

## **EFFETTI INTRA- E POST OPERATORI DELL'IGF-I IN UN MODELLO DI AUTOTRAPIANTO RENALE NEL SUINO**

*J. Rademacher, L. Passalia, A. Gaspari, E. Luzzana, C. Matteotti, M. Balestreri\*  
E. Casabianca, C.A. Scirè, A. Bertani, P. Dionigi, M. Maestri, A. Zonta*

*CHIRURGIA SPERIMENTALE, SEZIONE DI CHIRURGIA GENERALE A  
DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI  
\* SERVIZIO DI ANESTESIA E RIANIMAZIONE 2,  
IRCCS POLICLINICO S. MATTEO, PAVIA*

### **INTRODUZIONE**

L'insufficienza funzionale post-operatoria è una comune complicanza del trapianto di rene da donatore cadavere, con una incidenza che può essere calcolata intorno al 20-40% dei casi (1-2). I suoi effetti sulla sopravvivenza del graft consistono in un ritardo nella ripresa funzionale (DGF) ed in una amplificazione della nefrotossicità dei farmaci immunosoppressori comunemente impiegati (ciclosporina, FK 506). Tali eventi si accompagnano ad un aumento del rischio post-operatorio globale, alla necessità di applicare una terapia emodialitica temporanea, a maggiori costi di ospedalizzazione, ma soprattutto influiscono negativamente sulle probabilità di sopravvivenza a lungo termine dell'organo trapiantato (1). Nonostante i progressi compiuti nel campo della preservazione d'organo e dell'immunosoppressione, il danno ischemico continua a rappresentare l'obiettivo di un numero crescente di trials clinici e sperimentali per individuare innovazioni farmacologiche intra- e postoperatorie in grado di ridurlo. L'Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) sembra essere tra i peptidi più promettenti attualmente indagati, dopo studi preliminari *in vitro* nei quali viene riportato un effetto rigenerante sulle linee cellulari renali (3).

Le successive applicazioni *in vivo* hanno dimostrato non solo la sua capacità di ridurre sia il danno ischemico che l'effetto nefrotossico della ciclosporina, ma anche la sua proprietà di accelerare la ripresa di funzionalità renale in un modello di allotrapianto renale nel ratto (4). Tuttavia rimangono ancora alcune valutazioni da effettuarsi in previsione di un trial clinico. In primo luogo occorre specificare che il modello murino differisce molto dalle condizioni fisiologiche e metaboliche umane; è quindi necessaria una conferma dei risultati in un modello animale di media taglia. In secondo luogo, considerando la somiglianza strutturale dell'IGF-I con l'insulina, è ipotizzabile un'influenza sul

profilo glicemico dopo somministrazione continua di IGF-I. Il ruolo promotore della ripresa funzionale post-ischemica attribuito a questo fattore di crescita è probabilmente correlato con la regolazione del tono vascolare, mediante interazione con altre citochine ed incremento del rilascio di ossido nitrico, noto agente vasodilatatore. È sorto quindi un ulteriore dubbio di un eventuale effetto collaterale sull'assetto emodinamico intraoperatorio.

## MATERIALI E METODI

L'IGF-I da DNA umano ricombinante è stato gentilmente fornito dalla ditta Genentech Inc. (South San Francisco, CA, USA).

Nel corso di questo studio 12 suini, razza Landrace Large-white di sesso femminile, del peso medio di kg.  $26.5 \pm 5.6$ , sono stati sottoposti ad autotrapianto di rene; in tal modo si sono evitate le complicazioni aggiuntive derivanti dalla terapia immunosoppressiva. La procedura chirurgica prevedeva l'espianto del rene sinistro seguito dal lavaggio con soluzione di Ringer acetato a  $4^{\circ}\text{C}$  e successiva conservazione ipotermica fino al momento del reimpianto dell'organo. Si è mantenuto il tempo di ischemia fredda inferiore ai 60 minuti e quello di ischemia calda inferiore ai 30 minuti. Subito dopo la reperfusion dell'organo si è proceduto alla nefrectomia destra.

Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi di studio a seconda del trattamento farmacologico intra- e post-operatorio ricevuto, come descritto in tabella I. Gli animali del gruppo 1 o di controllo ( $n=6$ ) oltre alla normale profilassi antibiotica non sono stati sottoposti a trattamento farmacologico alcuno. Gli animali del gruppo 2 ( $n=6$ ) hanno invece ricevuto durante l'intervento 400  $\mu\text{g}$  di IGF-I, diluiti nella soluzione di lavaggio.

Gli effetti della somministrazione di IGF-I a livello sistemico si possono osservare e valutare quindi solo dal momento della reperfusion dell'organo. Agli animali trattati è stata inoltre somministrata una ulteriore dose di IGF-I pari a 50  $\mu\text{g}$  pro kg di peso corporeo al termine dell'intervento. In I, II e III giornata post-operatoria il trattamento farmacologico è consistito in dosi giornaliere di 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  s.c. frazionate in due somministrazioni. Nel periodo di osservazione postoperatoria tutti gli animali utilizzati per questo studio sono stati stabulati in condizioni standard di ambiente e clima, in accordo con la normativa dell'Unione Europea per il trattamento degli animali da laboratorio. Quali indici della funzionalità renale sono state valutate le concentrazioni plasmatiche giornaliere di creatinina ed azoto ureico fino alla settima giornata post-operatoria.

È stato valutato anche il profilo glicemico postoperatorio per osservare l'eventuale insorgenza di ipoglicemia nel gruppo trattato con Insulin-like Growth Factor-I. Gli animali al termine del periodo di osservazione sono stati

sacrificati con una dose letale di anestetico. Al momento dell'esame autoptico tutti gli animali sono stati sottoposti a prelievi biotipici di rene. I campioni di tessuto renale sono stati poi fissati in formalina 10% e successivamente inclusi in paraffina. Per l'osservazione in microscopia ottica le sezioni di tessuto ottenute sono state sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina e a reazione pentacromica secondo Movat.

Tutte le procedure chirurgiche sono state condotte in condizioni di sterilità ed in anestesia generale con monitoraggio respiratorio ed emodinamico. Per questo studio non sono stati utilizzati farmaci vasoattivi al fine di evitare effetti di mascheramento sulle eventuali modificazioni causate dell'IGF-I. Per l'analisi statistica dei parametri biochimici, emodinamici e respiratori considerati si è utilizzato il metodo dell'analisi della varianza a due criteri di classificazione (2-way-ANOVA; tests LSD) corretto secondo Bonferroni. Sono state considerate significative differenze di  $p < 0.05$ .

**Tabella I - Trattamento farmacologico intra- e post-operatorio. Gli animali del gruppo di controllo in I, II e III giornata post-operatoria hanno ricevuto sottocute iniezioni di solo solvente**

Gruppi	Procedura chirurgica	N	Trattamento farmacologico	
			Intraoperatorio	Post-operatorio
1: Controllo	Autotrapianto di rene sx	6	-	-
2: IGF-I	Autotrapianto di rene sx	6	400 ìg /kg flushing dose +50 ìg /kg sottocute al termine dell'intervento	100 ìg /kg/die sottocute suddivise in due somministrazioni da ripetersi in I, II, III giornata postoperatoria

## RISULTATI

L'IGF-I accelera la ripresa funzionale del graft. L'andamento postoperatorio dei parametri di funzionalità renale mette in evidenza il danno indotto dalla combinazione di ischemia calda e fredda. Negli animali del gruppo di controllo il picco della creatinina viene raggiunto nella prima giornata postoperatoria ( $3.07 \pm 1.10$  mg/dl) con un ritorno ai valori basali entro la settima giornata postoperatoria (fig. 1). Si sono registrati, invece, valori costantemente inferiori durante il periodo di osservazione postoperatoria nel gruppo degli animali trattati (fig. 1). Anche in questo caso il picco della creatininemia si è registrato in prima giornata ( $2.12 \pm 0.50$  mg/dl) con un completo ritorno ai valori basali entro la settima giornata postoperatoria. In I e II giornata postoperatoria la differenza tra i due gruppi è risultata significativa (2-way ANOVA  $p < 0.05$ ).

L'andamento dell'azotemia sembra essere influenzato in modo analogo

dalle procedure chirurgiche. Sia nel gruppo degli animali di controllo sia in quello dei trattati il valore massimo di BUN viene raggiunto in prima giornata postoperatoria (fig. 2) ( $55.20 \pm 13.77$  vs.  $80.00 \pm 21.63$  mg/dl). Sebbene una differenza statisticamente significativa si ottenga soltanto nelle prime tre giornate post-operatorie (multiple range test  $p < 0.05$ ), gli animali trattati con insulin like growth factor-I mostrano valori di BUN costantemente più bassi durante il periodo di osservazione, con un valor medio di  $34.75 \pm 9.91$  mg/dl in settimana giornata, perfino più basso che il valore basale ( $36.40 \pm 14.50$  mg/dl) (fig. 2).

Il profilo glicemico è risultato praticamente sovrapponibile in entrambi i gruppi di studio, rimanendo costantemente al di sopra di 80 mg/dl (fig. 3).

Per quanto riguarda i parametri emodinamici e respiratori considerati, essi non hanno subito variazioni significative dopo la somministrazione intraoperatoria di IGF-I. A 10 minuti dall'espianto del rene si è registrato un decremento dell'indice cardiaco con aumento delle resistenze vascolari sistemiche senza tuttavia evidenziare una differenza significativa tra i due gruppi. Al momento della riperfusione, corrispondente al rilascio sistemico dell'IGF-1, non si sono verificate modificazioni emodinamiche; in particolare la pressione arteriosa media è rimasta costante durante l'intera procedura chirurgica. Non si sono osservate né ipertensione polmonare né un abbassamento delle resistenze vascolari sistemiche dopo la riperfusione. I parametri respiratori non hanno subito particolari variazioni durante l'intervento.

L'istologia dei preparati biotici ha dimostrato una reale differenza fra animali trattati con Insulin-like Growth Factor-I ed animali di controllo, come schematizzato in tabella II.

Negli animali non trattati, infatti, viene alterata la normale architettura del tessuto renale. I tubuli mostrano un certo grado di ipotrofia e l'interstizio è interessato da tessuto fibrotico. Sono presenti segni evidenti di processi infiammatori con infiltrazione cellulare diffusa associata a congestione ematica. Gli infiltrati cellulari, in alcuni casi, si addensano in zone del parenchima producendo aree di infiammazione a carattere più propriamente focale. I vasi arteriosi denotano un aumento dello spessore della parete vasale con chiari segni di iperplasia della tonaca media. Negli animali trattati con Insulin-like Growth Factor-I, invece, si è osservata un'ottimale conservazione della normale architettura del parenchima renale. I glomeruli sono ben conformati ed esenti da processi di sclerosi e l'interstizio non mostra processi fibrotici né infiammatori in atto. I tubuli mantengono una corretta ultrastruttura senza alcun segno di ipotrofia o necrosi cellulare. Nei preparati biotici di questi animali vengono evidenziati il buono stato delle pareti vasali di arterie ed arteriole e l'assenza delle alterazioni patologiche di tipo iperplastico a carico della tonaca media che erano caratteristiche degli animali non trattati.

**Tabella II - Confronto istologico fra animali non trattati ed animali trattati con IGF-I.**

Gruppi di studio	Alterazioni tubulari	Alterazioni glomerulari	Infiltrati infiammatori	Ipertrofia della tonaca media arteriosa
Gruppo 1: controlli	+++	+++	+++	+++
Gruppo 2: IGF-I	-	-	-	-

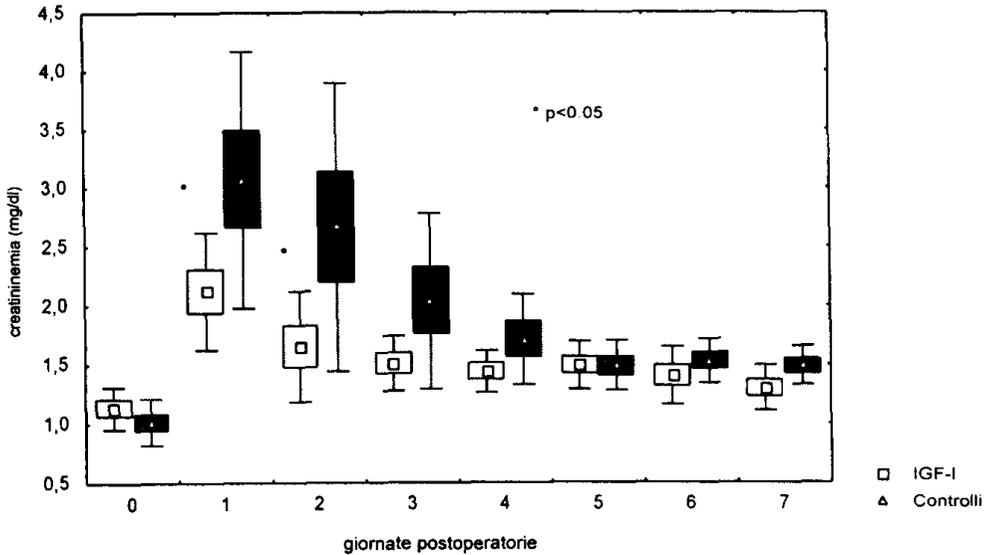


Figura 1 - Andamento della creatininemia nel periodo di osservazione postoperatoria.

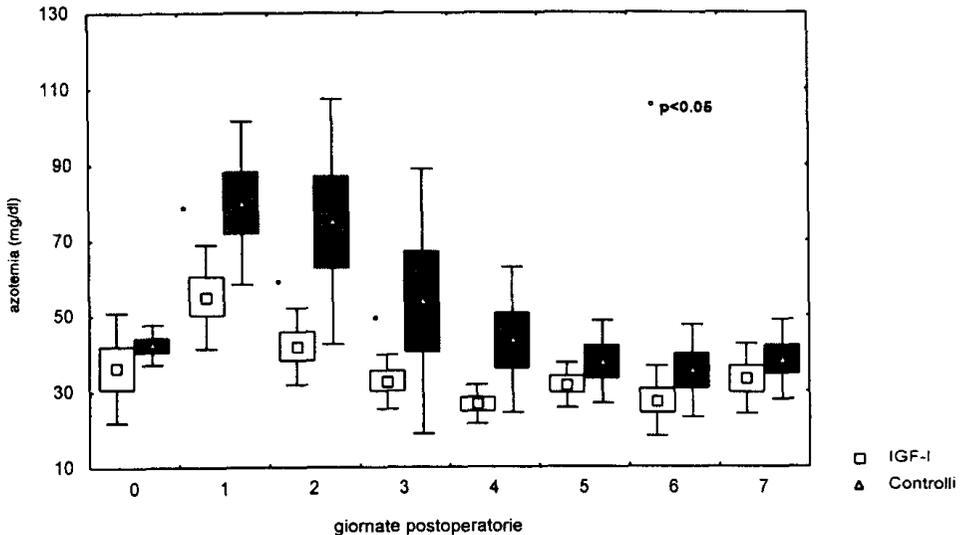


Figura 2 - Andamento dell'azotemia (BUN) nel periodo di osservazione postoperatoria.

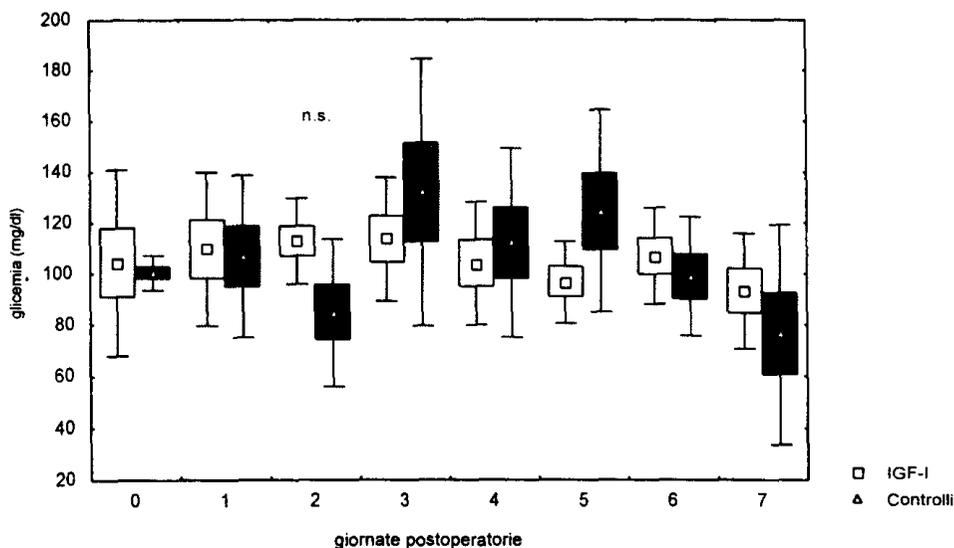


Figura 3 - Profilo glicemico nel periodo postoperatorio.

## DISCUSSIONE

Oltre ai ben noti effetti endocrini legati all'asse ormonale del GH (5), l'IGF-I sembra possedere una propria autonomia metabolico-funzionale a livello di alcuni organi e tessuti, giocando un ruolo importante nei processi di riparazione e proliferazione cellulare (6-7). In ambito renale la somministrazione esogena di IGF-I induce, in particolare, un aumento del flusso plasmatico renale, della velocità di filtrazione glomerulare e della proliferazione delle cellule epiteliali tubulari (8).

Nel gruppo trattato con IGF-I sono stati registrati nel periodo postoperatorio livelli di creatinina e di azoto sierico significativamente inferiori rispetto al gruppo di controllo, documentando così una precoce ed efficace ripresa della funzionalità renale in questo gruppo.

Nonostante in letteratura (9) venga riportato un effetto ipoglicemizzante dopo somministrazione di Insulin-like Growth Factor-I, l'andamento della glicemia nel periodo di osservazione post-operatoria si è mantenuto sostanzialmente sovrapponibile nei due gruppi, senza sostanziali differenze, rimanendo costantemente al di sopra di 80 mg/dl (fig. 3).

Mentre numerosi sono gli studi riguardanti gli effetti metabolici dell'insulin like growth factor-I, a tutt'oggi non esistono in letteratura dati altrettanto precisi per quanto riguarda i possibili effetti emodinamici e respiratori della somministrazione di IGF-I esogeno. In effetti la somiglianza strutturale di

questa somatomedina con le citochine ne suggerirebbe una potenziale attività vasoattiva. Dall'analisi dei principali parametri cardio-circolatori e respiratori intra-operatori è emerso che, in seguito a somministrazione acuta di IGF-I, non sussistono modificazioni rilevanti dell'assetto emodinamico nelle diverse fasi dell'intervento, né differenze significative tra i due gruppi per nessuno dei parametri considerati. In particolare al momento della riperfusione, che corrisponde al momento del rilascio in circolo del bolo di IGF-I, non sono state registrate alterazioni dello status emodinamico nel gruppo trattato rispetto ai controlli. Nonostante il documentato effetto vasodilatatorio dell'IGF-I non si è assistito ad una diminuzione delle resistenze vascolari sistemiche in questa fase, né successivamente. I valori di indice cardiaco e di pressione arteriosa media hanno inoltre mostrato un profilo costante, dopo l'iniziale modesto decremento conseguente alla laparotomia, durante l'intera procedura chirurgica, restando in entrambi i gruppi decisamente al di sopra dei valori di sicurezza. I valori sui quali si sono attestati, nei diversi gruppi e nelle varie fasi dell'intervento, i principali parametri respiratori documentano infine un grado di stress emodinamico comunque di livello modesto.

Dall'analisi dei preparati biotici viene un'ulteriore riprova dell'efficacia del trattamento con Insulin-like Growth Factor-I nel promuovere la ripresa della funzionalità renale. Le alterazioni dell'architettura parenchimale, quali infiltrazione infiammatoria ed iperplasia vasale, non sembrano essere infatti presenti negli animali trattati, ma risultano ben evidenziabili nel gruppo di controllo. Il dato istologico convalida perciò il dato funzionale.

In conclusione, anche se sono necessarie ulteriori conferme sperimentali, l'IGF-I, per le sue proprietà protettive sul rene, potrebbe trovare impiego nella pratica clinica, senza sensibili rischi per la stabilità emodinamica perioperatoria.

Questa molecola, strutturalmente correlata con l'insulina e dotata di specifiche attività su differenti tipi cellulari, merita quindi l'attenzione dei ricercatori per il suo potenziale uso nel campo della preservazione degli organi da trapianto.

## BIBLIOGRAFIA

1. Cecka JM, Cho YW, Terasaki PI. Analyses of the UNOS Scientific Renal Transplant Registry at three years-early events affecting transplant success. *Transplantation* 1992; 53: 59-64.
2. Finn, W.F. Prevention of ischemic injury in renal transplantation. *Kidney Int.* 1990; 37: 171-182.
3. Rabkin R, Brody M, Lu LH, Chan C, Shaheen AM, Gillett N. Expression of the genes encoding the rat renal insulin-like growth factor-I system.

JASN 1995; 6:1511-1518.

4. Maestri M, Dafoe D, Adams G, Gaspari A, Luzzana F, Innocente F, Rademacher J, Dionigi P, Barbieri A, Zonta F, Rabkin R. Insulin like growth factor-I ameliorates delayed kidney graft function and the acute nephrotoxic effects of cyclosporine. *Transplantation* 1997; 64(2): 185-190.
5. Hammerman MR, Miller SB. The growth hormone-insulin-like growth factor axis in kidney revisited. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: F 114.
6. Clark R, J Strasser, S McCabe, K Robbins and P Jardieu. Insulin-like growth factor-I stimulation of lymphopoeisis. *J Clin Invest.* 1992; 92: 540-548.
7. Zapf J, Schmid CH, Froesch ER. Biological and immunological properties of insulin-like growth factor (IGF) I and II. *Clin Endocrinol Metab* 1984; 13:3-7.
8. Guler H.-P, Eckardt K.-U., Zapf J., Bauer C. and Froesch E.R. Insulin-like growth factor I increases glomerular filtration and renal plasma flow in man. *Acta Endocrinol.* 1989; 121: 101-106.
9. Guler H.-P., Zapf J. and Froesch E.R. Short-term metabolic effects of recombinant human insulin-like growth factor I in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* 1987; 317: 137.
10. 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* 1992; 89:11876-11880.