

TRAPIANTO COMBINATO DI INTESTINO E MIDOLLO PER LO STUDIO DELL'INDUZIONE DI TOLLERANZA IMMUNOLOGICA

*S. Zonta, F. Fayer, F. Abbiati, E. Zitelli, P.F. Piccioni, M. Viola, L. Cobianchi,
C. Zampaglione, A. Venetis, L. Kordopati, A. Deho, B. Burroni, M. Balestreri*
M. Bonfichi*, A. Lorenzi*, M. Alessiani, A. Zonta*

*CHIRURGIA GENERALE A, DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA,
*ANESTESIA E RIANIMAZIONE 2, °ISTITUTO DI EMATOLOGIA, UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI ED IRCCS POLICLINICO S. MATTEO, PAVIA*

INTRODUZIONE

È stato recentemente messo in luce che lo sviluppo di uno stato di tolleranza immunologica negli organismi che abbiano subito un trapianto d'organo solido passi attraverso l'instaurazione di una particolare condizione definita "chimerismo". Si tratta di un singolare stato caratterizzato dal reciproco equilibrio tra il sistema immunitario dell'organo trapiantato e quello dell'organismo ricevente, esistente in ultima analisi nella piena accettazione del graft.

Le prime conferme sperimentali di questa ipotesi hanno favorito lo sviluppo di ricerche nelle quali il trapianto di organi (polmoni, cuore, fegato, rene) veniva accompagnato dall'infusione parallela nel ricevente di midollo del donatore [1, 2]. Così facendo si mira ad aumentare il numero di cellule immuno-competenti del donatore presenti nel ricevente in modo da indurre ed amplificare la condizione di chimerismo.

Lo scopo di questo studio pre-clinico è di valutare in termini di sopravvivenza e di eventuali complicanze post-operatorie, l'effetto dell'infusione di alte dosi di midollo osseo dopo trapianto di intestino.

MATERIALI E METODI

Sono stati sottoposti a trapianto ortotopico di intestino venticinque suini di razza Large White (peso medio 24±5 chili); la tecnica chirurgica utilizzata è stata precedentemente presentata [3]. Gli animali sono stati distinti in tre gruppi sperimentali in base al tipo di trattamento immunosoppressivo che veniva effettuato (vedi tabella I).

Gli animali appartenenti al Gruppo 1 non sono stati immunosoppressi e hanno costituito il gruppo di controllo. Gli animali inseriti nel Gruppo 2 e 3 sono stati oggetto di terapia immunosoppressiva secondo protocollo dettagliatamente riportato altrove [4]. Brevemente, sono stati utilizzati tacrolimus (FK506) a dosaggi orali tali da mantenere il livello sierico tra 5 e 15 ng/ml as-

sociato alla somministrazione orale di micofenolato mofetil (MMF) alla dose di 500 mg/die. Agli animali del Gruppo 3 è stata effettuata inoltre l'infusione in 3^a giornata post-operatoria di midollo osseo prelevato dallo stesso animale donatore alla dose media di $5,28 \times 10^8 \pm 2,01$ cellule midollari/kg. Le cellule midollari infuse sono state prelevate dai corpi midollari del donatore e quindi conservate ad una temperatura di 4°C fino al momento della somministrazione per via endovenosa. I suini oggetto di infusione midollare non hanno subito precondizionamento midollare con trattamenti citoablativi finalizzati ad una migliore colonizzazione delle cellule midollari del donatore nel midollo del ricevente.

Si è proceduto con scansione settimanale al monitoraggio dei seguenti parametri: peso corporeo, livello ematico FK 506, parametri ematochimici, stato infettivo mediante emocolture, stato immunologico intestinale mediante biopsie della mucosa. Gli aspetti peculiari anatomo patologici del rigetto acuto del trapianto di intestino trattato con tacrolimus sono stati descritti precedentemente [5].

Di giorno in giorno si è proceduto alla registrazione degli eventi clinici più rilevanti con particolare attenzione alla comparsa di diarrea e di segni connessi con possibili manifestazioni di una *Graft versus Host Disease* (GVHD). La conferma dello sviluppo di una eventuale GVHD ha richiesto l'esecuzione di biopsie cutanee in sede della lesione e la successiva indagine istologica.

Lo studio è stato protratto fino a 60 giorni al termine dei quali è stata sospesa la terapia immunosoppressiva agli animali sopravvissuti del Gruppo 2 e 3.

RISULTATI

I risultati in termini di sopravvivenza sono illustrati nella tabella I. Sono stati esclusi dall'analisi dei risultati gli animali deceduti per cause tecniche (arresto cardio-respiratorio durante o al termine dell'intervento, emorragia da rottura di CVC, infarto intestinale, ecc.)

Per quanto concerne il Gruppo 1, i 4 animali effettivi sono tutti deceduti entro 15 giorni dal trapianto per rigetto acuto. Relativamente al Gruppo 2, degli 8 animali, solo 1 è morto prematuramente in 35^a giornata post-operatoria per le complicanze di una infezione mentre i restanti 7 sono tutti giunti fino al termine dei 60 giorni dello studio in buone condizioni generali. Infine nel Gruppo 3, dei 7 animali inseriti in tale gruppo, 5 sono sopravvissuti fino allo scadere dei 60 giorni mentre 2 sono stati persi in 35^a e 58^a giornata rispettivamente per sepsi.

In merito alla terapia immunosoppressiva con FK 506, i livelli sierici medi registrati nel Gruppo 2 e nel Gruppo 3 sono completamente sovrapponibili ad

evidenziare l'analogo trattamento. In entrambi questi Gruppi non si sono registrati episodi di rigetto di grado medio o severo e episodi di GVHD. L'incidenza di episodi infettivi è stata simile nei Gruppi 2 e 3 sebbene nel Gruppo 3 sia avvenuto un decesso in più a causa di una sepsi severa (polmonite). L'analisi statistica dei risultati su citati non ha evidenziato differenze significative tra i due gruppi a confronto.

Tabella I

Gruppi	n	IS	Mediana livelli di FK (ng/ml)	Vivi a 60 giorni n (%)	Sopravvivenza mediana (gg.)	Infezioni ep/ animale
1	5	No	-	0 (0)	11	-
2	10	FK+MMF	11.5	7 (87.5)	60	1.25
3	10	FK+MMF+DBM	11.1	5 (71.5)	60	1.00

IS: immunosoppressione; DBM: midollo osseo infuso.

DISCUSSIONE

Uno dei principali ed ambiziosi obiettivi che si prefigura l'immunobiologia è quello di sviluppare metodiche alternative alla immunosoppressione farmacologica in grado di garantire ugualmente la sopravvivenza di un organo trapiantato. Fra le varie proposte che possono rappresentare il viatico alla tolleranza immunologica, l'infusione di midollo associato al trapianto di organi solidi è pratica ormai adottata da diversi centri di ricerca tanto più che è stato dimostrato da Ricordi et Al. [6] che tale procedura non espone i pazienti a rischi aggiuntivi rispetto a coloro che analogamente ricevono soltanto l'organo solido. Inoltre lo stesso Ricordi ha messo in luce che due variabili fondamentali che influenzano la sopravvivenza dell'organo trapiantato sono il momento temporale dell'infusione di midollo e la quota di midollo infuso.

Il nostro modello sperimentale di trapianto di intestino risulta particolarmente indicato per quest'ordine di valutazioni. Infatti alla quota di cellule midollari infuse va aggiunta anche la grande quantità di tessuto linfoide normalmente rappresentato in sede di intestino e trapiantata con il graft. Adottando una metodica analoga, Gruessner e coll. [7] hanno ottenuto risultati contrastanti con quelli presentati da Ricordi e da altri gruppi sull'uomo [1, 6]. Il nostro studio invece si allinea a quanto normalmente si può osservare nella pratica clinica. Infatti non si registrano significative differenze in termini di sopravvivenza e di cause di morte tra il gruppo di animali trattati con midollo e quello non trattato con midollo. Va infatti ricordato che la finalità di questo studio era di valutare in termini di mortalità e morbilità l'applicabilità della metodica di infusione di midollo. I risultati così ottenuti aprono nuovi campi di interesse in questo tipo di studio volti a valutare se gli animali che hanno subito l'infusione di midollo rispetto a quelli non trattati, sviluppano una sopravvivenza più lunga

una volta che sia stata sospesa la terapia immunosoppressiva o addirittura uno stato di tolleranza nei confronti dell'intestino trapiantato.

BIBLIOGRAFIA

1. Fontes P., Rao A., Demetria A.J. et Al. Bone marrow augmentation of donor-cell chimerism in kidney, liver, heart and pancreas islet transplantation. *Lancet* 1994; 344-151.
2. Zeevi A., Pavlick M., Lombardozzi S. et Al. Immune status of recipients following bone marrow augmented solid organ transplantation. *Transplantation* 1997; 34:65.
3. Alessiani M., Spada M., Vaccarisi S. et Al. Flessibilità del modello chirurgico di trapianto intestinale di suino. *Minerva Chirurgica* 1997; 52: 1017-28.
4. Alessiani M., Spada m., Dionigi P., et Al. Combined immunosuppressive therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil for small bowel transplantation in pigs. *Transplantation* 1996;62:563.
5. Spada M., Arbustini E., Alessiani M. et Al. Morphology of acute rejection and observation of lymphoproliferative hyperplastic reaction in FK506 treated pigs after small bowel transplantation. *Transplant. Proc.* 1994; 26, 3:1543.
6. Ricordi C., Karatzas T., Nery J. et Al. High dose bone marrow infusions to enhance allograft survival. *Transplantation* 1997;63:7.
7. Gruessner R.W.G., Uckun F.M., Pirenne J. et Al. Recipient preconditioning and donor-specific bone marrow infusion in pig model of total bowel transplantation. *Transplantation* 1997;63:12.

*Ricerca finanziata dal Progetto Finalizzato n.180RFM97/01
del Ministero della Sanità*