

IGF-I E ALLOTAPIANTO DI CUORE NEL RATTO

*F. Luzzana, F. Innocente, M. Polese, C. Matteotti, J. Rademacher, L.M. Lenti,
G. Zambotti, A. Gaspari, P. Dionigi, M. Maestri, A. Zonta*

*CHIRURGIA SPERIMENTALE, SEZIONE DI CHIRURGIA GENERALE A,
DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA, UNIVERSITÀ DI PAVIA*

INTRODUZIONE

Studi recenti dimostrano che l'Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) esogeno riduce, nel trapianto di rene, il danno ischemico e migliora la ripresa funzionale dell'organo (1, 2).

Il nostro gruppo ha dimostrato che l'IGF-I ha nel rene trapiantato un effetto protettivo sugli effetti tossici della ciclosporina ed è in grado di migliorare la rivascularizzazione glomerulare (3). Tuttavia essendo l'IGF-I un ormone stimolante la crescita cellulare ed in grado di interagire con l'attività del sistema immunitario aumentando gli elementi immunocompetenti circolanti, si è supposto che possa amplificare la risposta immunitaria nel rigetto (4). A tal proposito abbiamo dimostrato che la somministrazione di IGF-I in un modello sperimentale di allotrapianto di cute nel ratto non comporta un aumento di velocità nella comparsa di rigetto acuto (3).

Poiché questo modello sperimentale non dice che cosa avviene ad un organo vascolarizzato, si è reso necessario valutare gli effetti della sua somministrazione in un modello sperimentale di trapianto eterotopico di cuore, al fine di valutare il rischio di insorgenza di rigetto accelerato, ridotto dal trattamento con IGF-I.

MATERIALI E METODI

Animali. Sono stati utilizzati 10 ratti Wistar-Furth (maschi; peso 300 ± 50 gr), e 10 ratti Lewis (maschi; peso 300 ± 50 gr). Tutti gli animali sono stati stabulati in condizioni standard di acqua e cibo, ritmo di luce circadiano e temperatura ambientale di 20 °C, in accordo con la normativa dell'Unione Europea per il trattamento degli animali da laboratorio. Gli animali sono stati tenuti a digiuno dodici ore prima dell'intervento ed al termine dello studio, sono stati sacrificati con un'iniezione letale di anestetico.

Anestesia. I ratti sono stati sottoposti ad anestesia generale con associazione di Ketamina IM (44 mg/Kg) e Pentothal sodico IP (20 mg/Kg).

IGF-I L'Insulin-like Growth Factor-I umana da DNA ricombinante è stata

gentilmente fornita dalla ditta Genentech Inc. (South San Francisco, CA)

È stata adottata la tecnica di Ono e Lindsey (5) modificata come riportato in seguito.

Dopo laparotomia xifo-ombelico-pubica del donatore Wistar-Furth ed iniezione di 500 UI di eparina in soluzione acquosa per via cavale, si è cannulata l'aorta addominale con un'agocannula 20G, si è sezionata la vena cava inferiore sovraepatica e si è perfuso l'organismo con circa 100 ml di soluzione fisiologica fredda 4°C. Si è eseguita una toracotomia bimammaria con asportazione della porzione anteriore della gabbia toracica ed ablazione del pericardio. Si sono legate e sezionate la IVC e la SVC di destra con seta 6-0, attraverso il seno trasverso del pericardio si sono sezionate l'aorta ascendente e l'arteria polmonare; si è completata la deafferentazione cardiaca con legatura in blocco e sezione delle vene polmonari e della cava superiore sinistra con seta 6-0. A questo punto il graft è stato prelevato e posto in soluzione fisiologica fredda (4 °C) per un tempo variabile da 15 a 90 minuti. La durata media dell'intervento è stata di 20±3 minuti.

Il ricevente Lewis è stato preparato, dopo laparotomia xifoombelico-pubica, isolando un tratto di aorta e cava di circa 3 cm compreso tra la vena renale sinistra e la biforcazione iliaca. Si sono clampati in blocco i vasi distalmente e prossimalmente; si è proceduto al confezionamento di anastomosi termino-laterali rispettivamente tra aorta del donatore e aorta addominale del ricevente e fra arteria polmonare del donatore e cava inferiore del ricevente con monofilamento di nylon 9-0. Si sono declampati i vasi e si è ripperfuso l'organo. Dopo una breve fase di fibrillazione, il cuore ha riacquisito il proprio ritmo sinusale. La durata media di questa procedura è stata 65 ± 10 minuti.

Tabella I- Gruppi di studio: trattamento postoperatorio e tempi di ischemia

N	Gruppo	Intervento	IGF-I	Ischemia fredda	Ischemia calda
5	1	Trapianto eterotopico di cuore	-	34±28	27±5
5	2	Trapianto eterotopico di cuore	100 ìg/Kg/die I,II,III gg postoperatoria	36±31	27±4

Gli animali sottoposti a trapianto di cuore (Tab. I) sono stati randomizzati in due gruppi: gruppo 1 (controllo, n=5) e gruppo 2 (n=5) trattato con IGF-I secondo lo schema:

20 ìg nella soluzione di lavaggio (NaCl 0.9%)

Al termine dell'intervento: 50 ìg pro Kg sottocute

In giornata I, II, III postoperatoria: 100 ìg pro Kg sottocute.

Rigetto. Per la valutazione della comparsa di rigetto gli animali trapiantati di cute e di cuore sono stati sottoposti a controllo giornaliero. Per gli animali trapiantati di cuore, la contrattilità del graft è stata valutata mediante palpazione addominale quotidiana; l'assenza di tale attività cardiaca coincide con il rigetto dell'organo da parte dell'ospite.

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il metodo dell'analisi della varianza a due criteri di classificazione (2-way ANOVA); sono state considerate statisticamente significative differenze fra gruppi per $p < 0.05$.

RISULTATI

Nel gruppo 2 di animali trattati con IGF-I si è osservata una sopravvivenza media del cuore trapiantato di 8.5 ± 0.5 giorni contro i 6.6 ± 0.5 giorni del gruppo 1 di controllo. Dall'analisi delle curve di sopravvivenza è emersa una differenza statisticamente significativa fra i due gruppi di studio (ANOVA, gruppo 2 vs. gruppo 1: $p < 0.05$) come si può osservare in fig. 1.

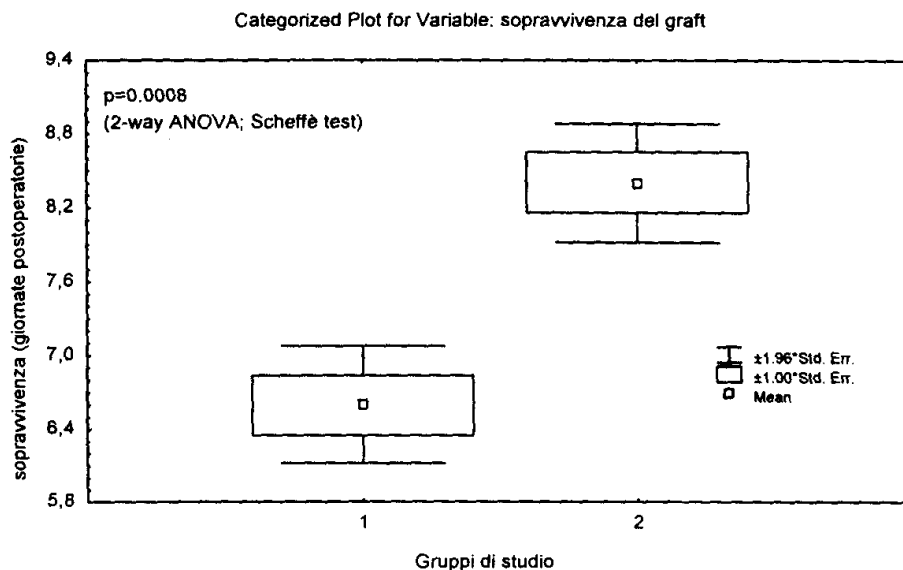


Figura 1 - Sopravvivenza degli allotrapianti di cuore con o senza somministrazione di IGF-1. Gruppo 2 vs Gruppo 1 esatto con $p=0.0008$.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Come già detto l'IGF-I possiede proprietà trofiche ed anaboliche sul rene, inoltre è provato un effetto stimolante e la risposta immunitaria che sembra possa interferire negativamente con l'attecchimento dell'organo trapiantato.

Clark e collaboratori (4) hanno riportato che la somministrazione di IGF-I induce linfoproliferazione nei ratti; in special modo le cellule T CD4+ a livello di milza e timo e le cellule B nella milza sembrano esserne influenzate. A questo viene correlato un incremento della produzione anticorpale in risposta alla stimolazione antigenica. Se il trattamento viene prolungato nel tempo, si osserva in parallelo un aumento del ritmo mitotico linfocitario (4). Gli stessi Autori hanno dimostrato che l'IGF-I stimola la linfopoiesi delle cellule B e promuove la ripresa funzionale nel trapianto di midollo osseo (6). Per determinare se effettivamente queste proprietà attribuite all'IGF-I possano accelerare le reazioni di rigetto, abbiamo in un primo tempo sviluppato un modello di trapianto di cute nel quale era fortemente presente la stimolazione antigenica. La somministrazione di IGF-I, o del suo analogo des(1-3)IGF-I, non ha affatto accelerato il rigetto del tessuto cutaneo trapiantato (3).

Il nostro studio si è prefissato di valutare gli effetti della somministrazione di IGF-I nel trapianto di un organo vascularizzato, quindi in un modello potenzialmente più simile ad un ipotizzabile impiego clinico. Non si sono osservati effetti ascrivibili ad un accelerazione delle reazioni di rigetto indotte dall'IGF-I. Al contrario, i nostri esperimenti hanno evidenziato una sopravvivenza leggermente prolungata rispetto ai controlli. Al punto attuale dei nostri studi è difficile ipotizzare quale attività dell'IGF-I sia responsabile di questo effetto. Altri autori (7) hanno ipotizzato una blanda attività immunosoppressiva, probabilmente determinata dalla comparsa di cloni cellulari circolanti immaturi, che potrebbero generare segnali anergizzanti o soppressivi al contatto con gli alloantigeni del donatore. In alternativa. Gli effetti dell'IGF-I sulla circolazione del graft e sulla sua rivascularizzazione potrebbero essere in parte responsabili della migliorata sopravvivenza attraverso un meccanismo legato alla maggiore perfusione ed a un diminuito rilascio di mediatori dell'infiammazione. Ulteriori studi sono in corso allo scopo di verificare tali ipotesi.

Nel valutare questo studio deve essere comunque considerato che il modello animale studiato, sebbene sia ampiamente utilizzato, differisce dalle condizioni umane. Ciò nonostante le conclusioni che si possono trarre da questo studio sperimentale sono importanti: l'IGF-I potrebbe potenzialmente essere di valore nel trattamento del ritardo della ripresa funzionale del graft dovuta alle lesioni ischemiche e non accelera il rigetto del graft. Mentre ulteriori studi sono richiesti per valutare i meccanismi coinvolti in quanto osservato, questa molecola, strutturalmente correlata con l'insulina e dotata di specifiche attività su differenti tipi cellulari, merita l'attenzione dei ricercatori per il suo potenziale uso nel campo della preservazione degli organi da trapianto.

BIBLIOGRAFIA

1. Rabkin R. Insulin-like growth factor-I treatment of acute renal failure. *J. Lab. Clin. Med.* 125: 684-685, 1995.
2. Miller, S. B., Martin, D. R., Kissane, J., Hammerman, M. R. IGF-I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci*, 89:11876-11880, 1992.
3. Maestri M, Dafoe DC, Adams GA, Gaspari A, Luzzana F, Innocente F, Rademacher J, Dionigi P, Barbieri A, Zonta F, Zonta A, Rabkin R. Insulin like growth factor I ameliorates delayed kidney graft function and the acute nephrotoxic effects of cyclosporine. *Transplantation* 64: 185-190, 1997.
4. Clark R, Strasser J, McCabe S, Robbins K, Jardieu P. Insulin-like growth factor-I stimulation of lymphopoiesis. *J Clin Invest* 92: 540-548, 1993
5. Ono K, Lindsay E. Improved technique of heart transplantation in rats. *J. Thorac Cardiovasc Surg* 57: 225-229, 1969
6. Jardieu P, Clark R, Mortensen D, Dorshkind K: In vivo administration of insulin-like growth factor-I stimulates primary B lymphopoiesis and enhances lymphocyte recovery after bone marrow transplantation. *J. Immunol.* 152:4320-4327, 1994.
7. Frattali A.L., Treadway J.L. and Pessin J.E.. Insulin/IGF-I hybrid receptors: implications for the dominant-negative phenotype in syndromes of insulinresistance. *J Cell Biochem* 48(1):43-50, 1992
8. Hunt, P. and D.D. Eardley. Suppressive effects of insulin and insulin-like growth factor-I on immune responses. *J. Immunol.* 136(11):3994-3999, 1986.