze vascolari totali. Nei gruppi Ischemia ed EVLP Ischemia le resistenze vascolari sono aumentate a causa del danno da ischemia cui sono stati sottoposti i polmoni contrariamente a quelli del gruppo EVLP Sham.

Il Wet/Dry Ratio è considerato, in letteratura, un indice dell'edema polmonare, essendo di fatto il rapporto tra il peso del polmone al termine della procedura e dopo la sua disidratazione. Il valore più alto è riscontrato nei gruppi con ischemia dove il danno, agendo negativamente soprattutto a livello del sistema vascolare, ne ha incrementato la componente edemigena.

Gli scambi gassosi polmonari, comprendenti la differenza di pO₂ e pCO₂, sono, anche nella pratica clinica quotidiana, il più importante fattore di valutazione della funzione polmonare. Uno degli scopi primari della procedura di EVLP è proprio quello di ricondizionare organi marginali e migliorarne la capacità di scambio.

Nel gruppo EVLP Ischemia si evince un trend di incremento sia del ΔpO_2 che del ΔpCO_2 e pertanto indice di miglioramento della capacità di gas exchange di questi organi. Sebbene i ratti trattati con ormone tiroideo siano solo due, si è evidenziato un andamento sovrapponibile al gruppo EVLP Sham per la fase pre-posizionamento nel circuito: i tempi di perfusione con Perfadex ricalcano quelli del gruppo EVLP Sham, mentre le pressioni riscontrate sia in arteria polmonare che di ventilazione (pressione di picco), hanno avuto un andamento sovrapponibile a quello del parenchima polmonare sottoposto ad ischemia.

Poichè la variazione avveniva solo dopo iniziata la perfusione con Steen più ormone tiroideo, abbiamo deciso di investigare la concentrazione di partenza della Steen. In letteratura sono riportati vari casi di malattia di Graves con relativa ipertensione polmonare sia nell'adulto [37][38], che in età pediatrica [39].

A concentrazioni fisiologiche infatti, la T3 agisce da vasodilatatore, contrariamente a quanto accade nello stato di tireotossicosi. Tale effetto è stato ben evidenziato dalle analisi eseguite sul DNA mitocondriale e dai risultati ottenuti che mostrano un aumento del mtDNA circolante e quindi un peggioramento del danno cellulare nei ratti con aggiunta di T3. Sulla membrana mitocondriale vi sono le integrine che potrebbero mediare l'azione degli ormoni tiroidei attraverso delle vie non canoniche. Il risultato positivo dell'instillazione intralveolare descritto in letteratura può essere un dato parziale che non rispecchia la reale risposta cellulare all'esposizione alla T3 (questo perché il gene del surfattante ha una azione diretta). L'aumento del mtDNA circolante è noto essere non solo espressione di danno ma anche un fattore proinfiammatorio: esso può rappresentare un segnale di danno tissutale (molecola di allarme, "alarmin") e determinare una risposta infiammatoria in maniera analoga a quanto farebbe il DNA batterico o virale. L'mtDNA è ipometilato in un modo diverso dal DNA nucleare, facendolo apparire così più "estraneo" al sistema immunitario rispetto al DNA self. Il primo lavoro che ha dimostrato il potenziale immunostimolante dell'mtDNA è del 2004 [40].

L'osservazione da noi riportata di un accumulo progressivo di mtDNA nel perfusato ricircolante nel polmone indica che quest'ultimo costituisce una fonte di mtDNA extracellulare, rilasciata probabilmente da cellule morte o danneggiate; dal momento che il rilascio è stato osservato anche in campioni non ischemici, è evidente che il rilascio di mtDNA non segue necessariamente una morte per necrosi, ma è un evento che si può verificare anche in altri circostanze che non portano necessariamente a morte cellulare.

Diversi studi hanno dimostrato la presenza di mtDNA circolante nel plasma nell'uomo e in modelli animali; è stato anche osservato che il livello di mtDNA cresce in seguito ad eventi traumatici, o in maniera età dipendente, raggiungendo i livelli massimi in soggetti ultranovantenni [i] e contribuendo al fenomeno dell'inflammaging [41]. Le concentrazioni di mtDNA osservate in condizioni post traumatiche o nei soggetti anziani

sono biologicamente attive e in grado di stimolare il rilascio di TNF-alfa, IL-1 e IL-6 da parte di monociti/macrofagi.

Da questo punto di vista, l'osservazione di un accumulo di mtDNA nel perfusato ci indica che gli organi perfusi possono rappresentare un'importante fonte di molecole proinfiammatorie nel soggetto ricevente nei momenti immediatamente successivi al trapianto, contribuendo così allo stato infiammatorio e all'attivazione della risposta immunitaria post trapianto. Resta naturalmente da chiarire se l'mtDNA misurato sia rilasciato dalle cellule dell'organo in maniera fisiologica e regolata, con un meccanismo di esocitosi basato su microvescicole, o se si tratti di un rilascio accidentale da parte di cellule danneggiate. L'osservazione nei nostri esperimenti che il polmone anche non ischemico rilascia mtDNA indica che il polmone è certamente una delle fonti dell'mtDNA in circolo.

La concentrazione del NADH nel perfusato è indicativa dello stato della catena respiratoria mitocondriale [33][42]. Tanto maggiore è la quantità di NADH rilasciata in soluzione, più grave è la disfunzione mitocondriale delle cellule, e nei nostri esperimenti il NADH è più alto nei gruppi ischemici e in quelli trattati con T3. L'EVLP da solo non consente il recupero della funzionalità mitocondriale, non permettendo ancora di recuperare il danno dell'ischemia. Questo dimostra come l'EVLP sia una procedura che attualmente non è ancora ottimale per il recupero del danno da ischemia-riperfusion, e una delle cause potrebbe essere l'eccessiva concentrazione di ormone tiroideo presente in soluzione.

7 CONCLUSIONI E FUTURO DEL PROGETTO

A causa della pandemia Covid 19 lo studio ha subito un forte rallentamento (il centro di studi preclinici dove venivano effettuati gli esperimenti ha chiuso per diversi mesi), per cui al momento della stesura di questa tesi non è stato possibile riportare i risultati delle analisi trascrittomiche. L'individuazione dei pathways di attivazione del T3 avrà un ruolo chiave nel definire l'esatto fabbisogno cellulare di ormone tiroideo e la potenzialità riparativa di quest'ultimo sul danno da ischemia-riperfusion. Il progetto prosegue pertanto a stretto giro con il completamento dei gruppi trattamento, sia senza ischemia (Sham) che con ischemia.

Per poter definire l'effetto biologico della molecola di T3 sul graft e le sue vie di attivazione sulla cellula ischemica, intendiamo procedere con un nuovo studio che utilizzi una soluzione di perfusione "custom made" che utilizzi albumina ricombinante, quindi priva di tutte le sostanze metabolicamente attive che nella Steen funzionano da fattore confondente. L'obiettivo è individuare la minima concentrazione efficace della T3 per la riparazione del danno ischemico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] J. Reeb, M. Cypel, Ex vivo lung perfusion, *Clin. Transplant.* 30 (2016) 183–194.
<https://doi.org/10.1111/ctr.12680>.
- [2] L.A.S. Stig Steen, Trygve Sjöberg, Leif Pierre, Qiuming Liao, Leif Eriksson, Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor, 357 (2005) 1–5.
http://biomedica.biblio.uniroma2.it/smartFiles_Data/ec18901b-e5bd-46c1-9f44-9882a7dc2089_Steen S.pdf%5Cnpapers3://publication/uuid/C2583EC3-44D3-4D48-9F48-507B15AF23B4.
- [3] S. Steen, R. Ingemansson, L. Eriksson, L. Pierre, L. Algotsson, P. Wierup, Q. Liao, A. Eyjolfsson, R. Gustafsson, T. Sjöberg, First Human Transplantation of a Nonacceptable Donor Lung After Reconditioning Ex Vivo, *Ann. Thorac. Surg.* 83 (2007) 2191–2194.
<https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2007.01.033>.
- [4] R. Ingemansson, A. Eyjolfsson, L. Mared, L. Pierre, L. Algotsson, B. Ekmehag, R. Gustafsson, P. Johnsson, B. Koul, S. Lindstedt, C. Lührs, T. Sjöberg, S. Steen, Clinical Transplantation of Initially Rejected Donor Lungs After Reconditioning Ex Vivo, *Ann. Thorac. Surg.* 87 (2009) 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2008.09.049>.
- [5] M. Cypel, J.C. Yeung, T. Machuca, M. Chen, L.G. Singer, K. Yasufuku, M. de Perrot, A. Pierre, T.K. Waddell, S. Keshavjee, Experience with the first 50 ex vivo lung perfusions in clinical transplantation, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 144 (2012) 1200–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2012.08.009>.
- [6] F. Valenza, L. Rosso, S. Coppola, S. Froio, A. Pallechi, D. Tosi, P. Mendogni, V. Salice, G.M. Ruggeri, J. Fumagalli, A. Villa, M. Nosotti, L. Santambrogio, L. Gattinoni, Ex vivo lung perfusion to improve donor lung function and increase the number of organs available for transplantation, *Transpl. Int.* 27 (2014) 553–561.
<https://doi.org/10.1111/tri.12295>.
- [7] G.A. Bassani, C. Lonati, D. Brambilla, F. Rapido, F. Valenza, S. Gatti, Ex vivo lung perfusion in the rat: Detailed procedure and videos, *PLoS One.* 11 (2016) 1–15.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167898>.
- [8] K. Nelson, C. Bobba, S. Ghadiali, D.H. Jr, S.M. Black, B.A. Whitson, Animal models of ex vivo lung perfusion as a platform for transplantation research, *World J. Exp. Med.*

- 4 (2014) 7. <https://doi.org/10.5493/wjem.v4.i2.7>.
- [9] R.D. Yusen, L.B. Edwards, A.I. Dipchand, S.B. Goldfarb, A.Y. Kucheryavaya, B.J. Levvey, L.H. Lund, B. Meiser, J.W. Rossano, J. Stehlik, The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Lung and Heart–Lung Transplant Report—2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant, *J. Hear. Lung Transplant.* 35 (2016) 1170–1184. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2016.09.001>.
- [10] G.I. Snell, A. Griffiths, B.J. Levvey, T. Oto, Availability of Lungs for Transplantation: Exploring the Real Potential of the Donor Pool, *J. Hear. Lung Transplant.* 27 (2008) 662–667. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2008.03.009>.
- [11] A.E. Gelman, A.J. Fisher, H.J. Huang, M.A. Baz, C.M. Shaver, T.M. Egan, M.S. Mulligan, Report of the ISHLT Working Group on Primary Lung Graft Dysfunction Part III: Mechanisms: A 2016 Consensus Group Statement of the International Society for Heart and Lung Transplantation, *J. Hear. Lung Transplant.* 36 (2017) 1114–1120. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2017.07.014>.
- [12] M.A. Roman, S. Nair, S. Tsui, J. Dunning, J.S. Parmar, Ex vivo lung perfusion: A comprehensive review of the development and exploration of future trends, *Transplantation.* 96 (2013) 509–518. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318295eeb7>.
- [13] H.F. Escobar-Morreale, M.J. Obregón, A. Hernández, F. Escobar Del Rey, G. Morreale De Escobar, Regulation of iodothyronine deiodinase activity as studied in thyroidectomized rats infused with thyroxine or triiodothyronine, *Endocrinology.* 138 (1997) 2559–2568. <https://doi.org/10.1210/endo.138.6.5212>.
- [14] S.A. Dulchavsky, J. Bailey, Triiodothyronine treatment maintains surfactant synthesis during sepsis., *Surgery.* 112 (1992) 475–479.
- [15] X. Yan, 2018_Pnas_Si_Spe, *Proc. Natl. Acad. Sci.* i (2017) 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas>.
- [16] J. Lei, S. Nowbar, C.N. Mariash, D.H. Ingbar, Thyroid hormone stimulates Na-K-ATPase activity and its plasma membrane insertion in rat alveolar epithelial cells, *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 285 (2003) 762–772. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00376.2002>.
- [17] C. Pantos, I. Mourouzis, T. Saranteas, V. Brozou, G. Galanopoulos, G. Kostopanagiotou,

- D. V. Cokkinos, Acute T3 treatment protects the heart against ischemia-reperfusion injury via TR α 1 receptor, *Mol. Cell. Biochem.* 353 (2011) 235–241.
<https://doi.org/10.1007/s11010-011-0791-8>.
- [18] M. Ibrahim, H. Strah, H. Huang, A. Krupnick, D. Kreisel, R. Hachem, E. Trulock, A. Alouch, A. Gelman, Circulating Mitochondrial DNA Is Elevated in Patients with Immediate Primary Graft Dysfunction, *J. Hear. Lung Transplant.* 32 (2013) S33.
<https://doi.org/10.1016/j.healun.2013.01.885>.
- [19] J. Yang, Y. Wang, M. Sui, F. Liu, Z. Fu, Q.X. Wang, Tri-iodothyronine preconditioning protects against liver ischemia reperfusion injury through the regulation of autophagy by the MEK/ERK/mTORC1 axis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467 (2015) 704–710.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.080>.
- [20] V. Fernández, I. Castillo, G. Tapia, P. Romanque, S. Uribe-Echevarría, M. Uribe, D. Cartier-Ugarte, G. Santander, M.T. Vial, L.A. Videla, Thyroid hormone preconditioning: Protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat, *Hepatology.* 45 (2007) 170–177. <https://doi.org/10.1002/hep.21476>.
- [21] S.M. Kim, S.W. Kim, Y.J. Jung, S. Il Min, S.K. Min, S.J. Kim, J. Ha, Preconditioning with thyroid hormone (3,5,3-triiodothyronine) prevents renal ischemia-reperfusion injury in mice, *Surg. (United States).* 155 (2014) 554–561.
<https://doi.org/10.1016/j.surg.2013.10.005>.
- [22] R. Vargas, L.A. Videla, Thyroid hormone suppresses ischemia-reperfusion-induced liver NLRP3 inflammasome activation: Role of AMP-activated protein kinase, *Immunol. Lett.* 184 (2017) 92–97. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.01.007>.
- [23] P.S. MacDonald, A. Aneman, D. Bhonagiri, D. Jones, G. O’Callaghan, W. Silvester, A. Watson, G. Dobb, A systematic review and meta-analysis of clinical trials of thyroid hormone administration to brain dead potential organ donors, *Crit. Care Med.* 40 (2012) 1635–1644. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182416ee7>.
- [24] S.F. Ma, L. Xie, M. Pino-Yanes, S. Sammani, M.S. Wade, E. Letsiou, J. Siegler, T. Wang, G. Infusino, R.A. Kittles, C. Flores, T. Zhou, B.S. Prabhakar, L. Moreno-Vinasco, J. Villar, J.R. Jacobson, S.M. Dudek, J.G.N. Garcia, Type 2 deiodinase and host responses of sepsis and acute lung injury, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45 (2011) 1203–1211. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0179OC>.
- [25] M. Bhargava, M.R. Runyon, D. Smirnov, J. Lei, T.J. Groppoli, C.N. Mariash, O.D.

- Wangensteen, D.H. Ingbar, Triiodo-L-thyronine rapidly stimulates alveolar fluid clearance in normal and hyperoxia-injured lungs, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178 (2008) 506–512. <https://doi.org/10.1164/rccm.200709-1429OC>.
- [26] A.E. Consolini, M.I. Ragone, P. Bonazzola, G.A. Colareda, Mitochondrial bioenergetics during ischemia and reperfusion, *Adv. Exp. Med. Biol.* 982 (2017) 141–167. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_8.
- [27] M. Kadletz, P.G. Mullen, M. Ding, L.G. Wolfe, A.S. Wechsler, Effect of triiodothyronine on postischemic myocardial function in the isolated heart, *Ann. Thorac. Surg.* 57 (1994) 657–662. [https://doi.org/10.1016/0003-4975\(94\)90563-0](https://doi.org/10.1016/0003-4975(94)90563-0).
- [28] F. Valenza, L. Rosso, M. Pizzocri, V. Salice, M. Umbrello, G. Conte, A. Stanzi, J. Colombo, S. Gatti, L. Santambrogio, G. Iapichino, L. Gattinoni, The consumption of glucose during ex vivo lung perfusion correlates with lung edema, *Transplant. Proc.* 43 (2011) 993–996. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.01.122>.
- [29] F. Valenza, L. Rosso, S. Coppola, S. Froio, J. Colombo, R. Dossi, J. Fumagalli, V. Salice, M. Pizzocri, G. Conte, S. Gatti, L. Santambrogio, L. Gattinoni, β -Adrenergic agonist infusion during extracorporeal lung perfusion: Effects on glucose concentration in the perfusion fluid and on lung function, *J. Hear. Lung Transplant.* 31 (2012) 524–530. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2012.02.001>.
- [30] C. Lonati, G.A. Bassani, D. Brambilla, P. Leonardi, A. Carlin, A. Favarsani, S. Gatti, F. Valenza, Influence of ex vivo perfusion on the biomolecular profile of rat lungs, *FASEB J.* 32 (2018) 5532–5549. <https://doi.org/10.1096/fj.201701255R>.
- [31] J.C. Parker, C.L. Ivey, A. Tucker, Phosphotyrosine phosphatase and tyrosine kinase inhibition modulate airway pressure-induced lung injury, *J. Appl. Physiol.* 85 (1998) 1753–1761. <https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.5.1753>.
- [32] L. Wang, E. Thompson, L. Bates, T.L. Pither, S.A. Hosgood, M.L. Nicholson, C.J.E. Watson, C. Wilson, A.J. Fisher, S. Ali, J.H. Dark, Flavin mononucleotide as a biomarker of organ quality - A pilot study, *Transplant. Direct.* (2020) 1–7. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000001046>.
- [33] A. Schlegel, X. Muller, M. Mueller, A. Stepanova, P. Kron, O. de Rougemont, P. Muiesan, P.A. Clavien, A. Galkin, D. Meierhofer, P. Dutkowski, Hypothermic oxygenated perfusion protects from mitochondrial injury before liver transplantation, *EBioMedicine.* 60 (2020) 103014. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103014>.

- [34] K. Tanaka, Y. Matsumoto, M. Mochizuki, M. Takezawa, M. Yoshimura, T. Motomura, F. Fukuda, K. Nakao, Thyroid hormone-free albumin: Charcoal treatment or resin treatment, *Ann. Nucl. Med.* 10 (1996) 357–359. <https://doi.org/10.1007/bf03164747>.
- [35] M. Cypel, M. Rubacha, J. Yeung, S. Hirayama, K. Torbicki, M. Madonik, S. Fischer, D. Hwang, A. Pierre, T.K. Waddell, M. De Perrot, M. Liu, S. Keshavjee, Normothermic Ex Vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation, *Am. J. Transplant.* 9 (2009) 2262–2269. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02775.x>.
- [36] M. Capuzzimati, O. Hough, M. Liu, Cell death and ischemia-reperfusion injury in lung transplantation, *J. Hear. Lung Transplant.* 41 (2022) 1003–1013. <https://doi.org/10.1016/J.HEALUN.2022.05.013>.
- [37] S.D. Santos, D. Lopes Sousa, A. Cristina Martins, J. Rua, P. Ribeiro, Cor Pulmonale Secondary to Severe Pulmonary Hypertension As the First Manifestation of Graves' Disease, *Cureus.* 14 (2022) 8–11. <https://doi.org/10.7759/cureus.28115>.
- [38] Z. Khan, G. Mlawa, M. Bashir, M. Abumedian, S. Yousif, A. Gupta, V. Warriar, Resolution of Thyrotoxicosis-Associated Pulmonary Hypertension With Treatment of Thyrotoxicosis: A Case-Based Report and Literature Review, *Cureus.* 14 (2022) 8–13. <https://doi.org/10.7759/cureus.21304>.
- [39] J. Oden, I.M. Cheifetz, Neonatal Thyrotoxicosis and Persistent Pulmonary Hypertension Necessitating Extracorporeal Life Support, *Pediatrics.* 115 (2005) e105–e108. <https://doi.org/10.1542/PEDS.2004-0554>.
- [40] L.V. Collins, S. Hajizadeh, E. Holme, I.-M. Jonsson, A. Tarkowski, Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses, *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 995–1000. <https://doi.org/10.1189/jlb.0703328>.
- [41] M. Pinti, V. Appay, J. Campisi, D. Frasca, T. Fülöp, D. Sauce, A. Larbi, B. Weinberger, A. Cossarizza, Aging of the immune system – focus on inflammation and vaccination, *Eur. J. Immunol.* 46 (2016) 2286. <https://doi.org/10.1002/EJL.201546178>.
- [42] B.G. Bruinsma, G. V. Sridharan, P.D. Weeder, J.H. Avruch, N. Saeidi, S. Özer, S. Geerts, R.J. Porte, M. Heger, T.M. Van Gulik, P.N. Martins, J.F. Markmann, H. Yeh, K. Uygun, Metabolic profiling during ex vivo machine perfusion of the human liver, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep22415>.
