



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

SCUOLA DI MEDICINA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA TRASLAZIONALE

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina e Chirurgia

Tesi di Laurea

**RILEVANZA CLINICA E APPROCCI TERAPEUTICI
SPERIMENTALI DELLA DELAYED GRAFT FUNCTION NEL
TRAPIANTO RENALE**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Vincenzo CANTALUPPI

Candidato:

Edoardo TESO



Firmato digitalmente da Vincenzo
Cantaluppi
Data: 21.06.2024 23:23:42 CEST
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI STUDI
DEL PIEMONTE ORIENTALE/01943490027

Matricola 20031894

Anno Accademico 2023/2024

Indice

| | |
|--|-----------|
| 1. Introduzione..... | 5 |
| 1.1 Epidemiologia del trapianto renale in Italia..... | 6 |
| 1.2 La funzione renale immediata..... | 8 |
| 1.3 Delayed Graft Function | 10 |
| 1.4 Cause e fattori di rischio di Delayed Graft Function | 12 |
| 1.4.1 Fattori di rischio legati al donatore: danno da ischemia-riperfusion..... | 13 |
| 1.4.2 Fattori di rischio legati al donatore: fonte di reperimento dei reni | 13 |
| 1.4.3 Fattori di rischio legati al donatore: qualità degli organi | 14 |
| 1.4.4 Fattori di rischio legati al ricevente | 16 |
| 1.5 Fisiopatologia della Delayed Graft Function | 17 |
| 1.6 Disfunzione mitocondriale | 22 |
| 1.7 Aumento dell'immunogenicità e del rischio di rigetto | 25 |
| 1.7.1 Rigetto T-mediato | 26 |
| 1.7.2 Rigetto anticorpo-mediato | 28 |
| 1.8 Aumento del rischio di sviluppare nefropatia cronica..... | 30 |
| 1.9 Effetti sulla sopravvivenza..... | 34 |
| 1.10 Standard cold storage e perfusione renale ipotermica..... | 35 |
| 1.11 Sviluppo di nuove terapie in associazione alla perfusione | 39 |
| 1.11.1 Sorbenti..... | 39 |
| 1.11.2 Terapia biologica | 41 |
| 2. Obiettivi dello studio | 46 |
| 3. Pazienti, materiali e metodi..... | 47 |
| 3.1 Pazienti e variabili..... | 47 |
| 3.2 Definizione delle sottopopolazioni | 48 |
| 3.3 Analisi istologica | 49 |
| 3.4 Fonte di reperimento dei dati | 50 |
| 3.5 Architettura del database ed analisi statistica | 51 |
| 3.6 Perfusione renale ipotermica ex vivo con sorbente | 52 |
| 3.7 Test in vivo ed in vitro con l'utilizzo di EVs derivate da EPC..... | 54 |
| 3.7.1 Isolamento e caratterizzazione delle EPC..... | 54 |
| 3.7.2 Isolamento delle EVs | 55 |
| 3.7.3 NanoTrack Analysis (NTA)-Nanosight | 55 |
| 3.7.4 Microscopia elettronica a scansione | 56 |

| | |
|--|------------|
| 3.7.5 Analisi MACSplex..... | 56 |
| 3.7.6 FACS e microscopia confocale | 56 |
| 3.7.7 Espressione genica e proteica degli inibitori del complemento nelle EV derivate da EPC | 58 |
| 3.7.8 Modello di IRI | 58 |
| 3.7.9 Colture cellulari di cellule tubulari endoteliali (TEnC) ed epiteliali (TEpC) | 60 |
| 3.7.10 Studi in vitro | 60 |
| 4. Risultati | 61 |
| 4.1 Analisi delle caratteristiche generali della popolazione | 61 |
| 4.2 Analisi delle caratteristiche generali dei donatori | 63 |
| 4.3 Analisi delle variabili legate alla caratterizzazione pretrapiantologica..... | 64 |
| 4.4 Analisi delle variabili legate al prelievo ed alla valutazione post-trapiantologica | 65 |
| 4.5 Analisi delle variabili relative al follow-up ed alle complicanze..... | 67 |
| 4.6 Analisi delle dei fattori di rischio di DGF | 70 |
| 4.7 Analisi delle variabili dipendenti da DGF e del follow-up | 74 |
| 4.8 Analisi della sopravvivenza dei pazienti | 78 |
| 4.9 Analisi della sopravvivenza dei graft | 85 |
| 4.10 Analisi dell'efficacia della perfusione renale | 92 |
| 4.11 Analisi dell'efficacia della terapia biologica con EVs..... | 96 |
| 4.11.1 Effetti delle EVs di EPCs su modello di IRI in vivo..... | 100 |
| 4.11.2 Effetti delle EVs di EPCs su colture cellulari in vitro..... | 104 |
| 5. Discussione | 111 |
| 5.1 Descrizione generale della popolazione | 111 |
| 5.2 Rilevanza clinica di DGF..... | 114 |
| 5.3 Analisi delle sopravvivenze | 116 |
| 5.4 Risultati sperimentali sulla perfusione renale ex vivo | 118 |
| 5.5 Risultati sperimentali della terapia biologica in vivo ed in vitro | 120 |
| 5.6 Nuova strategia per la gestione dell'IRI renale | 122 |
| 5.7 Punti di forza dello studio | 123 |
| 5.8 Limiti dello studio | 124 |
| 6. Prospettive future | 125 |
| 6.1 Trapianto di mitocondri | 125 |
| 6.2 Modulazione del microbioma intestinale | 126 |
| 7. Conclusioni..... | 127 |
| 8. Bibliografia | 129 |

1. Introduzione

Il trapianto renale rappresenta oggi la strategia terapeutica preferenziale nei pazienti affetti da insufficienza renale cronica in fase terminale (End-Stage Renal Disease ESRD), in quanto ripristina sia la componente esocrina che quella endocrina della normale funzione renale e garantisce migliore qualità di vita e sopravvivenza in tutti i pazienti, compresi quelli di età avanzata (1,2)

Confrontando la sopravvivenza dei pazienti di età superiore a 70 anni affetti da insufficienza renale cronica sottoposti a trapianto di rene e quella dei coetanei in lista d'attesa, emerge che il rischio di mortalità dei soggetti trapiantati è del 41% inferiore rispetto a quello dei soggetti in lista di attesa (3,4). Inoltre, il rischio relativo di mortalità tra i pazienti trapiantati rispetto a quelli in terapia dialitica subisce significative ed ampie modificazioni in relazione al tempo: risulta aumentato nel periodo immediatamente successivo all'intervento, a causa dei rischi legati alla procedura chirurgica ed all'utilizzo di farmaci immunosoppressori ad alte dosi, per poi diminuire progressivamente, risultando in una complessiva riduzione del tasso di mortalità a lungo termine (1,5). Considerando gli alti costi del trattamento dialitico della malattia renale in fase terminale, il trapianto di rene garantisce anche un notevole risparmio economico al sistema sanitario (6)

Nonostante i notevoli progressi terapeutici raggiunti dalla medicina per rallentare la progressione del danno renale, l'insufficienza renale cronica ha ormai acquisito caratteristiche epidemiche (7). L'elevata incidenza di diabete ed ipertensione, l'aumento del numero di pazienti obesi ed il progressivo invecchiamento della popolazione generale sono le principali cause di diffusione epidemica della malattia renale cronica nella maggior parte dei paesi di Europa, Nord America ed Asia, dove rappresenta la prima causa di trapianto renale. L'acquisizione di caratteristiche epidemiche dell'insufficienza renale cronica è uno dei principali motivi per cui il numero di trapianti eseguiti è in costante aumento, sia in Italia che nel mondo(8,9)

La sopravvivenza del rene trapiantato rappresenta, insieme alla sopravvivenza del paziente stesso, il principale outcome del trapianto renale e dipende da diversi fattori, tra cui la funzionalità renale nell'immediato periodo postoperatorio. Per questo motivo, per garantire la maggiore sopravvivenza del graft e del paziente, risulta fondamentale ridurre o eliminare del tutto il ritardo della ripresa della funzione renale post trapianto, o delayed graft function, (DGF) (10)

1.1 Epidemiologia del trapianto renale in Italia

Nel 2022 il numero totale di trapianti di rene eseguiti in Italia ammonta a 2.033 (11)

Più nel dettaglio, i trapianti da donatore deceduto sono stati 1.697, dei quali 1508 di rene singolo, 127 di rene doppio e 62 di rene combinato con un altro organo; i trapianti da donatore vivente sono stati 336.

Rispetto al 2021, il dato numerico costituisce una prova del riallineamento dell'attività trapiantologica nazionale alla situazione precedente la pandemia da SARS-CoV-2, durante la quale si è osservata una contrazione del numero totale dei trapianti di rene eseguiti (Fig. 1.1) (12)

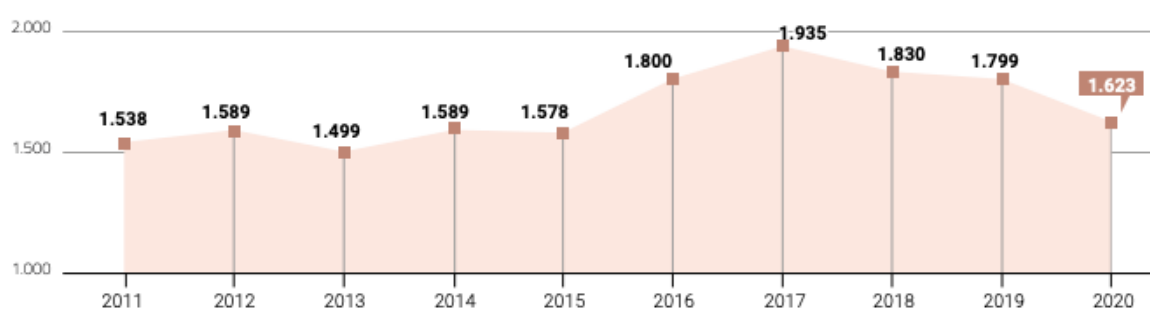


Fig. 1.1. Andamento annuale dei trapianti di rene da donatore deceduto eseguiti in Italia

Per quanto riguarda il tempo medio di attesa in lista trapianti, i pazienti che hanno ricevuto il trapianto da donatore deceduto nel 2022 hanno atteso mediamente in lista 20,6 mesi, rappresentando un tempo minore rispetto ai 24,2 mesi del 2021 (12).

Più della metà dei pazienti trapiantati (54%) aveva un'età compresa tra i 41 e i 60 anni, mentre il 25% aveva invece un'età compresa tra i 61 ed i 75 anni. Questo dato evidenzia una distribuzione demografica significativa, che riflette come le necessità di trapianto siano predominanti soprattutto nelle fasce d'età adulta ed anziana.

Anche per i trapianti da vivente, il dato del 2022 documenta un ritorno alla situazione precedente la pandemia da SARS-CoV-2. Il numero in aumento attesta anche l'efficacia delle campagne di sensibilizzazione al trapianto da vivente promosse dal Centro Nazionale Trapianti (Fig. 1.2) (11,12)

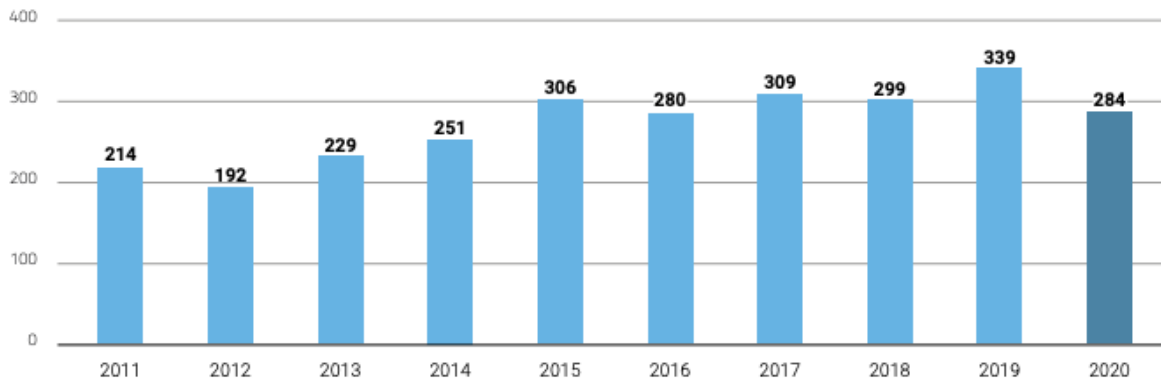


Fig. 1.2. Andamento annuale dei trapianti di rene da donatore vivente eseguiti in Italia

Nel caso specifico dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità di Novara, l’analisi epidemiologica della sopravvivenza del rene ad 1 anno dal trapianto e del numero totale dei trapianti effettuati dimostra valori superiori alla media nazionale per entrambi i parametri presi in considerazione (Fig. 1.3; centro trapianto n. 17) (12). Questo successo potrebbe essere attribuito a diversi fattori, tra cui la qualità delle cure pre- e postoperatorie, la gestione accurata delle liste d’attesa e l’esperienza dell’equipe trapiantologica.

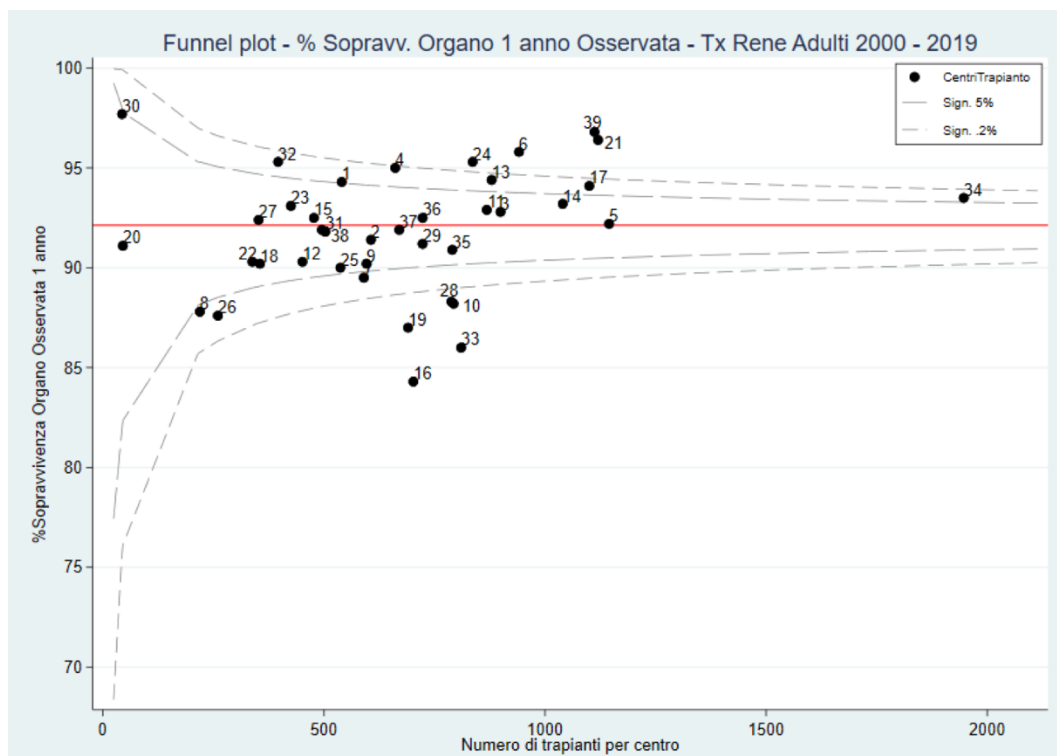


Fig. 1.3. Funnel plot della percentuale di sopravvivenza ad 1 anno del rene trapiantato

1.2 La funzione renale immediata

La funzione renale immediata è la capacità del rene trapiantato di raggiungere un tasso di filtrazione glomerulare adeguato e di produrre urine in quantità sufficiente per evitare di sottoporre il paziente a dialisi postoperatoria. Per tutti i pazienti sottoposti a trapianto, la funzione renale viene dettagliatamente valutata tramite parametri come il volume urinario prodotto, la creatinina sierica, l'urea nel sangue ed il tasso di filtrazione glomerulare, calcolato mediante formule di clearance della creatinina o misurato con tecniche radioisotopiche. Una buona funzione renale nell'immediato periodo postoperatorio costituisce uno dei principali outcome del trapianto; infatti, il recupero immediato della funzione renale è correlato alla riduzione della necessità di ricorrere a dialisi, a sua volta associata ad un maggior rischio di infezioni, complicanze emodinamiche e riduzione della qualità della vita (13). Le infezioni rappresentano una delle principali cause di mortalità nei pazienti sottoposti a dialisi, poiché il trattamento stesso può favorire l'introduzione di agenti patogeni nell'organismo e compromettere il sistema immunitario del paziente; le complicanze emodinamiche, ad esempio ipotensione e squilibri elettrolitici, possono portare a ulteriori problemi cardiovascolari, mentre la frequente necessità di trattamenti dialitici può limitare significativamente le attività quotidiane e sociali del paziente, riducendone la qualità della vita (14).

Il recupero immediato della funzione renale è associato anche ad un minor rischio di complicanze a lungo termine, come l'ipertensione e le malattie cardiovascolari, che sono comuni nei pazienti con trapianto renale. Un buon funzionamento del rene trapiantato migliora la capacità del corpo di eliminare le tossine e di mantenere l'equilibrio idroelettrolitico ed acido-base, riducendo così la necessità di interventi medici aggiuntivi sia nell'immediato periodo postoperatorio che a lungo termine, migliorando la qualità della vita del paziente.

Inoltre, un funzionamento renale ottimale permette una migliore efficacia delle terapie immunosoppressive - essenziali per prevenire il rigetto del trapianto - in quanto, affinché siano dosati correttamente e mantengano livelli terapeutici adeguati senza avere effetti tossici, i farmaci immunosoppressivi come la ciclosporina ed il tacrolimus richiedono un corretto funzionamento renale. Un rene con funzione subottimale non consente una efficace eliminazione dei farmaci né una regolazione precisa delle loro concentrazioni plasmatiche, aumentando di conseguenza il rischio di effetti collaterali e riducendo la compliance e l'aderenza del paziente al regime terapeutico (15,16). Questo aspetto è cruciale per la prevenzione del rigetto acuto e cronico, che rappresenta una delle complicanze più temute nei pazienti

trapiantati, poiché può compromettere significativamente la sopravvivenza dell'organo trapiantato e, talvolta, del paziente stesso (17,18)

Quindi, la funzione renale immediata rappresenta un indicatore predittivo fondamentale nel trapianto renale: è associato ad una maggiore sopravvivenza a 5 anni sia del graft che del paziente, alla riduzione del rischio di rigetto acuto ed a migliori esiti clinici complessivi (19). Anche per quanto riguarda l'aspetto economico, una soddisfacente funzione renale immediata ha implicazioni significative, poiché riducendo la necessità di dialisi e di ospedalizzazioni prolungate, si possono diminuire i costi associati alla gestione postoperatoria, liberando risorse per altri pazienti in lista d'attesa e migliorando l'efficienza complessiva del sistema sanitario(20). La dialisi è un trattamento costoso e dispendioso in termini di tempo, che richiede frequenti visite intraospedaliere e che può influire notevolmente sulla qualità della vita dei pazienti (21). Oltre ai costi diretti della dialisi, vi sono anche costi indiretti legati alle complicanze ad essa associate, come le infezioni, le complicanze cardiovascolari e l'eventuale necessità di ulteriori interventi medici, che possono essere ridotti o eliminati per i pazienti trapiantati che manifestano funzione renale immediata ed ottimale.

Alcuni studi economici hanno dimostrato che i pazienti con una buona funzione renale immediata richiedono meno risorse ospedaliere, hanno bisogno di meno visite di follow-up e manifestano complicanze postoperatorie con minore frequenza rispetto ai pazienti con DGF (22). Questo non solo migliora l'esperienza del paziente, ma contribuisce anche a una gestione più sostenibile del sistema sanitario.

Infine, migliorare gli esiti dei trapianti e ridurre la necessità di dialisi può aumentare la disponibilità di organi per altri pazienti in lista d'attesa, poiché gli organi disponibili possono essere utilizzati in modo più efficiente. Questo porta a un aumento complessivo delle vite salvate e a una migliore qualità della vita per un numero maggiore di pazienti. Di conseguenza, investire in tecnologie e pratiche che promuovano un recupero ottimale della funzione renale postoperatoria è un investimento nella salute dei pazienti, nell'efficienza trapiantologica e nella sostenibilità a lungo termine del sistema sanitario.

1.3 Delayed Graft Function

La delayed graft function (DGF) è una forma di insufficienza renale acuta che si manifesta con oliguria o anuria nel periodo postoperatorio del trapianto renale in circa il 25-30% dei pazienti trapiantati (18,23). La DGF rappresenta una complicanza trapiantologica significativa, in quanto correlata all'aumento dell'immunogenicità e del rischio di rigetto del graft, nonché alla riduzione della sopravvivenza del rene trapiantato e del paziente a lungo termine (10,24). Inoltre, è associata a tempi di degenza ospedaliera maggiori, necessità di monitoraggio intensivo e di trattamento sia dialitico che immunosoppressivo precoce, per minimizzare le complicanze e migliorare la funzionalità renale (25). Per questi motivi, la DGF ha conseguenze significative non solo a livello clinico ma anche economico sul sistema sanitario (22,26).

È stato osservato che i reni espianati da donatori deceduti presentano una maggiore incidenza di DGF rispetto a quelli da donatori viventi(27). Questa differenza può essere attribuita a vari fattori, tra cui il tempo di ischemia fredda prolungato, le comorbilità e le condizioni del donatore al momento della morte (28), motivo per cui la prevenzione della DGF si esegue anche tramite la scelta oculata del donatore e la gestione efficace delle condizioni perioperatorie, inclusa l'ottimizzazione delle tecniche chirurgiche e la riduzione dei tempi di ischemia fredda del graft.

La maggior parte dei reni trapiantati da cadavere che manifesta DGF - ed una minor parte di quelli trapiantati da vivente - incorre in un'alterazione della normale funzione renale attesa per il ricevente, con gradi di gravità che variano dalla totale anuria con necrosi tubulare acuta al recupero immediato della funzione renale(10) Proprio a causa dei diversi possibili quadri di gravità, la definizione di DGF non è univoca, costituendo ciò un ostacolo allo studio del fenomeno, rendendo difficile la comparazione dei dati tra studi diversi e la valutazione dell'efficacia delle strategie di intervento terapeutico e di prevenzione della DGF.

Inoltre, la variabilità nella definizione di DGF complica anche la gestione clinica dei pazienti, poiché l'utilizzo di diversi criteri diagnostici può portare a diversi approcci terapeutici e di monitoraggio. Tipicamente, nei principali studi multicentrici revisionati si definisce la DGF come la necessità di eseguire almeno una seduta di dialisi postoperatoria nei primi 7 giorni dal trapianto (29)

Sebbene questa definizione sia semplice e permetta di riconoscere e segnalare con facilità i casi di DGF, d'altra parte identifica come DGF anche i casi di pazienti sottoposti a dialisi postoperatoria per altri motivi, ad esempio iperkaliemia non legata a disfunzione renale.

Questo approccio può quindi portare a una sovrastima dei casi di DGF, complicando l'interpretazione dei dati epidemiologici e clinici (10). Per questo motivo, alcuni studi hanno proposto di considerare altri fattori per definire la DGF, ad esempio la produzione di urine minore di 1200 mL/die o la mancata riduzione della concentrazione di creatinina sierica di almeno il 10% del valore preoperatorio nelle prime 48 ore dall'intervento (30).

Va sottolineato come unificare la definizione di DGF aiuterebbe nella creazione di protocolli standardizzati per la gestione postoperatoria e per la prevenzione di questa complicanza, contribuendo a migliorare la qualità complessiva delle cure per i pazienti sottoposti a trapianto renale. Inoltre, una maggiore chiarezza diagnostica sarebbe essenziale per la ricerca a lungo termine mirata a identificare nuovi biomarcatori e nuove strategie terapeutiche.

Tuttavia, per convenzione e per semplicità nella trattazione, si è deciso di utilizzare la definizione più classica, accettata e diffusa di DGF, consentendo questa una maggiore uniformità nei criteri diagnostici e facilitando il confronto dei risultati con la maggioranza degli studi clinici presenti in letteratura.

1.4 Cause e fattori di rischio di Delayed Graft Function

I fattori di rischio di DGF possono essere legati alle caratteristiche del donatore, alla procedura chirurgica del prelievo o alle caratteristiche del ricevente (Tab. 1.1) (10,28)

Per quanto riguarda le caratteristiche del donatore, il rischio di DGF risulta aumentato per graft espantati da donatori sottoposti a danno da ischemia-riperfusion e da donatori deceduti (31), in particolare da donatori in arresto cardiaco (Donation after Cardiac Death, DCD) e da donatori expanded-criteria (Expanded-Criteria Donor, ECD) (32), i quali hanno un rischio di sviluppare necrosi tubulare acuta doppio rispetto ai graft espantati da donatori non in arresto cardiaco, così come hanno un rischio doppio di sviluppare DGF (33).

L'età del donatore è un altro importante fattore di rischio, considerando che il rischio di sviluppare DGF è anch'esso doppio se il rene proviene da donatore di età maggiore di 55 anni (34). Per quanto riguarda la procedura di prelievo chirurgico, l'utilizzo di macchinari da perfusione e la riduzione del tempo di ischemia fredda sono fattori protettivi dall'insorgenza di DGF (cfr. 1.10) (35,36)

Per quanto riguarda le caratteristiche del ricevente, le cause di DGF possono essere suddivise in prerenali, renali e postrenali:

1. La principale causa prerenale di DGF del rene trapiantato è l'ipovolemia del ricevente (37,38), il cui rischio può essere influenzato dalla somministrazione intraoperatoria di albumina.
2. I rischi renali nel ricevente sono rappresentati da necrosi tubulare acuta, nefrotossicità da ciclosporine o antibiotici, rigetto iperacuto da mismatch HLA o incompatibilità AB0.
3. I fattori di rischio postrenali sono rappresentati da ostruzioni o perdite ureterali.

| <i>Legati al donatore</i> | <i>Legati al ricevente</i> | <i>Legati al procurement</i> |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------------|
| DBD, DCD, ECD | Anzianità dialitica | Instabilità emodinamica |
| Danno da ischemia-riperfusion | Trapianto preemptive | Uso di farmaci nefrotossici |
| Età avanzata | Età avanzata | CIT prolungato |
| Ipertensione | Ipertensione | |
| BMI elevato | BMI elevato | |
| Sesso | Sesso | |
| Funzionalità renale scarsa | Mismatch HLA e %vPRA | |
| | Incompatibilità AB0 | |

Tab. 1.1. Fattori di rischio di DGF

1.4.1 Fattori di rischio legati al donatore: danno da ischemia-riperfusion

Il prelievo chirurgico del rene per il trapianto comporta necessariamente un tempo di ischemia fredda (Cold Ischemia Time, CIT), seguito dalla riperfusione sanguigna dopo il trapianto. La durata del tempo di ischemia fredda, definita come il tempo in cui l'organo viene conservato in uno stato ipotermico prima di procedere al trapianto, può influenzare i risultati dei trapianti renali; infatti, sebbene nei trapianti da donatori in morte cardiaca (DCD) un tempo di ischemia fredda inferiore a 24h è solitamente accettato, risultati migliori possono essere raggiunti con un tempo di ischemia fredda minore (28,39).

Inoltre, gli effetti negativi del tempo di ischemia fredda prolungato sono maggiori nei riceventi di reni da donatori di età avanzata (40,41)

1.4.2 Fattori di rischio legati al donatore: fonte di reperimento dei reni

I reni per il trapianto possono essere prelevati da donatori viventi o deceduti.

I donatori viventi possono essere suddivisi donatori correlati (ad esempio genitori, nonni, fratelli, figli) e non correlati ai riceventi (ad esempio coniugi, amici o sconosciuti). I donatori deceduti possono essere invece suddivisi in donatori in morte cerebrale o donatori con cessazione della circolazione: i primi (Donor after Brain Death, DBD) con lesione cerebrale irreversibile e circolazione mantenuta da misure di supporto, i secondi (Donor after Cardiac Death, DCD) con arresto cardiaco e cessazione della circolazione.

Il rischio di DGF è più alto per reni ricevuti da donatori deceduti (31,42) rispetto a donatori viventi (43). Ciò è dovuto al fatto che i donatori deceduti hanno, rispetto ai viventi, comorbidità maggiori, tasso di filtrazione glomerulare spesso subottimale ($> 50 \text{ mL/min/1,73m}^2$), instabilità emodinamica ed ipotensione o ipovolemia, tempo di ischemia fredda più lungo, danno da ischemia-riperfusion ed attivazione dell'immunità innata maggiori (Tab. 1.2). Inoltre, nei donatori deceduti può essere difficile ricostruire una storia clinica affidabile e, talvolta, il breve tempo a disposizione può precludere analisi più approfondite (28)

Per supportarne la circolazione, i donatori deceduti vengono più frequentemente sottoposti alla somministrazione di vasocostrittori ed inotropi, il cui uso è associato a percentuale di presentazione di funzione immediata e sopravvivenza ad 1 anno del graft minori rispetto ai gruppi di riceventi reni di donatori che ne sono stati sottoposti (rispettivamente, 58% e 73% contro 83% e 91%) (44).

I donatori in morte cerebrale di età superiore a 60 anni o quelli di età compresa tra 50 e 59 anni con due tra storia di ipertensione, creatinina sierica superiore a 1,5 mg/dL, causa di

morte cerebrovascolare, sono definiti donatori expanded-criteria (ECD) (45,46), i cui reni spesso presentano DGF rispetto ai reni di donatori standard-criteria (SCD).

Infine, il trapianto da vivente è più frequentemente preemptive, ovvero eseguito prima che il ricevente venga sottoposto a dialisi, con conseguente riduzione del rischio di sviluppare DGF ed aumento della sopravvivenza del graft e del paziente, rispetto al trapianto da donatore deceduto (47).

| | <i>Donatore vivente</i> | <i>Donatore deceduto</i> |
|-------------------------------|--|--------------------------|
| GFR | Ottimale, > 80 mL/min/1,73m ² | Subottimale |
| Circolo ed emodinamica | Normale e stabile | Instabile |
| AKI pretrapianto | Assente | Possibile |
| CIT | Assente | Prolungato |
| Danno da ischemia-riperfusion | Minimo | Grave |
| Attivazione immunitaria | Minima | Intensa |

Tab 1.2. Fattori che determinano un outcome migliore nel trapianto da vivente

1.4.3 Fattori di rischio legati al donatore: qualità degli organi

La carenza di organi da donatore vivente, le liste d'attesa in crescita e i tassi significativi di scarto dei reni costituiscono attualmente problemi fondamentali per la gestione logistica e clinica del trapianto renale. In letteratura è diffusamente accettato e dimostrato come la qualità dell'organo sia un determinante fondamentale della funzione renale e sulla sopravvivenza a lungo termine. Tuttavia, la qualità dell'organo è difficile da prevedere.

Van Moos et al. ha recensito i sistemi più frequentemente utilizzati per la valutazione della qualità del rene, come l'interpretazione della biopsia renale, i marcatori molecolari associati all'età biologica, i punteggi clinici e le analisi molecolari delle biopsie peritrapiantologiche, evidenziando come non esista un consenso univoco sulla validità clinica di tali analisi (48). Altri ricercatori si sono concentrati sulle indagini molecolari di tipo genetico, epigenetico, trascrittomico, proteomico e metabolomico (49) e, sebbene siano riportati alcuni interessanti risultati sul potenziale dei biomarcatori per predire l'outcome del trapianto, tali risultati non sono ancora stati confermati da studi più significativi, per cui la loro applicazione clinica rimane dubbia.

Per i donatori viventi, la maggior parte dei centri trapiantologici utilizza come marcatori dell'outcome del trapianto la creatinina sierica e la clearance della creatinina per stimare il GFR; tuttavia, pur essendo questi parametri facilmente reperibili ed affidabili, si dovrebbe considerare che i valori di creatinina sierica possono essere influenzati da età (riduzione di

circa 8 mL/min/1.73m² ogni 10 anni con variazioni individuali), dieta, massa muscolare ed esercizio fisico (50). Inoltre, il punteggio biotico di sclerosi, definito dal numero totale di glomeruli sclerotici, dalla presenza di atrofia tubulare, dalla fibrosi interstiziale > 5% del campione renale e da qualsiasi sclerosi, aumenta progressivamente con l'età, anche in assenza di patologia renale conclamata (51).

In molti centri, un GFR inferiore a 80 mL/min/1.73m² in almeno due misurazioni o la presenza di una comorbilità che porta a potenziali complicanze per il donatore o il ricevente rappresentano criteri di esclusione dei donatori viventi.

Per i donatori deceduti, la decisione è più complessa, poiché molti potenziali donatori presentano valori di GFR ridotti e, talvolta, oliguria. L'età del donatore, la presenza o assenza di comorbilità, la storia clinica ed i precedenti valori di creatinina sierica possono aiutare nella decisione di accettazione o rifiuto.

La questione principale riguarda i reni di donatori expanded-criteria che, pur garantendo al ricevente una sopravvivenza maggiore rispetto ai pazienti in lista d'attesa (3,5), comportano rischio di DGF doppio, rigetto acuto più frequente e funzionalità renale a lungo termine minore (52,53).

Le principali strategie che possono essere adottate con i reni di donatori expanded-criteria sono tre: i due reni vengono assegnati a due riceventi diversi; i due reni vengono assegnati ad un unico ricevente; i reni di donatori anziani vengono assegnati a riceventi anziani.

I risultati dell'utilizzo della prima strategia sono stati analizzati da una revisione sistematica e una metanalisi su 4833 primi trapianti, che hanno documentato un fallimento del graft 1,75 volte maggiore per i reni di donatori ECD rispetto a quelli di donatori SCD. Con un follow-up di 10 anni, tale differenza è risultata associata ad una diminuzione di 8 mesi del tempo medio al fallimento del graft per i riceventi da donatori ECD (54).

Per decidere di utilizzare la seconda strategia vengono utilizzati diversi criteri, sia clinici che laboratoristici: alcuni ricercatori hanno considerato il doppio trapianto se il GFR del donatore era inferiore a 90 mL/min/1.73m² (55); altri se l'età era superiore a 75 anni (56); altri ancora si sono basati su punteggi istologici (57). Nessuno di questi criteri è privo di criticità, ma i tassi di sopravvivenza del graft e del paziente hanno mostrato solo piccole differenze o nessuna differenza per i trapianti doppi e singoli di reni allocati secondo punteggi clinici o istologici affidabili (58,59).

Indipendentemente dalla strategia utilizzata, il principale problema dell'utilizzo di donatori expanded-criteria è l'alto rischio di sviluppare DGF.

1.4.4 Fattori di rischio legati al ricevente

La maggior parte dei candidati a ricevere il trapianto di rene è costituita da pazienti in dialisi cronica. I pazienti con instabilità emodinamica durante l'emodialisi ed i pazienti sottoposti a ultrafiltrazione eccessiva possono sviluppare ipotensione, che può essere ulteriormente aggravata dall'anestesia e dalla chirurgia, rendendo difficile la gestione preoperatoria ed aumentando il rischio di DGF. Per prevenire l'ipotensione intradialitica si possono mettere in atto alcune strategie terapeutiche, tra cui la somministrazione di albumina (60,61), ma se queste manovre non hanno successo, è meglio ritardare il trapianto di alcune ore per ottenere la correzione dell'ipotensione e la stabilizzazione emodinamica, riducendo così il rischio di DGF.

Nel periodo perioperatorio dovrebbero essere evitati, a meno che non siano strettamente necessari, gli antibiotici nefrotossici, come gli aminoglicosidi, la vancomicina, i chinoloni e l'amfotericina-B. Allo stesso modo, è necessaria cautela con l'uso di alcuni analgesici con potenziale effetto nefrotossico, in particolare farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) e paracetamolo in sovradosaggio(62–64).

Il cardine della terapia immunosoppressiva standard per i riceventi trapianto è rappresentato dai farmaci inibitori della calcineurina. Questi sono, però, agenti vasocostrittori che possono causare un aumento della creatinina sierica in acuto; inoltre, possono avere effetti tossici sul rene, con gravità che va da lievi cambiamenti del sistema tubulare (ad esempio vacuolizzazione isometrica, mitocondri giganti, microcalcificazioni) ed arteriopatologia con necrosi focale della tonaca media delle piccole arterie in assenza di cambiamenti intimali(63), fino alla microangiopatia trombotica che può portare alla perdita del graft (65).

Per ridurre la tossicità dei farmaci inibitori delle calcineurine sono state utilizzate diverse terapie di induzione, tra cui la più frequente è rappresentata da basse dosi di tacrolimus associato a basiliximab, micofenolato di mofetile e corticosteroidi. A seconda del caso, è possibile anche l'utilizzo di globuline anti-timociti, belatacept ed inibitori di mTOR (66,67)

1.5 Fisiopatologia della Delayed Graft Function

L'ischemia del tessuto, che inizia con il posizionamento della clamp vascolare sull'arteria renale durante il prelievo, è caratterizzata da riduzione della quantità di ossigeno e nutrienti, con conseguente accumulo di prodotti metabolici di scarto. A livello della cellula si osservano alterazioni biochimiche come l'inibizione del metabolismo ossidativo aerobico, il consumo di ATP, la riduzione dell'attività della pompa Na/K-ATPasi e l'aumento del metabolismo anaerobico, indotto da HIF-1 α . L'ATP viene rapidamente catabolizzata ad ipoxantina, che non può essere ulteriormente metabolizzata in condizioni di anaerobiosi e dunque si accumula(68). Anche il sodio si accumula all'interno della cellula, causandone un rigonfiamento, mentre la glicolisi anaerobia causa accumulo di acido lattico, che abbassa il pH intracellulare, e di enzimi litici lisosomiali. Si osserva anche la riduzione della capacità di transferrina e ferritina di legare il ferro con conseguente aumento della concentrazione intracellulare di ferro libero, un potente catalizzatore delle reazioni di formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), aumentando così lo stress ossidativo(69,70).

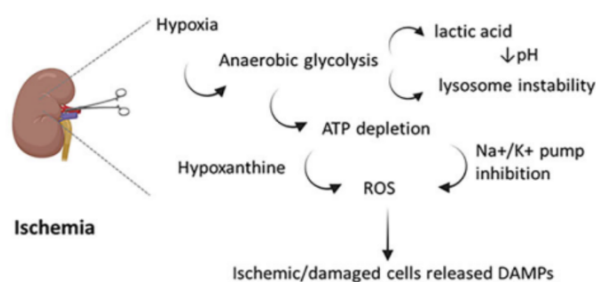


Fig. 1.4. Fase di ischemia dell'organo

La generazione di questi radicali induce la produzione a cascata di altri radicali come l'ossido nitrico (NO) ed il superossido, che reagiscono a formare perossinitrito, un potente ossidante che modifica le proteine tramite la formazione di 3-nitrotirosina(71). L'attività della NO-sintasi risulta aumentata anche a causa dell'ipossia nei tubuli. Inoltre, L'ossido nitrico ha il potenziale di ostacolare l'attività del citoscheletro, già disorganizzato per la riduzione dell'efflusso attivo del calcio intracellulare ATP-dipendente, portando al distacco delle cellule tubulari prossimali e quindi all'ostruzione tubulare. Pertanto, sebbene l'aumentata generazione di ossido nitrico da parte della NO-sintasi inducibile possa attenuare il danno renale promuovendo la vasodilatazione, la maggior parte degli studi presenti in letteratura ne sostiene il ruolo negativo a causa dell'aumento dei radicali dell'ossigeno e dello stress ossidativo(72,73).

Alcuni meccanismi citoprotettivi vengono attivati in risposta all'ischemia renale, tra cui la rapida diminuzione dell'attività metabolica cellulare, come dimostra l'aumento della trascrizione di geni i cui prodotti sono sia citoprotettivi, sia legati alla rigenerazione cellulare(74,75). Tuttavia, è stato osservato che nei reni espuntati da donatori deceduti l'espressione di geni che codificano per fattori legati alla risposta adattativa al danno cellulare, ad esempio VEGF, Bcl-2 ed emeossigenasi-1, sono ridotti rispetto al normale; questa inferiore espressione potrebbe dunque essere la manifestazione di un difettoso adattamento cellulare al danno di tipo ischemico ed influire sul recupero della funzionalità renale immediata(76). La riperfusione del tessuto renale ischemico causa aumento della temperatura, riossigenazione e ritorno al metabolismo aerobico, con produzione di ATP. Tuttavia, a questi effetti positivi sul tessuto si aggiunge la produzione di grandi quantità di ROS, tra cui l'anione superossido (O_2^-) ed il perossido di idrogeno (H_2O_2), i quali reagiscono a formare il gruppo idrossile libero, composto altamente reattivo e citotossico che dà inizio e sostiene la perossidazione lipidica della membrana cellulare (69,70).

In condizioni normali, enzimi antiossidanti (scavenger) fisiologicamente presenti nel tessuto renale contrastano l'effetto delle specie reattive dell'ossigeno ma, durante la riperfusione del tessuto ischemico, tali enzimi vengono rapidamente saturati dal gran numero di ROS, con conseguente morte cellulare(77).

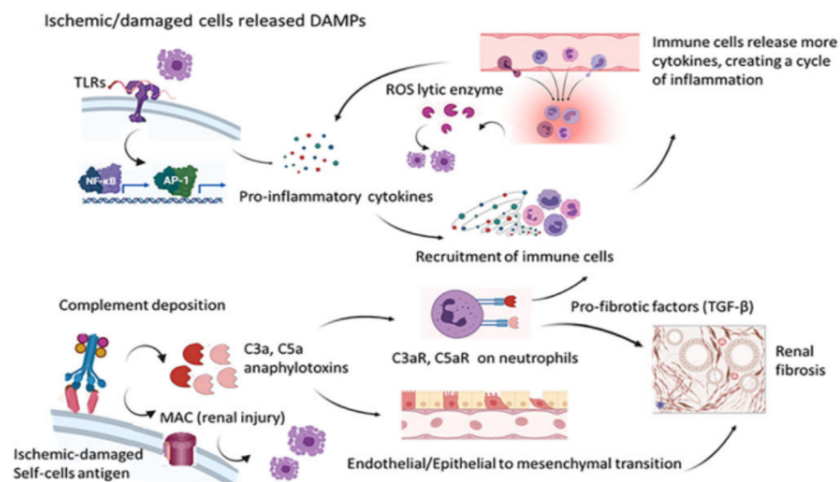


Fig. 1.5. Fase di riperfusione dell'organo

Il rilascio di citochine e chemochine infiammatorie durante la formazione di specie reattive dell'ossigeno e la perossidazione lipidica, insieme all'aumento dell'espressione di molecole di adesione sulla superficie cellulare, attrae cellule immunitarie come neutrofili e monociti, i quali rilasciano ulteriori quantità di ROS e sostengono il danno renale (70).

Le citochine proinfiammatorie rilasciate durante il danno da ischemia-riperfusion (IRI), come IL-1 β , IL-6 e TNF- α , sono prodotte dalle cellule immunitarie attivate, tra cui macrofagi e neutrofili, e contribuiscono all'amplificazione della risposta infiammatoria locale(78).

IL-1 β viene rilasciata immediatamente dopo il danno tissutale ed agisce promuovendo l'infiltrazione di altre cellule immunitarie ed aumentando l'espressione di molecole di adesione sulle cellule endoteliali, facilitando così il reclutamento di neutrofili e linfociti nella sede lesionata. Allo stesso modo, IL-6 agisce stimolando la differenziazione dei linfociti T e B ed inducendo la produzione di proteine epatiche di fase acuta nel fegato, come dimostra l'aumento dei livelli plasmatici di PCR. Il TNF- α induce l'apoptosi delle cellule tubulari renali danneggiate e potenzia la risposta infiammatoria mediante l'attivazione NF- κ B, il principale fattore nucleare espresso durante i processi infiammatori(79).

Le chemochine prodotte durante il periodo di ischemia-riperfusion rappresentano potenti chemoattrattori per i neutrofili, motivo per cui sono proprio i neutrofili le prime cellule reclutate nello sviluppo delle prime fasi del danno renale(78). Anche nel contesto del trapianto renale, diversi studi hanno dimostrato come l'induzione della sottofamiglia ELR-CXC e dell'IL-8 sia evidente già nella prima ora dal prelievo(80,81). Il ruolo patogenetico di queste ed altre citochine e chemochine è supportato anche dal fatto che il trattamento con anticorpi anti-IL-8, anti-KC/CXCL1, anti-MIP-2 ed anti-LIX/CXCL5 riduce l'infiltrazione dei neutrofili - e quindi il danno renale dopo ischemia-riperfusion - sia su modello sperimentale che su trapianto(80,81).

Una seconda fase di espressione delle chemochine, che coinvolge IP-10/CXCL1 e Mig/CXCL9 - entrambe indotte da IFN- γ - e MCP-1/CCL2, inizia a circa 3 ore dopo il trapianto e, se da una parte continua a sostenere l'infiltrazione dei neutrofili, dall'altra stimola il reclutamento di monociti, linfociti T e linfociti NK(78). Poiché questa seconda fase dipende almeno in parte dalla prima, agire precocemente sul rilascio citochinico nel tessuto renale potrebbe avere effetti modulatori sull'infiltrazione monocitica e linfocitaria, quindi sul danno renale, sull'immunogenicità e sulla sopravvivenza a lungo termine sia del graft che del paziente.

Anche il sistema del complemento, la cui attivazione locale risulta aumentata durante la ri-perfusion, contribuisce alla chemiotassi ed al danno tissutale renale. Ciò è sostenuto anche dal fatto che il blocco della cascata del complemento con antagonisti specifici del recettore C5a, attenua l'insufficienza renale indotta da IRI su modello animale (82,83).

L'attivazione del complemento può avvenire tramite le vie classica, alternativa e lectinica, ciascuna delle quali contribuisce alla risposta infiammatoria ed al danno tissutale. Il rilascio

massivo di DAMPs durante il processo di IRI attiva il complemento, come rivela l'accumulo locale di C3a, C5a ed anafilotossine che sostengono il reclutamento e l'attivazione di cellule infiammatorie come neutrofili e macrofagi nel sito del trapianto(84).

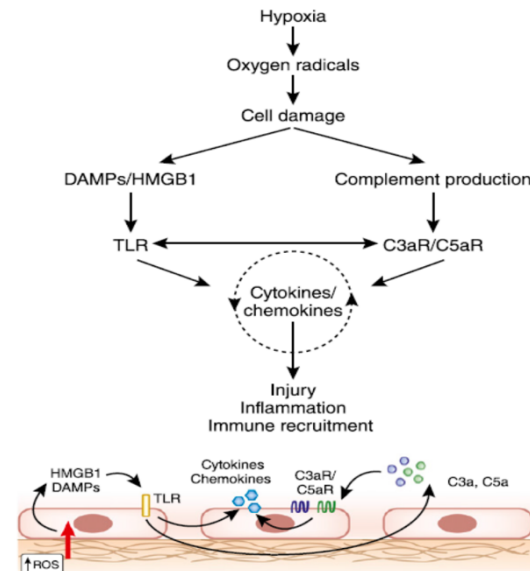


Fig. 1.6. Ruolo del sistema del complemento in corso di IRI

L'accumulo delle proteine del complemento non solo intensifica la risposta infiammatoria, ma contribuisce anche alla formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC), che agisce danneggiando direttamente le cellule endoteliali e tubulari del graft, compromettendo l'integrità vascolare e la funzionalità renale, aumentando il rischio di rigetto e riducendo la sopravvivenza del trapianto(84).

La localizzazione dei leucociti nei siti di infiammazione o lesione dipende in gran parte dai recettori di adesione(85): dopo il rotolamento sull'endotelio attivato, i recettori leucocitari interagiscono con i relativi ligandi di adesione espressi dalle cellule endoteliali, il cui legame comporta immobilizzazione sull'endotelio e diapedesi leucocitaria attraverso la parete vascolare. Nello specifico, il legame avviene tra molecole appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline presenti sulle cellule endoteliali, come la molecola di adesione cellulare intercellulare 1 (ICAM-1) e la molecola di adesione cellulare vascolare 1 (VCAM-1), con i loro ligandi integrina- β 1 ed integrina- β 2, presenti sui leucociti(86). Studi su modelli in vitro e su modelli animali hanno dimostrato che ICAM-1 è maggiormente espresso nel tessuto renale durante il danno da ischemia-riperfusion e che gli anticorpi anti-ICAM-1 hanno ridotto il danno tissutale e migliorato la funzione d'organo (87,88).

Il risultato finale della complessa interazione tra specie reattive dell'ossigeno, citochine e chemochine, cascata del complemento, molecole di adesione e leucociti è un processo

infiammatorio che sostiene il danno delle cellule epiteliali renali, in particolare quelle del tubulo prossimale.

A livello vascolare, durante la riperfusione del rene i vasa recta diventano congesti, la perfusione dei capillari peritubulari è ridotta mentre la permeabilità endoteliale è aumentata(89). Si osservano aumento delle resistenze vascolari, aumento della resistenza dell'arteriola afferente e conseguente brusca riduzione del filtrato glomerulare, dovuta principalmente al calo del gradiente di pressione idrostatica transcappillare glomerulare(90). È stato dimostrato, tramite l'inserimento di sonde termodiffusive nella corteccia renale di 30 riceventi di trapianto renale, che la microperfusione renale risulta essere inferiore nei pazienti che manifestano DGF rispetto a quelli con immediato recupero della funzione renale(91).

Anche l'endotelio vascolare danneggiato e l'endotelina hanno un importante ruolo patogenetico, visto che la lesione endoteliale comporta uno squilibrio del metabolismo degli eicosanoidi, con eccesso di trombossano, diminuzione della prostaciclina e conseguente vasospasmo(92). Nel danno renale da ischemia-riperfusione si osserva l'aumento dell'espressione sia dell'mRNA dell'endotelina sia della proteina stessa(93); inoltre, i pazienti che manifestano DGF hanno elevate concentrazioni sieriche di endotelina-1(94). Il ruolo patogenetico dell'endotelina è supportato anche dal fatto che antagonisti selettivi e non selettivi del recettore dell'endotelina riducono il danno renale da ischemia-riperfusione e stimolano la funzione renale precoce su modelli animali(95). La disfunzione endoteliale è inoltre associata alla maggior espressione di fattori emostatici, con conseguente aumento del rischio di trombosi e coagulazione(10).

Studi di biologia molecolare su modello animale hanno valutato le variazioni dell'espressione genica durante lo sviluppo del danno renale da ischemia-riperfusione; in particolare, l'analisi microarray ha rivelato una costante alterazione del pattern di espressione genica, con variazioni legate al tempo trascorso dall'ischemia(96). Tra i geni valutati, sono risultati aumentati a diversi tempi (3h, 12h e 24h) fattori di trascrizione come Egr-1 e c-fos, fattori di crescita come HGF e TGF- β , molecole di trasduzione del segnale infiammatorio come IL-1 β , IL-6 ed IL-8, fattori implicati nei processi riparativi come HSP-70 ed altri ancora come NO-sintasi endoteliale ed integrina- β 2. Allo stesso modo, tra i 156 geni la cui espressione è risultata ridotta rispetto al normale, sono stati identificati lo scambiatore sodio-idrogeno 3 (SLC9A3) ed alcuni membri della famiglia del citocromo P450, come quelli che codificano per le componenti CYP2D6, CYP2D9 e CYP2D14(97).

In letteratura è anche riportato l'aumento dell'espressione di altri geni associati alla risposta infiammatoria, come il fattore inducente l'interferone, le molecole MHC di classe II, l'apolipoproteina-E, il VEGF, le VCAM-1 e le interleuchine 1 e 10(98). Questi risultati derivano da studi su modelli animali e tramite prelievi bioptici da allotrapianti renali umani raccolti 30-60 minuti dopo la riperfusione. L'analisi immunohistochimica e trascrizionale mediante PCR quantitativa in tempo reale indica che i monociti e i trascritti correlati al loro reclutamento sono quelli maggiormente espressi nell'immediato periodo post riperfusione(99).

Per far fronte allo stress della riperfusione, enzimi endogeni come la glutatione-S-transferasi e la superossido-dismutasi sono indotti e risultano particolarmente importanti nel mitigare gli effetti negativi dei ROS; alcuni polimorfismi enzimatici specifici rendono questi enzimi incapaci di proteggere adeguatamente l'organo, risultando in lesioni da riperfusione che sostengono la disfunzione del graft dopo il trapianto (100). Ciò sostiene la tesi secondo la quale l'identificazione di un allele genetico che protegge contro le lesioni da riperfusione offrirebbe la possibilità di definire i polimorfismi al momento della tipizzazione tissutale per quantificare il rischio biologico intrinseco di DGF.

1.6 Disfunzione mitocondriale

Un altro meccanismo patogenetico che contribuisce a sostenere il danno renale in corso di DGF è la disfunzione mitocondriale (101). I mitocondri sono gli organuli cellulari deputati alla sintesi di ATP, all'omeostasi del calcio intracellulare, dei livelli di stress ossidativo e della vitalità cellulare. In particolare, sono essenziali per mantenere una adeguata funzionalità renale, dove il riassorbimento attivo di grandi quantità di soluti è possibile solo attraverso un metabolismo ossidativo mitocondriale efficiente (102)

In corso di DGF si osserva una significativa disfunzione dei mitocondri che può causare lesioni delle cellule tubulari renali (103), normalmente ricche di mitocondri che producono ATP tramite l'ossidazione degli acidi grassi. La fosforilazione ossidativa risulta gravemente ridotta nelle cellule tubulari danneggiate, con conseguente deplezione di ATP, morte cellulare e deposizione di lipidi intracellulari, conferendo in questo modo sia alle cellule che al tessuto un fenotipo analogo a quello che si osserva nel tessuto renale fibrotico (cfr 1.8)(104,105).

Ciò conferma ulteriormente l'ipotesi - già ampiamente dimostrata nella letteratura scientifica - secondo cui la disfunzione mitocondriale sia implicata non solo nella patogenesi del danno renale da ischemia-riperfusione, ma nella transizione a danno renale cronico(102,106).

Diversi studi sperimentali hanno documentato la riduzione della capacità di contrastare le specie reattive dell'ossigeno durante il danno renale da ischemia-riperfusion e durante la successiva riparazione tissutale; ciò è dimostrato da una parte dall'aumento dei ROS mitocondriali (mtROS) nelle cellule tubulari renali, dall'altra dagli effetti protettivi della somministrazione di antiossidanti durante questi processi. Infatti, in un modello murino di danno renale da ischemia-riperfusion e conseguente fibrosi è stato osservato come l'aumento persistente dei ROS e dello stress ossidativo sia accompagnato dalla riduzione sensibile dell'attività di enzimi scavenger come la superossido-dismutasi (SOD-1 e SOD-2) e la catalasi (107)

La perossidazione della membrana mitocondriale sostenuta dai ROS avviene soprattutto sulla cardiolipina, un fosfolipide che si ancora esclusivamente nella membrana mitocondriale interna con ruoli fondamentali nella regolazione della formazione delle creste mitocondriali e dell'organizzazione del complesso della catena respiratoria (108). Il fatto che la perossidazione della membrana mitocondriale indotta dallo stress ossidativo contribuisca in modo cruciale allo sviluppo del danno renale da ischemia-riperfusion e alla progressione a fibrosi è sostenuto dall'effetto protettivo della somministrazione di composti in grado di legarsi selettivamente alla cardiolipina (ad esempio SS-31) e prevenirne la perossidazione (109).

Per quanto riguarda gli effetti dei ROS sulle proteine mitocondriali, di solito si tratta di mutazioni delle sequenze proteiche e della struttura proteica indotte da reazioni di ossidazione diretta. In corso di danno renale da ischemia-riperfusion si osserva l'aumento dell'espressione del gene TRAP-1 e della corrispondente proteina HSP-75, in particolare nel tubulo prossimale e nell'ansa di Henle come risposta all'accumulo di proteine misfolded indotto dallo stress ossidativo, suggerendone l'effetto protettivo nei confronti della DGF (102,110). Invece, per quanto riguarda i danni al DNA mitocondriale indotti dai ROS, questi sono rivelati dall'aumento dei livelli di 8-idrossi-2-deossiguanosina, un marcatore del danno ossidativo del DNA, in corso di danno renale da IRI (111,112)

Anche la proteina di disaccoppiamento mitocondriale 2 (UCP-2) ha un ruolo patogenetico nello sviluppo della disfunzione mitocondriale, in quanto in modelli animali di danno renale da IRI knock-out per UCP-2 è stata osservata una frammentazione mitocondriale maggiore, con conseguente danno renale più grave rispetto al gruppo wild-type (113)

L'aumento dei ROS mitocondriali è anche in grado di attivare HIF-1 α (114), l'inflammosoma NLRP-3 (NOD-Like Receptor family, PYD-domain-containing-3) (115,116), la

produzione di citochine proinfiammatorie, la risposta immunitaria e l'espressione del TGF- β , con effetti profibrotici (117).

In presenza di alti livelli di specie reattive dell'ossigeno e stress ossidativo, oltre alle alterazioni di DNA, proteine e lipidi, si osservano anche l'inibizione della capacità di trasporto degli elettroni e la perdita del potenziale di membrana mitocondriale (MMP) (118,119). In modelli di danno da IRI cardiaca e cerebrale è già stato dimostrato come la disfunzione mitocondriale possa essere un indicatore della salute dei tessuti, proprio perché la perdita del potenziale di membrana mitocondriale nelle cellule danneggiate è associata alla compromissione della produzione di ATP e della vitalità cellulare (120,121).

Nonostante l'accettazione crescente del potenziale di membrana mitocondriale come indicatore della salute e della vitalità cellulare generale e nonostante la chiara utilità che potrebbe avere un indicatore simile in campo trapiantologico, la sua validità nella valutazione dei tessuti degli organi di donatori deceduti non è ancora stata esplorata a fondo.

Sun et al. hanno ipotizzato che il potenziale di membrana mitocondriale potesse essere un predittore indipendente del rischio di sviluppare DGF e, tramite la sua misurazione nelle biopsie dei trapianti di rene, hanno documentato come per ogni diminuzione del 10% del valore pretrapiantologico di MMP nel donatore, i riceventi avessero un rischio del 38% più elevato di sviluppare DGF (103)

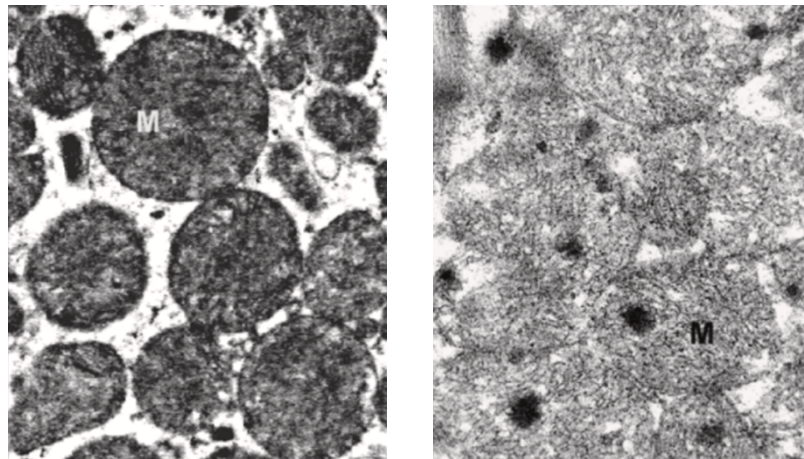


Fig. 1.7. Mitochondri funzionali e disfunzionali osservati in analisi ultrastrutturale

1.7 Aumento dell'immunogenicità e del rischio di rigetto

La DGF aumenta il rischio di rigetto del rene trapiantato, a causa degli effetti dell'immunità innata in risposta al danno renale e dell'immunità adattativa in risposta alla presenza di tessuto estraneo(122). Dopo il danno ischemico, si osservano due principali risposte immunitarie: da una parte il rilascio di molecole che vengono riconosciute come DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns) dai toll-like receptors (TLR) e dai pattern-recognition receptors (PRR) di macrofagi e cellule dendritiche, dall'altra un aumento dell'espressione di molecole MHC di classe I e II nel rene. In particolare, si nota un aumento di MHC-I nelle cellule tubulari e di MHC-II nelle cellule dell'interstizio(123). Tramite il riconoscimento diretto delle molecole di alloantigeni MHC presenti sul tessuto estraneo da parte delle cellule T del ricevente, si può innescare rapidamente una risposta citotossica intensa contro il rene trapiantato.

Allo stesso modo, il riconoscimento indiretto avviene quando i peptidi derivati dagli alloantigeni MHC estranei vengono processati e presentati dalle cellule presentanti l'antigene (APC) del ricevente al suo sistema immunitario su molecole MHC di classe II, sostenendo la risposta immunitaria mediata da linfociti T helper(124).

L'attivazione delle prime cellule immunitarie induce la produzione di citochine proinfiammatorie, come IL-1, IL-6 e TNF- α , che amplificano la risposta infiammatoria e favoriscono il reclutamento di ulteriori cellule immunitarie nel sito del trapianto. IL-1 è particolarmente importante per l'attivazione dei linfociti T e B, mentre IL-6 e TNF- α sono coinvolte nella promozione dell'infiammazione e nella regolazione della risposta immunitaria adattativa.

Inoltre, l'aumento dell'espressione di molecole MHC di classe I e II nel rene trapiantato, specialmente nelle cellule danneggiate dall'ischemia, rende tali cellule più facilmente individuabili al sistema immunitario del ricevente (125).

Durante il danno renale da ischemia-riperfusione si osserva anche l'aumento dell'espressione di molecole di adesione come ICAM-1 e VCAM-1, essenziali per la migrazione delle cellule immunitarie al sito di danno(126). L'espressione di queste molecole sulla superficie delle cellule endoteliali è stimolata dalle citochine proinfiammatorie, con effetto stimolatorio dell'adesione e della diapedesi delle cellule immunitarie nel tessuto renale. ICAM-1 interagisce con i leucociti attraverso l'integrina- β 1, permettendo loro di attraversare la barriera endoteliale e raggiungere il parenchima renale; VCAM-1 lega l'integrina- β 2 sui monociti e linfociti, promuovendone la migrazione(127).

Inoltre, l'interazione tra citochine proinfiammatorie e molecole di adesione non solo intensifica la risposta immunitaria, ma può anche contribuire alla cronicizzazione del danno tissutale, in quanto la continua attivazione e infiltrazione delle cellule immunitarie può causare un'inflammatione persistente che compromette la funzione a lungo termine del graft ed aumenta il rischio di rigetto cronico (125).

Nella maggior parte degli studi revisionati, il rigetto risulta essere più frequente nei pazienti che manifestano DGF rispetto a quelli che recuperano immediatamente una normale funzione d'organo(10,28,128,129). Questo fenomeno è dovuto alla maggiore suscettibilità del rene già danneggiato dall'ischemia-riperfusion e a subire ulteriori danni da parte delle cellule immunitarie attivate ed alla compromissione della barriera endoteliale, che facilita l'infiltrazione di cellule T ed altre cellule effettrici nel parenchima renale. Questo processo non solo riduce la sopravvivenza del graft, ma compromette anche la qualità della vita del paziente a lungo termine, aumentando la necessità di interventi terapeutici aggiuntivi e riducendo le possibilità di un esito trapiantologico stabile nel tempo(128).

Infatti, i pazienti con DGF richiedono un monitoraggio più intensivo rispetto ai pazienti che non manifestano DGF, tramite controlli frequenti dei livelli di creatinina sierica, biopsie renali per valutare il grado di rigetto e l'inflammatione, nonché l'adeguamento tempestivo delle dosi di farmaci immunosoppressivi; va però ricordato che i pazienti con DGF non possono beneficiare di terapie immunosoppressive più aggressive per mitigare maggiormente il rischio di rigetto, a causa della riduzione della loro funzione renale(125,130).

La prevenzione e la gestione efficace della DGF sono quindi cruciali per migliorare gli esiti a lungo termine del trapianto renale, mentre interventi preventivi, come la selezione ottimale dei donatori e la minimizzazione del tempo di ischemia fredda, possono ridurre l'incidenza di rigetto.

Il rigetto può manifestarsi in diverse forme, T-mediato ed anticorpo mediato, ognuna con meccanismi patogenetici specifici e conseguenze differenti, anche se la sovrapposizione tra le due forme è possibile.

1.7.1 Rigetto T-mediato

Il rigetto T-mediato si sviluppa nei primi mesi post trapianto ed è principalmente mediato da una risposta immunitaria contro il graft trapiantato, per il quale l'evento patogenetico principale è rappresentato dall'attivazione e dalla proliferazione dei linfociti T del ricevente dopo

aver riconosciuto gli antigeni MHC del donatore come estranei(131,132). La risposta acuta associata al rigetto T-mediato può essere suddivisa in due tipi principali, cellulare e umorale. La risposta cellulare è mediata dai linfociti T citotossici che, dopo aver riconosciuto direttamente gli antigeni MHC di classe I e II espressi dalle cellule del graft, rilasciano enzimi citotossici, come perforine e granzimi, che ne inducono la lisi cellulare(133,134). Le perforine formano pori sulla membrana delle cellule bersaglio, mentre i granzimi penetrano nelle cellule attraverso questi pori e ne innescano l'apoptosi(135). Inoltre, i linfociti T citotossici possono produrre citochine proinfiammatorie come IFN- γ , che stimolano l'attivazione di ulteriori componenti del sistema immunitario amplificando la risposta infiammatoria(136). In particolare, l'IFN- γ non solo attiva i macrofagi, aumentando quindi la fagocitosi e la distruzione delle cellule bersaglio, ma stimola anche l'espressione di MHC di classe II su cellule non professionali, amplificando la risposta immunitaria (137). Inoltre, la produzione di altre citochine proinfiammatorie, come IL-2 e TNF- α , contribuisce ulteriormente all'espansione ed all'attivazione dei linfociti T, perpetuando il ciclo di rigetto(138).

Questo processo è cruciale per l'eliminazione delle cellule del trapianto riconosciute come estranee e può determinare danni significativi al tessuto trapiantato, se non controllato adeguatamente tramite immunosoppressione.

La risposta cellulare T-mediata è in parte legata alla risposta umorale, che coinvolge i linfociti B. Questi, una volta attivati, si differenziano in plasmacellule e producono anticorpi diretti contro gli antigeni del graft, attivando il sistema del complemento e portando alla formazione di immunocomplessi (125,138). Quest'ultima innesca a sua volta una cascata di eventi che comprende la lisi cellulare mediata dal complemento, il richiamo di neutrofili e macrofagi al sito del trapianto e la liberazione di enzimi litici e radicali liberi che causano danno tissutale ed infiammazione. Inoltre, gli anticorpi possono mediare fenomeni di citotossicità cellulo-mediata dipendente da anticorpi (Antibody-Dependent Cellulo-mediated Cytotoxicity, ADCC), dove i linfociti NK riconoscono e distruggono le cellule del graft opsonizzate dagli anticorpi (139).

Il rigetto T-mediato può essere reversibile con un trattamento tempestivo a base di immunosoppressori, che agiscono riducendo l'attività del sistema immunitario del ricevente contro il tessuto del donatore. Questi farmaci includono corticosteroidi, inibitori della calcineurina (ad esempio ciclosporina e tacrolimus) e agenti antiproliferativi (come azatioprina e mofetilato di mofetile) (140,141). Il monitoraggio continuo dei livelli di immunosoppressori nel sangue e l'adattamento del regime terapeutico in base alla risposta clinica sono cruciali

per prevenire episodi di rigetto e per minimizzare gli effetti collaterali dei farmaci, tra cui nefrotossicità ed aumento del rischio infettivo (131).

Recentemente, l'uso di terapie biologiche con anticorpi monoclonali che bloccano specifiche molecole costimolatorie coinvolte nell'attivazione dei linfociti T, ha dimostrato risultati positivi nel migliorare il controllo del rigetto acuto. Ad esempio, gli anticorpi anti-CD25, come basiliximab e daclizumab, ormai entrati nella comune pratica clinica per la prima immunosoppressione postoperatoria, agiscono inibendo l'azione dell'IL-2, una citochina fondamentale per la proliferazione e la sopravvivenza dei linfociti T attivati(142).

1.7.2 Rigetto anticorpo-mediato

Il rigetto anticorpo-mediato iperacuto si verifica entro pochi minuti o ore dal trapianto ed è mediato da anticorpi preesistenti contro l'organo donato(138,143). Questi anticorpi si legano rapidamente agli antigeni presenti sull'endotelio del graft, attivando il sistema del complemento e provocando una risposta infiammatoria immediata, che porta alla trombosi disseminata dei vasi sanguigni del graft e alla sua necrosi. L'incidenza del rigetto iperacuto è molto bassa, grazie alle tecniche di analisi del cross-match che permettono di rilevare la presenza di anticorpi preformati nel ricevente prima del trapianto.

Nella maggior parte dei casi, il rigetto anticorpo-mediato è un processo graduale che può portare alla perdita del graft nel lungo termine a causa di infiammazione persistente e fibrosi(143,144). Questo tipo di rigetto è caratterizzato da una progressiva degenerazione dell'organo trapiantato, che si manifesta con fibrosi interstiziale ed arteriosclerosi dei vasi del graft, ispessimento delle pareti arteriose e formazione di aree fibrotiche nei glomeruli e nei tubuli renali, con conseguente compromissione della funzionalità del rene trapiantato(125,144).

Il rigetto anticorpo-mediato cronico può essere asintomatico nelle fasi iniziali, ma con il tempo i pazienti possono manifestare sintomi di insufficienza renale cronica, come aumento della creatinina sierica, proteinuria ed ipertensione(145). La diagnosi precoce del rigetto cronico è fondamentale per adottare interventi terapeutici tempestivi che possano rallentare la progressione del danno renale ed attualmente si basa su strategie diagnostiche tra cui il monitoraggio regolare dei parametri di funzione renale e la biopsia renale, che permette di valutare direttamente il grado di fibrosi e di infiammazione del graft(141,146).

Il rigetto cronico può essere influenzato da vari fattori, tra cui anamnesi positiva per precedenti episodi di rigetto acuto, infezioni, nefrotossicità da farmaci immunosoppressori e

comorbilità del ricevente, come ipertensione e diabete(147). Inoltre, un fattore di rischio cruciale è rappresentato dalla presenza di anticorpi donatore-specifici (DSA), che è stata associata ad un maggiore rischio di rigetto cronico, confermando il ruolo chiave della risposta immunitaria umorale in questo processo. I DSA possono legarsi agli antigeni del graft, attivando il complemento e causando danni ai vasi dell'organo trapiantato, contribuendo alla progressiva perdita di funzionalità renale attraverso l'ispessimento delle pareti vascolari, la riduzione del lume vascolare e la conseguente ischemia cronica del tessuto(148).

La gestione del rigetto cronico è complessa e richiede un bilanciamento preciso e personalizzato tra l'uso di farmaci immunosoppressori per prevenire ulteriori danni immunitari e la minimizzazione degli effetti collaterali nefrotossici degli stessi. Gli approcci terapeutici includono quindi da una parte l'ottimizzazione del regime immunosoppressivo per ridurre l'infiammazione senza compromettere la funzione renale, dall'altra il trattamento delle comorbilità del paziente e l'uso di terapie aggiuntive per migliorare la salute vascolare e ridurre la fibrosi(149). Farmaci come gli inibitori di mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin), ad esempio sirolimus ed everolimus, hanno mostrato effetti positivi nel rallentare la progressione del rigetto cronico, grazie alle loro proprietà antifibrotiche ed antiproliferative (150). Allo stesso modo, la modulazione dei linfociti T regolatori (Treg) ha recentemente dimostrato effetti positivi sulla prevenzione e sul trattamento del rigetto(151,152). I Treg sono un sottogruppo specializzato di linfociti T che svolge un ruolo fondamentale nel mantenimento della tolleranza immunitaria, impedendo che il sistema immunitario riconosca erroneamente ed inneschi una risposta immunitaria contro tessuti sani, compresi gli organi trapiantati. La capacità dei Treg di sopprimere le risposte immunitarie e ridurre l'infiammazione li rende strumenti potenzialmente efficaci nella gestione del rigetto del trapianto; infatti, studi recenti hanno documentato come l'espansione in vitro ed il potenziamento in vivo dei Treg possono migliorare significativamente la sopravvivenza del graft(151). Questo approccio può essere ottenuto attraverso diverse strategie, come l'uso di farmaci immunosoppressori selettivi che favoriscono l'espansione dei Treg, l'infusione di Treg preparati ex vivo e l'utilizzo di vescicole extracellulari modulatorie(153,154). L'integrazione di queste terapie immunomodulate con i trattamenti immunosoppressori tradizionali potrebbe offrire così un duplice vantaggio: da una parte ridurre la probabilità di rigetto, dall'altra diminuire la dose necessaria di farmaci immunosoppressori tradizionali, limitandone gli effetti collaterali associati.

1.8 Aumento del rischio di sviluppare nefropatia cronica

Il rivestimento epiteliale del tubulo renale possiede una notevole capacità rigenerativa, che gli permette di recuperare completamente la sua funzione fisiologica dopo danni strutturali e funzionali anche gravi(155). La sostituzione e la rigenerazione delle cellule epiteliali tubulari (TEC) perse durante il danno renale costituisce un processo intrinsecamente complesso, in cui si verificano significativi cambiamenti dell'espressione genica di alcuni fattori di crescita, tra cui Insulin-like Growth Factor (IGF), Epidermal Growth Factor (EGF) e Hepatocyte Growth Factor (HGF), il cui effetto è legato da una parte all'attività stimolatoria sul potenziale rigenerativo delle cellule tubulari sopravvissute, dall'altra al salvataggio delle cellule danneggiate durante la progressione verso un danno irreversibile(156).

Anche la disfunzione il sistema citoprotettivo Nrf-2/Keap-1 (Nuclear factor erythroid 2 Related Factor 2 e Kelch-like ECH-Associated Protein) contribuisce allo sviluppo di nefropatia cronica a partire da DGF post trapiantologica(157). Nrf-2 è un fattore di trascrizione che regola l'espressione di geni di risposta allo stress ambientale, che normalmente viene mantenuto nel citoplasma dalla proteina inibitoria Keap-1, la quale ne promuove l'ubiquitinazione e la degradazione proteasomale(158,159). Keap-1 contiene diversi residui di cisteina che fungono da sensori dello stato ossidoriduttivo intracellulare; in particolare, l'esposizione a ROS può modificare le cisteine reattive di Keap-1 ed indurre la dissociazione da Nrf-2(160,161). Quando Nrf-2 è dissociato da Keap-1, trasloca nel nucleo e si lega all'elemento di risposta antiossidante (ARE), localizzato nella regione promotrice di diversi geni bersaglio con effetti citoprotettivi, attivandone la trascrizione. Tra questi geni, si trovano anche quelli che codificano per enzimi scavenger come la catalasi, la superossido-dismutasi, l'eme-ossigenasi, l'ossidoreduttasi-1, la glutatione-S-transferasi e la glutatione-perossidasi-2 (159,162).

In topi knock-out per Nrf-2 è stata osservata una maggiore suscettibilità al danno renale da ischemia-riperfusionazione rispetto al gruppo wild-type; allo stesso modo, in topi knock-out per Keap-1 è stata osservata minore suscettibilità al danno ossidativo (163).

La via Nrf-2/Keap-1 è coinvolta nel controllo inibitorio di NF- κ B attraverso la riduzione della fosforilazione di I κ -B α (164); ciò è confermato dal fatto che topi knockout per Nrf-2 hanno mostrato una maggiore attività di NF- κ B e un aumento dell'espressione dei geni proinfiammatori in risposta al danno da ischemia-riperfusionazione rispetto al gruppo wild-type (165,166). Considerando che lo stress ossidativo e le risposte da esso indotte sono alla base della fisiopatogenesi del danno renale da IRI e dello sviluppo di nefropatia cronica, sarebbe

utile studiare in modo più approfondito l'attività del sistema Nrf-2/Keap-1 in corso di DGF. Alcuni studi hanno documentato come in corso di danno renale da IRI l'attività di Nrf-2 può risultare compromessa, con conseguente aumento della suscettibilità al danno in acuto per la riduzione dell'espressione dei geni citoprotettivi ed aumento della probabilità di sviluppare nefropatia cronica per aumento di geni proinfiammatori e profibrotici, come TGF- β (167).

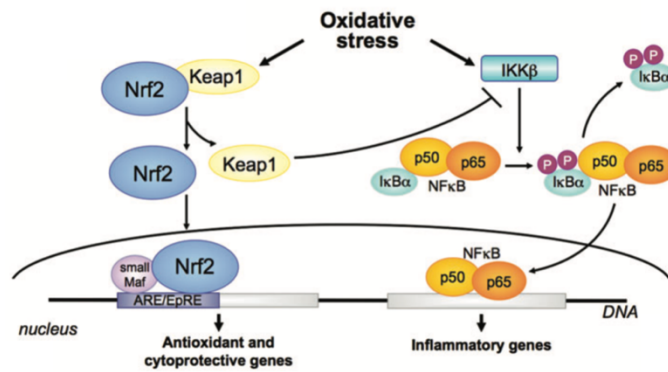


Fig. 1.8. Via di Nrf-2/Keap-1

Dopo il danno renale ischemico, acquistano un ruolo fondamentale anche le cellule staminali mesenchimali (MSC) immature del rene, che iniziano la divisione cellulare, proliferano e successivamente si differenziano in cellule epiteliali tubulari mature (168). Inoltre, tramite un complesso meccanismo di cross-talk, alla segnalazione indotta dal danno renale da ischemia-riperfusion rispondono anche le cellule staminali mesenchimali del midollo osseo, che migrano al sito danneggiato, si differenziano e promuovono la riparazione strutturale e funzionale del tessuto, permettendo il recupero completo o parziale dalla DGF post trapianto (169).

Tuttavia, nelle aree di danno da ischemia-riperfusion, oltre allo stimolo proliferativo e di differenziazione delle cellule staminali mesenchimali si osserva anche l'aumento di fattori come il Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) ed il Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), che sostengono la differenziazione dei fibroblasti dai loro precursori e stimolano la transizione epitelio-mesenchimale delle cellule tubulari renali; inoltre, già nelle prime fasi del danno renale alcune popolazioni di cellule renali acquisiscono capacità proliferativa e di sintetizzare nuova matrice extracellulare (170,171).

Inoltre, il quadro infiammatorio sostenuto induce, nelle cellule renali, l'acquisizione di un fenotipo secretorio proinfiammatorio detto SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype), caratterizzato da alta espressione di citochine proinfiammatorie, chemochine e fattori di crescita profibrotici. L'aumento progressivo del numero e dell'attività dei fibroblasti e

della loro capacità di sintetizzare nuova matrice extracellulare e l'acquisizione del fenotipo SASP determinano, fibrosi renale (172,173).

Diversi studi sperimentali di trapianto renale nei ratti hanno effettivamente documentato che il danno da ischemia-riperfusionem post trapiantologico può indurre modificazioni progressive in senso fibrotico (174). Tale danno fibrotico indotto dall'IRI riduce sensibilmente il numero totale di nefroni funzionali, spesso già ridotti del 50% rispetto al soggetto normale con due reni a causa della sostituzione di questi con un solo rene trapiantato, peggiorando la funzione renale generale.

Diversi studi hanno constatato come anche l'attivazione del complemento in corso di DGF rappresenti un mediatore cruciale nello sviluppo di fibrosi tubulo-interstiziale cronica. Infatti, l'attivazione delle vie classica, alternativa e lectinica è coinvolta non solo nella fisiopatogenesi della DGF (cfr. 1.5), ma anche nello sviluppo della fibrosi precoce (175). In un modello suino di danno renale da ischemia-riperfusionem, Castellano et al. hanno dimostrato la deposizione di C1q e MBL (Mannose-Binding Lectin) sui capillari peritubulari, con colocalizzazione di C4d dopo 15 minuti dalla ripersionem. Il trattamento con C1-INH ricombinante umano, un inibitore della C1-esterasi e quindi delle vie classica e lectinica, ha avuto effetti protettivi sul rene sottoposto ad ischemia-riperfusionem, tramite la riduzione delle cellule immunitarie infiltranti, la modulazione della genesi di miofibroblasti e la riduzione della transizione endotelio-mesenchimale (EndMT) e pericito-miofibroblastica (PMT) (176). Nella transizione endotelio-mesenchimale lo stimolo del complemento induce le cellule endoteliali ad acquisire un fenotipo miofibroblastico, contribuendo al danno vascolare ed allo sviluppo di fibrosi (177). Allo stesso modo, il complemento promuove la transizione pericito-miofibroblastica, con conseguente perdita di periciti, riduzione della capacità angiogenetica e riduzione della funzione d'organo (178).

Le componenti C3 e C1q hanno anche un ruolo nella regolazione dello switch fenotipico dei macrofagi da M1 (proinfiammatorio) a M2 (antinfiammatorio) (179,180).

Coerentemente con questi risultati, Delpech et al. hanno dimostrato che il trattamento con C1-INH ha effetto protettivo anche 3 mesi dopo l'evento lesivo, riducendo lo sviluppo della fibrosi cronica del graft (181). Oltre al blocco di C1, anche l'inibizione di C5aR1 e C5aR2 potrebbe offrire risultati promettenti, in quanto sono espressi sia sui leucociti periferici che su quelli infiltranti (come cellule dendritiche e linfociti T), nonché sulle cellule parenchimali renali come le cellule epiteliali tubulari, stimolando il reclutamento dei leucociti, sostenendo il danno renale e lo sviluppo di fibrosi (182).

Diversi studi hanno documentato come nella patogenesi del danno renale da IRI e nello sviluppo di nefropatia cronica sia presente anche disfunzione del sistema di Klotho, un gene la cui inibizione risulta associata alla sindrome da invecchiamento precoce (183,184). L'espressione di Klotho risulta ridotta in corso di IRI, ma i fattori che modulano l'espressione di Klotho nel danno renale non sono ancora completamente compresi (Fig. 1.x). Sia l'infiammazione sistemica che quella locale possono diminuire l'espressione di Klotho tramite la mediazione di citochine infiammatorie come il TNF- α e l'IFN- γ (185). Poiché il sistema del complemento gioca un ruolo cruciale nella risposta infiammatoria durante l'IRI, Castellano et al. ne ha esaminato la relazione con l'espressione di Klotho in un modello suino di IRI tramite la somministrazione di C1-INH, che ha protetto le cellule tubulari renali dalla riduzione dell'espressione di Klotho(186). Tra le diversi componenti del complemento, numerose evidenze hanno indicato il C5a come l'anafilotossina più importante nella patogenesi del danno renale mediato dal complemento(187) e proprio il C5a è risultato essere significativamente in grado di ridurre l'espressione di Klotho nelle TEC, stimolandone l'acquisizione di un fenotipo SASP (186).

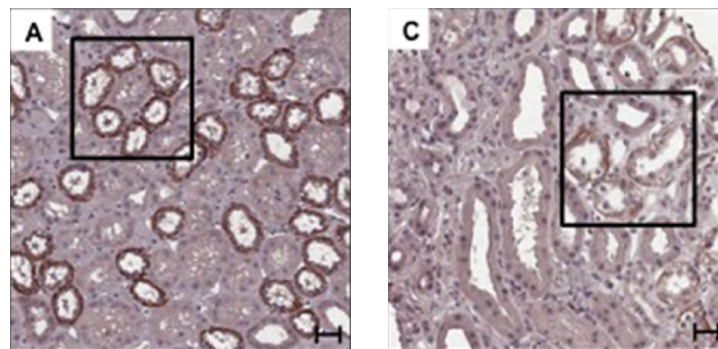


Fig. 1.9. Espressione di Klotho pre-trapianto e dopo DGF, che rivela una netta riduzione nel secondo caso

1.9 Effetti sulla sopravvivenza

L'insorgenza di DGF nei riceventi di trapianto renale costituisce un fattore di rischio negativo per la sopravvivenza a lungo termine del graft e, conseguentemente, del paziente stesso (24,28,188). Ciò è confermato in letteratura da diverse analisi multivariate, che hanno confermato come la DGF costituisca un predittore indipendente di perdita del trapianto, con rischio 2,9 volte maggiore rispetto ai soggetti che recuperano immediatamente la funzione renale post trapianto (10).

Già nei primi anni 2000 Halloran ed Hunsicker dimostrarono l'importanza della DGF come fattore di rischio a lungo termine del trapianto, documentando come l'emivita dei reni sottoposti a DGF fosse 7,2 anni, numero significativamente minore rispetto agli 11,5 anni dei reni con recupero immediato della funzione renale(189).

Inoltre, Yokoyama et al. ha valutato la sopravvivenza a 5 anni di 126 riceventi di trapianto renale raggruppato in base al recupero funzionale postoperatorio, documentando una sopravvivenza a 5 anni del 90% nel gruppo con funzione renale immediata, dell'84% nel gruppo con DGF con durata minore di 7 giorni e del 50% nel gruppo con DGF con durata maggiore di 7 giorni, dimostrando che non solo l'incidenza, ma anche la durata della DGF, costituiscono un fattore di rischio per la sopravvivenza del graft trapiantato (190). Risultati simili sono stati documentati da molteplici altri studi (191,192). In aggiunta, già nel 1997, un'analisi del Renal Data System degli Stati Uniti su più di 37.000 trapianti renali da cadavere aveva dimostrato che la DGF costituisce un predittore indipendente della perdita del trapianto renale a 5 anni dall'intervento, con rischio relativo di 1,53 (18).

Una delle questioni ancora controverse in letteratura è se la DGF abbia effetti negativi anche in assenza di rigetto, in particolare per il fatto che la biopsia non viene sempre eseguita durante la manifestazione di DGF ed il rigetto può essere sottodiagnosticato. Tuttavia, uno studio multicentrico su 57.000 trapianti da cadavere negli Stati Uniti ha dimostrato come la DGF abbia effetti negativi sulla sopravvivenza indipendentemente dalla presenza di rigetto, confermando inoltre che la compresenza di entrambi, rigetto e DGF, abbia effetti ancora peggiori (emivita del graft di 6,2 anni in caso di compresenza, rispetto ad emivita di 9,4 anni in caso di sola DGF) (17).

Anche Troppman et al. hanno documentato come la sopravvivenza a 10 anni del trapianto renale sia del 64% nel gruppo dei pazienti con recupero immediato della funzione renale o rigetto, del 44% nel gruppo con DGF, del 36% nel gruppo con rigetto, del 15% nel gruppo con entrambe le manifestazioni patologiche (193).

1.10 Standard cold storage e perfusione renale ipotermica

Fin dai primi giorni dall'avvento del trapianto di organi, l'ipotermia ha rappresentato un mezzo efficace per la preservazione d'organo in assenza di circolazione ossigenata. Nel 1968 Belzer per primo riusciva a preservare con successo reni umani utilizzando una macchina da perfusione extracorporea, anche se questa era grande, ingombrante e difficile da trasportare (194). Poco tempo dopo, veniva sviluppata una soluzione elettrolitica che permetteva di conservare per 24 ore un rene in un contenitore circondato da ghiaccio, secondo una procedura denominata Standard Cold Storage (SCS) (195). Successivamente, diverse altre soluzioni di conservazione sono state introdotte nella pratica clinica trapiantologica, tra cui in particolare la soluzione della University of Wisconsin (UW), l'istidina-triptofano-chetoglutarato (HTK) e il citrato iperosmolare di Marshall. L'utilizzo di una soluzione di conservazione a discapito di un'altra può avere effetti sull'incidenza di DGF, la quale può a sua volta influenzare gli esiti a lungo termine del trapianto renale. Con una metanalisi, O'Callaghan et al. hanno dimostrato come l'utilizzo di UW e HTK sono associate ad un'incidenza di DGF simile, ma minore rispetto a soluzioni di conservazione più vecchie come l'Euro-Collins (196).

Insieme all'evoluzione delle soluzioni di conservazione degli organi, si sono evolute anche le tecnologie di perfusione meccanica extracorporea (Hypothermic Machine Perfusion, HMP), di cui sono disponibili diversi dispositivi ampiamente simili tra loro, ma con lievi differenze nella temperatura di perfusione (da 4°C a 10°C), nel flusso (pulsatile o non pulsatile) e nella fornitura di ossigenazione (ossigenato o non ossigenato) (35,36).

Una volta espantato il rene dal donatore, questo viene incannulato e collegato ad un circuito progettato specificamente per il dispositivo; quindi, mentre viene trasportato al centro trapianto per la procedura chirurgica, il rene viene perfuso continuamente a temperature tipicamente comprese tra 6°C e 12°C all'interno del dispositivo. In caso di rottura della pompa, gli attuali macchinari da perfusione renale sono in grado di tornare allo standard cold storage, annullando il rischio di perdita del graft.

Lo SCS agisce rimuovendo il sangue ed i coaguli dal graft e rimpiazzando la circolazione con una soluzione statica ed acellulare di conservazione in un ambiente ipotermico; la perfusione agisce similmente, liberando però continuamente la microcircolazione da metaboliti tossici e ROS, aumentando la produzione di NO, con conseguente riduzione del vasospasmo e della resistenza vascolare intrarenale (197,198), nonché migliore funzionalità renale precoce (199). Rispetto allo SCS, la HMP ha il vantaggio di poter fornire in tempo reale parametri aggiuntivi come il flusso e la resistenza vascolare, fondamentali per valutare la

vitalità dell'organo prima del trapianto e nella valutazione dell'allocazione dei reni (35,36,200), insieme alla funzione renale del donatore ed alla valutazione dei parametri istologici secondo lo score di Karpinski.

Il meccanismo attraverso il quale l'ipotermia protegge il tessuto è l'inibizione del metabolismo delle cellule, che si riduce del 50% per ogni calo di 10°C, riducendo la richiesta di ossigeno ed il consumo di ATP, quindi prevenendo i danni da ischemia (201).

Invece, l'importanza dell'ossigenazione che la HMP può offrire è dovuta al fatto che la principale fonte di ATP in vivo è la fosforilazione ossidativa mitocondriale, che dipende dall'ossigeno come accettore finale degli elettroni. Durante l'ischemia dovuta al prelievo, il trasporto degli elettroni viene interrotto, con conseguente accumulo di NADH, succinato e metaboliti purinici, nonché diminuzione di ATP (202). La supplementazione di ossigeno durante HMP stimola i processi mitocondriali fisiologici con evidenza di attività di trasporto degli elettroni, come testimoniano livelli inferiori di NADH e succinato e maggiore risintesi di ATP, rispetto allo SCS (203).

Attualmente, è stato dimostrato che l'uso della perfusione a macchina ipotermica (HMP), rispetto alla tradizionale conservazione statica a freddo, riduce il rischio di DGF (28,36,204). Una recente metanalisi su 16 studi (2266 partecipanti) ha dimostrato che l'uso della HMP riduce il rischio di DGF rispetto allo SCS; lo stesso risultato è stato osservato anche per i sottogruppi DBD e DCD (35). Moers et al. ha documentato un beneficio significativo in termini di sopravvivenza del trapianto renale da donatore deceduto per la HMP rispetto allo SCS, sia ad 1 anno (94% contro 90%) che a 3 anni (91% contro 87%) (205,206). Allo stesso modo, Zhong et al. ha documentato un effetto simile per reni provenienti da donatore DCD, sia ad 1 anno (98% contro 93%) che a 3 anni (93% contro 82%) (207). Risultati simili sono confermati in letteratura (208,209)

Poiché l'incidenza complessiva di DGF è più alta nel sottogruppo DCD, l'utilizzo di HMP previene, in termini assoluti, più episodi di DGF nei trapianti DCD rispetto ai trapianti DBD. Per questo motivo il numero di HMP necessari per prevenire un episodio di DGF (Number Needed to Treat, NNT) è inferiore nei trapianti DCD rispetto ai DBD (risp. 7,26 contro 13,60), confermando il potenziale che la perfusione ex vivo potrebbe avere nell'aumentare la disponibilità di reni trapiantabili, anche se inizialmente in condizioni non ottimali (35).

Per quanto riguarda la funzione renale, diversi studi hanno riportato miglioramenti significativi della funzione del trapianto a breve termine nei casi sottoposti a HMP rispetto a quelli sottoposti a SCS (206,207,210).

Dal punto di vista del risparmio economico, Moers et al. ha documentato che la HMP sia più conveniente dello SCS a causa della minore incidenza di DGF e dei costi ad essa legati (211). Inoltre, la MP può offrire un'opportunità per migliorare la qualità dell'organo mediante terapie farmacologiche specifiche, ad esempio la somministrazione di antiossidanti ed immunomodulanti (200).

Più recentemente, Nicholson ha introdotto nel trapianto renale una tecnica di perfusione normotermica (Normothermic Machine Perfusion, NMP) utilizzando dispositivi di bypass cardiopolmonare modificati, similmente a ciò che costituisce già pratica clinica nel trapianto di fegato (212). La NMP utilizza una temperatura di perfusione di 35°C-37°C, più simile a quella corporea, che permette di mantenere il metabolismo fisiologico minimizzando l'accumulo di substrati tossici e specie reattive dell'ossigeno (213,214).

| | Preclinical studies | Clinical studies |
|--------------------------------------|--|---|
| Hypothermic machine perfusion (HMP) | Mechanism, metabolomics [1-3,4*] Ex-vivo graft treatment [5,6] Stem cell therapy, gene modification [7,8] Gradual rewarming [9*] Oxygenated machine perfusion [4*] | Benefit of HMP on different donor types [10-15] Optimization of pumping time, reconditioning, or continuous perfusion [16-18,19*] Assessment, biomarkers [11,20-22] Ex-vivo graft treatment [23] |
| Normothermic machine perfusion (NMP) | Development of prolonged normothermic perfusion [25*,26**,27,28*,29] Optimization, ex-vivo treatment [31-34,43] Assessment [28*] Comparison of normothermic and hypothermic machine perfusion [4*,35] | First clinical experiences [36-41] Assessment [38,39] |

Fig. 1.10. Riassunto degli studi preclinici e clinici su HMP e NMP presenti in letteratura

La NMP presenta due potenziali vantaggi: in primo luogo, se i requisiti metabolici del graft vengono soddisfatti, si potrebbe ottenere una conservazione più lunga con una migliore funzionalità post-trapianto rispetto ad un organo sottoposto ad ischemia fredda prolungata; in secondo luogo, si potrebbe avere un ripristino pressoché totale della funzione d'organo (215). Hosgood et al. ha confrontato l'efficacia della conservazione di reni di maiale con NMP e HMP, documentando infatti livelli di creatinina minori, eGFR maggiore e resistenze vascolari intraparenchimali minori rispetto ai reni trattati con HMP; questi risultati dimostrano come la NMP permetta un mantenimento migliore della normale funzione d'organo (216). Ferdinand et al. ha confrontato l'espressione genica di reni sottoposti a SCS e NMP per 0h e 2h, documentando come 956 geni siano risultati sovraespressi e 353 inibiti dopo 2h in NMP renale (217). Nel gruppo trattato con ipotermia è stata osservata la riduzione di diversi geni coinvolti nella fosforilazione ossidativa, a conferma dell'effetto inibitorio dell'ipotermia sul metabolismo cellulare. Al contrario, nel gruppo sottoposto a NMP è stata osservato l'aumento dell'espressione degli stessi geni, suggerendo una migliore attività metabolica energetica delle cellule renali. Tuttavia, se da una parte la NMP migliora il

metabolismo cellulare, dall'altra non riduce l'espressione di vie di segnalazione infiammatorie, come quelle mediate da TNF- α , IL-1 β e NF- κ B. Oltre a queste, altre citochine e chemochine proinfiammatorie sono risultate maggiormente espresse in corso di NMP, tra cui anche IL-8 e CXCL-2. L'RNA-Seq su biopsie da reni DCD che avevano subito NMP, come parte di un trial clinico randomizzato attualmente in corso per valutarne l'efficacia, ha rivelato cambiamenti trascrizionali più marcati nei trapianti con episodio di DGF, nonché una significativa correlazione tra l'espressione dei proinfiammatori e la durata di DGF. Al contrario, la durata di DGF era correlata negativamente all'espressione dei geni implicati nel metabolismo ossidativo. Questi dati indicano che i reni sottoposti a NMP sono meno suscettibili a sviluppare DGF rispetto a quelli posti in ipotermia, a causa dei minori effetti ischemici, ma che allo stesso tempo sviluppano una risposta infiammatoria maggiore che sostiene i danni, soprattutto durante la fase di riperfusione.

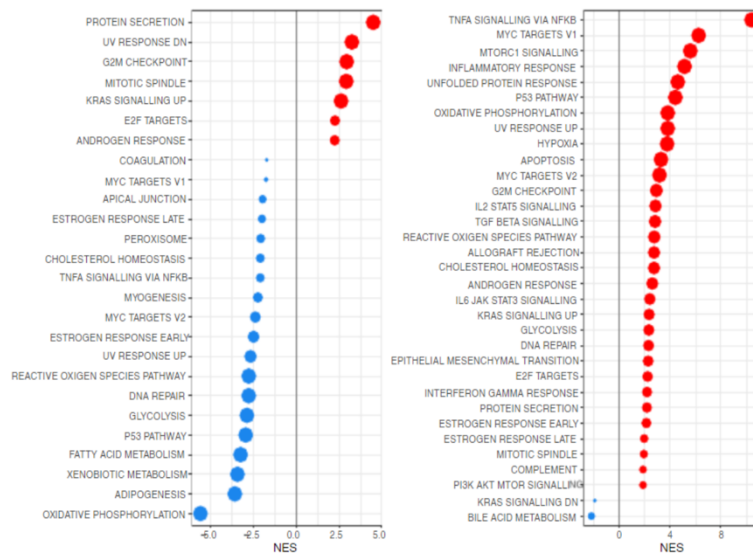


Fig. 11. Regolazione negativa (blu) o positiva (rosso) di diverse vie cellulari durante HMP e NMP

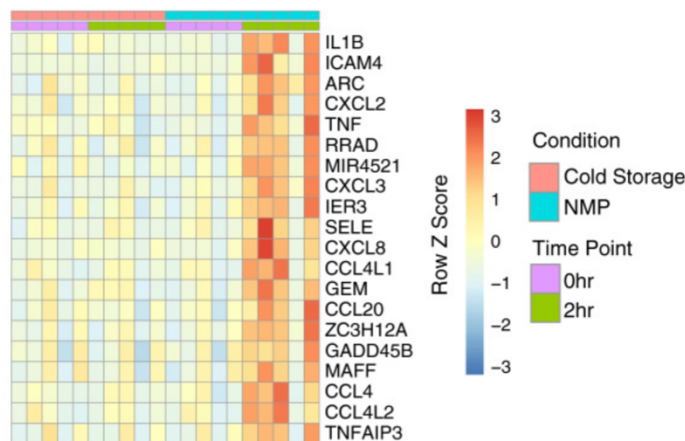


Fig. 1.12. Espressione genica di reni sottoposti a HMP e NMP per 0h e 2h

1.11 Sviluppo di nuove terapie in associazione alla perfusione

1.11.1 Sorbenti

L'utilizzo di sorbenti in associazione a perfusione rappresenta una strategia innovativa e promettente in condizioni patologiche caratterizzate dalla necessità di purificare il sangue durante la circolazione extracorporea, ad esempio la cardiocirurgia(218), la sepsi(219,220) e l'intossicazione da alcuni farmaci(221).

Le cartucce di sorbenti, ad esempio CytoSorb[®], contengono sfere di copolimero biocompatibile polistirene-divinilbenzene capaci di adsorbire molecole di peso molecolare di 10-50kDa attraverso una combinazione di esclusione dimensionale ed interazioni idrofobiche [2 Poli]. Possono essere utilizzate in emoperfusione o inserite all'interno di un circuito di terapia sostitutiva renale continua (CRRT) in associazione ad un emofiltro convenzionale, di un bypass cardiopolmonare (CPB) o di un circuito di ossigenazione extracorporea a membrana. I sorbenti sono in grado di rimuovere una vasta gamma di molecole dal sangue, tra cui citochine proinfiammatorie (ad esempio IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF e G-CSF), PAMPs e DAMPs, tra cui le componenti C5a e C3 del complemento, chemochine (ad esempio MCP-1 e CXCL-1, nonché un gran numero di altre molecole esogene ed endogene (221).

In un modello murino di sepsi, Kellum et al. ha dimostrato come l'emoadsorbimento con sorbenti abbia aumentato significativamente la sopravvivenza a breve termine attraverso la riduzione dell'espressione della via di NF- κ B e dei geni ad essa legati, tra cui TNF- α , IL-6 ed IL-10. La riduzione dell'espressione di questi geni indica un effetto modulante dell'emoadsorbimento sull'infiammazione sistemica, dimostrando il potenziale di questa terapia nel migliorare gli esiti clinici nei pazienti con stati infiammatori severi(222). Risultati simili sono riportati da trial clinici randomizzati e da metanalisi, che hanno confermato l'efficacia dell'emoadsorbimento nel ridurre i livelli di citochine infiammatorie e migliorare la prognosi nei pazienti settici. In particolare, la riduzione dei livelli di TNF- α , IL-6 ed IL-10 è stata associata a un miglioramento della funzione d'organo e una diminuzione della mortalità (219,220)

Hosgood et al. ha documentato come durante la HMP renale, i livelli di citochine e chemochine proinfiammatorie, tra cui IL-6 e TNF- α , aumentino sensibilmente, sostenendo l'infiammazione del tessuto. L'infiammazione indotta da queste citochine può compromettere la funzionalità del rene trapiantato e aumentare il rischio di sviluppare complicanze come la DGF. L'utilizzo di HMP in associazione a sorbenti ha dimostrato efficacia nel ridurre

significativamente le concentrazioni di queste citochine e chemochine proinfiammatorie nel perfusato, suggerendo un potenziale beneficio nel migliorare la qualità dell'organo e nel ridurre l'incidenza di complicanze post-trapianto (217).

In un ulteriore studio, Kellum et al. ha documentato gli stessi effetti su 8 donatori DBD trattati con emoadsorbimento con sorbenti. In questo contesto, i livelli di TNF- α , IL-6 ed IL-10 sono risultati essere inferiori dopo il trattamento, riducendo lo stato infiammatorio generale dei donatori. Questo è particolarmente rilevante poiché un basso stato infiammatorio nei donatori può migliorare la qualità degli organi per il trapianto, aumentando le possibilità di successo del trapianto stesso e migliorando gli esiti a lungo termine per i riceventi(223).

Infine, in un modello suino di trapianto di polmone, Ersham et al. ha documentato come la perfusione ipotermica del graft in associazione a sorbenti ha ridotto l'espressione citochinica e migliorato la funzionalità del graft nell'immediato periodo postoperatorio (224).

Vista la capacità dei sorbenti di ridurre la concentrazione plasmatica di molecole proinfiammatorie e visti gli studi di efficacia riportati in letteratura per patologie caratterizzate da alta risposta infiammatoria, nonché i risultati su modello murino, suino e umano, è lecito affermare che l'utilizzo di sorbenti in associazione alla HMP potrebbe dimostrarsi efficace anche nel trapianto renale e nella prevenzione di DGF, la cui fisiopatologia è legata, almeno in parte, all'aumento delle citochine proinfiammatorie che sono risultate ridotte negli studi suddetti. Ulteriori studi sull'efficacia clinica di HMP in associazione a sorbenti andrebbero eseguiti per permettere a questa promettente tecnologia di acquisire un ruolo maggiormente consolidato nella pratica trapiantologica.

1.11.2 Terapia biologica

Trapianto di mitocondri

La disfunzione mitocondriale è una caratteristica fondamentale della patogenesi del danno renale da IRI (cfr. 1.6). Una possibile strategia terapeutica per ridurre il danno renale in corso di DGF e migliorare la sopravvivenza del paziente e del graft potrebbe essere rappresentata dal trapianto di mitocondri, che sosterebbe il metabolismo energetico cellulare del tessuto renale riducendone la disfunzione e la riparazione maladattativa (225).

Mitocondri funzionali possono essere isolati da qualsiasi tessuto non ischemico, anche se il tessuto che ne permette un recupero maggiore è il tessuto muscolare striato (225). Inoltre, in letteratura non sono riportate differenze significative tra gli effetti di mitocondri isolati da tessuti differenti (226,227). I mitocondri isolati possono essere forniti al ricevente tramite infusione vascolare o iniezione locale nel sito di interesse: nel primo caso si diffondono in tutto l'organismo e vengono assorbiti da qualsiasi tessuto, ma in particolare nei tessuti ad alta richiesta energetica; nel secondo caso vengono assorbiti principalmente nel tessuto bersaglio (225).

Rossi et al. ha dimostrato in un modello in vitro e murino in vivo di trapianto renale da donatore DCD come il trapianto di mitocondri riduce la disfunzione mitocondriale ed il danno renale legato all'IRI(228). In particolare, è stato osservato come il trapianto di mitocondri abbia aumentato la produzione di ATP e migliorato la capacità proliferativa delle TEC dopo IRI. Inoltre, l'analisi con qRT-PCR ha documentato la diminuzione di due marcatori di apoptosi, caspasi-3 e SOD-1. Lo stesso studio ha dimostrato anche che trapianto di mitocondri ha dimostrato riduce lo stress ossidativo, come documentato dalla riduzione dei ROS mitocondriali e della produzione di TBARS, nonché dal ripristino del MMP. Inoltre, l'analisi dell'attività della catena di trasporto degli elettroni (ETC) e di alcuni enzimi del ciclo di Krebs ha documentato effetti protettivi del trapianto di mitocondri sull'attività di ETC e sull'attività degli enzimi del ciclo di Krebs, riducendo la disfunzione mitocondriale.

Cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali (SC) sono cellule non specializzate con capacità di autorinnovamento ed in grado di differenziarsi in qualsiasi citotipo dell'organismo. Tra le cellule progenitrici, il tipo più studiato negli ultimi decenni è rappresentato dalle cellule staminali mesenchimali (MSC), cellule stromali adulte multipotenti con alto potenziale proliferativo derivate da precursori non ematopoietici (229). Inizialmente isolate nel midollo osseo (BM-MSC), sono state successivamente identificate in diversi tessuti fetali ed adulti, tra cui il tessuto adiposo

(AD-MS), il sangue del cordone ombelicale (UC-MS), la membrana fetale (FM-MS) e la placenta umana (hP-MS) (230). La loro presenza diffusa rende le MS la tipologia di SC piú accessibile e, di conseguenza, la migliore candidata per la ricerca della medicina rigenerativa: infatti, le MS sono state ampiamente investigate per le loro proprietà riparative, rigenerative ed immunomodulatorie, rivelandosi efficaci nel ridurre il danno renale e nel favorire la riparazione del tessuto su diversi modelli animali (231–233).

Gli effetti delle MS sono mediati principalmente da segnalazioni paracrine ed eventualmente endocrine sulle cellule bersaglio (234,235), tramite la secrezione di fattori di crescita e soprattutto di vescicole extracellulari (EV), le quali vengono generate come esosomi dal compartimento endosomiale o per gemmazione diretta della membrana plasmatica (236). La comunicazione intercellulare avviene attraverso il trasferimento delle molecole bioattive trasportate nelle EV, specialmente mRNA e microRNA (miRNA) che inducono cambiamenti nel fenotipo e nella funzione delle cellule bersaglio (237,238). Il fatto che la segnalazione sia mediata da mRNA e miRNA è confermato dal fatto che il trattamento delle EV con RNasi ne annulla gli effetti.

In modelli di danno renale da ischemia-riperfusion, la somministrazione di EV derivate da MS ha diminuito il danno tubulare e favorito il recupero della funzione renale (239,240).

In un modello murino di trapianto renale da DCD, Gatti et al. hanno documentato come le EV derivate da BM-MS infuse si siano accumulate nei glomeruli e nei tubuli lesionati, stimolando la proliferazione delle cellule epiteliali tubulari e riducendo l'apoptosi delle cellule renali sopravvissute (240). Le EV derivate da fibroblasti non hanno indotti gli stessi effetti, dimostrando come questi siano specifici per le EV derivate da MS.

Un altro studio su modello in vitro di deplezione di ATP ha evidenziato il ruolo di specifici miRNA trasportati da EV derivate da MS (miR-148b-3p, miR-410, miR-495, miR-548c-5p, miR-886-3p) nel proteggere le TEC dall'IRI, tramite la regolazione inibitoria di miRNA coinvolti nell'apoptosi, nell'ipossia e nella riorganizzazione del citoscheletro (241).

Altri studi hanno evidenziato come le EV di BM-MS possano indurre dedifferenziazione e crescita delle TEC tramite l'aumento dell'espressione di HGF (242), nonché prevenire l'apoptosi tramite il trasferimento di miR-21 e miR-223 (243,244).

Molti effetti delle EV derivate da MS sono legati al metabolismo aerobico: ad esempio, possono trasportare complessi respiratori che supportano il metabolismo aerobico quando la capacità respiratoria mitocondriale è compromessa (245); possono attenuare il danno mitocondriale nelle TEC stabilizzando il DNA mitocondriale danneggiato dai ROS (246);

possono indurre cambiamenti epigenetici come l'inversione della sovraregolazione degli istoni H2 e H2B, tipiche delle cellule apoptotiche (247).

Zhang et al. hanno documentato che le EV derivate da MSC possono stimolare Nrf-2 e la via di ARE (cfr. 1.8), aumentando la capacità di risposta allo stress ossidativo e limitando la senescenza cellulare (248,249).

Un altro aspetto che contribuisce agli effetti riparativi mediati delle EV di MSC è la stimolazione dell'angiogenesi, con aumento della proliferazione tubulare e riduzione della rarefazione capillare, della glomerulosclerosi e della fibrosi tubulointerstiziale. Questo aspetto è stato confermato da Zou et al. tramite l'osservazione dell'aumento dell'espressione di VEGF e la riduzione dell'espressione di HIF-1 α indotti da EV di MSC in un modello murino di danno renale da IRI (250).

Diversi studi hanno documentato l'aumento dell'espressione di VEGF, di Nrf-2 e dei geni associati alla via Nrf-2/ARE (251,252); allo stesso tempo, ha dimostrato la riduzione dell'espressione di IL-6, FGFR-1, TGF- β 1, della transizione epitelio-mesenchimale e della polarizzazione dei macrofagi infiltranti il tessuto verso il fenotipo profibrotico M2 (253,254).

In letteratura sono presenti studi che suggeriscono come le EV di MSC possano ridurre l'attività del complemento attraverso il trasporto di mRNA codificanti per inibitori specifici del complemento, come il fattore H, CD55 e CD59 (255).

D'altra parte, la somministrazione di SC ha il potenziale di indurre tumorigenesi e maldifferenziamento a causa di diverse ragioni legate alle caratteristiche intrinseche delle cellule staminali e ai contesti biologici in cui vengono utilizzate (256). Infatti, le SC hanno capacità proliferative e di differenziazione pressoché illimitate che, se inappropriate o non regolate correttamente, possono determinare sviluppo di tumori o maldifferenziamento cellulare (257). Inoltre, durante il processo di generazione ed espansione delle SC, possono verificarsi mutazioni genetiche su oncogeni ed oncosoppressori, nonché modificazioni epigenetiche implicate nella tumorigenesi (258).

In conclusione, la somministrazione di cellule staminali mesenchimali ha mostrato risultati incoraggianti nella riduzione del danno renale da ischemia-riperfusion e nello sviluppo di fibrosi e potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico nella DGF in associazione alla perfusione renale, ma i rischi di tumorigenesi e maldifferenziamento devono essere attentamente considerati e controllati.

Vescicole extracellulari derivate da cellule progenitrici endoteliali

Le EPCs rappresentano una popolazione eterogenea di cellule mononucleate CD34+ che originano nel midollo osseo e che, dopo stimoli come il danno tissutale, si mobilitano e si dirigono verso il sito danneggiato attraverso la circolazione sanguigna (259). Queste cellule progenitrici mostrano alcune caratteristiche tipiche delle cellule staminali, come l'espansione clonale e la capacità angiogenica (260). Le EPCs sono implicate in diversi processi, tra cui l'omeostasi vascolare, la neovascolarizzazione, la riparazione vascolare, la rigenerazione endoteliale e l'angiogenesi (261). Le EPCs esprimono antigeni endoteliali come CD31, vWF, eNOS, VE-caderina, VEGFR-2, ICAM-1, integrina $\alpha 4$, CD44 e CD29, tipiche delle EPC (262). Alcune di queste molecole, in particolare l'integrina $\alpha 4$ e il CD29 (integrina $\beta 1$), rappresentano i recettori implicati nel riconoscimento delle EVs e della loro internalizzazione da parte delle cellule bersaglio, poiché il blocco con anticorpi specifici ne impedisce l'internalizzazione. Come descritto per le EVs derivate da MSCs, anche le EVs derivate da EPCs inducono effetti sulle cellule bersaglio tramite il trasferimento di RNA (mRNA e miRNA), poiché il trattamento con RNasi ne annulla gli effetti protettivi (263).

Le EPCs possono poi differenziare in cellule endoteliali mature (264), favorendo la neoangiogenesi e promuovendo la riparazione dei tessuti (265). Le EPCs rilasciano fattori paracrini di diverso tipo, come fattori di crescita, citochine e chemochine che influenzano la biologia cellulare negli organi danneggiati tramite la regolazione di angiogenesi, proliferazione, migrazione e sopravvivenza, apoptosi e modulazione immunitaria (265,266). Tra questi fattori, sono presenti TNF- α , TNFR-2 e TNFR-1, TRAIL, PDGF, Wnt, VEGF, TGF- β , FGF-2, IGF-1 ed EGF, nonché grandi quantità RNA (mRNA e miRNA) con attività regolatoria: Tutti questi fattori vengono tipicamente rilasciati all'interno di EVs (267), come già descritto per le MSCs.

In modelli murino sperimentali di glomerulonefrite da anticorpi contro Thy-1.1, caratterizzata da proliferazione mesangiale e perdita endoteliale, la somministrazione di EVs derivate da EPCs ha dimostrato avere un ruolo riparativo sui glomeruli danneggiati (268,269). Le cellule endoteliali e mesangiali riceventi mRNA dalle EV sono risultati essere codificanti per gli inibitori del complemento Fattore H, CD55 e CD59, con effetti di riduzione dell'apoptosi delle cellule mesangiali e della deposizione di C5b-9/C3 (270). Sebbene il modello di glomerulonefrite sperimentale non sia sovrapponibile a quello della DGF, risultati sovrapponibili in termini di protezione delle EVs derivate da EPCs sono stati osservati in corso di IRI renale (271).

Cantaluppi et al. ha riportato gli effetti positivi di miR-126 e del miR-296 rilasciati dalle EVs di EPCs umane in un modello murino di IRI. Infatti, è stato osservato come le EVs si localizzino nei capillari peritubulari e nelle cellule tubulari, stimolino la proliferazione cellulare e riducano l'apoptosi e l'infiltrazione leucocitaria. Le EVs di EPCs hanno anche effetti protettivi contro la progressione verso il danno renale cronico, in quanto associate a minore rarefazione capillare, glomerulosclerosi e fibrosi tubulo-interstiziale. Questi effetti positivi non sono stati osservati dopo il trattamento delle EPCs con RNasi, dopo deplezione aspecifica di miRNA e dopo trasfezione delle EPCs con antagomir specifici per miR-126 e miR-296 (272).

In ambito trapiantologico, gli effetti protettivi delle EVs derivate da EPCs sono stati esplorati nel trapianto di isole pancreatiche. Cantaluppi et al. ha documentato l'aumento della proliferazione, della resistenza all'apoptosi e della crescita endoteliale nelle isole pancreatiche trattate con EVs derivate da MSCs. Questi effetti sono stati mediati tramite la via di PI3K/Akt, l'aumento di eNOS e le molecole antiapoptotiche e proangiogenetiche CD31 e TSP-1. Anche in questo modello il trattamento con Rnasi annulla gli effetti protettivi delle EVs derivate da EPC, confermando il ruolo modulatore degli RNA trasportati nelle EVs (273).

In conclusione, visti gli effetti protettivi della somministrazione di EVs derivate da EPC in modelli in vitro ed in vivo, nonché modelli trapiantologici, questa strategia potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico nella DGF in associazione alla perfusione renale, soprattutto considerando l'annullamento degli effetti avversi legati alla terapia con SC intere, ovvero l'aumento del rischio di tumorigenesi e di maldifferenziamento.

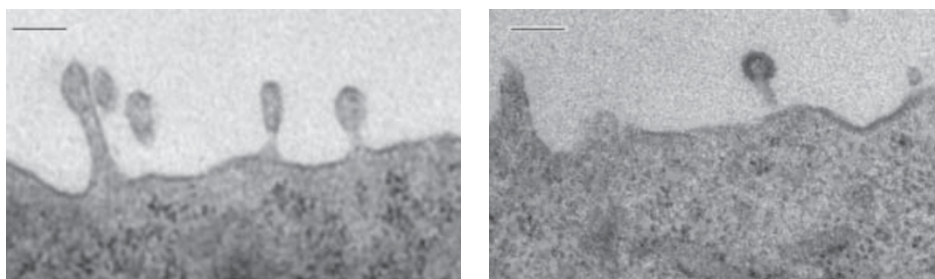


Fig. 1.13. Produzione di EVs per shedding della membrana plasmatica di EPCs

2. Obiettivi dello studio

Lo scopo generale di questo lavoro è di analizzare la rilevanza clinica complessiva della DGF dei pazienti sottoposti a trapianto renale presso la S.C.D.U Nefrologia e Trapianto di Rene dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità di Novara, con l'obiettivo di definire i seguenti aspetti:

- I. Analisi delle caratteristiche generali della popolazione dei pazienti portatori di trapianto di rene.
- II. Analisi delle caratteristiche generali dei donatori.
- III. Analisi delle caratteristiche generali della popolazione di pazienti che ha sviluppato DGF in relazione alla popolazione di pazienti che non ha sviluppato DGF.
- IV. Analisi comparativa ed associativa delle variabili che costituiscono fattori di rischio per DGF.
- V. Analisi comparativa della sopravvivenza del rene (death-censored graft survival) e del paziente.
- VI. Analisi dei parametri clinico-laboratoristici e valutazione comparativa della funzione renale a 6 mesi, 1 anno, 3 anni, 5 anni e 10 anni per la popolazione di pazienti che ha sviluppato DGF in relazione a quella dei pazienti che non ha sviluppato DGF.

Insieme allo studio della rilevanza clinica della DGF, il lavoro in questione si prefigge l'obiettivo di presentare e valutare i più recenti approcci terapeutici e sperimentali nella prevenzione e nel trattamento della DGF e delle sue complicanze per migliorare gli esiti del trapianto renale, in particolare:

- I. Utilizzo della perfusione renale ipotermica in associazione a sorbenti.
- II. Infusione di vescicole extracellulari derivate da progenitori endoteliali umani.

3. Pazienti, materiali e metodi

3.1 Pazienti e variabili

Nello studio sono stati inclusi tutti i pazienti sottoposti a trapianto di rene presso il Centro Trapianti dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità di Novara, dal 4 Novembre 1998 al 31 dicembre 2023, su un arco temporale di 25 anni.

Dell’intera popolazione di 1560 pazienti sono stati valutati i seguenti aspetti (Tab. 3.1):

- Variabili relative al ricevente, quali età (anni), sesso, BMI, metodica dialitica ed anzianità dialitica (mesi), trapianto preemptive, numero del trapianto, diabete mellito.
- Variabili relative al donatore, quali età (anni), sesso, BMI, diabete mellito, ipertensione arteriosa, concentrazione sierica della creatinina (mg/dl), GFR stimato con la formula di Cockcroft-Gault ($\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$), classificazione come SCD o ECD e come DBD o DCD.
- Variabili legate alla caratterizzazione pretrapiantologica, quali mismatch HLA e DR, score istologico secondo Karpinski-Remuzzi, valore percentuale del PRA virtuale.
- Variabili legate al prelievo ed alla valutazione post-trapiantologica, quali riperfusione, terapia di induzione eseguita, CIT (ore), DGF, tempo necessario alla ripresa funzionale, creatininemia (mg/dl), GFR ($\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$) e proteinuria alle dimissioni (g/die), giorni di degenza, presenza di anticorpi specifici antidonatore (DSA).
- Variabili relative al follow-up (creatininemia, GFR e proteinuria a 6 mesi, 1 anno, 3 anni, 5 anni e 10 anni) ed a complicanze post-trapiantologiche a breve e lungo termine, quali rigetto e tipologia di rigetto, fallimento del trapianto e rientro in dialisi, decesso.

| <i>Ricevente</i> | <i>Donatore</i> | <i>Pre-trapianto</i> | <i>Post-trapianto</i> | <i>Follow-up</i> |
|---------------------|-----------------|----------------------|-----------------------|------------------|
| Età | Età | Mismatch HLA | Riperfusione | Creatininemia |
| Sesso | Sesso | Mismatch DR | Induzione | GFR |
| BMI | BMI | %vPRA | CIT | Proteinuria |
| Metodica dialitica | Ipertensione | Score istologico | DGF | DSA |
| Anzianità dialitica | Diabete Mellito | DSA | Ripresa funzione | Rigetto |
| Preemptive | Creatininemia | | Creatininemia | Fallimento |
| Numero trapianto | GFR | | GFR | Decesso |
| Diabete Mellito | ECD o SCD | | Proteinuria | |
| | DCD o DBD | | Degenza | |

Tab. 3.1. Riassunto delle variabili considerate nella popolazione

La metodica dialitica è rappresentata da emodialisi, dialisi peritoneale o entrambe le modalità; l'anzianità dialitica è espressa in mesi.

Per la definizione di ECD sono stati adottati i criteri di Crystal City del 2001, ovvero “donatore di età maggiore di 60 anni oppure con età compresa tra 50 e 59 anni con almeno due delle seguenti caratteristiche: anamnesi positiva per ipertensione arteriosa, causa di morte cerebrovascolare, valori di creatinina sierica maggiori di 1,5 mg/dl.

La terapia di induzione è rappresentata da anti-IL2R (basiliximab), ATG (Thymoglobuline), entrambi i farmaci.

Per DGF è stata utilizzata la definizione più diffusa ed accettata in letteratura di necessità di almeno una seduta emodialitica nei primi 7 giorni postoperatori.

3.2 Definizione delle sottopopolazioni

Del totale dei 1560 pazienti sottoposti a trapianto renale, per l'analisi della sopravvivenza del paziente e del graft sono state identificate le popolazioni di riceventi trapianto da donatore vivente (con 155 pazienti) e da donatore deceduto (con 1.255 pazienti). Dal totale sono stati esclusi 150 pazienti, riceventi trapianto dopo il 31/12/2021, limite temporale stabilito per l'analisi della sopravvivenza. La popolazione dei riceventi da donatore deceduto è stata ulteriormente suddivisa in riceventi da donatore DCD (con 12 pazienti) e da donatore DBD (con 1.243 pazienti). Infine, la popolazione dei riceventi da donatore DBD è stata ulteriormente suddivisa in riceventi da donatore ECD (con 768 pazienti) e da donatore SCD (con 528 pazienti) (Fig. 3.1).

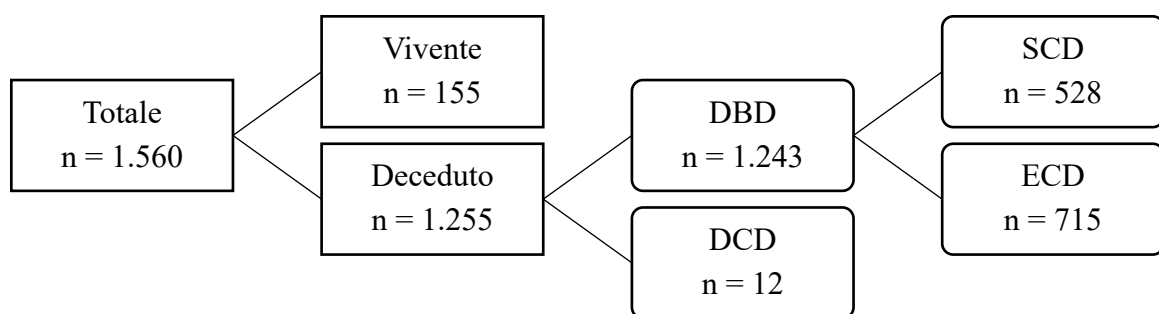


Fig. 3.1. Flowchart di selezione delle sottopopolazioni

3.3 Analisi istologica

La biopsia renale pretrapiantologica sul donatore è stata eseguita dai chirurghi prelevatori al momento stesso del prelievo secondo i seguenti criteri:

1. Fino al 31 dicembre 2012, in caso di organi provenienti da donatori con età maggiore di 60 anni, oppure da donatori con età minore di 60 anni ma con caratteristiche cliniche tali da far supporre la possibile presenza di danno renale, ad esempio ipertensione arteriosa, diabete mellito, riduzione della funzionalità renale, proteinuria, dimensioni generali dei o della corticale ridotte all'esame ecografico.
2. Dopo il 1 gennaio 2013, in caso di:
 - a. eGFR stimato secondo Cockcroft-Gault < 60 ml/min.
 - b. Età > 70 .
 - c. Età compresa tra 60 e 70, se la causa di morte non sia sopravvenuta per trauma o se è presente almeno una delle seguenti condizioni:
 - i. Spessore ecografico della corticale renale $< 1,2$ cm
 - ii. Diametro longitudinale ecografico dei reni < 10 cm.
 - iii. Divergenza di almeno 2 cm tra il diametro longitudinale dei due reni all'esame ecografico.
 - iv. Ipertensione arteriosa non trattata.
 - v. Diabete mellito.
 - vi. Tabagismo con consumo di sigarette > 20 /die.
 - vii. Proteinuria > 30 mg/dl (++ allo stick urinario).
 - d. Età < 60 con almeno una delle condizioni di cui sopra.

I campioni istologici sono stati inviati presso l'Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino, dove sono stati allestiti i vetrini con colorazioni ematossilina-eosina, PAS e tricromica di Masson. L'esame istologico è stato eseguito sempre da patologi afferenti a quest'unica struttura, al fine di ridurre la variabilità diagnostica interindividuale.

Lo score istologico assegnato ad ogni rene è quello di Karpinski-Remuzzi (Fig. 3.2).

- Glomerular global sclerosis
 Based on three sections (the first, middle, and last sections, if available); the number of globally sclerosed glomeruli expressed as a percentage.
- 0 none globally sclerosed
 - 1+ <20% global glomerulosclerosis
 - 2+ 20 to 50% global glomerulosclerosis
 - 3+ >50% global glomerulosclerosis
- Tubular atrophy
- 0 absent
 - 1+ <20% of tubuli affected
 - 2+ 20 to 50% of tubuli affected
 - 3+ >50% of tubuli affected
- Interstitial fibrosis
- 0 absent
 - 1+ <20% of renal tissue replaced by fibrous connective tissue
 - 2+ 20 to 50% of renal tissue replaced by fibrous connective tissue
 - 3+ >50% of renal tissue replaced by fibrous connective tissue
- Arterial and arteriolar narrowing
- For the vascular lesions, if the changes are focal, the most severe lesion present gives the final grade.
- 0 absent
 - 1+ increased wall thickness but to a degree that is less than the diameter of the lumen
 - 2+ wall thickness that is equal or slightly greater to the diameter of the lumen
 - 3+ wall thickness that far exceeds the diameter of the lumen with extreme luminal narrowing or occlusion

Fig. 3.2. Score istologico secondo Karpinski-Remuzzi

3.4 Fonte di reperimento dei dati

Per il gruppo dei pazienti seguiti con visita periodica a Novara, in vita e con trapianto funzionante, la principale fonte di dati è rappresentata dalle cartelle dell'ambulatorio post-trapiantologico renale della S.C.D.U. di Nefrologia e Centro Trapianti dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Maggiore della Carità di Novara. In tali cartelle sono allegate le lettere di dimissioni dei ricoveri successivi al trapianto, le comunicazioni con il paziente e con il centro di riferimento, i valori degli esami ematochimici più importanti, i referti degli esami strumentali eseguiti nel follow-up, gli aggiornamenti terapeutici e le visite periodiche. Inoltre, sono incluse le cartelle di immissione in lista e i risultati degli esami specialistici eseguiti al momento dell'immissione in lista e nei successivi controlli.

Per il gruppo dei pazienti deceduti o rientrati in dialisi, la principale fonte di dati è rappresentata dalle cartelle dell'ambulatorio post-trapiantologico conservate presso l'archivio del Centro Trapianti di Novara e le cartelle di ricovero archiviate.

In caso di dati mancanti, le informazioni sono state reperite tramite i Centri di Dialisi presso i quali il paziente è attualmente in carico o tramite il database del Centro Nazionale Trapianti. Per l'analisi della sopravvivenza del graft e del paziente sono stati considerati tutti i pazienti sottoposti a trapianto renale dal 4 novembre 1998 al 31 dicembre 2021, per un totale di 1406 pazienti su un arco temporale di 23 anni.

3.5 Architettura del database ed analisi statistica

Per la registrazione dei dati è stato costruito un database con il programma Microsoft Excel 2022, in collaborazione con il servizio di Statistica Medica dell'Università del Piemonte Orientale. In tale database, ad ogni paziente corrisponde un record di dati anagrafici, a cui si associano in rapporto uno a molti i record dei trapianti eseguiti a Novara. Ad ogni record di un singolo trapianto eseguito a Novara, sono collegati in rapporto uno a molti i dati relativi alle varie complicanze post-trapiantologiche e del follow-up clinico.

Dopo essere stati convertiti dal database Excel, i dati sono stati analizzati con il programma STATA v18: le variabili continue sono riportate come media e deviazione standard, o mediana e scarto interquartile se non distribuite normalmente, mentre le variabili categoriche sono riportate come frequenze assolute e percentuali.

Il livello di associazione tra variabili è stato valutato con il test χ^2 .

La differenza di variabili continue tra gruppi è stata valutata tramite il test di Wilcoxon-Mann-Whitney o il test T di Student.

L'associazione tra variabili categoriche è stata valutata tramite il modello di regressione logistico; sono stati calcolati l'odds ratio (OR) ed il relativo intervallo di confidenza al 95% (95% IC) per quantificare la forza delle associazioni.

La sopravvivenza cumulativa è stata calcolata con il metodo di Kaplan-Meier, mentre per il relativo intervallo di confidenza al 95% è stata utilizzata la formula di Greenwood.

Per studiare la relazione tra la sopravvivenza dei pazienti e del graft in associazione alla DGF è stata utilizzata l'analisi di regressione univariabile di Cox, o modello dei rischi proporzionali, assumendo che l'Hazard Ratio (HR) sia costante nel tempo e considerando il tempo fino al verificarsi dell'evento di interesse. Per la sopravvivenza del paziente l'evento di interesse considerato è la morte; per la sopravvivenza del graft è il rientro in dialisi, con la morte come dato censurato (death-censored graft survival).

3.6 Perfusione renale ipotermica ex vivo con sorbente

Tre coppie di reni di maiale sono state prelevate, preparate chirurgicamente e sottoposte a SCS per un tempo medio di 3h, dopo il quale uno dei due reni di ogni coppia è stato sottoposto a perfusione renale ipotermica con macchinario PerLife® (Aferetica, Mirandola, IT).

La suddivisione dei reni da sottoporre a perfusione è avvenuta come segue:

1. Il rene della prima coppia è stato sottoposto a HMP standard per 4h.
2. Il rene della seconda coppia è stato sottoposto a HMP standard per 2h.
3. Il rene della terza coppia è stato sottoposto a HMP con aggiunta di sorbente (PerSorb®) per 2h.

I tre reni rimanenti sono stati lasciati in SCS per lo stesso tempo del rene gemello (4h, 2h e 2h, rispettivamente). Al termine del tempo stabilito per la perfusione e per lo SCS, per i tre reni sottoposti a perfusione è stato prelevato un campione di perfusato, sul quale sono stati analizzati i livelli di creatininemia e di lattati tramite spettroscopia di massa (LC-MS²).

Su tutte le coppie è stato eseguito un prelievo bioptico per analisi al microscopio ottico con colorazione ematossilina-eosina e valutazione delle componenti glomerulare, tubulare, interstiziale e vascolare.

Da tutte le coppie sono poi stati raccolti campioni di tessuto destinati all'analisi di:

1. Espressione dei livelli di mRNA di NGAL, marcatore di danno tubulare, tramite qRT-PCR.
2. Attività della catena di trasporto degli elettroni (ETC) e della produzione di ATP, per valutare l'attività metabolica. Per misurare il flusso di elettroni dal complesso I al complesso III come indice della respirazione mitocondriale, i mitocondri isolati sono stati risospesi in 0,2 mL di buffer A (5 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 5% p/v albumina sierica bovina (BSA); pH 7,2) e seguiti da 0,1 mL di buffer B (25% p/v saponina, 50 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 5% p/v BSA, 0,12 mM citocromo c ossidato, 0,2 mM NaN₃, pH 7,5) per 5 minuti a temperatura ambiente per bloccare il complesso IV e permettere l'accumulo di citocromo c ridotto. La reazione di riduzione del citocromo è stata avviata aggiungendo 0,15 mM di NADH ed è stata seguita per 5 minuti a 37°C, leggendo l'assorbanza a 550 nm mediante un lettore di micropiastre Packard EL340 (Bio-Tek Instruments). I risultati sono stati espressi in nanomoli di citocromo c ridotto/min/mg di proteina mitocondriale. I livelli di ATP sono stati misurati con il kit di dosaggio bioluminescente ATP (Merck, Darmstadt, Germania) secondo le istruzioni del produttore.

3. Livelli di attività di enzimi mitocondriali implicati nel ciclo di Krebs, per valutare l'attività metabolica cellulare. Gli enzimi analizzati sono stati l' α -chetoglutarato-deidrogenasi, la succinato-deidrogenasi, la malato-deidrogenasi e la citrato-sintasi.
4. Livelli del potenziale di membrana mitocondriale tramite JC1 e livelli di espressione del poro di transizione della permeabilità mitocondriale (mPTP), marcatori di disfunzione mitocondriale. $8 \cdot 10^6$ cellule sono state lavate con PBS, staccate mediante raschiamento delicato e incubate per 30 minuti a 37°C con $2 \mu\text{M}$ della sonda fluorescente JC-1 (Biotium Inc.), quindi centrifugate a 13.000g per 5 minuti e risospese in $0,5 \text{ mL}$ di PBS. La fluorescenza rossa (λ eccitazione: 550 nm , λ emissione: 600 nm) e la fluorescenza verde (λ eccitazione: 485 nm ; λ emissione: 535 nm) sono state misurate (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Bio-Tek Instruments) e le unità di fluorescenza relative sono state utilizzate per calcolare la percentuale di fluorescenza verde (depolarizzata) rispetto alla fluorescenza rossa (polarizzata) dei mitocondri, considerata un indice dei mitocondri danneggiati.
5. Livelli di ROS e TBARS mitocondriali, per valutare lo stress ossidativo nel mitocondrio. Per quanto riguarda i ROS, la frazione mitocondriale ($200 \mu\text{L}$) delle TEC danneggiate da IRI è stata trattata per 30 minuti a 37°C con $5 \mu\text{M}$ della sonda fluorescente sensibile ai ROS MitoSOX (Thermo Fisher Scientific). I ROS mitocondriali sono stati misurati utilizzando un lettore di micropiastre HT Synergy a 96 pozzetti (Bio-Tek Instruments). Le unità di fluorescenza relative sono state convertite in nanomoli di ROS/mg di proteina mitocondriale, utilizzando una curva standard eseguita con diluizioni seriali di H_2O_2 . Per quanto riguarda i TBARS, il danno ossidativo è stato misurato nella frazione mitocondriale ($200 \mu\text{L}$) delle TEC utilizzando il kit di dosaggio per la perossidazione lipidica 4-HNE (Abcam), che misura il 4-idrossi-nonenale come indice della perossidazione lipidica. I risultati sono stati espressi in nmol/mg di proteina mitocondriale.

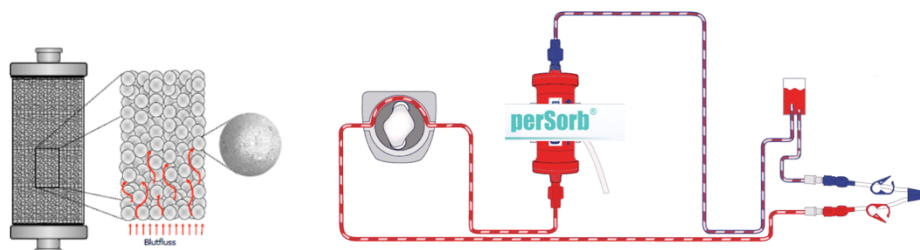


Fig. 3.3 Sorbente PerSorb[®] e schema di funzionamento con PerLife[®]

3.7 Test in vivo ed in vitro con l'utilizzo di EVs derivate da EPC

3.7.1 Isolamento e caratterizzazione delle EPC

Le EPC sono state isolate da cellule mononucleate del sangue periferico di donatori sani tramite centrifugazione a densità (Histopaque 1077; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Dopo l'isolamento, $8 \cdot 10^6$ cellule mononucleate/mL di medium sono state piastrate in pozzetti di coltura rivestiti di fibronectina in endothelial cell basal medium-2 (EBM-2; Clonetics Biowhittaker, Walkersville, MD) integrato con FCS al 5%, VEGF, FGF-2, EGF, IGF-1 e acido ascorbico. Dopo 3 giorni in coltura, le cellule non adese sono state rimosse mediante lavaggio con tampone fosfato salino (PBS) e le cellule sono state coltivate nello stesso terreno fino alla comparsa delle colonie. Dopo aver ottenuto monostrati omogenei con la tipica morfologia cobblestone, sono state effettuate la caratterizzazione fenotipica e la valutazione funzionale delle proprietà angiogenetiche. Alla citometria a flusso le EPC sono risultate negative per CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD20, CD62-E, VEGFR-1, CD14 e CD45 ma positive per CD34, CD133, Tie-2, VEGFR-3 e VEGFR-2. Le EPC sono poi state caratterizzate tramite doppia colorazione per LDL acetilata marcata con 1,1-dioctadecile-3,3,3,3-tetrametilindocarbocianina e ulex europaeus agglutinina-1. Il fenotipo endoteliale è stato ulteriormente confermato mediante Western blot e RT-PCR per l'espressione di marker caratteristici delle cellule endoteliali, come Tie-2, VEGFR-2 e VEGFR-3, ma non VEGFR-1. Le EPC sono state trasdotte con un lentivettore contenente una CMV-GFP expression-cassette. Le cellule 293T sono state transfettate con un sistema lentivirale a 4 plasmidi tramite il metodo di precipitazione con CaCl₂. I sovranatanti sono stati raccolti 48 e 72 ore dopo la transfezione, filtrati e concentrati con 2 ulteriori ultracentrifugazioni. I titoli della preparazione virale sono stati determinati tramite saggio immunoassorbente con enzyme-linked p24 (ELISA; Alliance, Perkin-Elmer, Wellesley, MA), determinazione del titolo GFP sulle cellule 293T e Taq-man RT-PCR per la determinazione dei genomi provirali trasdotti. Per la marcatura genica, dopo 3-4 passaggi in coltura, le EPC sono state piastrate su piastre a 24 pozzetti in terreno di coltura completo e quindi trasdotti durante la notte con un lentivettore contenente CMV-GFP expression-cassette, con un MOI di circa 20. Il terreno di coltura è stato sostituito con terreno fresco il giorno successivo. La trasduzione delle EPC è stata confermata con microscopia a fluorescenza e FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting). Per questo studio, sono state utilizzate EPC da 10 a 30 passaggi.

3.7.2 Isolamento delle EVs

Le EVs sono state ottenute dai surnatanti delle EPC coltivati in terreno EBM-2 privo di FCS e integrato con BSA allo 0,25%. Dopo centrifugazione a 2000g per 20 minuti per rimuovere i detriti, i surnatanti privi di cellule sono stati centrifugati a 100.000g (Beckman Coulter Optima L-90K ultracentrifuge; Beckman Coulter, Fullerton, CA) per 1 ora a 4°C, lavati in terreno 199 privo di siero contenente 25 mM di N-2-idrossietilpiperazina-N-2-etansolfonico (Sigma-Aldrich) e sottoposti a una seconda ultracentrifugazione nelle stesse condizioni. Per tracciare le EVs con microscopia a fluorescenza o FACS, le EVs sono state marcate con il cromoforo alifatico rosso fluorescente PKH26 (Sigma-Aldrich). Poi sono state lavate e ultracentrifugate a 100.000g per 1 ora a 4°C. I pellet delle EVs sono stati messi in sospensione in terreno 199 ed il contenuto proteico è stato quantificato con il metodo di Bradford (BioRad, Hercules, CA). La contaminazione da endotossine delle EVs è stata esclusa con il test Limulus (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) e le EVs sono state conservate a -80°C.

In esperimenti selezionati, le EVs sono state trattate con 1 U/mL di RNasi (Ambion, Austin, TX) per 1 ora a 37°C; la reazione è stata fermata con l'aggiunta di 10 U/mL di inibitore di RNasi (Ambion) e le EVs sono state lavate mediante ultracentrifugazione. L'efficacia del trattamento con RNasi è stata valutata dopo l'estrazione dell'RNA utilizzando il reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) con analisi spettrofotometrica dell'RNA totale estratto (non trattato, $3,3 \pm 0,2$ µg RNA/mg proteina EVs; trattato con RNasi, $<0,2$ µg RNA/mg proteina EVs). Inoltre, l'RNA estratto da EVs trattate e non trattate con RNasi è stato marcato con retrotrascrizione guidata da oligo-dT e analizzato su gel di agarosio allo 0,6% per mostrare la completa degradazione dell'RNA da trattamento con RNasi. Come controllo, le EVs sono state trattate con 1 U/mL di DNasi (Ambion) per 1 ora a 37°C.

3.7.3 NanoTrack Analysis (NTA)-Nanosight

Diversi preparati di EV ottenuti mediante ultracentrifugazione dei surnatanti delle EPC sono stati analizzati con NanoSight LM10 (Nanosight, Amesbury, UK), dotato di Nanoparticle Analysis Systems e del software analitico NTA 1.4, per valutare la dimensione e la concentrazione delle EV. Le acquisizioni sono state effettuate impostando il livello della telecamera a 14 e sono stati registrati tre video di 30 secondi per ciascun campione. Il numero totale di EV (NTA/mL) è stato ottenuto moltiplicando il valore fornito dallo strumento per la diluizione per l'analisi per la quantità in ml in cui gli EV sono stati risospesi.

3.7.4 Microscopia elettronica a scansione

Le EVs sono state fissate in fissativo di Karnowski, disidratate in alcol, essiccate su superficie di vetro e ricoperte di oro mediante sputter coating. I campioni sono stati esaminati con un microscopio elettronico a scansione Jeol T300 (Tokyo, Giappone). Le immagini sono state ottenute tramite elettroni secondari a una distanza di lavoro di 15-25 mm e una tensione accelerante di 20-25 kV.

3.7.5 Analisi MACSPlex

Le EVs sono state sottoposte a citometria a flusso multiplex (MACSPlex Exosome Kit, umano, Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA) in conformità alle linee guida ISEV. Il kit MACSPlex ha permesso di rilevare l'espressione di 39 antigeni di superficie utilizzando diversi subset di bead rivestite con anticorpi. Le diverse preparazioni di EV sono state diluite in un tampone MACSPlex fino ad un volume finale di 120 μ L; successivamente, 15 μ L di bead di cattura per EV MACSPlex sono state aggiunte direttamente alla sospensione. Per rilevare gli EV legati ai bead sono stati aggiunti anticorpi di rilevamento anti-CD9, anti-CD63 e anti-CD81 coniugati con APC per 1 ora, in rotazione oscillatoria delicata a 450 rpm e protetti dall'esposizione alla luce. Dopo l'incubazione, i bead non coniugati sono stati lavati tre volte a 3000g per 5 minuti con il tampone MACSPlex; quindi, il sovranatante è stato aspirato lasciando 150 μ L per ciascun campione per l'acquisizione. L'analisi citometrica a flusso è stata eseguita con un citofluorimetro CytoFLEX (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA), registrando circa 5000-8000 eventi. L'intensità media della fluorescenza (MFI) di tutti e 39 i marcatori degli esosomi è stata corretta per il background e selezionata in base alla rispettiva intensità di fluorescenza.

3.7.6 FACS e microscopia confocale

Le dimensioni delle EVs sono state confermate con FACSscan (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA). Lo strumento è stato lavato con una soluzione di risciacquo priva di particelle per 15 minuti per eliminare il background. Per l'analisi delle dimensioni sono state utilizzate sfere di diverse dimensioni (1, 2, 4 e 6 μ m; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) come marcatori dimensionali e l'analisi è stata eseguita utilizzando una scala logaritmica per i parametri di forward scatter e side scatter. Il numero di EVs diluite in rapporto 1:20 è stato analizzato con citometria a flusso con acquisizione di 30 μ L in flusso medio per 20 secondi come descritto da Baj-Krzyworzeka.

L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita utilizzando i seguenti anticorpi coniugati con FITC o PE: CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD20, CD62E, CD14, CD45, CD34, CD146 (Dako Cytomation, Copenhagen, Denmark); CD133 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany); Tie-2, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 (R&D System, Minneapolis, MN); ICAM-1, integrina $\alpha 4$ (Becton Dickinson), integrina $\alpha v\beta 3$, integrina $\alpha 5$, integrina $\alpha 6$ (BioLegend, San Diego, CA); e Ha solubile (Sigma-Aldrich). Come controllo sono state utilizzate IgG non immuni di topo coniugate con FITC o PE (Dako Cytomation). L'immunofluorescenza indiretta è stata eseguita su cellule coltivate su vetrini, fissate in paraformaldeide al 4% contenente saccarosio al 2%. La microscopia confocale è stata eseguita utilizzando un microscopio confocale Zeiss, modello LSM 5 PASCAL (Jena, Germania). L'anticorpo anti-antigene HLA-I umano è stato ottenuto da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); l'anticorpo anti-CD31 umano è stato ottenuto da Becton Dickinson. Il colorante Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) è stato aggiunto per la colorazione nucleare.

La forma e le dimensioni delle EVs sono state valutate mediante microscopia elettronica a trasmissione e tecnologia Nanosight (Nanosight, Londra, UK). L'espressione degli antigeni sulle EVs è stata studiata con FACS utilizzando anticorpi diretti contro CD14, CD34, CD42b, L-selectina, P-selectina, CD154 (Dako, Copenhagen, Denmark), integrina $\alpha 4$ (Becton Dickinson, San Jose, CA), integrina $\alpha v\beta 3$, integrina $\alpha 6$ (BioLegend, San Diego, CA) e HLA-I e -II (Santa Cruz Biotechnology). L'estrazione dell'RNA dalle EVs è stata effettuata utilizzando il kit di isolamento mirVana (Ambion). L'RNA è stato analizzato utilizzando il bioanalizzatore Agilent 2100 (Agilent Tech, Santa Clara, CA). I livelli di espressione dei miRNA sono stati analizzati utilizzando il kit Applied Biosystems TaqMan MicroRNA Assay Human Panel Early Access (Applied Biosystems, Foster City, CA) per profilare 365 miRNA mediante qRT-PCR (E-MEXP-2956, European Bioinformatics Institute). Tutte le reazioni sono state eseguite utilizzando uno strumento di PCR in tempo reale Applied Biosystems 7900HT equipaggiato con una piastra di reazione a 384 pozzetti. I livelli di espressione dei miRNA sono stati analizzati mediante qRT-PCR in un sistema StepOne Real Time (Ambion): 200 ng di RNA sono stati retrotrascritti e il DNA complementare è stato utilizzato per rilevare e quantificare specifici miRNA all'interno di EPC, fibroblasti e EVs derivati da entrambi i tipi cellulari mediante qRT-PCR utilizzando il kit miScript SYBR Green PCR (Qiagen, Valencia, CA). In esperimenti selezionati, le EVs sono state etichettate con il colorante fluorescente rosso PKH26 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) o trattate con 1 U/mL di RNasi (Ambion) e successivamente bloccate con 10 U/mL di inibitore di RNasi (Ambion).

3.7.7 Espressione genica e proteica degli inibitori del complemento nelle EV derivate da EPC

L'espressione di Fattore H, CD55 e CD59 sia nelle EPC che nelle EV è stata studiata con FACS, western blot e microscopia confocale. L'RNA è stato estratto dalle EPC e dalle EV utilizzando il kit di isolamento mirVana (Ambion, Austin, TX) e analizzato con l'Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tech. Inc., Santa Clara, CA). Il contenuto di acidi nucleici delle EV è stato studiato mediante analisi GUAVA FACS utilizzando arancio di acridina (Sigma Aldrich, St Louis, MO). La RT-PCR è stata eseguita con il kit di trascrizione inversa ad alta capacità (Applied Biosystems, Foster City, CA). I primer oligonucleotidici specifici per sequenza sono stati progettati utilizzando Primer Express (Applied Biosystems); Fattore H umano: forward, 5'-TTACTGGGATCACATTCATTGCA-3'; reverse, 5'-TGGCAGGCAACGTCTATAGATTT-3'; CD55 umano: forward, 5'-TTGAAGAGTTCTGCAATCGTAGCT-3'; reverse, 5'-CTGTAACCTGGACGGCACTCAT-3'; CD59 umano: forward, 5'-TCTTCTGCCATTCAGGTCATAGC-3'; reverse, 5'-TGGTAATGAGACACGCATCAAAA-3'. L'espressione relativa dei diversi mRNA è stata rilevata mediante il metodo SYBR green utilizzando l'analisi di quantificazione relativa Ct (Ct = Ct target – Ct control). In esperimenti selezionati, le EV sono state marcate con il colorante fluorescente rosso PKH26 (Sigma Aldrich) o trattate con una dose elevata (1 U/mL) di RNasi (Ambion) per 1 ora a 37°C. Il bioanalizzatore e la qRT-PCR sono stati utilizzati per valutare il contenuto totale di RNA e la presenza di mRNA selezionati (Fattore H, CD55 e CD59) e microRNA (miR-126, miR-296) in EV non stimolate o trattate con RNasi. Le EV isolate da fibroblasti umani sono state utilizzate come controllo in tutti gli esperimenti.

3.7.8 Modello di IRI

Ratti maschi Wistar (peso corporeo di 250 g) sono stati anestetizzati utilizzando una camera di induzione con isoflurano e somministrazione intraperitoneale di ketamina (100 mg/kg). Un'iniezione sottocutanea di 1-2 ml di soluzione fisiologica è stata somministrata per sostituire la perdita di liquidi durante la procedura chirurgica. Dopo un'incisione addominale mediana, il rene destro è stato rimosso con una tecnica subcapsulare. L'arteria e la vena renale sinistra sono state occluse utilizzando una pinza vascolare non traumatica applicata attraverso l'ilo del rene per 45 minuti. Gli animali sono stati divisi nei seguenti gruppi: (1) normali (non trattati); (2) operati in sham (nephrectomia destra); (3) IRI (nephrectomia destra + clampaggio del peduncolo renale sinistro); (4) IRI + EVs di EPC (nephrectomia destra +

clampaggio del peduncolo renale sinistro + iniezione ev di 30 mg di EVs); (5) IRI + RNasi EVs di EPC (nephrectomia destra + clampaggio del peduncolo sinistro + iniezione ev di 30 mg di EVs di EPC pretrattate con 1 U/ml di RNasi); (6) IRI + siRNA Dicer EVs di EPC (nephrectomia destra + clampaggio del peduncolo renale sinistro + iniezione ev di 30 mg di EVs derivati da EPC ingegnerizzati per knock-down Dicer mediante siRNA); (7) IRI + siRNA Control EVs di EPC (nephrectomia destra + clampaggio del peduncolo renale sinistro + iniezione ev di 30 mg di EVs ingegnerizzati con un siRNA irrilevante); (8) IRI + Antago-miR-126/296 EVs di EPCs (nephrectomia destra + clampaggio del peduncolo renale sinistro + iniezione i.v. di 30 mg di EVs derivati da EPC trasfettati con antago-miR anti-miR-126 e anti-miR-296); e (9) IRI + EVs di fibroblasti (nephrectomia destra + clampaggio del peduncolo renale sinistro + iniezione ev di 30 mg di EVs derivate da fibroblasti coltivati). Per tutti i gruppi, le EVs sono state diluite in soluzione salina allo 0,9% e iniettati nella vena caudale immediatamente dopo IRI. Sei animali per ogni gruppo sono stati sacrificati al giorno 2 ed al giorno 7. I reni sono stati rimossi per istologia e immunoistochimica. Per l'istologia renale, sezioni di reni in paraffina spesse 5 mm sono state colorate di routine con ematossilina/eosina o tricromica di Masson (Merck, Darmstadt, Germania). I cast ialini luminali e la perdita cellulare (denudazione della membrana basale tubulare) sono stati valutati in campi non sovrapposti (fino a 28 per sezione) utilizzando un obiettivo 40x (campo ad alta potenza) per valutare il punteggio di AKI. Il numero di cast e profili tubulari che mostrano necrosi è stato registrato in modalità cieca. La proliferazione è stata valutata nei ratti iniettati con bromodeossiridina mediante anticorpi monoclonali anti-bromo-deossiridina (Dako) o anti-antigene nucleare delle cellule in proliferazione (Santa Cruz Biotechnology). Il test TdT-mediated dUTP nick end labeling (Chemicon International, Temecula, CA) per il rilevamento delle cellule apoptotiche è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore. L'infiltrazione leucocitaria è stata valutata mediante colorazione con anticorpi anti-monociti (Chemicon International) o anti-granulociti (Serotec, Oxford, UK). La colorazione immunoperossidasi è stata eseguita utilizzando un anticorpo anti-mouse HRP (Pierce, Rockford, IL). L'analisi al microscopio confocale è stata eseguita su sezioni congelate per la localizzazione di EVs etichettate con PKH26 all'interno dei reni dopo colorazione con un anticorpo anti-laminina (Sigma-Aldrich) o anti-antigene delle cellule endoteliali del ratto-1 (Serotec). Inoltre, sono state eseguite colorazioni specifiche in immunoistochimica per le frazioni C5b9 (MAC) e C3 del complemento e per i rispettivi inibitori, Fattore H, CD55 (DAF) e CD59. Campioni di sangue per la misurazione della creatinina sierica e dei BUN sono stati raccolti prima a 2 e 7 giorni dopo IRI. Le concentrazioni di creatinina sono state determinate

utilizzando un analizzatore di creatinina Beckman II (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Il BUN è stato valutato in sangue eparinizzato utilizzando un analizzatore di chimica automatizzato Beckman Synchrotron CX9 (Beckman Instruments)

3.7.9 Colture cellulari di cellule tubulari endoteliali (TE_nC) ed epiteliali (TE_pC)

Le TE_nC e le TE_pC primarie sono state ottenute utilizzando filtri con diverse mesh per eliminare i glomeruli. Le cellule isolate sono state coltivate in pozzetti rivestiti di gelatina con VEGF (Lonza, Basilea, Svizzera). Dopo tre passaggi in coltura, le cellule sono state ulteriormente separate mediante smistamento cellulare magnetico utilizzando un anticorpo anti-CD31 accoppiato a sfere magnetiche (sistema MACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) e caratterizzate per i marcatori endoteliali (CD31, CD105 e fattore von Willebrand).

3.7.10 Studi in vitro

Le TE_nC e le TE_pC sono state coltivate per 24 ore in una camera umidificata ermetica, riempita con una miscela di gas contenente 5% CO₂, 94% N₂ e 2% O₂ a 20 atm, 37°C. Sono poi state piastrate su piastre a sei pozzetti ed incubate con diverse dosi di EVs marcate con PKH26 per 2 ore. L'internalizzazione delle EVs è stata valutata mediante microscopia confocale (Zeiss LSM 5 PASCAL, Jena, Germania) o FACS.

Le TE_nC e le TE_pC sono state poi coltivate su piastre a 24 pozzetti e incubate con 250 µg/mL di 2,3-bis-(2-metossi-4-nitro-5-solfenil)-2H-tetrazolio-5-carbossanilide (XTT) (Sigma Aldrich). I campioni sono stati analizzati in un lettore ELISA automatizzato a una lunghezza d'onda di 450 nm per valutare il danno citotossico.

Le TE_nC e le TE_pC sono state sottoposte al test TUNEL (Chemicon Int.) e analizzate al microscopio a fluorescenza per rilevare le cellule apoptotiche, colorate di verde in 10 campi microscopici non consecutivi.

Dopo l'incubazione con diversi tipi di EVs, l'RNA totale è stato estratto dalle cellule per eseguire la RT-PCR per il Fattore H, CD55 e CD59. Le cellule sono state colorate con anticorpi specifici diretti contro C5b-9 (Santa Cruz o Dako, rispettivamente), C3, Fattore H (Abcam), CD55 o CD59 (Becton Dickinson): le cellule sono state quindi incubate con anticorpi anti-IgG secondari coniugati con fluoresceina-isotiocianato o ficoeritrina ed esaminate mediante immunofluorescenza e FACS.

4. Risultati

4.1 Analisi delle caratteristiche generali della popolazione

L'analisi dell'intera popolazione dei pazienti sottoposti a trapianto renale è stata eseguita per le seguenti variabili: età, sesso, BMI, metodica dialitica ed anzianità dialitica, trapianto preemptive, diabete mellito, numero del trapianto (Tab 4.1; Tab 4.2; Tab 4.3). L'età media al trapianto è risultata essere $51,4 \pm 12,7$ anni; il sesso più frequente nella popolazione è risultato essere quello maschile (64,3%) ed il BMI medio è risultato essere $23,9 \pm 3,4$. L'anzianità dialitica media è risultata essere $55,2 \pm 57,2$ mesi. Il trapianto preemptive è stato eseguito nel 6,7% del totale dei trapianti. Il 6,9% della popolazione soffre di diabete mellito.

| | Totale (n = 1560) | % |
|-------------------------|-------------------|------|
| Età (y) | $51,4 \pm 12,7$ | |
| Sesso M | 978 | 64,3 |
| Sesso F | 543 | 35,7 |
| BMI | $23,9 \pm 3,4$ | |
| Anzianità dialitica (m) | $55,2 \pm 57,2$ | |
| Preemptive | 103 | 6,7 |
| Diabete Mellito | 105 | 6,9 |

Tab 4.1. Caratteristiche generali della popolazione di riceventi

La metodica dialitica più frequente nella popolazione è risultata essere l'emodialisi (67,8%), seguita dalla dialisi peritoneale (14%), da entrambe le metodiche (10%) e da nessuna metodica (8%).

| Metodica dialitica | Totale (n = 1560) | % |
|---------------------|-------------------|------|
| Nessuna | 122 | 8 |
| Emodialisi | 1032 | 67,8 |
| Dialisi peritoneale | 214 | 14 |
| Entrambe | 153 | 10 |

Tab. 4.2. Metodica dialitica nella popolazione di riceventi

La maggior parte della popolazione è costituita da riceventi primo trapianto (88,3%), mentre solo l'11,7% è rappresentato da riceventi di trapianto successivo al primo.

| Numero del trapianto | Totale (n = 1560) | % |
|----------------------|-------------------|------|
| 1 | 1.343 | 88,3 |
| > 1 | 178 | 11,7 |

Tab. 4.3. Numero di trapianto: primo trapianto o successivi

4.2 Analisi delle caratteristiche generali dei donatori

L'analisi della popolazione dei donatori è stata eseguita per le seguenti variabili: età, sesso, BMI, diabete mellito, ipertensione arteriosa, concentrazione sierica della creatinina, GFR stimato con la formula di Cockcroft-Gault, classificazione come ECD o SCD, classificazione come DCD o DBD (Tab. 4.4). L'età media dei donatori è risultata essere $55 \pm 15,8$ anni, più alta rispetto alla popolazione dei riceventi; il sesso maschile e quello femminile hanno la stessa frequenza nella popolazione dei donatori (49,5% e 50,4%, rispettivamente). Il BMI medio è risultato essere $25 \pm 3,8$. Il 5,1% dei donatori soffre di diabete mellito, il 40,5% di ipertensione. La creatininemia media è risultata essere $0,87 \pm 0,42$ mg/dl, mentre l'eGFR medio $99,6 \pm 44,5$ ml/min/1,73m².

I donatori deceduti sono stati nella maggior parte dei casi DBD (97,6% del totale dei deceduti), mentre i DCD sono risultati esserne la minor parte (2,1%). Più della metà dei donatori DBD è risultata essere ECD (57,6% dei DBD), mentre poco meno della metà è risultata essere SCD (42,4%).

| | Totale (n = 1560) | % |
|-----------------------------------|-------------------|------|
| Età (y) | $55 \pm 15,8$ | |
| Sesso M | 754 | 49,5 |
| Sesso F | 767 | 50,4 |
| BMI | $25 \pm 3,8$ | |
| Diabete Mellito | 79 | 5,1 |
| Ipertensione | 616 | 40,5 |
| Creatininemia (mg/dl) | $0,87 \pm 0,42$ | |
| eGFR (ml/min/1,73m ²) | $99,6 \pm 44,5$ | |
| ECD | 768 | 57,6 |
| SCD | 566 | 42,4 |
| DCD | 32 | 2,1 |
| DBD | 1.334 | 97,6 |

Tab. 4.4. Caratteristiche generali dei donatori

4.3 Analisi delle variabili legate alla caratterizzazione pretrapiantologica

L'analisi delle variabili legate alla caratterizzazione pretrapiantologica è stata eseguita sulle seguenti variabili: mismatch HLA, mismatch DR, score istologico secondo Karpinski-Remuzzi (Tab. 4.5; Tab. 4.6) e valore percentuale del PRA virtuale, il cui valore medio è risultato essere $15,9 \pm 30$. Nella maggior parte dei casi il punteggio di mismatch HLA tra donatore e ricevente è risultato essere 3 (33,4%), 4 (30,6%) e 2 (22,4%); meno frequenti sono risultati gli altri punteggi. Il punteggio mismatch DR è risultato essere di 1 nella metà dei casi (50,5%), seguito da 0 (40,1%) e 2 (5,7%).

| Totale (n = 1560) | Mismatch HLA | % | Mismatch DR | % |
|-------------------|--------------|------|-------------|------|
| 0 | 19 | 1,2 | 611 | 40,1 |
| 1 | 93 | 6,1 | 768 | 50,5 |
| 2 | 341 | 22,4 | 87 | 5,7 |
| 3 | 509 | 33,4 | | |
| 4 | 466 | 30,6 | | |
| 5 | 72 | 4,7 | | |
| 6 | 21 | 1,3 | | |

Tab. 4.5. Mismatch HLA e Mismatch DR

Del totale dei donatori biopsiati (49,4% dei donatori), gli score bioptici più frequenti sono risultato essere 2 (17,7%) e 3 (12,7%); meno frequenti gli altri, in particolare 5 (0,2%).

| Score Karpinski | Biopsia (n = 752, 49,4%) | % |
|-----------------|--------------------------|------|
| 0 | 27 | 1,8 |
| 1 | 87 | 5,7 |
| 2 | 270 | 17,7 |
| 3 | 194 | 12,7 |
| 4 | 47 | 3 |
| 5 | 3 | 0,2 |

Tab. 4.6. Score istologico secondo Karpinski nella popolazione di donatori sottoposti a biopsia renale

4.4 Analisi delle variabili legate al prelievo ed alla valutazione post-trapiantologica

L'analisi è stata eseguita sulle seguenti variabili: terapia di induzione eseguita, CIT, DGF e necessità di dialisi, tempo necessario per il recupero della funzione renale, creatininemia, eGFR e proteinuria alle dimissioni, giorni di degenza, presenza di anticorpi specifici antidonatore (DSA) ad un anno dal trapianto (Tab. 4.7; Tab. 4.8).

Il valore medio di CIT è risultato essere $18,7 \pm 5,6$ ore e la riperfusione è stata applicata nel 2,8% dei casi. La DGF si è sviluppata nel 23% della popolazione. Il tempo medio necessario al recupero della funzione renale è risultato essere $4,4 \pm 6,5$ giorni, mentre la degenza media $22,8 \pm 16,9$ giorni.

Il valore medio di creatininemia è risultato essere $1,95 \pm 0,82$, quello dell'eGFR $45,9 \pm 19$ e quello della proteinuria $0,46 \pm 0,47$.

Il 33,7% dei pazienti a cui sono stati valutati i DSA (34% del totale della popolazione) è risultato esserne negativo entro 1 anno dal trapianto, mentre l'1,7% positivo.

| | Totale (n = 1560) | % |
|-----------------------------------|-------------------|------|
| CIT (h) | $18,7 \pm 5,6$ | |
| Riperfusione | 43 | 2,8 |
| DGF | 351 | 23 |
| Tempo di recupero funzionale (g) | $4,4 \pm 6,5$ | |
| Creatininemia (mg/dl) | $1,95 \pm 0,82$ | |
| eGFR (ml/min/1,73m ²) | $45,9 \pm 19$ | |
| Proteinuria (g/die) | $0,46 \pm 0,47$ | |
| Giorni di degenza | $22,8 \pm 16,9$ | |
| DSA negativi | 512 | 33,7 |
| DSA positivi | 26 | 1,7 |

Tab. 4.7. Variabili legate al prelievo e post-trapiantologiche

La maggioranza dei pazienti trapiantati (78,8%) ha ricevuto come terapia di induzione anti-IL2R (basiliximab), mentre la minor parte ATG (18,47%); solo al 2,63% sono stati somministrati entrambi.

| Terapia di induzione | Totale (n = 1560) | % |
|----------------------|-------------------|-------|
| Anti-IL2R | 1.199 | 78,8 |
| ATG | 281 | 18,47 |
| Entrambe | 40 | 2,63 |

Tab. 4.8. Terapia di induzione eseguita

4.5 Analisi delle variabili relative al follow-up ed alle complicanze

L'analisi delle variabili relative al follow-up è stata eseguita su: creatininemia, GFR e proteinuria a 6 mesi, 1 anno, 3 anni, 5 anni e 10 anni (Tab. 4.9) (Fig. 4.1; Fig. 4.2; Fig. 4.3); l'analisi delle complicanze post-trapiantologiche a breve e lungo termine è stata eseguita su: espianto chirurgico, rigetto e tipologia di rigetto, fallimento del trapianto e rientro in dialisi, decesso (Tab. 4.10; Tab. 4.11).

La durata media del trapianto è risultata essere $98,2 \pm 68,4$ mesi.

| Totale (n = 1560) | 6 mesi | 1 anno | 3 anni | 5 anni | 10 anni |
|-------------------|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| Creatininemia | $1,69 \pm 0,6$ | $1,66 \pm 0,6$ | $1,61 \pm 0,6$ | $1,63 \pm 0,6$ | $1,68 \pm 0,7$ |
| eGFR | $49,8 \pm 18,8$ | $51,8 \pm 27,9$ | $53,2 \pm 21$ | $54,8 \pm 24$ | $50,8 \pm 21$ |
| Proteinuria | $0,26 \pm 0,4$ | $0,29 \pm 0,6$ | $0,35 \pm 0,6$ | $0,39 \pm 0,7$ | $0,42 \pm 0,7$ |

Tab. 4.9. Variabili del follow-up. La creatininemia è espressa in mg/dl; l'eGFR è espresso in ml/min/1,73m²; la proteinuria è espressa in g/die

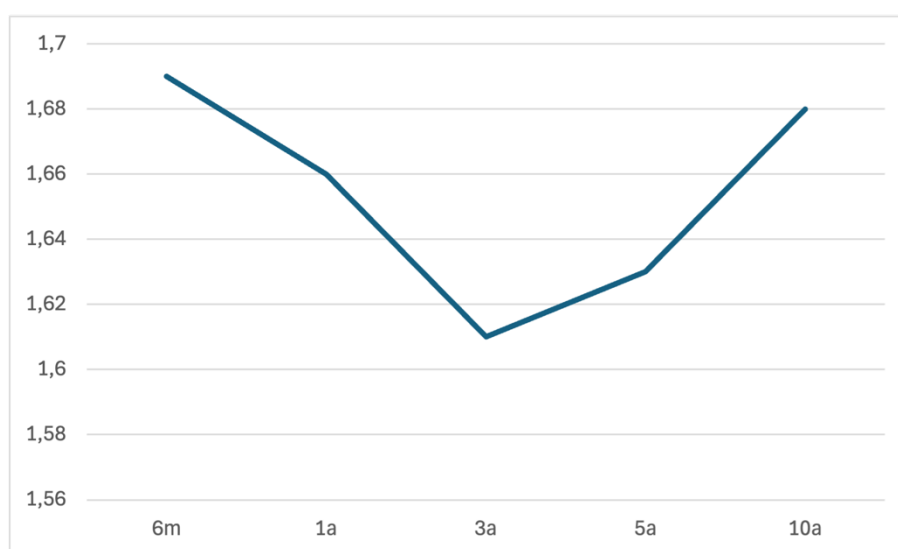


Fig. 4.1. Andamento dei valori medi della creatininemia in mg/dL nel tempo

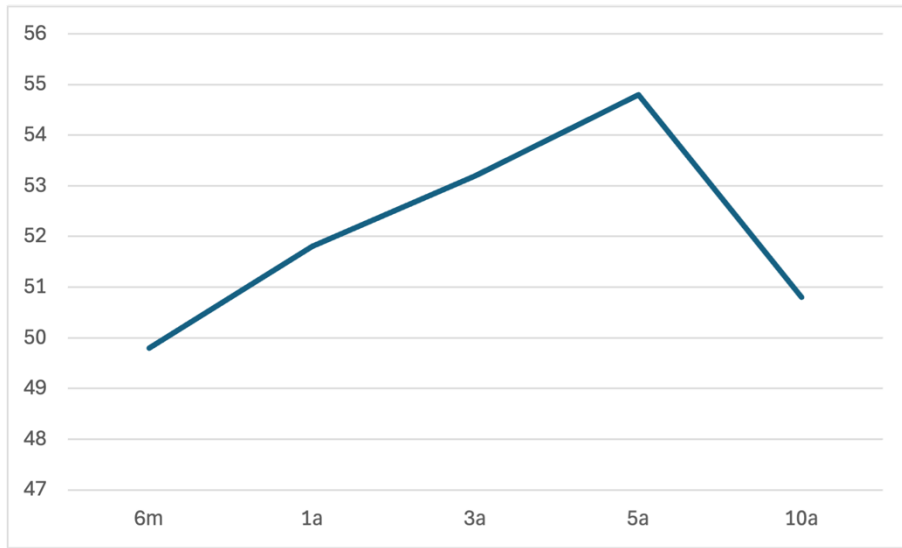


Fig. 4.2. Andamento dei valori medi di eGFR espresso in ml/min/1.73m² nel tempo

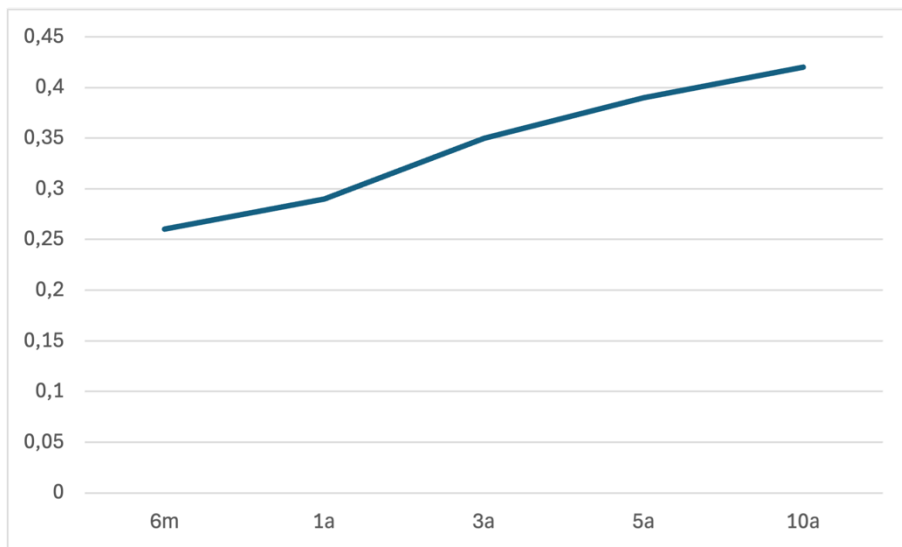


Fig. 4.3 Andamento dei valori medi della proteinuria espressa in g/die nel tempo

Il rigetto ha complicato il 13,5% dei trapianti. Il 4,2% dei pazienti ha sviluppato rigetto acuto (31,2% del totale dei rigetti), l'8,7% di tipo cronico (64% del totale dei rigetti) e l'1,1% sia acuto che cronico (8,7% del totale dei rigetti).

| | Totale (n = 1560) | % |
|-----------------|-------------------|------|
| Rigetto | 205 | 13,5 |
| Rigetto acuto | 64 | 4,2 |
| Rigetto cronico | 133 | 8,7 |
| Entrambi | 18 | 1,1 |

Tab. 4.10. Rigetto e tipologia di rigetto

La complicanza più frequente nella popolazione generale è risultata essere il decesso (22,9%), seguita dal fallimento con rientro in dialisi (17,2%); meno frequente l'espianto del graft (2,3%).

| | Totale (n = 1560) | % |
|------------|-------------------|------|
| Espianto | 35 | 2,3 |
| Fallimento | 262 | 17,2 |
| Decesso | 349 | 22,9 |

Tab. 4.11. Complicanze a breve e lungo termine

4.6 Analisi delle dei fattori di rischio di DGF

L'analisi dei fattori di rischio di DGF (cfr. 1.4) è stata eseguita associando ogni possibile rischio, determinato aprioristicamente in base all'evidenza dimostrata dalla letteratura scientifica, alla manifestazione di DGF. Ogni variabile considerabile fattore di rischio per DGF è stata quindi analizzata nelle due seguenti sottopopolazioni: riceventi che hanno sviluppato IGF (cfr. 1.2) e riceventi che hanno sviluppato DGF.

Il calcolo dell'Odds Ratio (OR) per il rischio associato alle variabili categoriche del ricevente (Tab. 4.12) ha dimostrato che il sesso maschile, il diabete mellito ed il trapianto successivo al primo rappresentano tre fattori di rischio indipendenti di DGF, con rischio di rispettivamente 1,3, 1,9 e 2 volte maggiore rispetto al sesso femminile, alla popolazione senza diabete mellito ed ai primi trapianti. Il trapianto preemptive è risultato essere un fattore protettivo rispetto al trapianto non-preemptive (OR = 0,15).

| | IGF (n = 1.170) | DGF (n = 351) | OR | p-value | IC 95% |
|---------------|-----------------|---------------|------|----------|----------|
| Sesso M | 736 (75,3%) | 242 (24,7%) | 1,3 | = 0,039 | 1-1,6 |
| Diabete | 67 (63,8%) | 38 (36,2%) | 1,9 | = 0,001 | 1,3-3 |
| Preemptive | 98 (95,2%) | 5 (4,8%) | 0,15 | < 0,0001 | 0,06-0,3 |
| Trapianto > 1 | 115 (64,6%) | 63 (35,4%) | 2 | < 0,0001 | 1,4-2,8 |

Tab. 4.12. Fattori di rischio categorici legati al ricevente nelle sottopopolazioni IGF e DGF

L'associazione di variabili continue del ricevente e DGF (Tab. 4.13) è stata valutata con il test T (età e BMI) ed il test di Wilcoxon-Mann-Whitney (anzianità dialitica).

L'età media, il BMI medio e l'anzianità dialitica media della popolazione DGF sono tutte risultate essere significativamente maggiori rispetto alla popolazione IGF.

| | IGF (n = 1170) | DGF (n = 351) | p-value | IC 95% |
|-------------------------|----------------|---------------|----------|-----------|
| Età (y) | 50,6 ± 13 | 53,9 ± 11,4 | < 0,0001 | 50,8-52 |
| BMI | 23,6 ± 3,4 | 24,9 ± 3,4 | < 0,0001 | 23,4-23,8 |
| Anzianità dialitica (m) | 50,1 ± 52,4 | 70,9 ± 67,7 | < 0,0001 | / |

Tab. 4.13. Fattori di rischio continui legati al ricevente nelle sottopopolazioni IGF e DGF

L'analisi del rischio di DGF associato all'aumento di età, BMI ed anzianità dialitica nel ricevente è stato eseguito con regressione logistica (Tab. 4.14), che ha rivelato un aumento del rischio del 2%, 11% e 5%, rispettivamente, per ogni incremento di unità considerata. Ciò corrisponde ad un aumento del 2% del rischio per ogni anno di età, dell'11% per ogni punto di BMI e del 5% per ogni mese di anzianità dialitica.

| | IGF (n = 1.170) | DGF (n = 351) | OR | p-value | IC 95% |
|----------------------------|-----------------|---------------|------|----------|-----------|
| Età (y) | 50,6 ± 13 | 53,9 ± 11,4 | 1,02 | < 0,0001 | 1,01-1,03 |
| BMI | 23,6 ± 3,4 | 24,9 ± 3,4 | 1,11 | < 0,0001 | 1,08-1,15 |
| Anzianità dialitica (m) | 50,1 ± 52,4 | 70,9 ± 67,7 | 1,05 | < 0,0001 | 1-1,11 |

Tab. 4.14. Rischio di DGF per l'aumento di ogni unità delle variabili continue del ricevente

Il calcolo dell'OR per il rischio associato alle variabili categoriche del donatore (Tab. 4.15) ha dimostrato che il sesso maschile comporta un rischio 1,4 volte maggiore di sviluppare DGF; l'ipertensione arteriosa 1,7 volte maggiore; la classificazione del donatore come ECD (cfr. 1.4) di 1,7 volte maggiore; la classificazione come DCD (cfr. 1.4) 2,6 volte maggiore. Il diabete mellito nel donatore non è risultato essere un fattore di rischio statisticamente significativo di DGF, con rischio sovrapponibile ai riceventi da non diabetici (OR = 0,9).

| | IGF (n = 1.170) | DGF (n = 351) | OR | p-value | IC 95% |
|-----------------|-----------------|---------------|-----|----------|---------|
| Sesso M | 556 (73,7%) | 198 (26,3%) | 1,4 | = 0,004 | 1,1-1,8 |
| Diabete Mellito | 62 | 17 | 0,9 | = 0,654 | 0,5-1,5 |
| Ipertensione | 437 | 179 | 1,7 | < 0,0001 | 1,3-2,1 |
| ECD | 555 (72,3%) | 213 (27,7%) | 1,7 | < 0,0001 | 1,3-2,1 |
| DCD | 18 (56,2%) | 14 (43,7%) | 2,6 | = 0,007 | 1,3-5,4 |

Tab. 4.15. Fattori di rischio categorici legati al donatore nelle popolazioni IGF e DGF

L'associazione di variabili continue del donatore e DGF (Tab. 4.16) è stata valutata con il test T. L'età media, il BMI medio e la creatininemia media dei donatori nella popolazione DGF sono tutte risultate essere significativamente maggiori rispetto alla popolazione IGF. L'eGFR medio è risultato essere significativamente minore rispetto alla popolazione IGF.

| | IGF (n = 1.170) | DGF (n = 351) | p-value | IC 95% |
|--------------------------------------|-----------------|---------------|----------|------------|
| Età (y) | 53,9 ± 16,2 | 58,7 ± 14,2 | < 0,0001 | 54,2-55,8 |
| BMI | 24,9 ± 3,8 | 25,7 ± 3,8 | = 0,0008 | 24,9-25,3 |
| Creatininemia (mg/dl) | 0,86 ± 0,41 | 0,93 ± 0,44 | = 0,003 | 0,85-0,9 |
| eGFR (ml/min/1,73m ²) | 101,7 ± 46 | 92,4 ± 38,4 | = 0,0007 | 97,3-101,8 |

Tab. 4.16. Fattori di rischio continui legati al ricevente nelle sottopopolazioni IGF e DGF

L'analisi del rischio di DGF associato all'aumento di età, BMI, creatininemia e eGFR del donatore è stato eseguito con regressione logistica (Tab. 4.17), che ha rivelato un aumento del rischio del 2%, 5%, 46%, -1% rispettivamente, per ogni incremento di unità considerata. Ciò corrisponde ad un aumento del 2% del rischio per ogni anno di età, del 5% per ogni punto di BMI, del 46% per ogni mg/dl di creatininemia e dell'1% per ogni punto di riduzione dell'eGFR.

| | IGF (n = 1.170) | DGF (n = 351) | OR | p-value | IC 95% |
|--------------------------------------|-----------------|---------------|------|----------|-------------|
| Età (y) | 53,9 ± 16,2 | 58,7 ± 14,2 | 1,02 | < 0,0001 | 1,01-1,03 |
| BMI | 24,9 ± 3,8 | 25,7 ± 3,8 | 1,05 | = 0,001 | 1,02-1,08 |
| Creatininemia (mg/dl) | 0,86 ± 0,41 | 0,93 ± 0,44 | 1,46 | = 0,004 | 1,12-1,91 |
| eGFR (ml/min/1,73m ²) | 101,7 ± 46 | 92,4 ± 38,4 | 0,99 | = 0,001 | 0,991-0,997 |

Tab. 4.17. Rischio di DGF per l'aumento di ogni unità delle variabili continue del donatore

Il calcolo dell'OR per il rischio associato alle variabili categoriche del prelievo ha documentato che la riperfusione del rene comporta un rischio 2,47 volte maggiore di sviluppare DGF ($p = 0,004$, IC 95% = 1,33-4,59).

L'associazione di variabili continue del prelievo e della caratterizzazione pretrapiantologica con DGF (Tab. 4.18) è stata valutata con il test T ed il test di Wilcoxon-Mann-Whitney.

Il CIT medio ed il valore medio di %vPRA della popolazione DGF sono risultati essere significativamente maggiori rispetto alla popolazione IGF. Il punteggio medio di mismatch HLA e DR non è risultato essere significativamente diverso da quello della popolazione IGF. Il rischio di sviluppare DGF legato all'aumentare di ogni unità di CIT è stato calcolato con regressione logistica, che ha dimostrato un aumento del rischio del 4% per ogni ora di CIT aggiuntiva (OR = 1,04, $p < 0,0001$, IC 95% = 1,91-1,06).

| | IGF (n = 1.170) | DGF (n = 351) | p-value | IC 95% |
|--------|-----------------|---------------|----------|-----------|
| CIT | 18,3 ± 5,5 | 19,7 ± 5,9 | = 0,0002 | 18,4-19 |
| MM HLA | 3,06 ± 1,23 | 3,03 ± 1,03 | = 0,66 | / |
| MM DR | 0,63 ± 0,59 | 0,67 ± 0,58 | = 0,2 | / |
| %vPRA | 14,4 ± 28,5 | 21,8 ± 34,5 | = 0,01 | 13,6-18,1 |

Tab. 4.18. Fattori di rischio continui legati al prelievo ed alla caratterizzazione pretrapiantologica nelle sottopopolazioni IGF e DGF

Il calcolo dell'OR per il rischio di sviluppare DGF associato alla terapia di induzione ha documentato un aumento del rischio rispetto alla non somministrazione di induzione; in particolare, l'utilizzo di anti-IL2R comporta un rischio 2 volte maggiore, l'utilizzo di ATG 3,1 volte maggiore e l'utilizzo di entrambi 11,2 volte maggiore (Tab. 4.19).

| Induzione | IGF (n = 1.170) | DGF (n = 351) | OR | p-value | IC 95% |
|-----------|-----------------|---------------|------|----------|----------|
| Anti-IL2R | 879 (75,1%) | 235 (67%) | 2 | = 0,043 | 1,02-3,9 |
| ATG | 199 (17,1%) | 82 (23,4%) | 3,1 | = 0,002 | 1,52-6,2 |
| Entrambe | 16 (13,7%) | 24 (68,4%) | 11,2 | < 0,0001 | 4,51-28 |

Tab. 4.19. Rischio di DGF per l'aumento di ogni unità delle variabili continue del donatore

4.7 Analisi delle variabili dipendenti da DGF e del follow-up

L'analisi delle variabili continue considerate aprioristicamente come dipendenti dall'insorgenza di DGF è stata eseguita con il test T (Tab. 4.20).

La concentrazione sierica media della creatinina alle dimissioni, il tempo medio necessario per il recupero di una funzionalità renale soddisfacente ed il tempo medio di degenza sono risultati essere significativamente maggiori nella popolazione DGF rispetto alla popolazione IGF. Il eGFR alle dimissioni è risultato essere significativamente minore nella popolazione DGF rispetto alla popolazione IGF.

La proteinuria alle dimissioni non ha dimostrato avere differenze significative tra le due popolazioni.

| | IGF (n = 1170) | DGF (n = 351) | p-value | IC 95% |
|-----------------------------------|----------------|---------------|----------|-----------|
| Creatininemia (mg/dl) | 1,76 ± 0,64 | 2,58 ± 1 | < 0,0001 | 0,9-0,72 |
| eGFR (ml/min/1,73m ²) | 49,4 ± 19,2 | 34,3 ± 12,8 | < 0,0001 | 12,9-17,2 |
| Proteinuria (g/die) | 0,46 ± 0,47 | 0,48 ± 0,49 | = 0,566 | 0,44-0,49 |
| Tempo di recupero funzionale (g) | 1,9 ± 2 | 12,4 ± 9,2 | < 0,0001 | 4-4,7 |
| Giorni di degenza | 19 ± 13 | 35,7 ± 21,5 | < 0,0001 | 21,9-23,7 |

Tab. 4.20. Variabili dipendenti dall'insorgenza di DGF nelle sottopopolazioni IGF e DGF

L'analisi delle variabili continue nel tempo (6 mesi, 1 anno, 3 anni, 5 anni, 10 anni) considerate aprioristicamente come dipendenti da DGF è stata eseguita con il test T (Tab. 4.21). I valori medi della creatininemia nella popolazione DGF sono risultati essere significativamente maggiori a tutti i tempi considerati rispetto alla popolazione IGF (Fig. 4.4).

| Creatininemia | IGF (n = 1.170) | DGF (n = 351) | p-value | IC 95% |
|---------------|-----------------|---------------|----------|-----------|
| 6 mesi | 1,6 ± 0,55 | 2,02 ± 0,68 | < 0,0001 | 1,66-1,73 |
| 1 anno | 1,57 ± 0,58 | 1,95 ± 0,72 | < 0,0001 | 1,62-1,7 |
| 3 anni | 1,55 ± 0,6 | 1,85 ± 0,69 | < 0,0001 | 1,57-1,65 |
| 5 anni | 1,58 ± 0,6 | 1,82 ± 0,63 | < 0,0001 | 1,58-1,67 |
| 10 anni | 1,61 ± 0,61 | 1,97 ± 0,98 | = 0,0004 | 1,6-1,77 |

Tab. 4.21. Valori medi di creatininemia nelle sottopopolazioni IGF e DGF

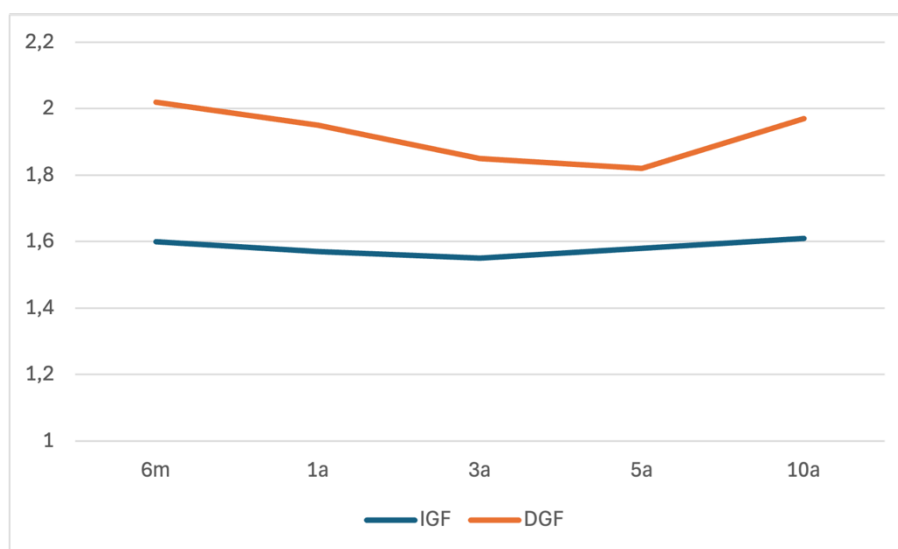


Fig. 4.4. Andamento dei valori medi della creatininemia espressa in mg/dl nel tempo nelle sottopopolazioni IGF e DGF

I valori medi di eGFR nella popolazione DGF sono risultati essere significativamente minori a tutti i tempi considerati rispetto alla popolazione IGF (Fig. 4.5) (Tab. 4.22).

| eGFR | IGF (n = 1.170) | DGF (n = 351) | p-value | IC 95% |
|---------|-----------------|---------------|----------|-----------|
| 6 mesi | 51,5 ± 18,8 | 43,9 ± 17,5 | < 0,0001 | 48,5-51 |
| 1 anno | 53,6 ± 29,9 | 45,3 ± 17,7 | = 0,0003 | 49,9-53,7 |
| 3 anni | 54,5 ± 21,1 | 48,6 ± 21,1 | = 0,0017 | 51,7-54,7 |
| 5 anni | 56 ± 24,9 | 50,1 ± 22,5 | = 0,0108 | 52,9-56,6 |
| 10 anni | 51,4 ± 21,4 | 48,6 ± 23,7 | = 0,0366 | 48,3-53,3 |

Tab. 4.22. Valori medi di eGFR nelle sottopopolazioni IGF e DGF

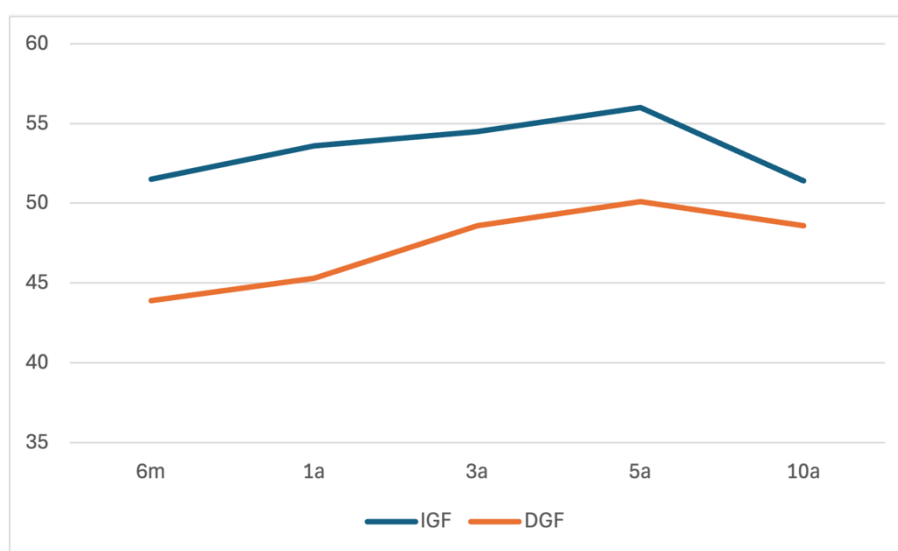


Fig. 4.5 Andamento dei valori medi di eGFR espresso in ml/min/1,73m² nel tempo nelle sottopopolazioni IGF e DGF

I valori medi di proteinuria nella popolazione DGF non sono risultati significativamente differenti rispetto alla popolazione IGF (Fig. 4.6) (Tab. 4.23).

| Proteinuria | IGF (n = 1.170) | DGF (n = 351) | p-value | IC 95% |
|-------------|-----------------|---------------|---------|-----------|
| 6 mesi | 0,26 ± 0,42 | 0,27 ± 0,27 | = 0,918 | 0,24-0,29 |
| 1 anno | 0,29 ± 0,68 | 0,29 ± 0,34 | = 0,980 | 0,25-0,33 |
| 3 anni | 0,34 ± 0,64 | 0,37 ± 0,63 | = 0,628 | 0,30-0,40 |
| 5 anni | 0,38 ± 0,76 | 0,44 ± 0,63 | = 0,455 | 0,33-0,46 |
| 10 anni | 0,37 ± 0,68 | 0,59 ± 0,99 | = 0,568 | 0,32-0,51 |

Tab. 4.23. Valori medi di proteinuria nelle sottopopolazioni IGF e DGF

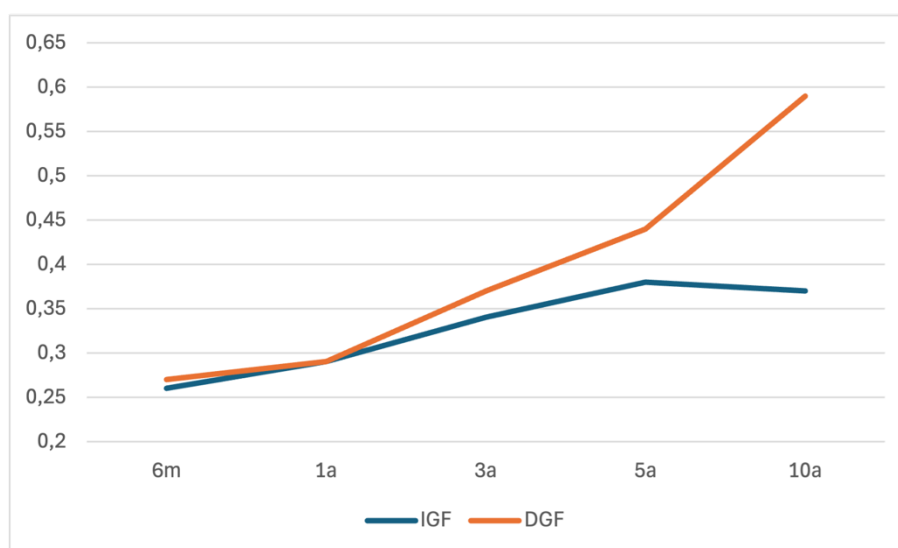


Fig. 4.6 Andamento dei valori medi della proteinuria espressa in g/die nel tempo nelle sottopopolazioni IGF e DGF

Il calcolo dell'OR per quantificare il rischio di insorgenza di rigetto ha rivelato che la popolazione DGF ha un rischio di 1,8 volte maggiore rispetto alla popolazione IGF ($p < 0,0001$, IC 95% = 1,3-2,5).

L'analisi associativa della durata generale del trapianto nelle sottopopolazioni IGF e DGF (valori medi di $102,2 \pm 68,7$ e $84,2 \pm 65,5$ mesi, rispettivamente) è stata eseguita con il test T, che ha rivelato una durata significativamente maggiore nella popolazione IGF ($p < 0,0001$, IC 95% = 94,6-101,6).

4.8 Analisi della sopravvivenza dei pazienti

L'analisi della sopravvivenza cumulativa dei pazienti secondo Kaplan-Meier è stata eseguita sulla popolazione generale dei sottoposti a trapianto renale nel periodo 4/11/1998-31/12/2021 (Fig. 4.7) e sulle sottopopolazioni selezionate (cfr. 3.2), considerando anche le suddivisioni secondo la variabile DGF o IGF. Per ogni analisi sono riportate le percentuali di sopravvissuti a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nella popolazione di riferimento. L'analisi della sopravvivenza della popolazione generale dei riceventi trapianto ha documentato sopravvivenze di 98,5%, 93,1%, 80%, 60% e 43,3% (Tab. 4.24).

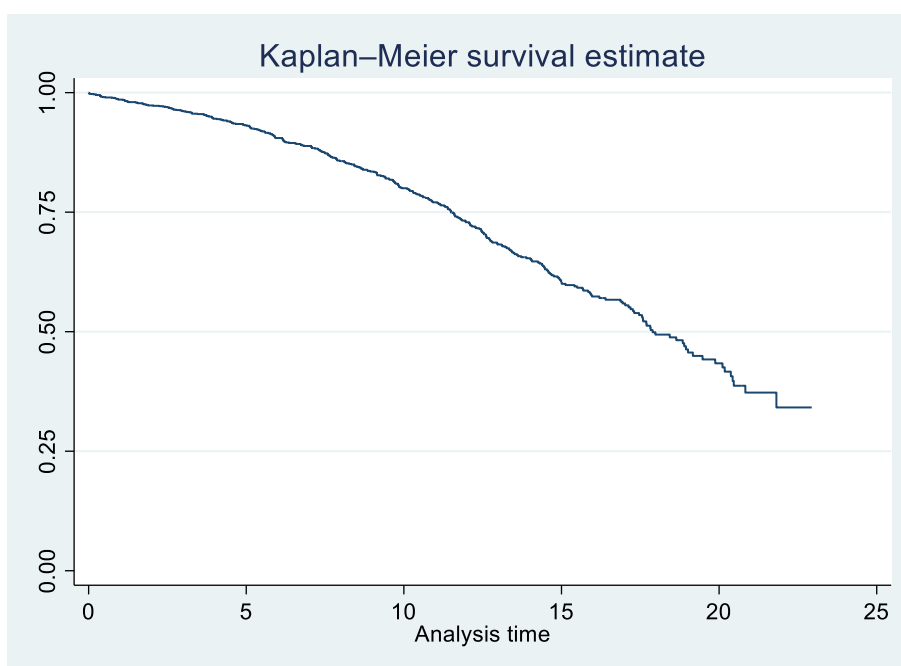


Fig. 4.7. Sopravvivenza della popolazione generale dei trapiantati

| | % | IC 95% |
|---------|------|-----------|
| 1 anno | 98,5 | 97,7-99 |
| 5 anni | 93,1 | 91,6-94,3 |
| 10 anni | 80 | 77,3-82,4 |
| 15 anni | 60 | 55,9-63,8 |
| 20 anni | 43,3 | 37,6-48,9 |

Tab. 4.24. Sopravvivenza della popolazione generale a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni

L'analisi comparativa della sopravvivenza dei pazienti delle popolazioni IGF e DGF ha documentato una sopravvivenza significativamente maggiore nel gruppo IGF a tutti i tempi considerati (Fig. 4.8) (Tab. 4.25). Il rischio di DGF per la sopravvivenza del paziente è stato calcolato con il modello di Cox-Breslow, che ha documentato un Hazard Ratio (HR) di 1,86 ($p < 0,0001$; IC 95% = 1,48-2,34).

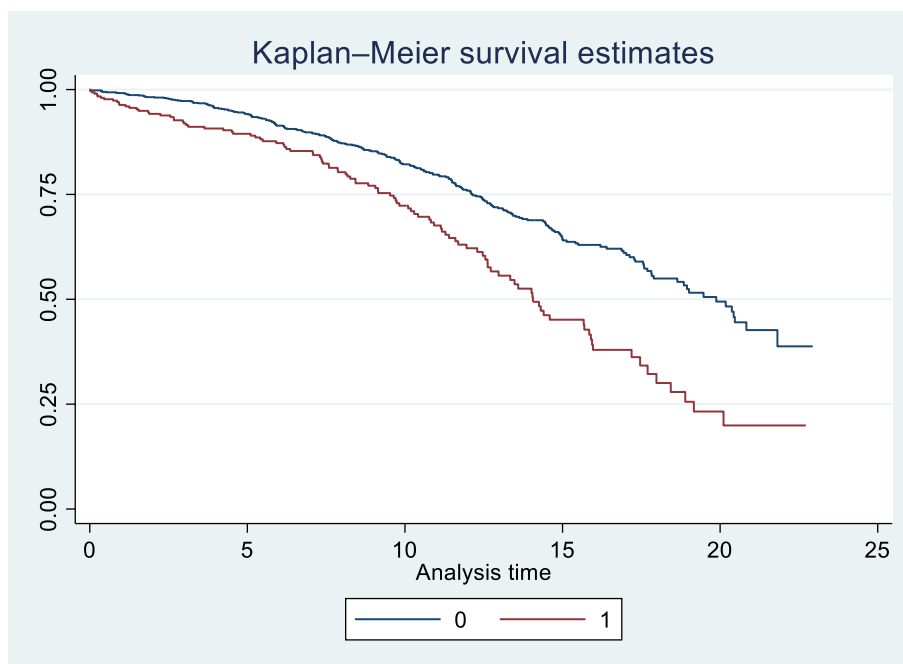


Fig. 4.8. Sopravvivenza delle popolazioni IGF (0) e DGF (1)

| | IGF, % | IC 95% | DGF, % | IC 95% |
|---------|--------|-----------|--------|-----------|
| 1 anno | 99,1 | 98,3-99,5 | 96,3 | 93,4-97,9 |
| 5 anni | 94,1 | 92,4-95,5 | 89,4 | 85,1-92,5 |
| 10 anni | 82,1 | 79,2-84,7 | 72,3 | 65,7-77,8 |
| 15 anni | 64,5 | 59,5-68,1 | 45,1 | 36,3-53,5 |
| 20 anni | 49,4 | 42,8-55,7 | 19,9 | 10,5-31,4 |

Tab. 4.25. Sopravvivenza a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nelle sottopopolazioni IGF e DGF

L'analisi comparativa della sopravvivenza dei pazienti nelle sottopopolazioni dei riceventi da donatore vivente (LD) e da donatore deceduto (DBD e DCD) ha documentato una sopravvivenza significativamente maggiore per la popolazione dei riceventi da LD a tutti i tempi considerati (Fig. 4.9) (Tab. 4.26).

Il rischio sulla sopravvivenza di ricevere un rene da donatore deceduto rispetto al vivente è stato calcolato con il modello di Cox-Breslow, che ha documentato un HR di 2,48 ($p = 0,011$; IC 95% = 1,22-5,01).

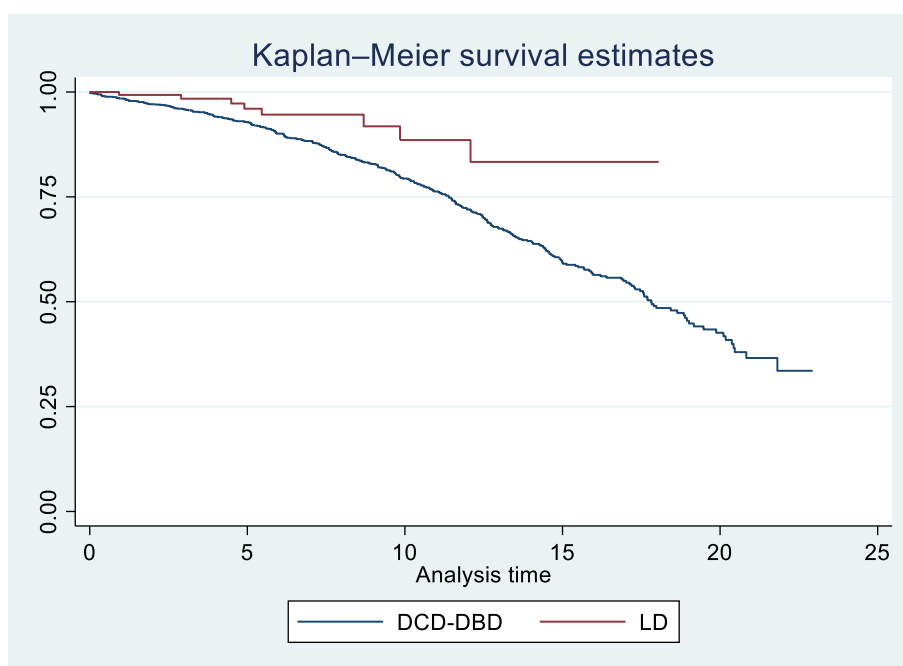


Fig. 4.9. Sopravvivenza delle popolazioni di riceventi da LD e da DBD/DCD

| | LD, % | IC 95% | DBD/DCD, % | IC 95% |
|---------|-------|------------|------------|-----------|
| 1 anno | 99,3 | 95,1-99,9 | 98,4 | 97,5-99 |
| 5 anni | 96 | 89,4-98,5 | 92,8 | 91,1-94,2 |
| 10 anni | 88,5 | 74,9-94,99 | 79,3 | 76,5-81,8 |
| 15 anni | 83,3 | 64,7-92,6 | 59 | 54,9-62,9 |
| 20 anni | / | / | / | / |

Tab. 4.26. Sopravvivenza a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nelle sottopopolazioni di riceventi da LD e da DBD/DCD. La sopravvivenza a 20 anni dei riceventi da DBD/DCD è omessa, poiché non è possibile il confronto con il dato dei riceventi da LD (tempo massimo = 18 anni)

L'analisi della sopravvivenza dei pazienti nelle sottopopolazioni dei riceventi da donatore standard-criteria (SCD) e da donatore expanded-criteria (ECD) ha documentato una sopravvivenza significativamente maggiore per la popolazione dei riceventi da SCD a tutti i tempi considerati (Fig. 4.10) (Tab. 4.27). Il rischio sulla sopravvivenza di ricevere un rene da ECD rispetto a SCD è stato calcolato con il modello di Cox-Breslow, che ha documentato un HR di 3,98 ($p < 0,0001$; IC 95% = 3,12-5).

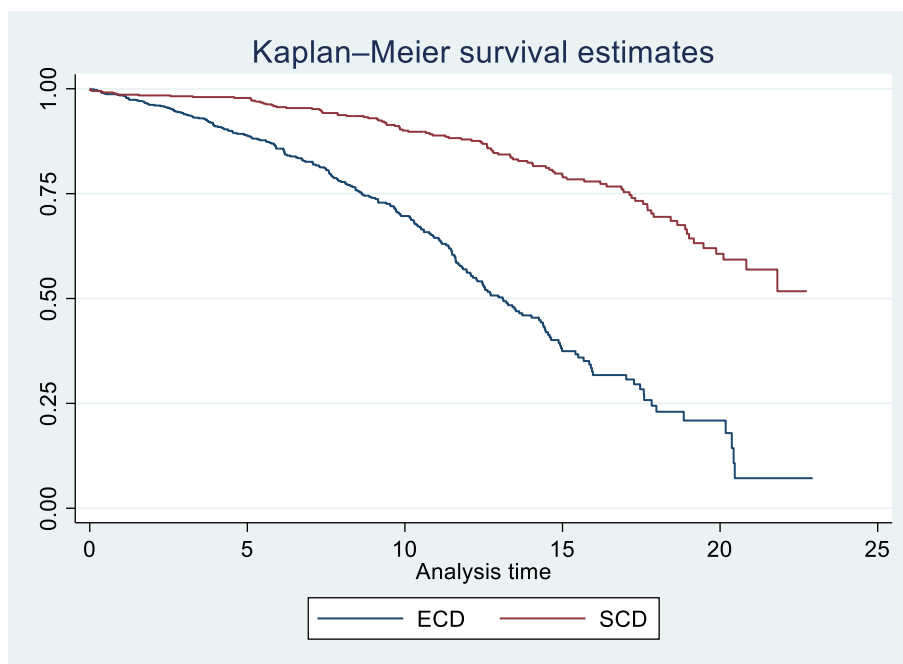


Fig. 4.10. Sopravvivenza delle popolazioni di riceventi da SCD e da ECD

| | SCD, % | IC 95% | ECD, % | IC 95% |
|---------|--------|-----------|--------|-----------|
| 1 anno | 98,6 | 97,2-99,3 | 98,4 | 97,1-99,1 |
| 5 anni | 97,8 | 96,1-98,7 | 88,8 | 86,1-91,2 |
| 10 anni | 90 | 86,7-92,5 | 69,7 | 65,2-73,6 |
| 15 anni | 78,8 | 73,9-83 | 37,4 | 31,3-43,5 |
| 20 anni | 60,6 | 52,3-68 | 17,9 | 10,3-27,1 |

Tab. 4.27. Sopravvivenza a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nelle sottopopolazioni di riceventi da SCD e da ECD

L'analisi della sopravvivenza dei pazienti nelle sottopopolazioni dei riceventi da donatore vivente (LD), da donatore deceduto IGF e da donatore deceduto DGF ha documentato una sopravvivenza significativamente maggiore per la popolazione dei riceventi da LD a tutti i tempi considerati (Fig. 4.11) (Tab. 4.28). Il rischio sulla sopravvivenza di ricevere un rene da donatore deceduto IGF e DGF rispetto a LD è stato calcolato con il modello di Cox-Breslow, che ha documentato HR di 2,1 ($p = 0,038$; IC 95% = 1-4,2) e 3,8 ($p < 0,0001$; IC 95% = 1,8-7,8), rispettivamente.

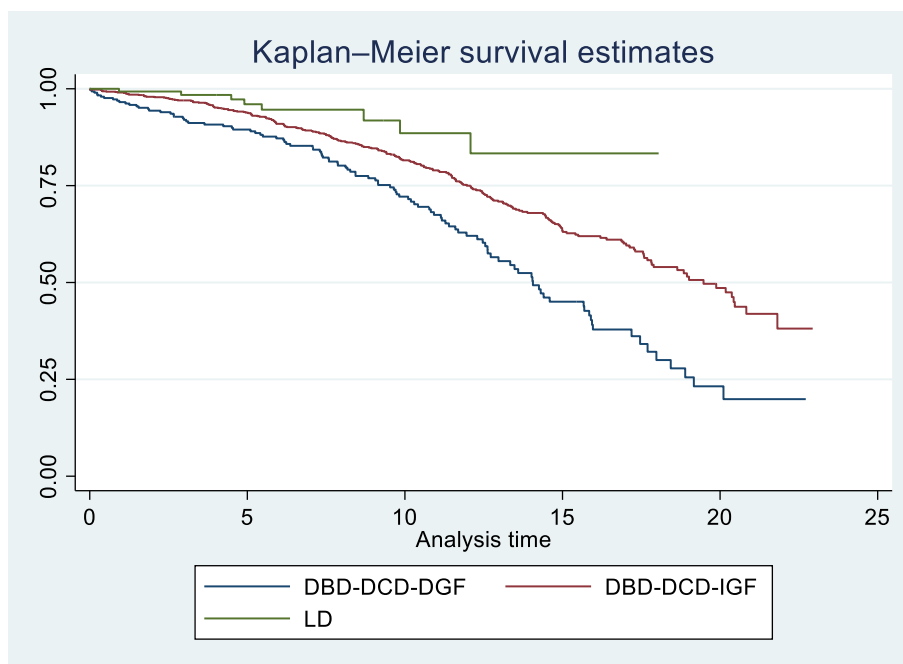


Fig. 4.11. Sopravvivenza delle popolazioni di riceventi da LD, da deceduto IGF e da deceduto DGF

| | LD, % | IC 95% | DBD/DCD IGF, % | IC 95% | DBD/DCD DGF, % | IC 95% |
|---------|-------|------------|-------------------|-----------|-------------------|-----------|
| 1 anno | 99,3 | 95,1-99,9 | 98,9 | 98-99,4 | 96,5 | 93,6-98,1 |
| 5 anni | 96 | 89,4-98,5 | 93,8 | 92-95,2 | 89,4 | 85-92,6 |
| 10 anni | 88,5 | 74,9-94,99 | 81,5 | 78,4-84,2 | 72,1 | 65,4-77,7 |
| 15 anni | 83,3 | 64,7-92,6 | 63 | 58,4-67,3 | 45 | 36,2-53,4 |
| 20 anni | / | / | / | / | / | / |

Tab. 4.28. Sopravvivenza a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nelle sottopopolazioni di riceventi da LD, da deceduto IGF e da deceduto DGF. La sopravvivenza a 20 anni dei riceventi da deceduti IGF e da deceduti DGF è omessa, poiché non è possibile il confronto con il dato dei riceventi da LD (tempo massimo = 18 anni).

L'analisi della sopravvivenza dei pazienti nelle sottopopolazioni dei riceventi da donatore SCD-IGF, SCD-DGF, ECD-IGF e ECD-DGF ha documentato una sopravvivenza significativamente maggiore per la popolazione dei riceventi da SCD-IGF a tutti i tempi considerati (Fig. 4.12) (Tab. 4.29; Tab 4.30). Il rischio sulla sopravvivenza di ricevere un rene da donatore SCD-DGF, ECD-IGF e ECD-DGF rispetto a SCD-IGF stato calcolato con il modello di Cox-Breslow, che ha documentato HR di 2 (p = 0,001; IC 95% = 1,3-3,2), 4,2 (p < 0,0001; IC 95% = 3,2-5,6), 6,1 (p < 0,0001; IC 95% = 4,3-8,4), rispettivamente.

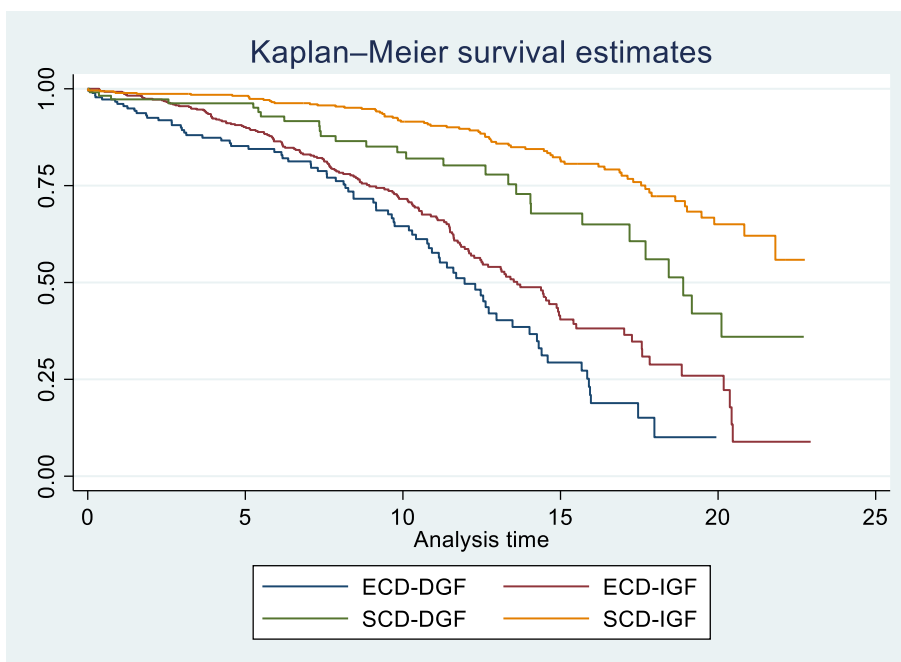


Fig. 4.12. Sopravvivenza delle popolazioni di riceventi da SCD e ECD in base all'evento DGF

| | SCD IGF, % | SCD DGF, % | ECD IGF, % | ECD DGF, % |
|---------|------------|------------|------------|------------|
| 1 anno | 98,9 | 97,2 | 99,2 | 96,1 |
| 5 anni | 98,1 | 96,2 | 90,1 | 85,2 |
| 10 anni | 91,5 | 83,6 | 71,5 | 63,4 |
| 15 anni | 81,2 | 67,8 | 40,4 | 29,3 |
| 20 anni | / | / | / | / |

Tab. 4.29. Sopravvivenza a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nelle sottopopolazioni di riceventi da SCD e da ECD, in base all'evento DGF. La sopravvivenza a 20 anni è omessa, poiché non è possibile un confronto con il dato dei riceventi da ECD DGF (tempo massimo = 19 anni)

| | SCD IGF, IC 95% | SCD DGF, IC 95% | ECD IGF, IC 95% | ECD DGF, IC 95% |
|---------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 anno | 97,4-99,5 | 91,7-99,1 | 97,9-99,7 | 91,9-98,1 |
| 5 anni | 96,3-99 | 90-98,5 | 86,9-92,5 | 78,7-89,8 |
| 10 anni | 88-94 | 73,6-90 | 66,4-76 | 54,1-71,3 |
| 15 anni | 75,8-85,5 | 53,3-78,5 | 32,9-47,8 | 19,1-40,2 |
| 20 anni | 55,8-72,7 | 17,9-54,4 | 12,5-33,6 | / |

Tab. 4.30. Intervalli di confidenza al 95% in riferimento alla Tab 4.26

4.9 Analisi della sopravvivenza dei graft

L'analisi della sopravvivenza cumulativa dei graft secondo Kaplan-Meier è stata eseguita sulla popolazione generale dei sottoposti a trapianto renale nel periodo 4/11/1998-31/12/2021 (Fig. 4.13) e sulle sottopopolazioni selezionate (cfr. 3.2), considerando anche le suddivisioni delle popolazioni secondo la variabile DGF o IGF.

Per ogni analisi sono riportate le percentuali di graft funzionanti a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nella popolazione di riferimento.

L'analisi della sopravvivenza dei graft della popolazione generale dei riceventi trapianto ha documentato sopravvivenze di 97,8%, 92,3%, 81,2%, 70,1% e 59,4% (Tab. 4.31).

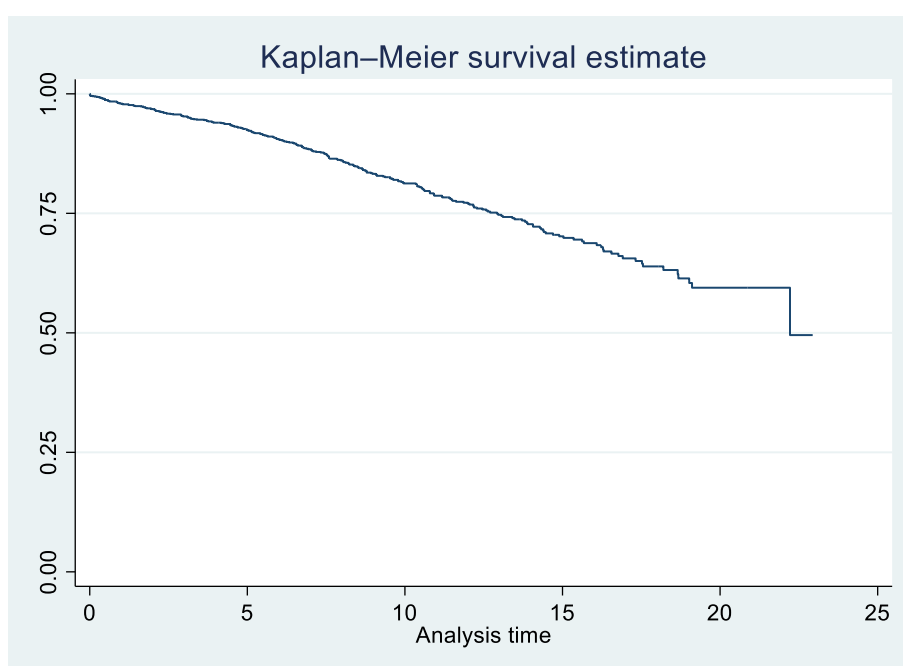


Fig. 4.13. Sopravvivenza del graft nella popolazione generale

| | % | IC 95% |
|---------|------|-----------|
| 1 anno | 97,8 | 96,9-98,5 |
| 5 anni | 92,3 | 90,7-93,7 |
| 10 anni | 81,2 | 78,6-83,6 |
| 15 anni | 70,1 | 66,4-73,6 |
| 20 anni | 59,4 | 53,5-64,8 |

Tab. 4.31. Sopravvivenza del graft a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni

L'analisi comparativa della sopravvivenza dei graft nelle popolazioni IGF e DGF ha documentato una sopravvivenza significativamente maggiore nel gruppo IGF a tutti i tempi considerati (Fig. 4.14) (Tab. 4.32).

Il rischio di DGF per la sopravvivenza del graft è stato calcolato con il modello di Cox-Breslow, che ha documentato un Hazard Ratio (HR) di 2,21 ($p < 0,0001$; IC 95% = 1,7-2,85).

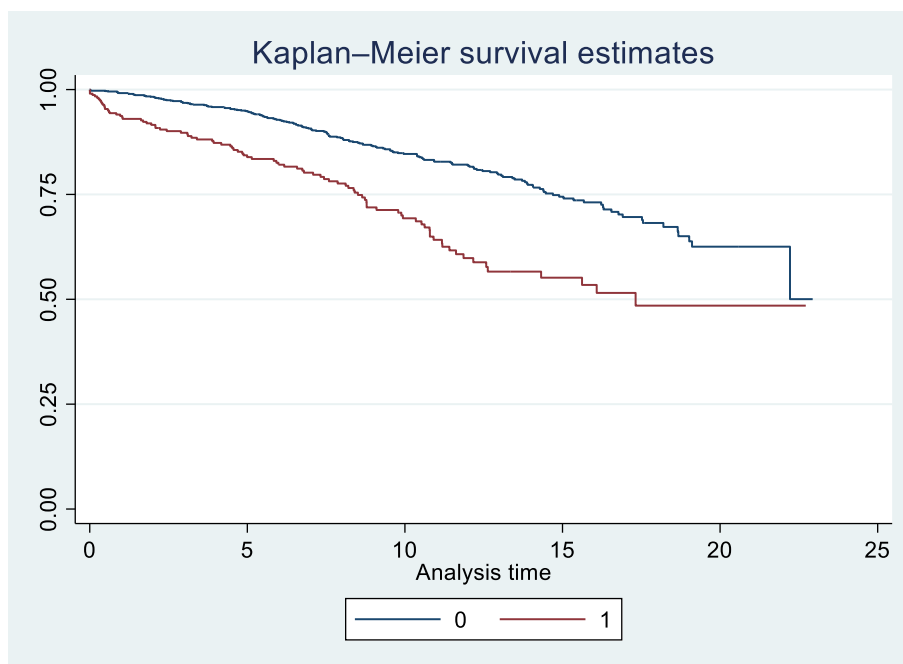


Fig. 4.14. Sopravvivenza del graft nelle popolazioni IGF (0) e DGF (1)

| | % IGF | IC 95% | % DGF | IC 95% |
|---------|-------|-----------|-------|-----------|
| 1 anno | 99,1 | 98,3-99,5 | 93,3 | 89,8-95,6 |
| 5 anni | 94,7 | 93,1-95,9 | 83,9 | 78,9-87,7 |
| 10 anni | 84,6 | 81,8-87 | 69,3 | 62,5-75 |
| 15 anni | 74,4 | 70,2-78,1 | 55,1 | 46,6-62,8 |
| 20 anni | 62,5 | 55,4-68,8 | 48,4 | 37,9-58,2 |

Tab. 4.32. Sopravvivenza del graft a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nelle popolazioni IGF e DGF

L'analisi comparativa della sopravvivenza del graft nelle sottopopolazioni dei riceventi da donatore vivente (LD) e da donatore deceduto (DBD e DCD) ha documentato una sopravvivenza significativamente maggiore per la popolazione dei riceventi da LD a tutti i tempi considerati (Fig. 4.15) (Tab. 4.33).

Il rischio sulla sopravvivenza di ricevere un rene da donatore deceduto rispetto al vivente è stato calcolato con il modello di Cox-Breslow, che ha documentato un HR di 2 ($p = 0,04$; IC 95% = 1-3,9).

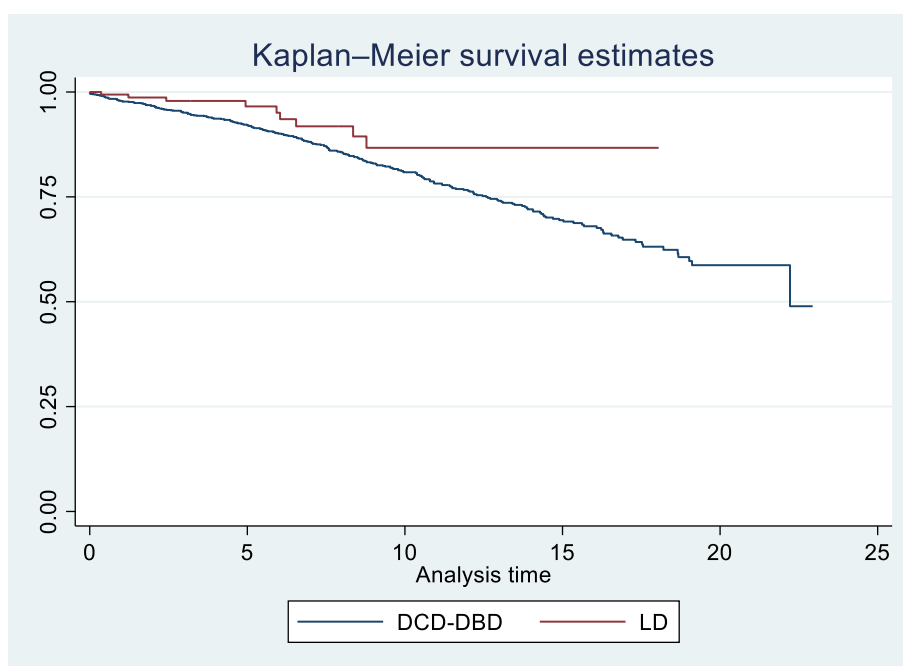


Fig. 4.15. Sopravvivenza del graft nelle popolazioni IGF (0) e DGF (1)

| | LD, % | IC 95% | DBD/DCD, % | IC 95% |
|---------|-------|-----------|------------|-----------|
| 1 anno | 99,3 | 95,7-99,9 | 97,8 | 96,9-98,5 |
| 5 anni | 96,5 | 90,6-98,7 | 92 | 90,2-93,4 |
| 10 anni | 86,7 | 74,3-93,3 | 80,8 | 78,1-83,3 |
| 15 anni | 86,7 | 74,3-93,3 | 69,4 | 65,5-72,9 |
| 20 anni | / | / | / | / |

Tab. 4.33. Sopravvivenza del graft a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nelle sottopopolazioni di riceventi da LD e da DBD/DCD. La sopravvivenza a 20 anni dei riceventi da DBD/DCD è omessa, poiché non è possibile il confronto con il dato dei riceventi da LD (tempo massimo = 18 anni)

L'analisi della sopravvivenza del graft nelle sottopopolazioni dei riceventi da donatore standard-criteria (SCD) e da donatore expanded-criteria (ECD) ha documentato una sopravvivenza significativamente maggiore per la popolazione dei riceventi da SCD a tutti i tempi considerati (Fig. 4.16) (Tab. 4.34). Il rischio sulla sopravvivenza di ricevere un rene da ECD rispetto a SCD è stato calcolato con il modello di Cox-Breslow, che ha documentato un HR di 2,04 ($p < 0,0001$; IC 95% = 1,5-2,6).

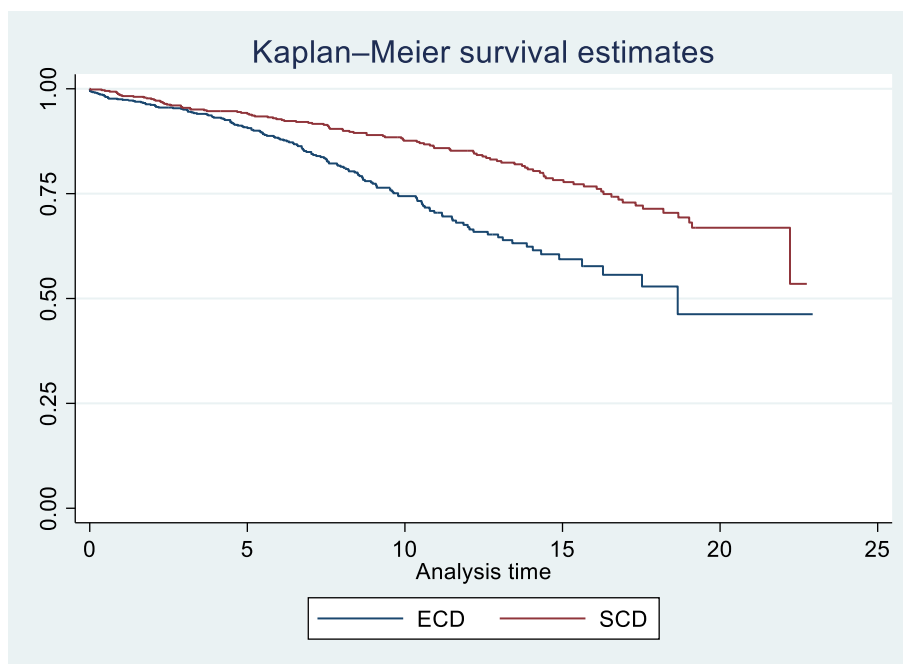


Fig. 4.16. Sopravvivenza del graft nelle popolazioni di riceventi da SCD e da ECD

| | SCD, % | IC 95% | ECD, % | IC 95% |
|---------|--------|------------|--------|-----------|
| 1 anno | 98,4 | 97-99,1 | 97,5 | 96-98,4 |
| 5 anni | 94 | 91,6-95,76 | 90,6 | 88-92,7 |
| 10 anni | 87,6 | 84,2-90,3 | 74,4 | 69,9-78,3 |
| 15 anni | 78,2 | 73,4-82,2 | 59,3 | 52,6-65,4 |
| 20 anni | 66,8 | 59,6-73,1 | 46,2 | 31,4-59,8 |

Tab 4.34. Sopravvivenza del graft a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nelle sottopopolazioni di riceventi da SCD e da ECD

L'analisi della sopravvivenza del graft nelle sottopopolazioni dei riceventi da donatore vivente (LD), da donatore deceduto IGF e da donatore deceduto DGF ha documentato una sopravvivenza significativamente maggiore per la popolazione dei riceventi da LD a tutti i tempi considerati (Fig. 4.17) (Tab. 4.35). Il rischio sulla sopravvivenza di ricevere un rene da donatore deceduto IGF e DGF rispetto a LD è stato calcolato con il modello di Cox-Breslow, che ha documentato HR di 1,6 ($p = 0,155$; IC 95% = 0,83-3,19) e 6,8 ($p < 0,0001$; IC 95% = 1,72-6,8), rispettivamente.

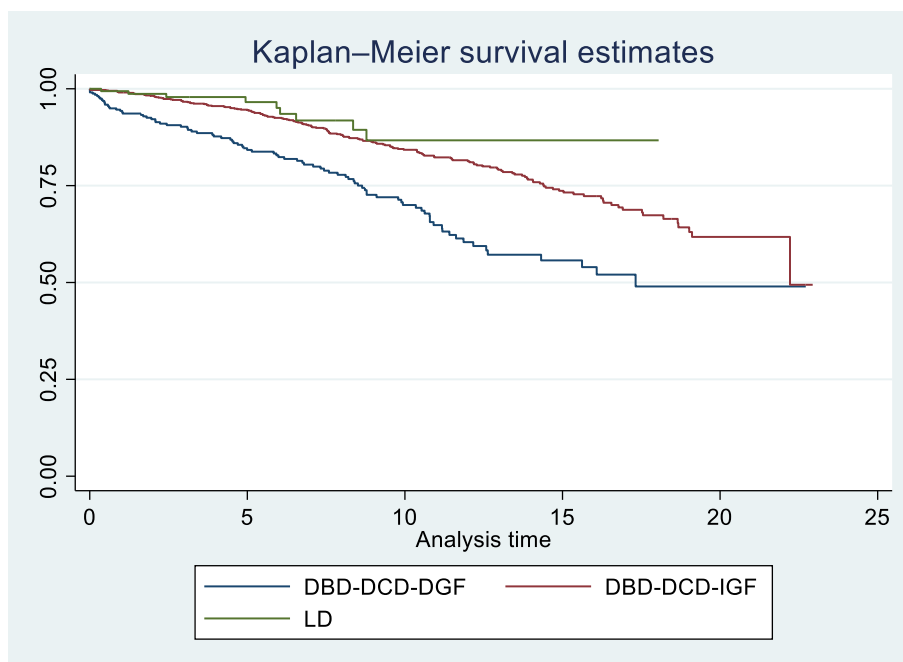


Fig. 4.17. Sopravvivenza delle popolazioni di riceventi da LD, da deceduto IGF e da deceduto DGF

| | LD, % | IC 95% | DBD/DCD IGF, % | IC 95% | DBD/DCD DGF, % | IC 95% |
|---------|-------|-----------|-------------------|-----------|-------------------|-----------|
| 1 anno | 99,3 | 95,7-99,9 | 99 | 98,1-99,5 | 94,2 | 91-96,3 |
| 5 anni | 96,5 | 90,6-98,7 | 94,4 | 92,6-95,8 | 84,2 | 79,2-88,1 |
| 10 anni | 86,7 | 74,3-93,3 | 84,2 | 81,5-86,8 | 70 | 63,2-75,7 |
| 15 anni | 86,7 | 74,3-93,3 | 73,6 | 69,3-77,4 | 55,7 | 47,5-63,4 |
| 20 anni | / | / | / | / | / | / |

Tab. 4.35. Sopravvivenza a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nelle sottopopolazioni di riceventi da LD, da deceduto IGF e da deceduto DGF. La sopravvivenza a 20 anni dei riceventi da deceduti IGF e da deceduti DGF è omessa, poiché non è possibile il confronto con il dato dei riceventi da LD (tempo massimo = 18 anni).

L'analisi della sopravvivenza del graft nelle sottopopolazioni dei riceventi da donatore SCD-IGF, SCD-DGF, ECD-IGF e ECD-DGF ha documentato una sopravvivenza significativamente maggiore per la popolazione dei riceventi da SCD-IGF a tutti i tempi considerati (Fig. 4.18) (Tab. 4.36; Tab 4.37). Il rischio sulla sopravvivenza di ricevere un rene da donatore SCD-DGF, ECD-IGF e ECD-IGF rispetto a LD stato calcolato con il modello di Cox-Breslow, che ha documentato HR di 1,9 ($p = 0,003$; IC 95% = 1,25-2,99), 1,8 ($p < 0,0001$; IC 95% = 1,38-2,6), 3,9 ($p < 0,0001$; IC 95% = 2,75-5,53), rispettivamente.

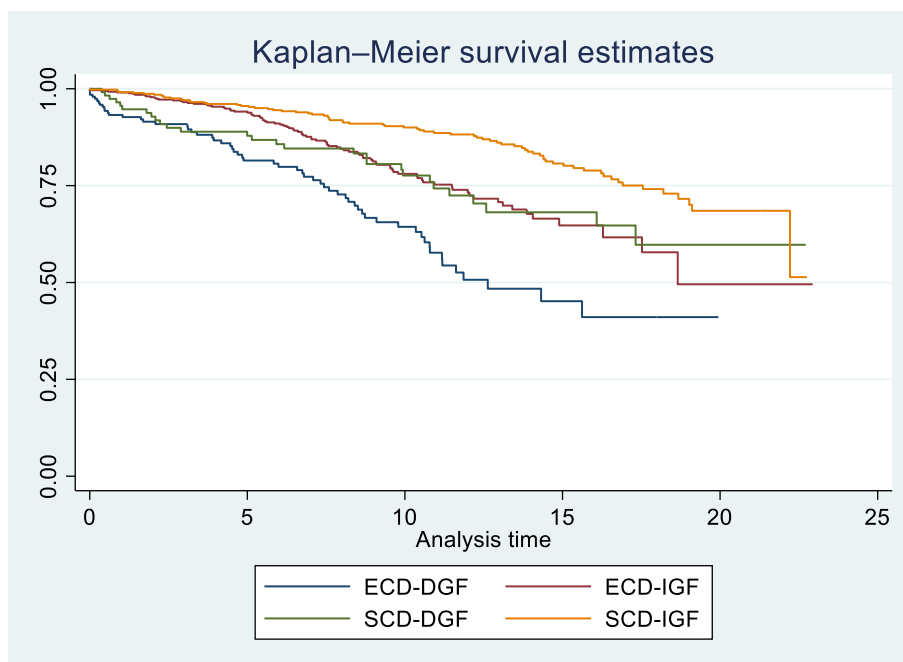


Fig. 4.18. Sopravvivenza del graft di riceventi da SCD-IGF, SCD-DGF, ECD-IGF e ECD-DGF

| | SCD IGF, % | SCD DGF, % | ECD IGF, % | ECD DGF, % |
|---------|------------|------------|------------|------------|
| 1 anno | 99,1 | 95,6 | 99 | 93,2 |
| 5 anni | 95,5 | 86,8 | 93,8 | 81,4 |
| 10 anni | 90 | 77,6 | 78 | 43,9 |
| 15 anni | 80,7 | 68,1 | 64,7 | 45,1 |
| 20 anni | / | / | / | / |

Tab. 4.36. Sopravvivenza del graft a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni nelle sottopopolazioni di riceventi da SCD e da ECD, in base all'evento DGF. La sopravvivenza a 20 anni è omessa, poiché non è possibile un confronto con il dato dei riceventi da ECD DGF (tempo massimo = 19 anni)

| | SCD IGF, IC 95% | SCD DGF, IC 95% | ECD IGF, IC 95% | ECD DGF, IC 95% |
|---------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 anno | 97,7-99,6 | 89,7-98,1 | 97,7-99,6 | 88,6-96 |
| 5 anni | 93,1-97,1 | 78,7-91,9 | 91,1-95,7 | 74,4-86,7 |
| 10 anni | 86,4-92,6 | 67,4-84,9 | 72,9-82,3 | 55-72,2 |
| 15 anni | 75,5-84,9 | 55,7-77,7 | 56,6-71,7 | 22-56,5 |
| 20 anni | / | / | / | / |

Tab. 4.37. Intervalli di confidenza al 95% in riferimento alla Tab 4.26

4.10 Analisi dell'efficacia della perfusione renale

L'analisi dei livelli di creatinina e dei lattati nei campioni di perfusato raccolti a 4h ore per il primo rene in HMP standard ed a 2h per i reni in HMP senza e con PerSorb[®], ha documentato valori di creatinina e di lattati minori nei reni perfusi per 2h rispetto ai reni perfusi per 4h; inoltre, i valori del rene in HMP con PerSorb[®] sono risultati minori rispetto al rene in HMP standard (Fig. 4.19).

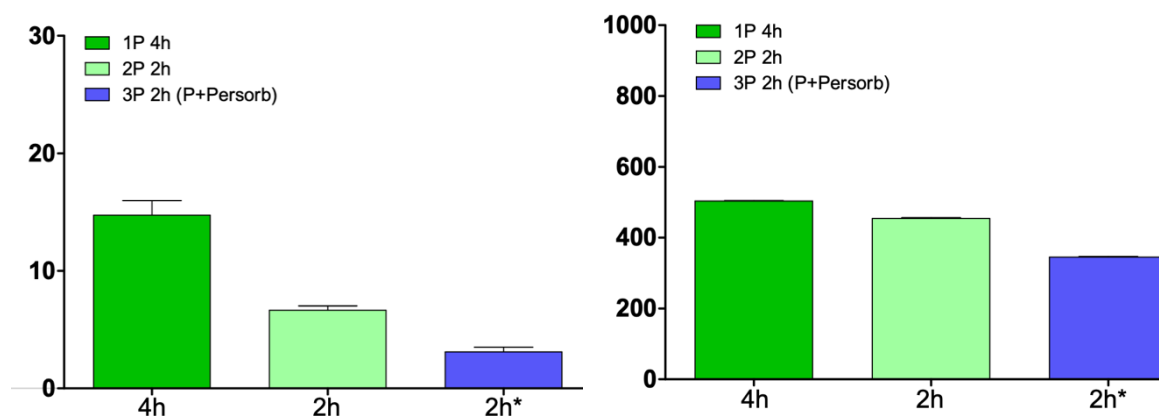


Fig. 4.19. Valori di creatinina e lattati del perfusato espressi in microM

L'esame istologico eseguito con colorazione ematossilina-eosina (Fig. 4.20) ha documentato una sovrapposizione dei segni classici di danno tubulare (necrosi, vacuolizzazione isometrica, infiltrato infiammatorio, presenza di casts, etc.) tra reni non perfusi e quelli perfusi in ipotermia indipendentemente dalla presenza del sorbente. Tuttavia, è possibile che una differenza in termini istologici possa essere osservata con altri staining specifici, ad esempio per valutare alterazioni tipiche di senescenza e disfunzione mitocondriale.

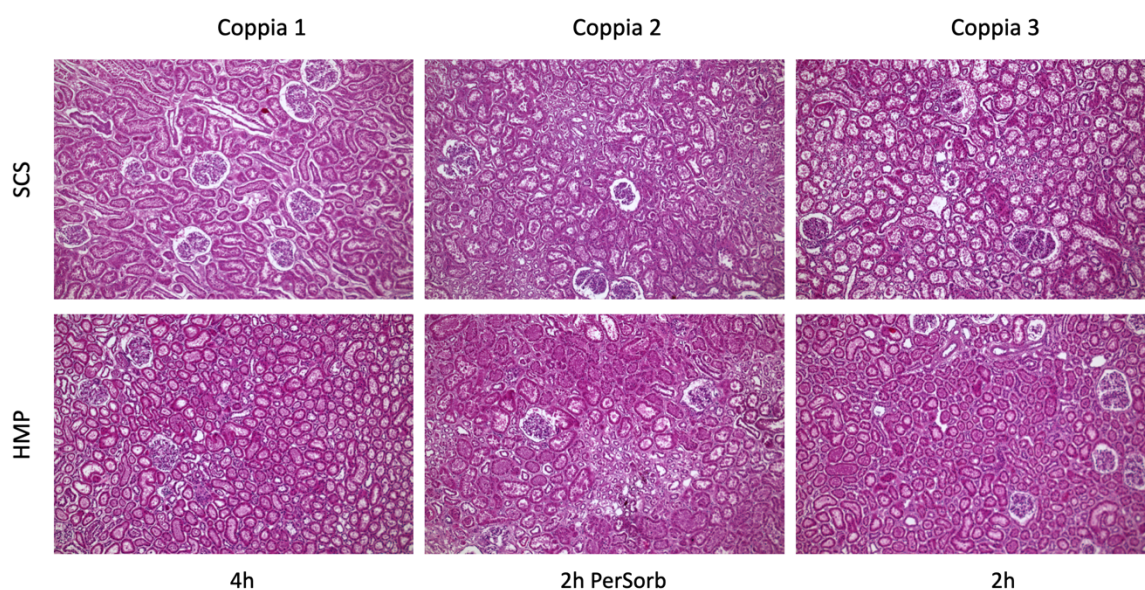


Fig. 4.20. Esame istologico con colorazione EE di tutti i campioni

L'analisi dell'espressione di mRNA di NGAL, marcatore di danno tubulare, è risultata essere minore nelle tre coppie di reni perfusi rispetto alle tre coppie di reni perfusi. Inoltre, l'espressione dell'mRNA di NGAL del rene perfuso con PerSorb® è risultata minore rispetto ai reni perfusi con HMP standard (Fig. 4.21)

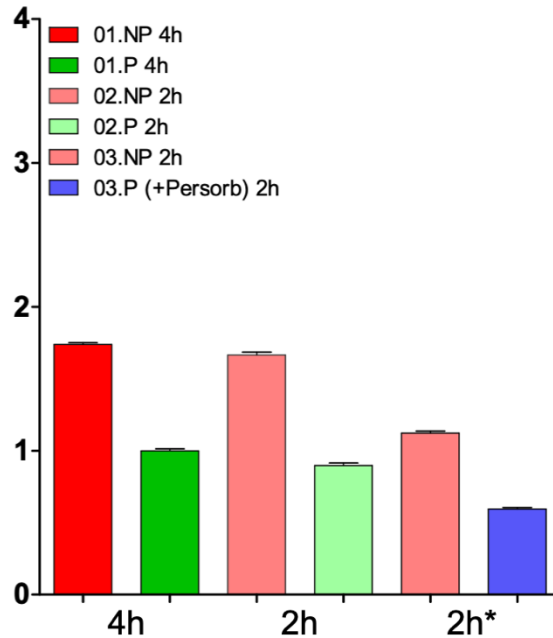


Fig. 4.21. Espressione dell'mRNA di NGAL di tutti i campioni

L'analisi del metabolismo mitocondriale dei campioni ha documentato livelli di attività della catena di trasporto degli elettroni (ETC) e di ATP (Fig. 4.22) maggiori nei reni sottoposti a HMP rispetto a quelli sottoposti a SCS; inoltre, i risultati sono stati maggiori nel rene sottoposto a perfusione con PerSorb®.

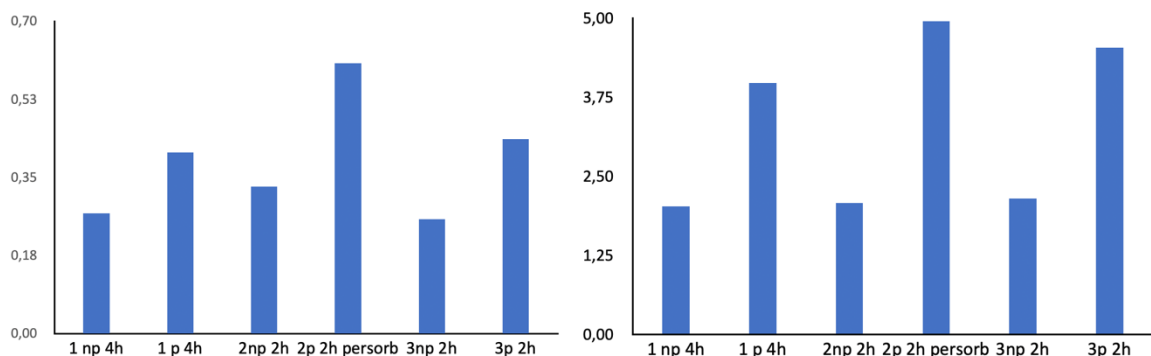


Fig. 4.22. Attività della ETC espressa in nmol red cit c/min/mg prot e livelli di ATP espressi in nmol/mg prot in tutti i campioni

L'analisi dell'attività degli enzimi mitocondriali del ciclo di Krebs inclusi nello studio, ovvero α -chetoglutarato-deidrogenasi (Fig. 4.23), succinato-deidrogenasi (Fig. 4.24), malato-deidrogenasi (Fig. 4.25) e citrato-sintasi (Fig. 4.26), ha documentato livelli di attività maggiori nel rene perfuso con PerSorb[®] rispetto ai reni non perfusi; lo stesso risultato è stato osservato anche rispetto ai reni in HMP standard.

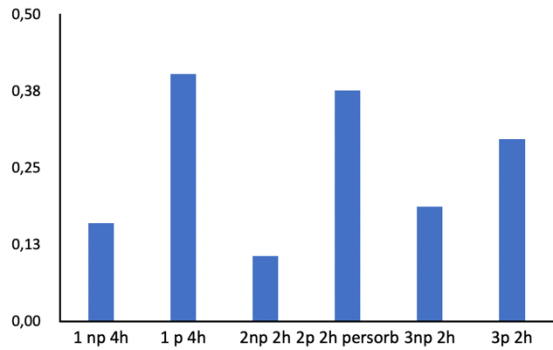


Fig. 4.23. Attività dell' α -chetoglutarato-deidrogenasi espressa in nmol NADH/min/mg prot

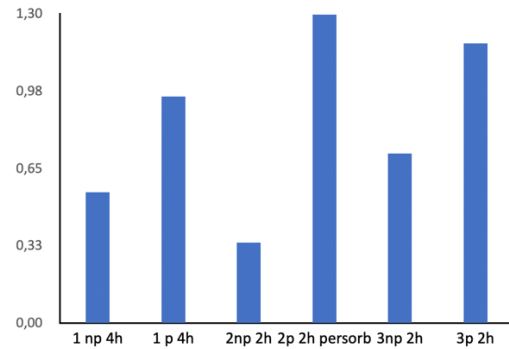


Fig. 4.24. Attività della succinato-deidrogenasi espressa in nmol FADH₂/min/mg prot

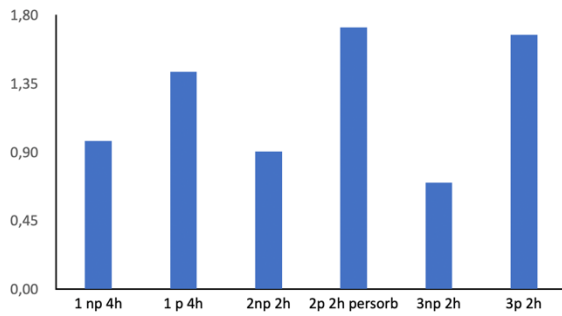


Fig.4.25. Attività della malato-deidrogenasi espressa in nmol NADH/min/mg prot

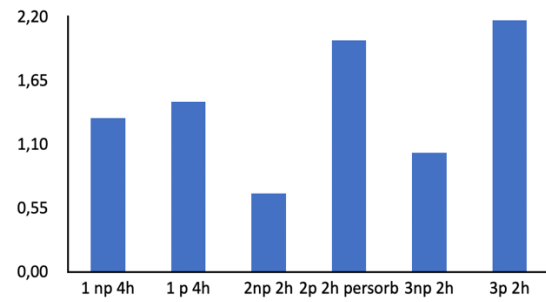


Fig. 4.26. Attività della citrato-sintasi espressa in mU/mg prot

L'analisi dei livelli di ROS mitocondriali e TBARS mitocondriali per la quantificazione dello stress ossidativo nel mitocondrio ha documentato livelli minori nei reni sottoposti a HMP rispetto a quelli sottoposti a SCS. Inoltre, lo stress ossidativo è risultato minore nel rene sottoposto a HMP con PerSorb[®] rispetto ai reni trattati con HMP standard (Fig. 4.27).

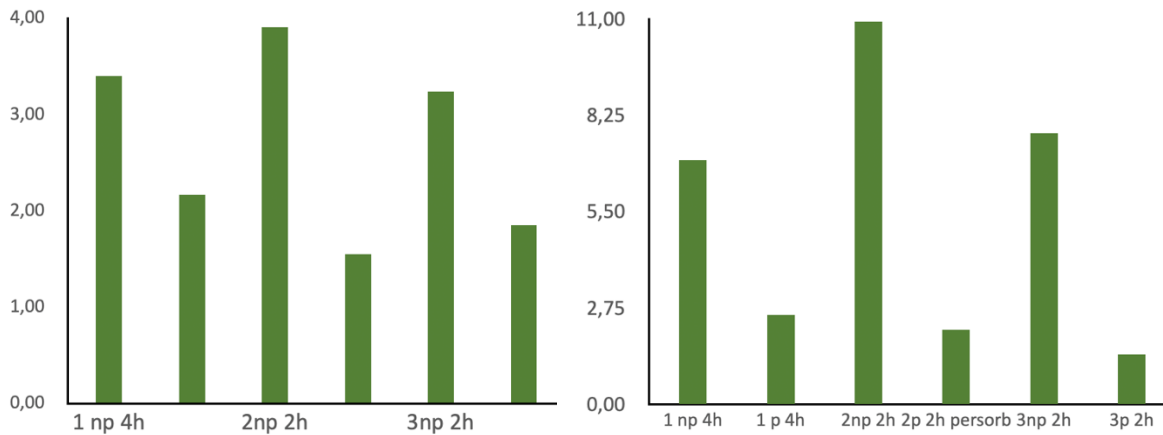


Fig. 4.27. Livelli di ROS e TBARS mitocondriali espressi in nmol/mg prot in tutti i campioni

L'analisi del potenziale di membrana mitocondriale (cfr. 1.6) eseguita con JC1 e l'analisi dell'espressione del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (mPTP) come marcatori di disfunzione mitocondriale hanno rivelato livelli minori di entrambi nei reni sottoposti a HMP rispetto a quelli sottoposti a SCS. Inoltre, il rene perfuso con PerSorb[®] ha dimostrato valori minori rispetto ai reni in HMP standard (Fig. 4.28).

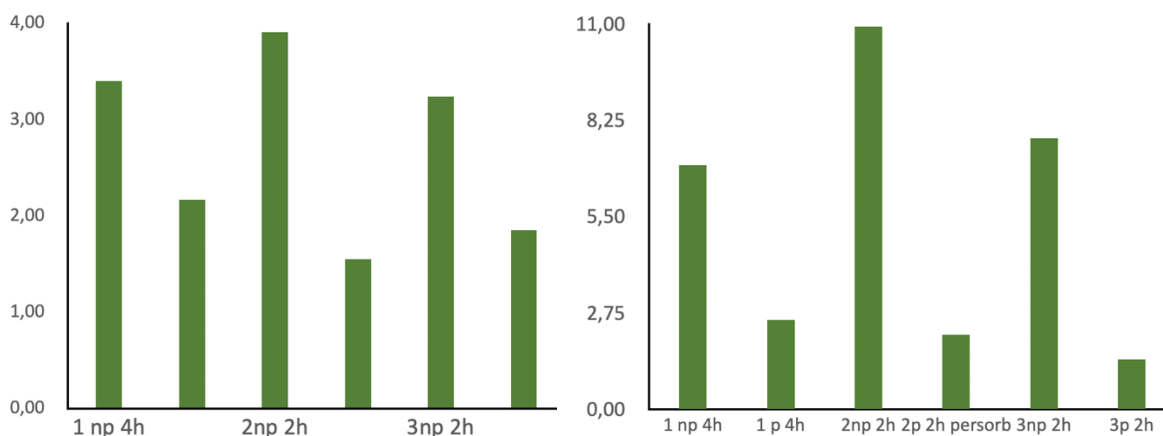


Fig. 4.28. Risultati del saggio JC1 espressi in % mitocondri green/red ed espressione di mPTP espressa in % di cellule fluorescenti.

4.11 Analisi dell'efficacia della terapia biologica con EVs

Le EPCs e le EVs derivate sono state analizzate con microscopia elettronica, Nanosight, FACS, bioanalisi degli RNA e dei miRNA con conseguente qRT-PCR degli stessi.

La microscopia confocale (Fig. 4.29) ha documentato come le EPCs siano in grado di rilasciare EVs in condizioni fisiologiche ed in presenza di particolari stimoli, ad esempio l'ipossia. Le immagini ultrastrutturali delle EVs raccolte dopo ultracentrifugazione hanno confermato le dimensioni delle stesse, successivamente valutate anche con Nanosight.

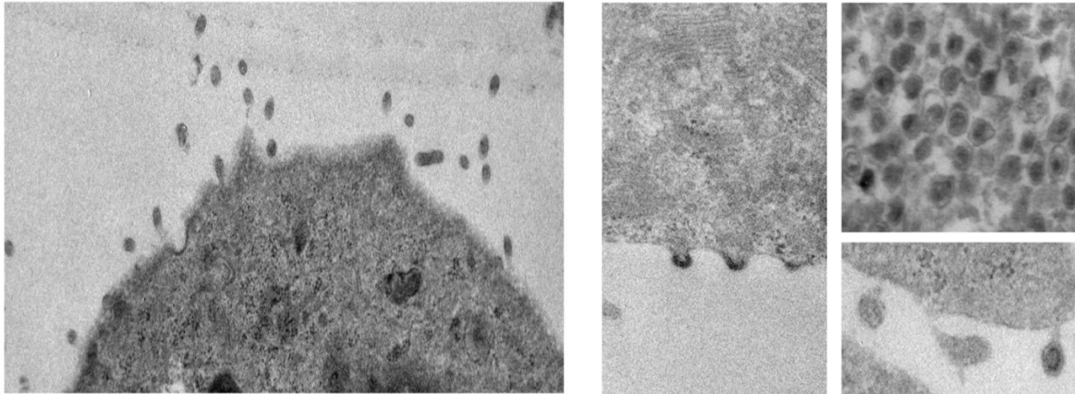


Fig. 4.29. Immagini in microscopia elettronica delle EVs di EPCs

L'analisi Nanosight ha documentato la presenza di EVs di dimensioni eterogenee appartenenti sia alla famiglia degli esosomi che a quella delle shedding vesicles, o microvescicole. La dimensione media delle EVs derivate da EPC è risultata essere 160nm (Fig. 4.30)

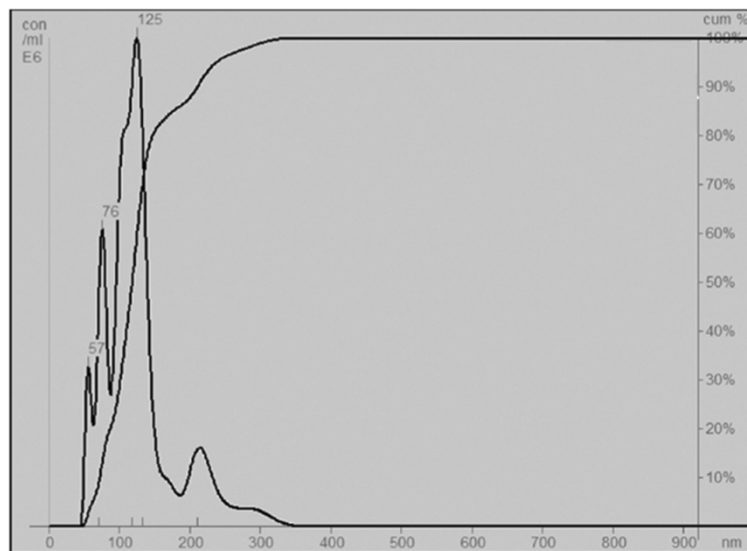


Fig. 4.30. Intensità relativa espressa in concentrazione/ml E6 su dimensioni espresse in nm rilevate all'analisi Nanosight

L'analisi FACS ha documentato la presenza, sulla superficie delle EVs derivate da EPC, di marcatori staminali come CD34 e CD133, marcatori endoteliali come CD31, molecole HLA-I e HLA-II, nonché diverse molecole appartenenti alla famiglia delle integrine e delle selectine, necessarie all'internalizzazione delle EVs nelle cellule bersaglio. L'analisi dei diversi sottotipi di RNA contenuti nelle EVs derivate da EPCs tramite Bioanalyzer ha documentato la presenza di piccoli RNA della famiglia dei miRNA, successivamente caratterizzati con qRT-PCR, che ha identificato diversi miRNA con funzione proangiogenetica, proliferativa, antiapoptotica ed antifibrotica (Fig. 4.31; Fig. 4.32).

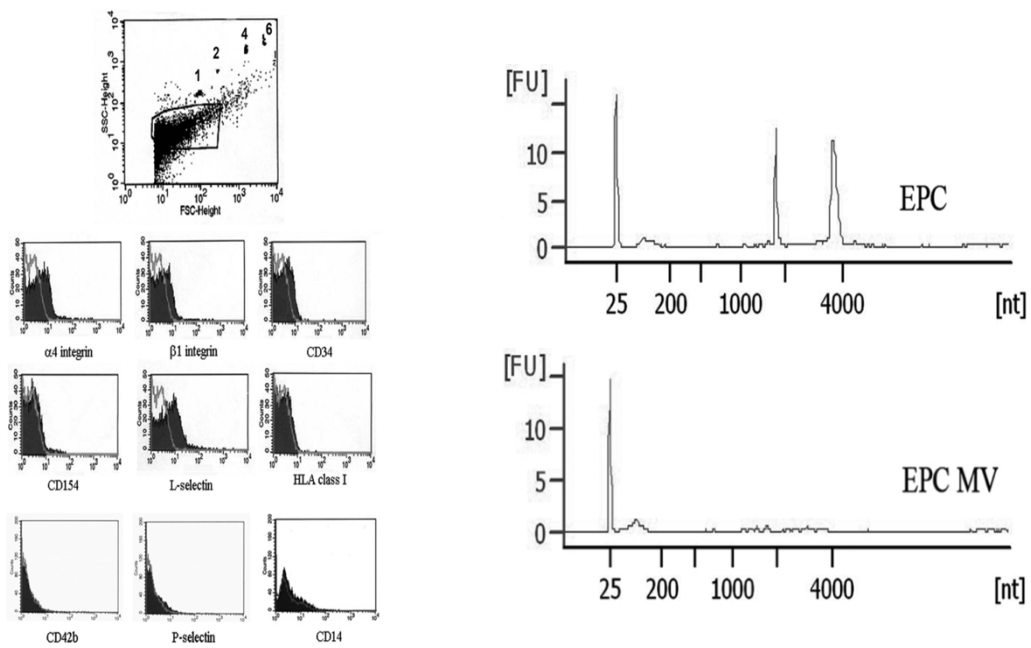


Fig. 4.31. Analisi delle molecole di superficie e degli RNA di EPCs e EVs di EPCs (FACS e Bioanalyzer)

| ANGIOGENESIS | PROLIFERATION | APOPTOSIS INHIBITION | FIBROGENESIS INHIBITION |
|--------------|---------------|----------------------|-------------------------|
| let-7a | miR-106b | let-7c | miR-192 |
| let-7b | miR-125a | miR-17-5p | miR-200a |
| let-7c | miR-125b | miR-103 | miR-200b |
| let-7d | miR-130a | miR-125a | let-7b |
| let-7e | miR-15a | miR-125b | let-7c |
| let-7f | miR-181b | miR-145 | let-7d |
| let-7g | miR-181c | miR-155 | let-7e |
| miR-126 | miR-181d | miR-181b | |
| miR-130 | miR-223 | miR-181c | |
| miR-19b | miR-23a | miR-181d | |
| miR-210 | miR-24 | miR-191 | |
| miR-296 | miR-26a | miR-21 | |
| miR-378 | miR-26b | miR-210 | |
| miR-92 | miR-27a | miR-23a | |
| | miR-31 | miR-23b | |
| | miR-484 | miR-24 | |
| | | miR-26a | |
| | | miR-26b | |
| | | miR-27a | |
| | | miR-27b | |
| | | miR-29a | |
| | | miR-30a | |
| | | miR-30b | |
| | | miR-30c | |
| | | miR-30d | |
| | | miR-30e | |
| | | miR-378 | |

Fig. 4.32. miRNA contenuti in EVs di EPCs raggruppati in base alla funzione

Sia le EPCs che le EVs derivate da EPCs esprimono mRNA per gli inibitori del complemento Fattore H, CD55 e CD59. In Fig. 4.33 sono riportate le immagini citofluorimetriche e di immunofluorescenza per Fattore H, CD55 e CD59 sulle EPCs. Gli stessi inibitori del complemento sono presenti a livello proteico sulle EVs derivate da EPCs, come rivelato dalle analisi con western blot e FACS (Fig. 4.34). Di interesse, il pretrattamento delle EVs con 1 U/ml RNasi ha ridotto i livelli di tutti i sottotipi di RNA presenti nelle EVs, limitandone di fatto l'azione biologica.

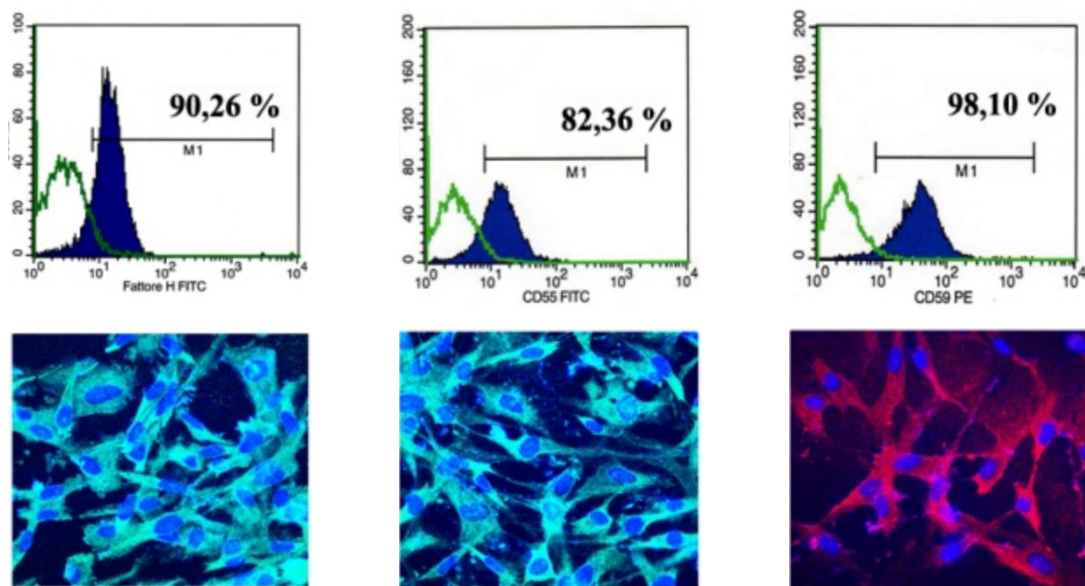


Fig. 4.33. Espressione di Fattore H, CD 55 e CD59 nelle EVs di EPCs valutata con FACS ed immunofluorescenza

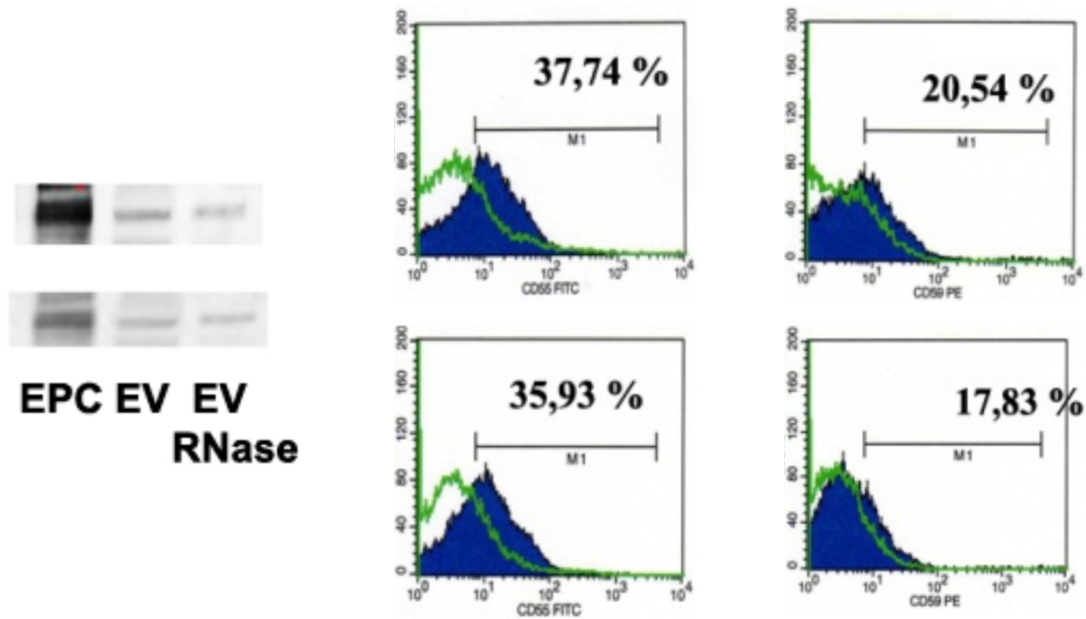


Fig. 4.34. Espressione di Fattore H, CD 55 e CD59 nelle EPCs e nelle EVs di EPCs senza e con RNasi specifiche, valutata con western blot o FACS

Infine, Fattore H, CD55 e CD59 sono presenti anche a livello genico sia nelle EPCs che nelle EVs derivate da EPCs, come confermato dall'analisi con qRT-PCR (Fig. 4.35). Tali risultati suggeriscono la possibilità che le EVs derivate da EPCs trasferiscano orizzontalmente mRNA codificanti per gli inibitori del complemento alle cellule bersaglio danneggiate.

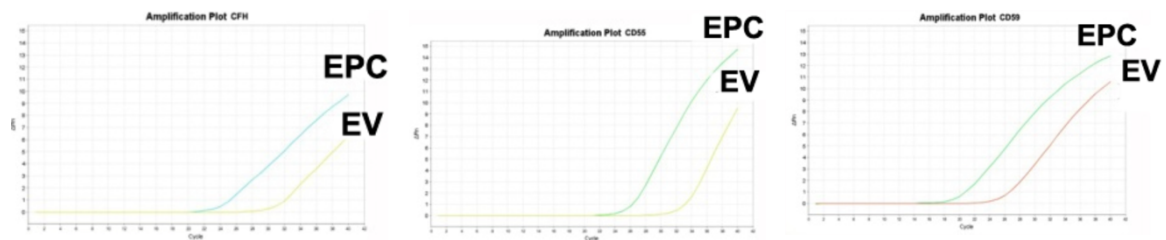


Fig. 4.35. Espressione di Fattore H, CD 55 e CD59 nelle EPC e nelle EVs di EPCs valutata con qRT-PCR

4.11.1 Effetti delle EVs di EPCs su modello di IRI in vivo

Nel modello murino di IRI (cfr. 3.7.8), l'infusione di EVs derivate da EPCs ha indotto la riduzione dell'espressione di C5b-9 (MAC) e C3 del complemento (Fig. 4.36; Fig. 4.37).

La somministrazione di RNasi specifiche ha annullato gli effetti inibitori delle EVs sull'espressione di C5b-9 e C3, definendo un quadro simile a quello osservabile nel gruppo sottoposto a IRI.

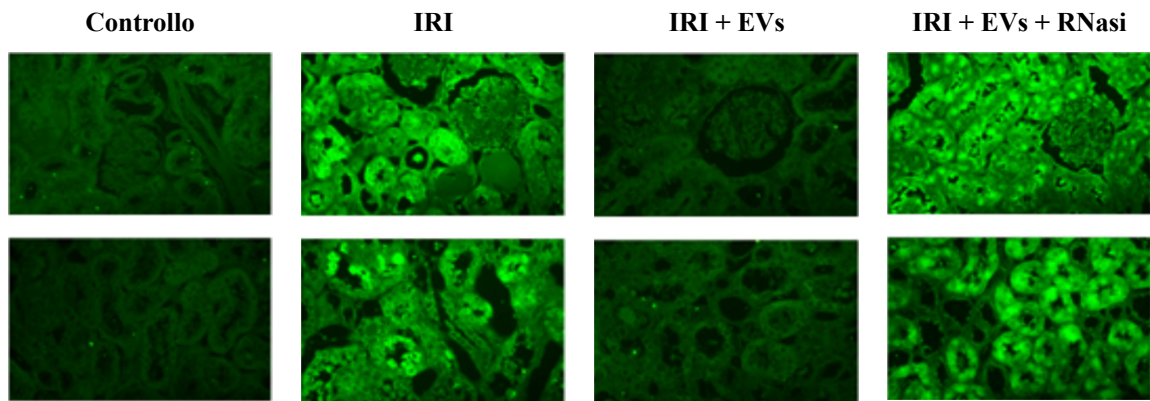


Fig. 4.36. Immagini all'immunofluorescenza dell'espressione di C5b-9 nel gruppo di controllo, nel gruppo sottoposto a IRI, nel gruppo sottoposto a IRI ed infusione di EV, nel gruppo sottoposto a IRI, infusione di EVs e RNasi specifico

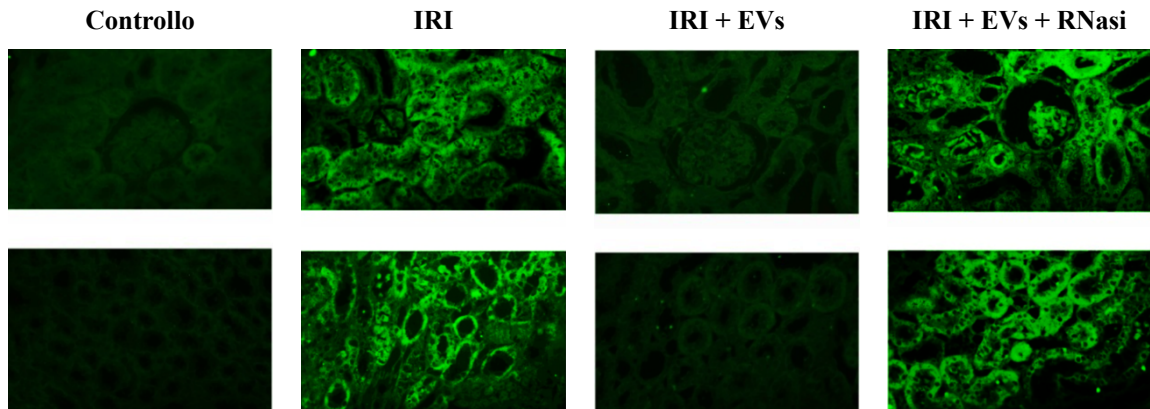


Fig. 4.37. Immagini all'immunofluorescenza dell'espressione di C3 nel gruppo di controllo, nel gruppo sottoposto a IRI, nel gruppo sottoposto a IRI ed infusione di EVs, nel gruppo sottoposto a IRI, infusione di EVs e RNasi specifico

Gli stessi risultati sono stati confermati alla quantificazione dell'intensità relativa dell'immunofluorescenza (Fig. 4.38).

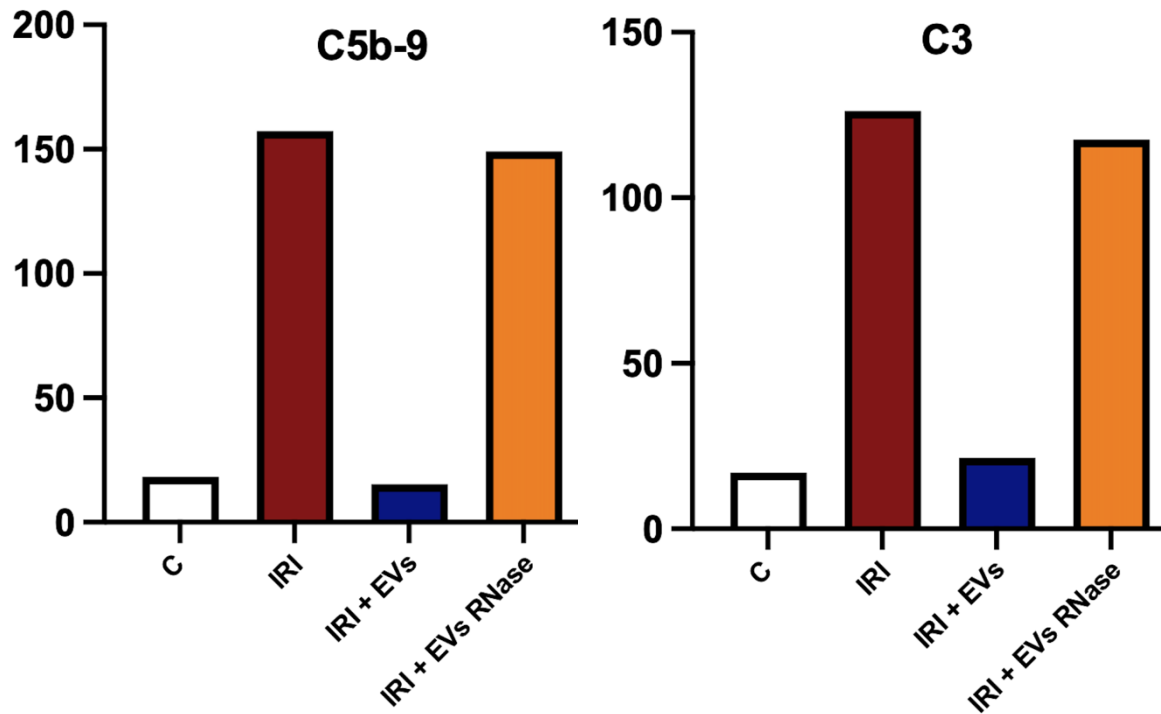


Fig. 4.38. Intensità relativa dell'immunofluorescenza in tutti i gruppi per C5b-9 e C3

Così come la riduzione dell'espressione C5b-9 e C3 del complemento, l'infusione di EVs derivate da EPC ha indotto l'aumento degli inibitori del complemento Fattore H, CD55 e CD59 (Fig. 4.39; Fig. 4.40; Fig. 4.41). La somministrazione di RNasi specifiche ha annullato gli effetti stimolatori delle EVs sull'espressione degli inibitori del complemento Fattore H, CD55 e CD59, definendo un quadro simile a quello osservabile nel gruppo sottoposto a IRI.

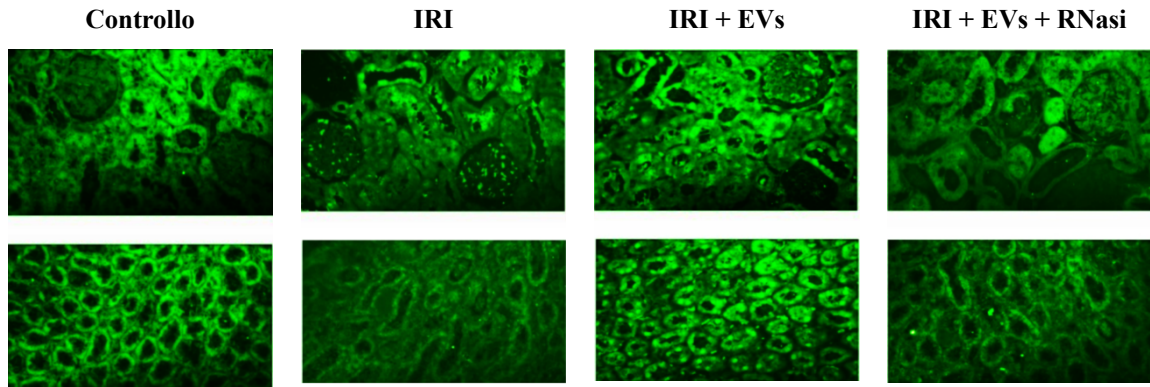


Fig. 4.39. Immagini all'immunofluorescenza dell'espressione di Fattore H per tutti i gruppi

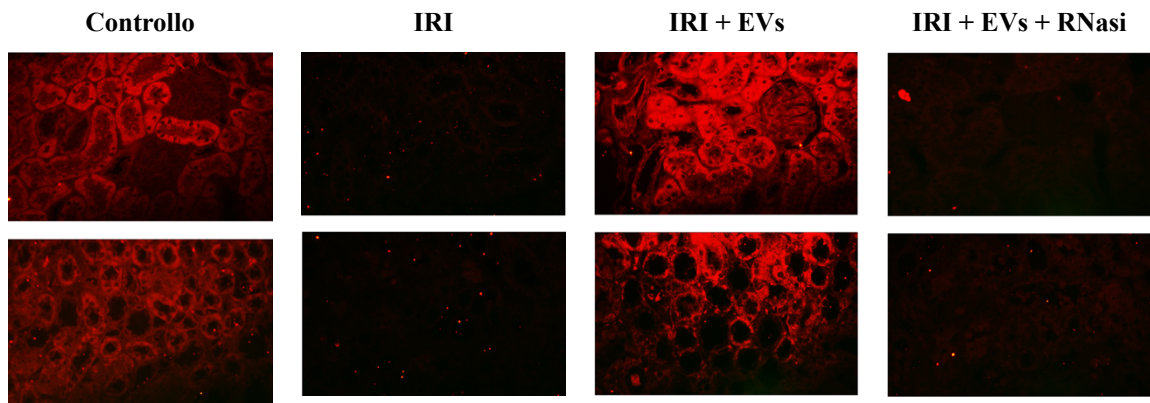


Fig. 4.40. Immagini all'immunofluorescenza dell'espressione di CD55 per tutti i gruppi

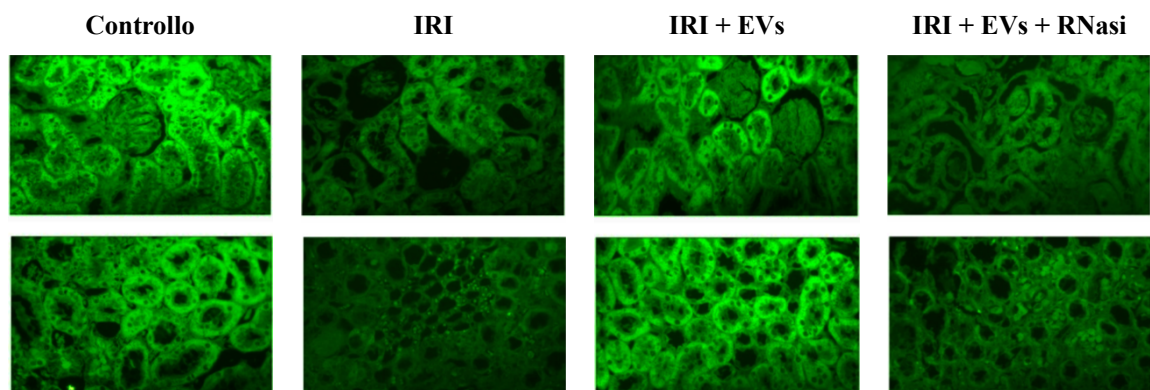


Fig. 4.41. Immagini all'immunofluorescenza dell'espressione di CD59 per tutti i gruppi

Gli stessi risultati sono stati confermati alla quantificazione dell'intensità relativa dell'immunofluorescenza (Fig. 4.42).

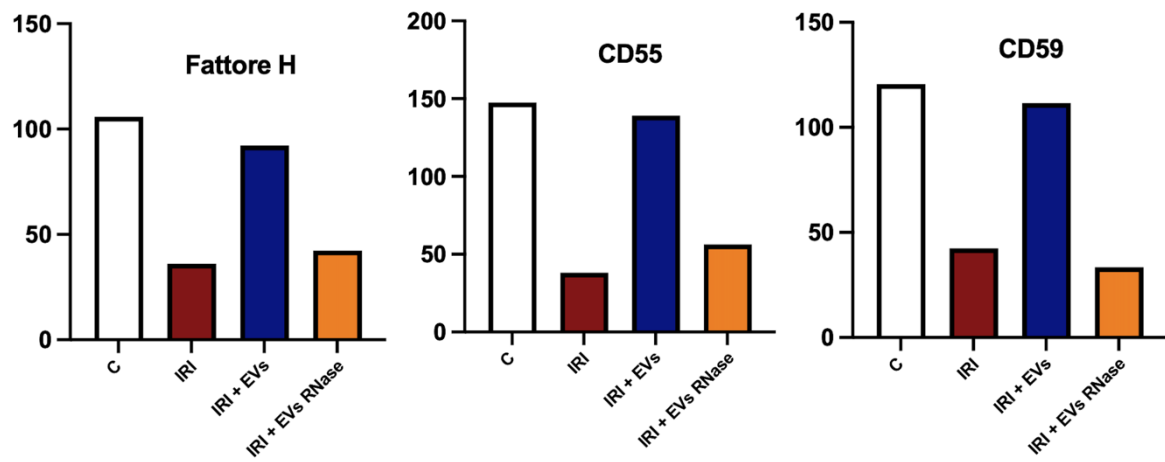


Fig. 4.42. Intensità relativa all'immunofluorescenza in tutti i gruppi per Fattore H, CD55 e CD59

4.11.2 Effetti delle EVs di EPCs su colture cellulari in vitro

Per confermare i dati ottenuti dal modello di ischemia-riperfusion in vivo, cellule endoteliali isolate dai capillari peritubulari umani (TEnC) e cellule epiteliali tubulari umane (TEpC) sono state coltivate in condizione di normossia e di ipossia per valutare l'effetto protettivo delle EVs derivate da EPCs.

L'analisi degli effetti citotossici e dell'attività apoptotica delle cellule TEnC e TEpC è stata analizzata con i saggi XTT e TUNEL, rispettivamente. Dopo aver dimostrato l'internalizzazione delle EVs marcate con un fluorocromo rosso (PKH26) sia nelle TEnC che nelle TEpC (Fig. 4.43), è stata osservata la riduzione degli effetti citotossici e del numero di cellule apoptotiche dopo la somministrazione di EVs derivate da EPCs, per entrambe le tipologie di cellule in condizioni di ipossia.

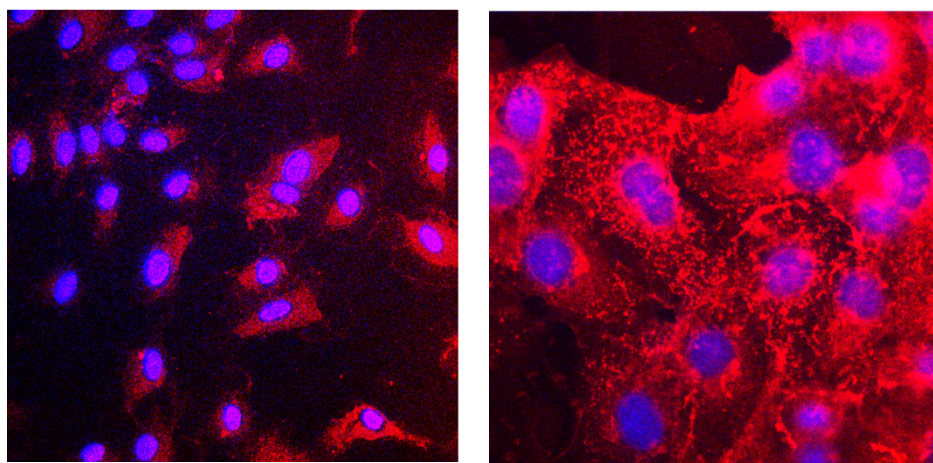


Fig. 4.43. Localizzazione delle EVs marcate con colorante fluorescente rosso nelle TEnC e nelle TEpC

I saggi XTT e TUNEL sono stati valutati sulle seguenti gruppi: normossia; ipossia; ipossia e somministrazione di EVs; ipossia, somministrazione di EVs e RNasi specifiche; ipossia, somministrazione di EVs e siRNA (small interfering RNA) di Fattore H, CD55 e CD59; ipossia, somministrazione di EV e siRNA di controllo senza attività sugli inibitori del complemento.

Nelle colture con TEnC, la somministrazione di EV di EPC ha determinato la riduzione degli effetti citotossici, definendo un quadro simile a quello delle cellule in normossia. La somministrazione di EVs di EPC e specifiche RNasi o siRNA ha annullato gli effetti protettivi delle EV, definendo un quadro simile a quello delle cellule in ipossia. La somministrazione di EV e siRNA di controllo ha definito un quadro sovrapponibile alla somministrazione di sole EV. Allo stesso modo, la somministrazione di EV ha determinato la riduzione del numero di cellule apoptotiche, definendo un quadro simile a quello delle cellule in normossia. La somministrazione di EV e specifiche RNasi o siRNA ha annullato gli effetti protettivi delle EV, definendo una situazione simile a quella delle cellule in ipossia. La somministrazione di EV e siRNA di controllo ha invece definito un quadro sovrapponibile alla somministrazione di sole EV (Fig. 4.44).

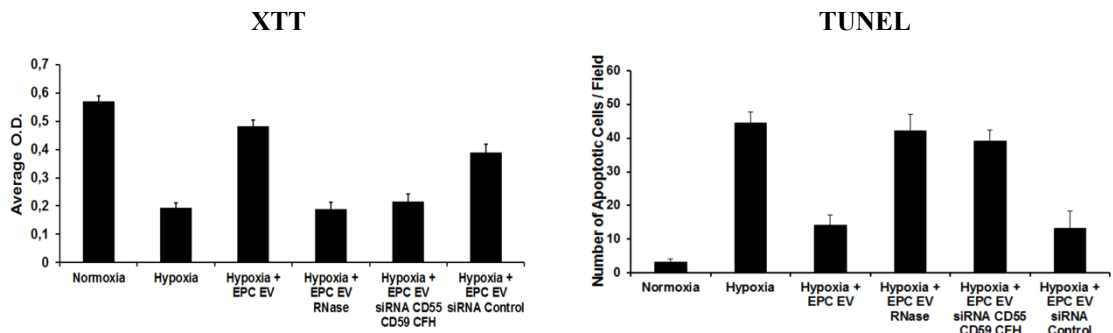


Fig. 4.44. Risultati dei saggi XTT e TUNEL per valutare gli effetti citotossici e l'apoptosi nelle TEnC

Risultati del tutto analoghi sono stati osservati nelle colture con TEpC (Fig. 4.45).

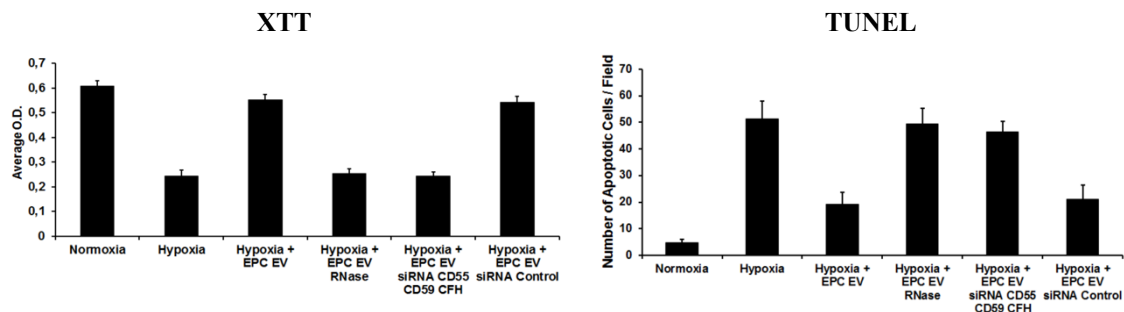


Fig. 4.45. Risultati dei saggi XTT e TUNEL per valutare gli effetti citotossici e l'apoptosi nelle TEpC

Sia sulle colture TEnC che sulle colture TEpC è stata eseguita l'analisi dell'espressione di mRNA codificanti per Fattore H, CD55 e CD59 con qRT-PCR.

Per le colture TEnC la qRT-PCR ha rilevato un aumento di espressione di mRNA per tutti e tre gli inibitori del complemento considerati; lo stesso aumento non è stato osservato per il gruppo trattato con somministrazione di EV e specifiche RNasi, dove l'espressione di mRNA è rimasta sovrapponibile a quella osservata nel gruppo in ipossia (Fig. 4.46).

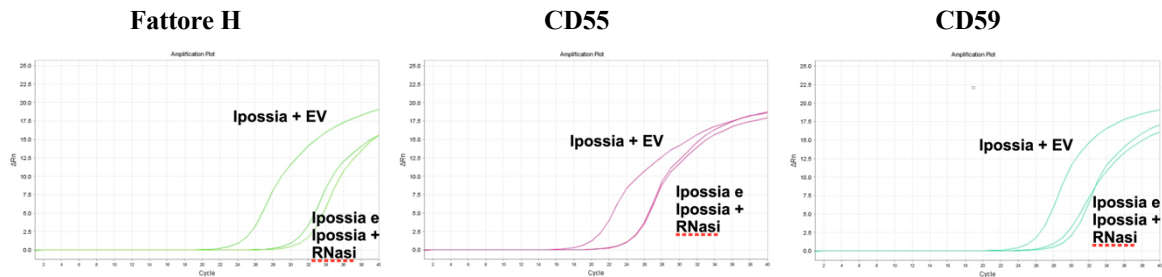


Fig. 4.46. Espressione degli mRNA codificanti per Fattore H, CD55 e CD59 in qRT-PCR in TEnC

Gli stessi risultati sono stati confermati alla quantificazione relativa degli mRNA (Fig. 4.47).

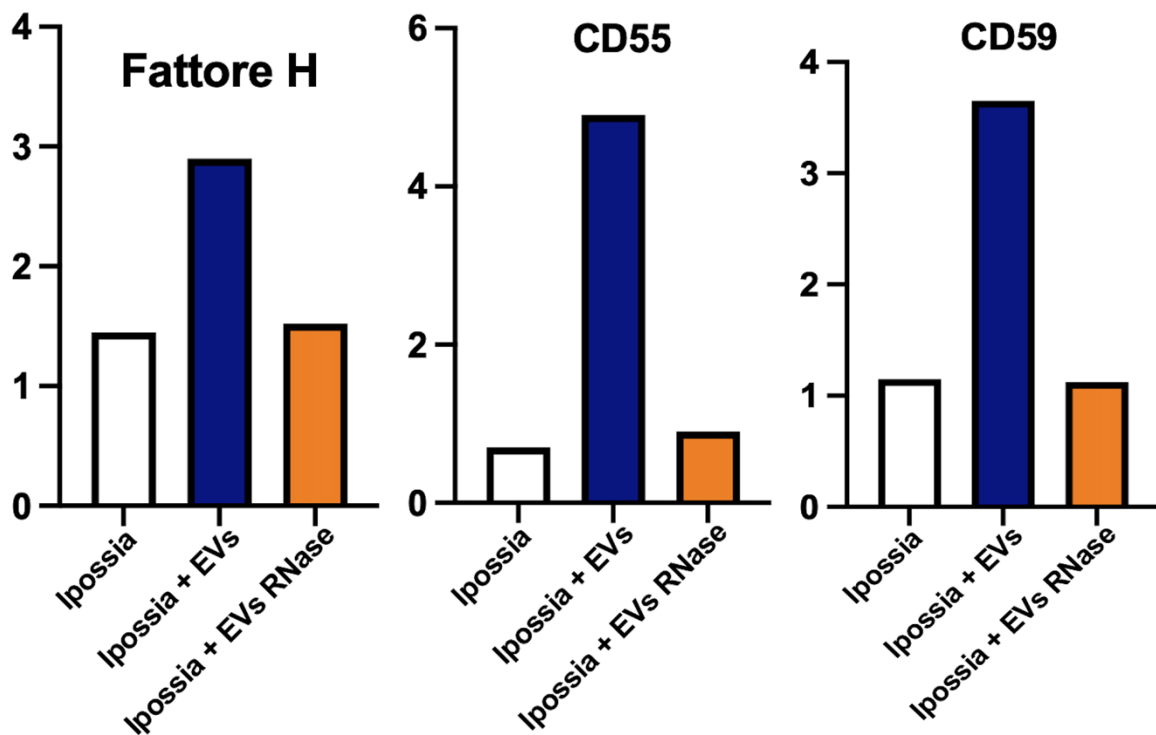


Fig. 4.47. Quantificazione relativa degli mRNA di Fattore H, CD55 e CD59 nelle colture TEnC espresso in $n = 2^{-\Delta Ct}$

Risultati del tutto analoghi sono stati osservati nelle colture con TEpC (Fig. 4.48; Fig. 4.49).

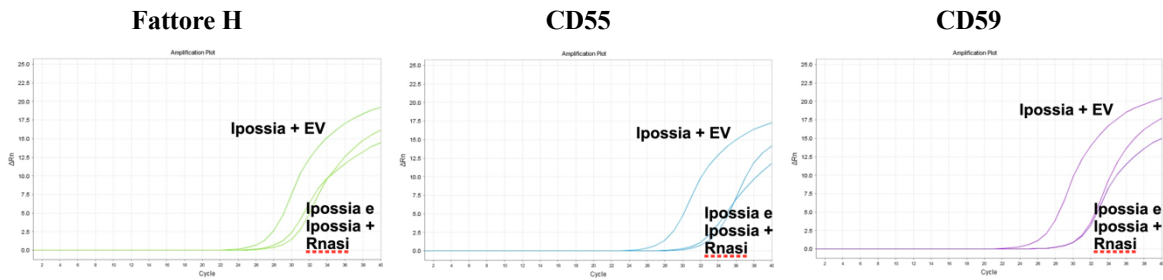


Fig. 4.48. Espressione degli mRNA codificanti per Fattore H, CD55 e CD59 in qRT-PCR in TEpC

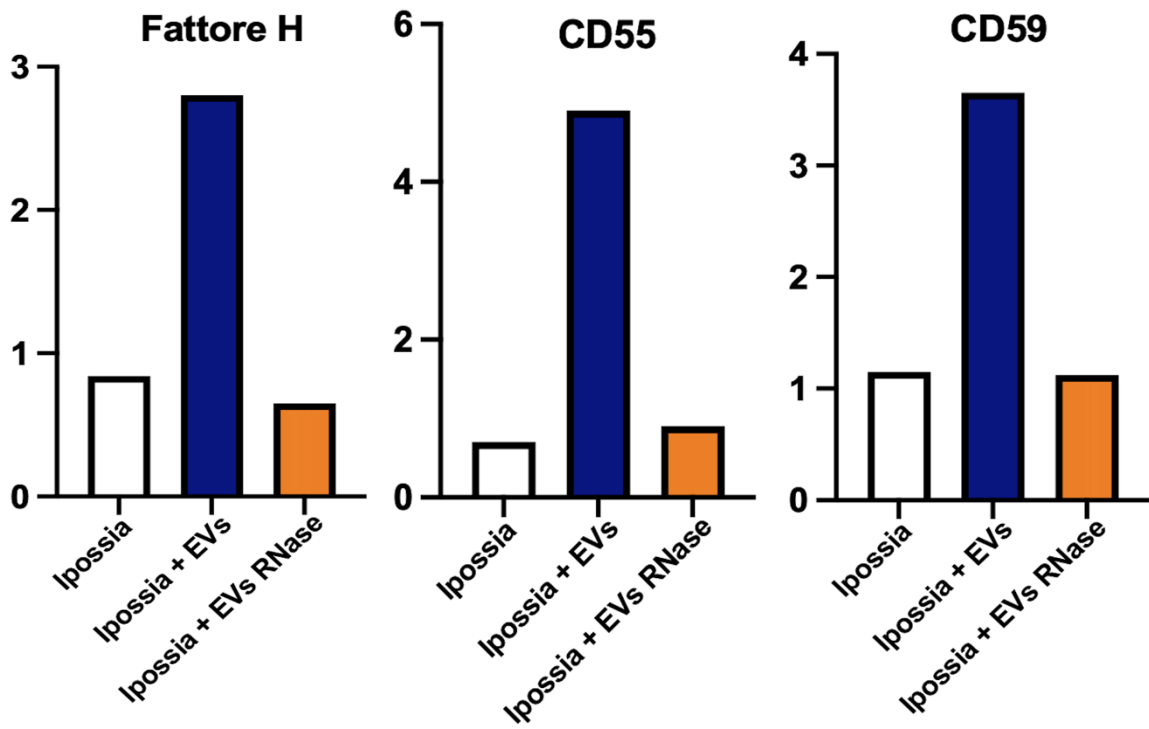


Fig. 4.49. Quantificazione relativa degli mRNA di Fattore H, CD55 e CD59 nelle colture TEpC espresso

$$\text{in } n = 2^{(-\Delta Ct)}$$

Sia per le colture TEnC che per quelle TEpC è stata valutata l'espressione di C5b-9 con immunofluorescenza, che ha rivelato in entrambi i casi una riduzione dell'espressione nel gruppo trattato con EV rispetto al gruppo non trattato. L'aggiunta della specifica RNasi ha annullato gli effetti protettivi delle EV, definendo un quadro simile al gruppo in ipossia (Fig. 4.50).

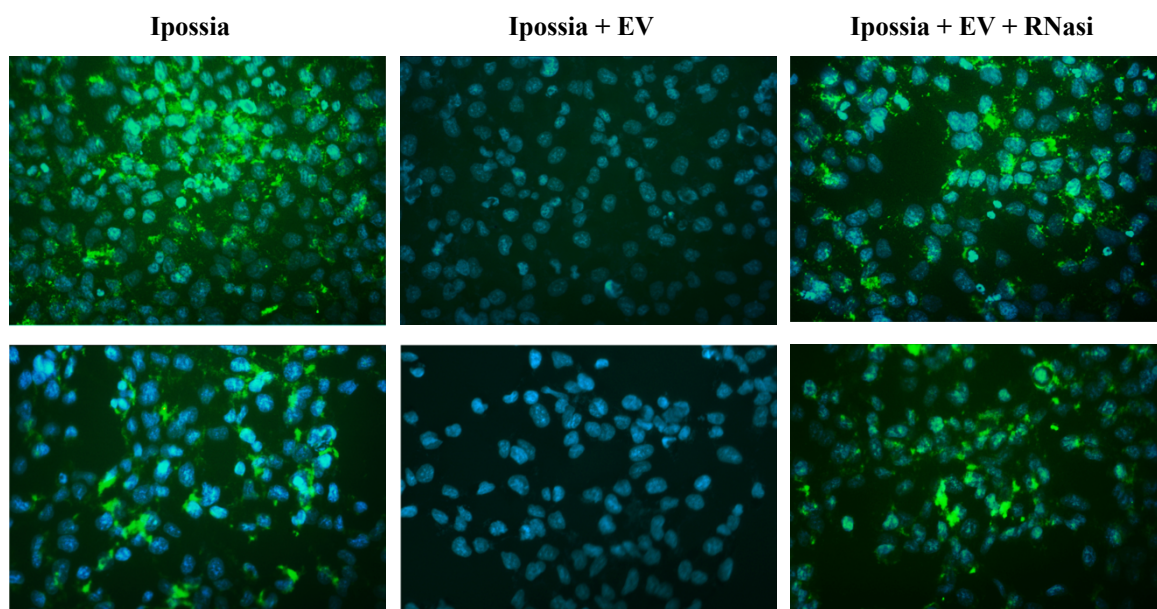


Fig. 4.50. Espressione di C5b-9 in immunofluorescenza nelle colture TEnC (sopra) e TEpC (sotto)

L'analisi FACS è stata eseguita sia sulle colture TEnC che sulle colture TEpC per valutare l'espressione delle componenti C5b-9 e C3 del complemento e degli inibitori del complemento Fattore H, CD55, CD59.

L'analisi dell'espressione di C5b-9 e C3 nelle TEnC ha documentato una riduzione dell'espressione nel gruppo trattato con EV rispetto al gruppo non trattato. L'aggiunta di specifiche RNasi e siRNA ha annullato gli effetti protettivi delle EV, definendo un quadro sovrapponibile al gruppo ipossico, mentre l'aggiunta di siRNA di controllo ha determinato effetti sovrapponibili a quelli osservati nel gruppo trattato con sole EV (Fig. 4.51).

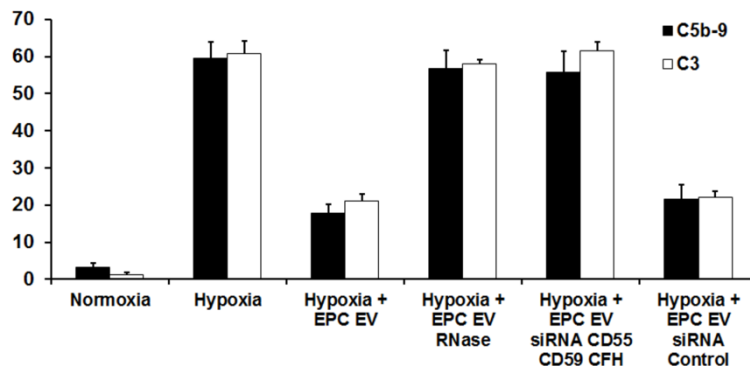


Fig. 4.51. Percentuale di TEnC positive alla fluorescenza per C5b-9 e C3 rilevato all'analisi FACS

Risultati del tutto analoghi sono stati osservati per le TEpC (Fig. 4.52).

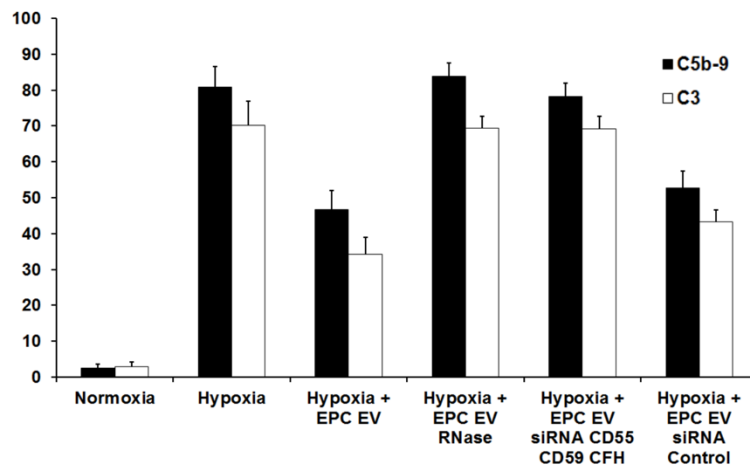


Fig. 4.52. Percentuale di TEpC positive alla fluorescenza per C5b-9 e C3 rilevato all'analisi FACS

L'analisi dell'espressione di Fattore H, CD55 e CD59 nelle TEnC ha documentato un aumento dell'espressione nel gruppo trattato con EV rispetto al gruppo non trattato. L'aggiunta di specifiche RNasi e siRNA ha annullato gli effetti protettivi delle EV, definendo un quadro sovrapponibile al gruppo ipossico, mentre l'aggiunta di siRNA di controllo ha determinato effetti sovrapponibili a quelli osservati nel gruppo trattato con sole EV (Fig. 4.53).

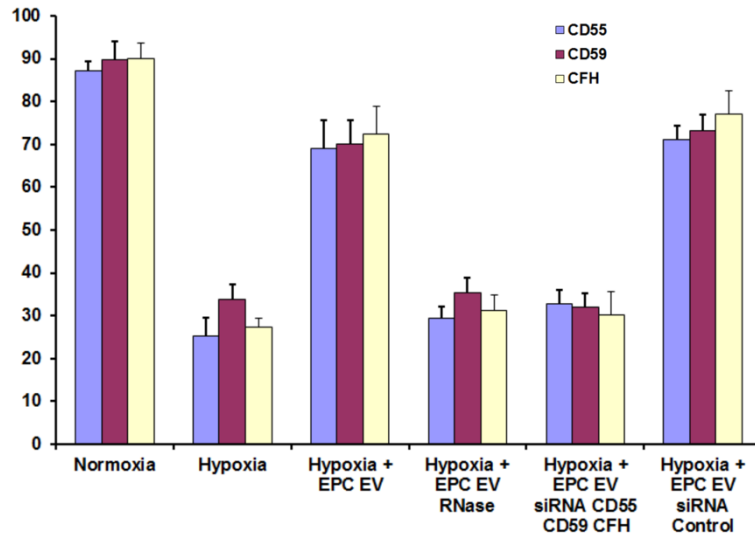


Fig. 4.53. Percentuale di TEnC positive alla fluorescenza per Fattore H, CD55 e CD59 rilevato all'analisi FACS

Risultati del tutto analoghi sono stati osservati per le TEpC (Fig. 4.54).

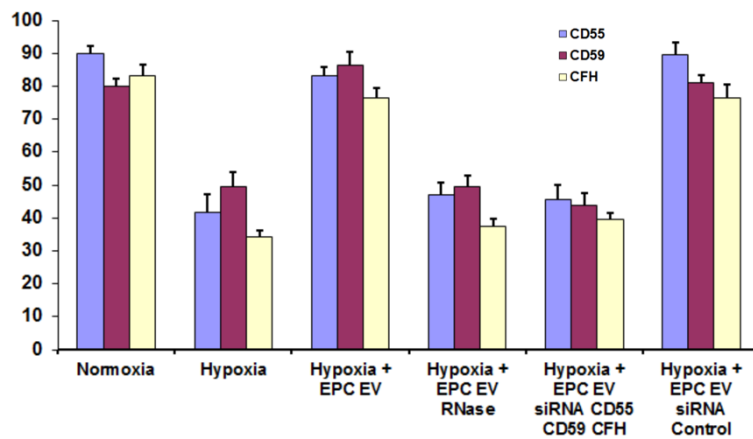


Fig. 4.54. Percentuale di TEpC positive alla fluorescenza per Fattore H, CD55 e CD59 rilevato all'analisi FACS

5. Discussione

5.1 Descrizione generale della popolazione

L'analisi epidemiologica dell'intera popolazione dei trapiantati presso il Centro Trapianto Renale dell'A.O.U. Maggiore della Carità di Novara (n = 1560) ha fornito un gran numero di dati ed informazioni cliniche e laboratoristiche, la cui interpretazione permette da una parte di valutare in modo esauriente l'attività del Centro Trapianto Renale negli anni, dall'altra di quantificare il rischio di sviluppare DGF in base ai diversi fattori di rischio riconosciuti in letteratura e di sviluppare complicanze in base alla DGF.

L'analisi descrittiva della popolazione generale ha documentato che la maggior parte dei trapianti eseguiti è risultata essere il primo trapianto del paziente (88,3%), mentre solo una piccola parte di pazienti è stata sottoposta a trapianto successivo al primo (11,7%). Questo dato è incoraggiante, poiché ridurre il numero di pazienti che necessitano di un trapianto successivo al primo permette di gestire in modo più efficace le risorse, sia trapiantologiche che ospedaliere, liberando posti in lista d'attesa e consentendo a più pazienti di beneficiare del trapianto renale che, pur non essendo considerato una terapia salvavita e non consentendo di raggiungere una sopravvivenza sovrapponibile al soggetto sano, ha dimostrato essere associato ad una sopravvivenza del paziente maggiore rispetto alla dialisi (cfr. 1).

L'età media dei riceventi è risultata essere $51,4 \pm 12,7$ anni, confermando che la fascia più frequentemente sottoposta a questo tipo di intervento è quella adulta.

Il sesso dei riceventi è risultato più frequentemente essere quello maschile (64,3%); ciò potrebbe essere legato alla prevalenza maggiore di patologie che costituiscono fattori di rischio di nefropatia, come l'ipertensione arteriosa, nel sesso maschile.

Il BMI medio dei riceventi è risultato essere $23,9 \pm 3,4$, rivelando che in media la popolazione dei riceventi al momento del trapianto è normopeso.

L'anzianità dialitica media dei riceventi dializzati è risultata essere $55,2 \pm 57,22$ mesi (circa 4 anni); il dato temporale è accettabile, ma va ricordato che un obiettivo fondamentale trapiantologia è rappresentato dalla riduzione dell'attesa necessaria per ricevere il trapianto, visto che questo comporta non solo una riduzione dei costi del sistema sanitario, ma anche un importante miglioramento della qualità di vita dei pazienti.

La metodica dialitica più frequente è risultata essere l'emodialisi (67,8%), seguita dalla dialisi peritoneale (14%); la grande differenza è probabilmente dovuta al fatto che la dialisi peritoneale può essere considerata solo in pazienti selezionati, in quanto richiede un'importante educazione del paziente ed una gestione della dialisi autonoma.

Il diabete mellito è risultato essere presente nel 6,9% della popolazione; poiché tale patologia rappresenta un fattore di rischio di nefropatia cronica sia sul rene nativo che sul rene trapiantato (oltre ad un gran numero di altre complicanze sistemiche), la riduzione maggiore possibile della sua incidenza rappresenta un obiettivo fondamentale della trapiantologia e della medicina moderna in generale.

L'età media dei donatori è risultata essere $55 \pm$ anni; questo dato intermedio viene giustificato dal fatto che la causa di morte nella maggior parte dei donatori è rappresentata dal trauma e dall'evento cerebrovascolare, che sono più frequenti rispettivamente nella popolazione giovane e nella popolazione anziana. Il sesso maschile e femminile sono risultati essere ugualmente frequenti nella popolazione dei donatori, mentre il BMI è risultato essere di $25 \pm 3,8$, documentando che il donatore medio è sovrappeso. Il diabete mellito è risultato essere presente nel 5,1% dei donatori, mentre l'ipertensione si è rivelata di gran lunga più frequente (40,5%).

La grande maggioranza dei donatori è risultata essere costituita da donatori deceduti in morte cerebrale (DBD, 97,6%), mentre solo una piccola parte è risultata essere costituita da donatori deceduti in morte cardiaca (DCD, 2,1%). La ristrettezza del numero dei donatori DCD è giustificata da una parte dal fatto che spesso i reni di questi donatori, a causa della cessazione della circolazione, incorrono in danni ischemici non trascurabili e, di conseguenza, vengono più frequentemente giudicati non idonei al trapianto; dall'altra dal fatto che l'utilizzo di donatori DCD è iniziato, nel Centro Trapianto Renale dell'A.O.U. Maggiore della Carità di Novara, abbastanza recentemente (2018).

La popolazione dei donatori è risultata essere divisa in SCD e ECD in modo abbastanza uniforme (rispettivamente 42,4% e 57,6%). L'alto numero di donatori ECD è una conseguenza della sempre crescente richiesta di reni per il trapianto renale, vista l'acquisizione di caratteristiche epidemiche della malattia renale cronica (cfr. 1).

La creatininemia media dei donatori è risultata essere $0,87 \pm 0,42$ mg/dl, mentre l'eGFR medio è risultato essere $99,6 \pm 44,5$ ml/min/1,73m²; questi valori rivelano come in media la funzionalità renale dei donatori sia del tutto accettabile.

I punteggi di mismatch HLA tra donatore e ricevente sono risultati essere 3 (33,4%), 4 (30,6%) e 2 (22,4%), mentre il punteggio di mismatch DR è risultato essere 1 nella metà dei casi (50,5%); questi dati sottolineano come lo scenario ideale di assenza di mismatch sia abbastanza infrequente, e quanto la terapia immunosoppressiva sia fondamentale nel trapianto.

Gli score bioptici più frequenti sono risultato essere 2 (17,7%) e 3 (12,7%). Anche questo dato sottolinea come gli organi disponibili per il trapianto non siano spesso ideali e come siano quindi fondamentali strategie sempre più efficaci per rendere utilizzabili anche organi non ottimali. Una di queste strategie è rappresentata dalla perfusione renale ipotermica; tuttavia, questa non è ancora stata adottata come prassi presso diversi centri trapianti, tra cui il Centro Trapianto Renale dell'A.O.U. Maggiore della Carità di Novara, dove solo nel 2,8% dei trapianti è stato fatto ricorso alla HMP, che viene riservata solo a casi selezionati, come organi provenienti da donatori DCD.

Il CIT medio nel totale dei trapianti eseguiti è risultato essere $18,7 \pm 5,6$ ore; questo dato è accettabile secondo quanto sostenuto dalla maggior parte delle linee guida trapiantologiche, che indicano come ottimale un CIT < 24h; tuttavia, va ricordato come la riduzione del CIT sia associata a migliore funzione renale nell'immediato periodo postoperatorio ed a migliore sopravvivenza del graft a lungo termine. Per questo motivo, la riduzione del CIT rappresenta uno degli obiettivi fondamentali della trapiantologia.

La DGF si è manifestata nel 23% dei pazienti trapiantati. Come il CIT, anche la DGF è associata a migliore funzione renale nell'immediato periodo postoperatorio ed a migliore sopravvivenza del graft a lungo termine; perciò, anche la riduzione dell'incidenza di DGF rappresenta un obiettivo fondamentale del trapianto renale.

Il tempo medio necessario per il recupero completo della funzione renale è risultato essere $4,4 \pm 6,5$ giorni, mentre il tempo medio di degenza è risultato essere $22,8 \pm 16,9$ rappresentando un tempo accettabile per la gestione clinica del paziente trapiantato, ma che potrebbe essere ridotto al fine di migliorare la qualità di vita del paziente e liberare risorse ospedaliere per altri pazienti.

La creatinemia media alle dimissioni è risultata essere $1,95 \pm 0,82$ mg/dl, mentre l'eGFR medio è risultato essere $45,9 \pm 19$ ml/min/1,73m², ricordando come il trapianto renale costituisca in ogni caso un evento traumatico per il graft.

Per quanto riguarda la terapia di induzione, la maggioranza dei pazienti ha ricevuto anti-IL2R (78,8%), mentre una minor parte ATG (18,45%), che infatti è riservato a pazienti selezionati con elevato rischio immunologico.

Il rigetto ha complicato il 13,5% dei trapianti. In particolare, il 4,2% dei pazienti ha sviluppato rigetto acuto, l'8,7% rigetto cronico e l'1,1% entrambi. Il rischio di rigetto è intrinsecamente legato al concetto di allotrapianto, ma va ricordato come uno degli obiettivi fondamentali della trapiantologia è quello di ridurre al minimo la sua incidenza.

La complicità a breve e lungo termine più frequente è risultata essere il decesso (22,9%), seguita dal fallimento del graft con rientro in dialisi (17,2%) e l'espianto del graft (2,3%). Anche la riduzione del numero dei fallimenti con rientro in dialisi rappresenta uno degli obiettivi fondamentali della trapiantologia, in quanto il mantenimento di un graft funzionale mantiene alta la qualità di vita del paziente e permette di sottoporre a trapianto un numero maggiore di pazienti.

La durata complessiva media del trapianto renale è risultata essere $98,2 \pm 68,4$ mesi (circa 8 anni), rappresentando un ottimo risultato per l'attività del Centro Trapianto Renale dell'A.O.U. Maggiore della Carità di Novara.

5.2 Rilevanza clinica di DGF

L'analisi della rilevanza clinica di DGF è stata eseguita associando ogni possibile rischio di DGF, determinato aprioristicamente in base a quanto riportato dalle principali evidenze della letteratura scientifica, con l'insorgenza di DGF; sono stati poi analizzati gli effetti dell'insorgenza di DGF su diverse variabili e sulla sopravvivenza del paziente e del graft.

Come atteso dall'evidenza presente in letteratura scientifica, l'età, il sesso maschile, il BMI, il diabete mellito, l'anzianità dialitica ed il trapianto successivo al primo sono tutti risultati essere fattori di rischio indipendenti di DGF.

Il rischio di DGF aumenta del 2% per ogni anno di età aggiuntivo, dell'11% per ogni punto di BMI aggiuntivo e del 5% per ogni mese di anzianità dialitica aggiuntivo. Questo è legato al fatto che tutte le variabili considerate sono associate, tra le altre cose, ad un aumento dello stato infiammatorio generale del paziente.

Il sesso maschile ha un rischio 1,3 volte maggiore, il paziente diabetico 1,9 volte maggiore ed il paziente che riceve un trapianto successivo al primo 2 volte maggiore di sviluppare DGF rispetto al sesso femminile, al paziente sano ed al paziente che riceve il primo trapianto di rene. Il trapianto preemptive rappresenta un fattore protettivo da DGF (OR = 0,15), come atteso dalla letteratura scientifica; questo è legato al fatto che i pazienti sono più spesso giovani e con meno comorbidità, nonché più spesso riceventi da donatore vivente, a sua volta con meno comorbidità e con una funzione renale migliore rispetto al donatore deceduto; inoltre, il trapianto da vivente non prevede un periodo di ischemia fredda, limitando i danni da ischemia e riperfusione del graft.

Come atteso dall'evidenza presente in letteratura scientifica, l'età del donatore, il sesso maschile nel donatore, il BMI del donatore, l'ipertensione arteriosa nel donatore, la

classificazione come ECD e come DCD, l'aumento di creatininemia e la riduzione dell'eGFR nel donatore, sono tutti risultati essere fattori di rischio indipendenti di DGF.

Il rischio di DGF aumenta del 2% per ogni anno di età del donatore aggiuntivo, del 5% per ogni punto di BMI del donatore aggiuntivo, del 46% per ogni mg/dl di creatininemia del donatore aggiuntivo e dell'1% per ogni ml/min/1,73m² di eGFR in meno.

Il sesso maschile nel donatore comporta un rischio 1,4 volte maggiore, il donatore iperteso 1,7 volte maggiore, il donatore DCD 2,6 volte maggiore ed il donatore ECD di 1,7 volte maggiore per il ricevente di sviluppare DGF. L'ipertensione costituisce un fattore di rischio indipendente di nefropatia cronica, che aumenta la probabilità che il graft abbia una funzionalità minore rispetto al donatore non iperteso. I donatori DCD sono tipicamente donatori in cui il danno ischemico del graft è significativamente maggiore a causa della cessazione della circolazione, mentre i donatori ECD sono più spesso di età avanzata e con una funzione renale peggiore rispetto agli SCD.

Il rischio di DGF aumenta inoltre del 4% per ogni ora di ischemia fredda aggiuntiva; questo è legato al fatto che, nonostante sia posto in ipotermia per rallentare il metabolismo, il rene sviluppa più danni da ischemia, accumula più metaboliti di scarto e subisce reazioni da ri-perfusione maggiori. Il dato dimostra chiaramente come la diminuzione del CIT rappresenta un obiettivo fondamentale della pratica trapiantologica, in quanto permetterebbe di ridurre l'incidenza di DGF e migliorare la sopravvivenza a lungo termine del graft e del paziente.

Il valore percentuale del PRA virtuale, marcatore dello stato di immunità reattiva del ricevente, è risultato essere maggiore nella popolazione che ha sviluppato DGF rispetto alla popolazione con recupero immediato della funzione renale. Tuttavia, le variabili immunologiche considerate (mismatch HLA e mismatch DR) non sono risultate essere significativamente diverse nelle due sottopopolazioni. Questo è dovuto al fatto che, sebbene l'attivazione immunitaria giochi un ruolo fondamentale nella patogenesi del danno renale da ischemia i-riperfusione, questa è principalmente sostenuta dalle modificazioni patologiche legate all'ischemia ed al danno ossidativo indotto dalla ri-perfusione.

I pazienti sottoposti a terapia di induzione hanno un rischio maggiore di sviluppare DGF rispetto alla popolazione a cui non viene somministrata terapia di induzione; in particolare, l'utilizzo di ATG ha rivelato un rischio maggiore rispetto all'anti-IL2R, e l'utilizzo di entrambe le terapie un rischio ancora maggiore. Tuttavia, questo risultato potrebbe rappresentare un bias dello studio, in quanto la terapia di induzione viene, nell'attuale pratica clinica trapiantologica, somministrata a tutti i pazienti sottoposti a trapianti renale, ed il confronto con la popolazione a cui non viene somministrata (già numericamente ristretta) è stato

eseguito con pazienti trapiantati agli inizi dell'attività di trapianto del Centro Trapianto Renale dell'A.O.U. Maggiore della Carità di Novara. L'aumento del rischio legato all'utilizzo di una terapia di induzione non è tanto legato alla terapia di induzione stessa, quanto alle caratteristiche dei pazienti ai quali la terapia di induzione viene somministrata. Infatti, la terapia con ATG (o l'associazione ATG e anti-IL2R) viene riservata a pazienti selezionati ad alto rischio immunologico, già a rischio di sviluppare DGF anche senza la terapia di induzione.

Come atteso dalla letteratura, la creatininemia media alle dimissioni e la creatininemia media a 6 mesi, 1 anno, 3 anni, 5 anni e 10 anni è risultata essere sempre maggiore nella popolazione DGF; l'eGFR medio alle dimissioni e l'eGFR medio a 6 mesi, 1 anno, 3 anni, 5 anni e 10 anni è risultato essere sempre minore nella popolazione con DGF rispetto ai controlli IGF. Invece, la proteinuria non ha dimostrato differenze significative nelle due sottopopolazioni, né alla dimissione né nel tempo. Tuttavia, l'analisi dell'andamento della proteinuria nel tempo dimostra come la differenza dei valori della popolazione DGF e della popolazione IGF cresca progressivamente, lasciando supporre che la differenza a lungo termine potrebbe essere statisticamente significativa (Fig. 4.6).

Il tempo necessario per il recupero della funzionalità renale ed i giorni di degenza sono risultati essere maggiori nella popolazione DGF rispetto alla popolazione IGF. Ciò dimostra come la diminuzione dell'incidenza di DGF permetterebbe di ridurre i tempi di degenza ed i costi del sistema sanitario, permettendo una più efficace gestione delle risorse ospedaliere ed aumentando la qualità di vita del paziente.

5.3 Analisi delle sopravvivenze

L'analisi della sopravvivenza generale del paziente e del graft è risultata essere ottimale e sopra la media nazionale, come atteso dai dati rilasciati dal Centro Nazionale Trapianti (Fig. 1.3).

L'analisi comparativa della sopravvivenza del paziente e del graft nelle sottopopolazioni DGF ed IGF ha dimostrato una sopravvivenza significativamente minore nella popolazione DGF, confermando l'evidenza della letteratura che identifica la DGF come un evento patogenetico negativo per la sopravvivenza a lungo termine del paziente e del graft.

L'analisi comparativa della sopravvivenza del paziente e del graft nel trapianto da vivente e da donatore deceduto (DBD o DCD) ha documentato una sopravvivenza significativamente minore per il trapianto da donatore deceduto. Questo risultato è legato da una parte al fatto

che la funzione renale del donatore vivente è statisticamente migliore rispetto al donatore deceduto, dall'altra al fatto che sia il donatore che il ricevente nel trapianto da vivente sono spesso più giovani e con meno comorbilità.

I donatori DCD sono stati considerati insieme ai donatori DBD e la sopravvivenza della sola sottopopolazione DCD non è stata riportata, in quanto intrinsecamente accompagnata da bias per due motivazioni: la prima, i trapianti da DCD rappresentano un numero molto ristretto sul totale, poiché spesso vengono scartati ed i loro organi non allocati; la seconda, i trapianti da DCD hanno iniziato ad essere eseguiti presso il Centro Trapianto Renale dell'A.O.U. Maggiore della Carità di Novara abbastanza recentemente (2018), motivo per cui il periodo di osservazione massimo è di 3,5 anni e la sopravvivenza del 100% (nessun evento registrato). Questo risultato falserebbe le analisi comparative della sopravvivenza dei riceventi da DCD, che viene riportata in letteratura come significativamente minore rispetto al donatore DBD, mentre risulta essere del 100% in questo studio retrospettivo.

L'analisi comparativa della sopravvivenza del paziente e del graft nel trapianto da donatore SCD e da donatore ECD ha documentato una sopravvivenza significativamente minore per il trapianto da donatore ECD, confermando quanto riportato in letteratura. Questo risultato è legato al fatto che i donatori ECD sono donatori non ideali, spesso anziani e con funzionalità renale ridotta rispetto ai donatori SCD; l'utilizzo di organi di donatori ECD è però necessario nella pratica trapiantologica per soddisfare la crescente richiesta di organi.

L'analisi comparativa della sopravvivenza del paziente e del graft nel trapianto da donatore vivente, da donatore deceduto con IGF e da donatore deceduto con DGF ha documentato una sopravvivenza significativamente minore per il trapianto da donatore deceduto con IGF rispetto al trapianto da vivente, nonché una sopravvivenza significativamente minore per il trapianto da donatore deceduto con DGF rispetto al donatore con IGF. Questo dimostra che anche nella sottopopolazione dei donatori deceduti la DGF rappresenta una complicanza in grado di influenzare la sopravvivenza a lungo termine del paziente e del graft.

L'analisi comparativa della sopravvivenza del paziente nel trapianto da donatore SCD e da donatore ECD, ulteriormente suddivisi in base a IGF e DGF, ha documentato una sopravvivenza significativamente minore per il trapianto da SCD-DGF rispetto a SCD-IGF, una sopravvivenza minore per il trapianto da ECD-IGF rispetto a SCD-DGF ed ancora una sopravvivenza minore per il trapianto da ECD-DGF rispetto a ECD-IGF. Questo risultato mette in luce il peso delle due variabili indipendenti DGF e donatore ECD nella sopravvivenza a lungo termine del paziente.

L'analisi comparativa della sopravvivenza del graft nel trapianto da donatore SCD e da donatore ECD, ulteriormente suddivisi in base a IGF e DGF, ha documentato una sopravvivenza significativamente minore per il trapianto da SCD-DGF rispetto a SCD-IGF, una sopravvivenza sovrapponibile per il trapianto da ECD-IGF e da SCD-DGF ed ancora una sopravvivenza minore per il trapianto da ECD-DGF. Questo interessante risultato di sovrapposizione tra la sopravvivenza del graft nel trapianto da ECD-IGF e da SCD-DGF dimostra come la DGF sia una complicanza che inficia negativamente sulla sopravvivenza del graft tanto quanto il ricevere da un donatore ECD.

L'analisi delle sopravvivenze ha quindi permesso di confermare l'evidenza riportata nella letteratura scientifica sull'esperienza trapiantologica di 23 anni del Centro Trapianto Renale dell'A.O.U. Maggiore della Carità di Novara, dimostrando come la DGF rappresenti un'importante complicanza trapiantologica con effetti negativi sulla sopravvivenza del paziente e del graft.

5.4 Risultati sperimentali sulla perfusione renale ex vivo

Lo studio preclinico su modello animale della perfusione renale ex vivo con PerSorb[®] ne ha dimostrato l'efficace nella riduzione del danno renale da ischemia-riperfusion, tramite il miglioramento della funzione renale, la riduzione del danno tubulare e la riduzione dello stress ossidativo legato alla disfunzione mitocondriale.

L'analisi dei livelli di creatinina e lattati nei campioni di perfusato ha mostrato risultati significativi in termini di protezione renale. Infatti, i valori di creatinina e lattati sono risultati essere minori nei reni perfusi per 2 ore rispetto a quelli perfusi per 4 ore, suggerendo che l'allungamento dei tempi di ischemia fredda potrebbe aver peggiorato il danno ischemico. Inoltre, l'uso di PerSorb[®] durante la HMP ha ulteriormente ridotto i livelli di creatinina e lattati rispetto alla HMP standard, dimostrando l'efficacia di PerSorb[®] nel migliorare l'efficacia della HMP nel ridurre il danno renale.

L'espressione dell'mRNA di NGAL, un marcatore di danno tubulare, è risultata essere minore nei reni perfusi rispetto a quelli non perfusi, confermando che la perfusione protegge contro il danno tubulare. Inoltre, l'espressione di NGAL è stata ancora più contenuta nei reni perfusi con PerSorb[®] rispetto a quelli sottoposti a HMP standard. Questo dato supporta ulteriormente l'ipotesi che PerSorb[®] offra una protezione aggiuntiva contro il danno renale durante la perfusione. Poiché l'aumento di NGAL è associato alla transizione da AKI a CKD,

è possibile supporre che la perfusione con PerSorb[®] potrebbe ridurre gli effetti profibrotici nel danno renale da IRI e quindi diminuire il rischio di sviluppare nefropatia cronica.

L'analisi del metabolismo mitocondriale ha rivelato che i reni sottoposti a HMP avevano livelli di attività della catena di trasporto degli elettroni (ETC) e di ATP maggiori rispetto a quelli conservati in SCS, dimostrando che la HMP mantiene una migliore funzione mitocondriale nel tessuto renale rispetto alla SCS. Inoltre, i reni perfusi con PerSorb[®] hanno mostrato un ulteriore incremento di questi parametri rispetto ai reni trattati con HMP standard, indicando che PerSorb[®] migliora l'efficienza energetica mitocondriale durante la perfusione.

L'attività degli enzimi del ciclo di Krebs, tra cui α -chetoglutarato-deidrogenasi, succinato-deidrogenasi, malato-deidrogenasi e citrato-sintasi, è risultata essere maggiore nei reni perfusi con PerSorb[®] rispetto a quelli non perfusi e a quelli in HMP standard. Questo risultato indica che PerSorb[®] non solo migliora la funzione mitocondriale generale, ma specificamente aumenta l'attività degli enzimi chiave del metabolismo energetico, fornendo una protezione metabolica più completa.

L'analisi dei livelli di ROS mitocondriali e TBARS ha indicato che lo stress ossidativo era minore nei reni sottoposti a HMP rispetto a quelli conservati con SCS. Ancora una volta, i reni perfusi con PerSorb[®] hanno mostrato livelli ancora più bassi di stress ossidativo rispetto a quelli in HMP standard, suggerendo che PerSorb[®] può ridurre ulteriormente il danno ossidativo durante la perfusione, migliorando così la sopravvivenza e la funzione del rene trapiantato.

Il potenziale di membrana mitocondriale, misurato con JC1, e l'espressione del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (mPTP) sono stati utilizzati come marcatori di disfunzione mitocondriale. I risultati hanno mostrato livelli minori di entrambi i marcatori nei reni sottoposti a HMP rispetto a quelli in SCS, indicando una minore disfunzione mitocondriale con la HMP. Inoltre, i reni perfusi con PerSorb[®] hanno dimostrato valori ancora più bassi rispetto a quelli in HMP standard, suggerendo che PerSorb[®] può migliorare ulteriormente la stabilità mitocondriale durante la perfusione.

Poiché in letteratura sono riportati studi che dimostrano come la riduzione di MMP sia un predittore del rischio di sviluppare DGF (cfr. 1.6), è lecito supporre che l'utilizzo di perfusione renale con PerSorb[®], che protegge dalla riduzione di MMP, potrebbe ridurre l'incidenza di DGF ed aumentare quindi la sopravvivenza a lungo termine del paziente e del graft, almeno in parte attraverso la riduzione della disfunzione mitocondriale.

I risultati ottenuti, insieme al fatto che in letteratura sono presenti studi che dimostrano l'efficacia della perfusione con PerSorb[®] nella riduzione del danno da ischemia su altri organi,

ad esempio durante il trapianto di fegato (cfr. 1.11), suggeriscono che l'uso di PerSorb® durante la HMP potrebbe rappresentare un significativo avanzamento nella conservazione degli organi per il trapianto. La capacità di PerSorb® di ridurre i livelli di creatinina e lattati, diminuire l'espressione di NGAL, migliorare la funzione mitocondriale e ridurre lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale indica che questa strategia terapeutica potrebbe migliorare notevolmente gli esiti post-trapianto.

5.5 Risultati sperimentali della terapia biologica in vivo ed in vitro

L'analisi condotta sulle EV derivate da EPC ha rivelato importanti informazioni sul loro ruolo nella modulazione del sistema del complemento in corso di IRI. Le tecniche utilizzate, tra cui la microscopia elettronica, Nanosight, FACS e la bioanalisi degli RNA e dei miRNA, hanno permesso di caratterizzare dettagliatamente queste vescicole e il loro contenuto molecolare, fornendo una base per comprendere i meccanismi d'azione delle EV nel contesto dell'IRI.

L'analisi Nanosight ha dimostrato che le EV presentano una dimensione media di 160 nm, con una distribuzione di dimensioni che indica una popolazione eterogenea. Questa variabilità dimensionale potrebbe riflettere la presenza di diverse sottoclassi di EV, ciascuna con specifiche funzioni biologiche implicate nella patogenesi del danno da ischemia-riperfusion. La bioanalisi dell'RNA contenuto nelle EV ha rivelato la presenza di diversi miRNA con attività proangiogenetica, proliferativa, antiapoptotica e antifibrotica, suggerendo che le EV derivate da EPC possono contribuire a una vasta gamma di processi rigenerativi e di protezione tissutale durante IRI.

L'espressione di mRNA codificanti per gli inibitori del complemento, tra cui il Fattore H, CD55 e CD59, sia nelle EPC che nelle EV derivate, è un'importante evidenza che suggerisce l'esistenza di un meccanismo attraverso il quale le EV possono modulare l'attività del complemento in corso di IRI. Il trattamento delle EV con RNasi specifiche ha ridotto significativamente i livelli di questi mRNA, indicando che l'RNA contenuto nelle EV possiede un ruolo cruciale nella capacità delle EV di modulare l'attività complemento.

Nel modello murino di IRI, l'infusione di EV derivate da EPC ha determinato una riduzione dell'espressione di C5b-9 (MAC) e C3 del complemento. Questo effetto inibitorio è stato confermato sia dalle analisi in immunofluorescenza sia dalla quantificazione dell'intensità relativa dell'immunofluorescenza. La somministrazione di RNasi specifiche ha annullato questi effetti, riportando i livelli di C5b-9 e C3 a quelli osservati nel gruppo IRI non trattato

con EV. Questi risultati sottolineano l'importanza degli RNA contenuti nelle EV nel mediare gli effetti protettivi contro il danno sostenuto dal complemento.

Inoltre, l'infusione di EV ha aumentato i livelli degli inibitori del complemento Fattore H, CD55 e CD59 nel tessuto renale murino post-IRI. Anche in questo caso, il trattamento con RNasi specifiche ha annullato gli effetti stimolatori delle EV, evidenziando ulteriormente il ruolo cruciale dell'RNA contenuto nelle EV nella modulazione del sistema del complemento. I risultati ottenuti suggeriscono che le EV derivate dalle EPC potrebbero rappresentare una strategia terapeutica promettente per ridurre il danno tissutale mediato dal complemento in condizioni di IRI. La capacità delle EV di ridurre l'attivazione del complemento e di aumentare gli inibitori del complemento potrebbe tradursi in una protezione significativa del tessuto ischemico-riperfuso, migliorando gli esiti clinici.

I risultati documentati in vivo sono stati ulteriormente analizzati in vitro.

L'analisi degli effetti citotossici e apoptotici condotta tramite saggi XTT e TUNEL ha fornito informazioni significative sulla capacità delle EV derivate da EPC di proteggere le cellule endoteliali tubulari (TEnc) e le cellule epiteliali tubulari (TEpC) in condizioni di ipossia in vitro. La riduzione degli effetti citotossici e del numero di cellule apoptotiche dopo la somministrazione di EV suggerisce un potenziale meccanismo protettivo mediato dalle EV.

Sono stati valutati vari gruppi di trattamento: normossia, ipossia, ipossia con somministrazione di EV, ipossia con somministrazione di EV e RNasi specifiche, ipossia con somministrazione di EV e siRNA per Fattore H, CD55 e CD59, e infine ipossia con somministrazione di EV e siRNA di controllo. I risultati hanno mostrato che la somministrazione di EV in condizioni di ipossia ha determinato una riduzione significativa degli effetti citotossici e dell'apoptosi sia nelle TEnc che nelle TEpC, riportando la situazione a un quadro simile a quello osservato in condizioni di normossia.

Il trattamento con RNasi specifiche o siRNA per Fattore H, CD55 e CD59 ha annullato gli effetti protettivi delle EV, dimostrando che gli RNA contenuti nelle EV sono essenziali per mediare questi effetti. L'annullamento degli effetti protettivi da parte di RNasi e siRNA specifici, ma non da parte di siRNA di controllo, conferma il ruolo modulatore degli RNA nella risposta cellulare all'ipossia.

La qRT-PCR ha rilevato un aumento dell'espressione di mRNA per Fattore H, CD55 e CD59 nelle TEnc e nelle TEpC trattate con EV, mentre questo aumento non è stato osservato nei gruppi trattati con EV e RNasi specifiche. Questo suggerisce che le EV non solo riducono l'attivazione del complemento ma promuovono anche l'espressione di inibitori del complemento, fornendo una doppia protezione contro il danno da complemento.

L'analisi dell'espressione di C5b-9 e C3 mediante immunofluorescenza e FACS ha confermato che le EV riducono l'attivazione del complemento nelle TEnC e TEpC. La riduzione dell'espressione di queste componenti del complemento nel gruppo trattato con EV rispetto al gruppo non trattato supporta ulteriormente l'ipotesi che le EV esercitino un effetto protettivo significativo contro il danno mediato dal complemento.

L'aggiunta di specifiche RNasi e siRNA ha annullato gli effetti protettivi delle EV, confermando che gli RNA nelle EV sono fondamentali per la modulazione dell'attivazione del complemento. Questo risultato è coerente con i dati ottenuti per l'espressione di C5b-9, C3, Fattore H, CD55 e CD59, dimostrando un chiaro legame tra gli RNA nelle EV e la loro capacità di proteggere le cellule endoteliali e epiteliali tubulari dall'ipossia.

In conclusione, le EV derivate da EPC mostrano un potenziale significativo come agenti terapeutici per la protezione delle cellule endoteliali ed epiteliali tubulari renali dal danno indotto da ischemia tramite la riduzione dell'attività del complemento o l'aumento dell'espressione di inibitori del complemento come Fattore H, CD55 e CD59.

La comprensione dettagliata dei loro meccanismi d'azione e l'ottimizzazione delle loro applicazioni cliniche rappresentano un campo di ricerca promettente che potrebbe avere un impatto significativo sulla gestione della DGF nel trapianto renale.

5.6 Nuova strategia per la gestione dell'IRI renale

Il danno renale che si sviluppa durante il prelievo e la conservazione dell'organo è, come già descritto dettagliatamente, un danno di tipo ischemia-riperfusione. L'IRI rappresenta un'entità fisiopatogeneticamente dinamica, nella quale, però, la fase di ischemia e quella di ripercussione possono essere considerate almeno in parte separate. Questa divisione è utile dal punto di vista della ricerca, per l'identificazione e lo studio di nuove strategie terapeutiche che agiscano efficacemente in modo specifico su una delle due fasi.

Nella fase di ischemia i danni cellulari sono principalmente dovuti alla disfunzione mitocondriale ed all'impossibilità di mantenere una corretta omeostasi energetica; per questo motivo, l'ipotermia rappresenta una strategia ben nota ed efficace di preservazione d'organo, come dimostrato dalla maggior parte della letteratura scientifica in merito.

Invece, nella fase di ripercussione i danni cellulari sono principalmente dovuti all'aumento dello stress ossidativo e della risposta infiammatoria, che sostengono il danno in acuto e possono favorire la transizione a danno renale cronico. Questo comporta la riduzione della funzionalità del graft ed il rischio di sviluppare complicanze a breve e lungo termine.

La prima proposta sperimentale che questo studio intende avanzare è l'introduzione della perfusione renale ibrida, ovvero una perfusione inizialmente ipotermica per minimizzare i danni legati alla disfunzione mitocondriale e dell'omeostasi energetica, e successivamente introdurre progressivamente la perfusione normotermica per migliorare precocemente la funzionalità del graft.

La seconda proposta che si intende avanzare è l'utilizzo di terapie in associazione alla perfusione ibrida: in primo luogo, aggiungere sorbenti come PerSorb[®], che ha dimostrato risultati preclinici incoraggianti, per sostenere l'attività mitocondriale nella fase di ischemia e per ridurre la risposta infiammatoria in entrambe le fasi tramite l'adsorbimento dei mediatori proinfiammatori; in secondo luogo, l'utilizzo di terapia biologica tramite trapianto di mitocondri, somministrazione di MSCs e, soprattutto, somministrazione di EVs derivate da EPC, che ha anch'essa dimostrato risultati preclinici incoraggianti nel ridurre la risposta infiammatoria ed immunitaria in acuto e ridurre il rischio di progressione a danno cronico.

Attualmente, non esiste alcuno studio clinico in corso sull'efficacia di questa possibile strategia, che rappresenta una proposta innovativa potenzialmente rivoluzionaria in ambito trapiantologico. Viste le evidenze, questo studio sostiene che debba essere considerata la possibilità di valutare questa strategia tramite preclinici di conferma e, successivamente, trial clinici randomizzati.

5.7 Punti di forza dello studio

Lo studio retrospettivo include una popolazione di grandi dimensioni ed un tempo di osservazione molto lungo, con un totale di 1.560 pazienti osservati in un arco temporale di 25 anni (nel caso dell'analisi delle sopravvivenze, 1.406 pazienti osservati per 23 anni).

Non solo la numerosità della popolazione generale ed il lungo tempo di osservazione, ma anche la grande quantità di variabili analizzate all'interno della popolazione (38) e lo studio sulla sopravvivenza del paziente e del graft a 1 anno, 5 anni, 10 anni, 15 anni e 20 anni, rappresentano importanti punti di forza dello studio. Inoltre, la quasi totalità delle analisi statistiche è risultata essere significativa ed ha confermato i dati descritti in letteratura scientifica attesi. Infine, gli studi sperimentali hanno entrambi prodotto risultati positivi promettenti, che potrebbero costituire un punto di partenza di future analisi precliniche ed eventualmente trial clinici.

5.8 Limiti dello studio

Il principale limite dello studio clinico è rappresentato dal fatto di essere di tipo retrospettivo e basato su una casistica di tipo monocentrico. Pur essendo la numerosità globale dei pazienti studiati elevata, alcune sottopopolazioni analizzate, ad esempio la popolazione di riceventi da donatori DCD, sono caratterizzate da bassa numerosità, che potrebbe incidere sul calcolo della significatività statistica, soprattutto nelle analisi di sopravvivenza comparativa. La presenza di questo limite è stata riportata e discussa ogniqualvolta si sia presentata nel corso dello studio. Nonostante questi limiti, i risultati riscontrati in termini di rischio di DGF e di sopravvivenza del paziente e del graft sono risultati essere sovrapponibili ai dati presenti nella letteratura scientifica internazionale.

Per quanto riguarda lo studio della perfusione renale ex vivo, nonostante i risultati promettenti è importante considerare che il modello suino studiato in un ambiente controllato potrebbe non riflettere pienamente le condizioni cliniche reali. Studi futuri dovrebbero concentrarsi su sperimentazioni cliniche per confermare l'efficacia di PerSorb® in corso di IRI in pazienti umani. Inoltre, ulteriori ricerche potrebbero esplorare ulteriormente i meccanismi molecolari attraverso i quali PerSorb® esercita i suoi effetti protettivi, al fine di ottimizzare ulteriormente le condizioni di perfusione e migliorare la conservazione degli organi.

Un altro limite dello studio è rappresentato dal modello murino utilizzato per l'analisi dell'attività delle EV derivate da EPC che, sebbene utile per una prima fase preclinica, potrebbe non riprodurre in modo esaustivo la complessità della risposta umana all'IRI. Studi futuri dovrebbero mirare a confermare i risultati dimostrati nel modello murino in modelli preclinici più complessi ed eventualmente in studi clinici. Inoltre, l'identificazione dei meccanismi molecolari esatti attraverso i quali gli RNA nelle EV modulano il complemento potrebbe offrire ulteriori marcatori diagnostici di danno da ischemia-riperfusion e target terapeutici. Anche l'utilizzo di modelli cellulari in vitro rappresenta una limitazione, in quanto potrebbe non rappresentare pienamente la complessità dell'ambiente in vivo. Gli stessi risultati andrebbero confermati in modelli animali ed eventualmente in studi clinici per valutare l'efficacia delle EV derivate da EPC.

6. Prospettive future

6.1 Trapianto di mitocondri

La disfunzione mitocondriale è una caratteristica fondamentale della patogenesi del danno renale da IRI (cfr. 1.6). Una possibile strategia terapeutica per ridurre il danno renale in corso di DGF e migliorare la sopravvivenza del paziente e del graft potrebbe essere rappresentato dal trapianto di mitocondri, che sosterebbero il metabolismo energetico cellulare del tessuto renale riducendone la disfunzione e le lesioni. L'efficacia del trapianto di mitocondri è già stata descritta da diversi studi, in particolare nel campo del trapianto di cuore e nell'ischemia miocardica (cfr. 1.11.3).

Come il cuore, anche il rene è un organo caratterizzato da elevata richiesta energetica funzionale, per cui gli l'efficacia osservata nel trapianto di cuore potrebbero risultare utile anche nel trapianto di rene. Nel caso del trapianto renale, sia l'infusione che l'iniezione locale di mitocondri potrebbero essere strategie di somministrazione valide, poiché da una parte il rene è caratterizzato da un'alta attività metabolica ossidativa ed assorbirebbe i mitocondri infusi, dall'altra si ha l'accesso diretto al tessuto renale durante l'intervento chirurgico.

I mitocondri trapiantati potrebbero sostenere la popolazione mitocondriale disfunzionale del graft (anche tramite fusione con i mitocondri danneggiati) e ripristinare la produzione di ATP mediante fosforilazione ossidativa, permettendo il mantenimento dell'integrità cellulare e delle funzioni fisiologiche delle cellule renali. In questo modo potrebbero ridurre i danni tissutali legati alla fase ischemica, come la deplezione di ATP e l'accumulo dei suoi cataboliti. Inoltre, i mitocondri trapiantati potrebbero contribuire alla riduzione dello stress ossidativo tramite la produzione di enzimi antiossidanti e ridurre la quantità di ROS prodotte durante la fase di riperfusione. La riduzione dei danni durante la fase ischemica e della produzione di ROS durante la fase di riperfusione, nonché la riduzione degli effetti citotossici e dei fenomeni apoptotici, potrebbero ridurre di conseguenza l'espressione delle citochine proinfiammatorie e delle chemochine responsabili dell'inizio e del mantenimento della risposta infiammatoria tissutale indotta da IRI.

In conclusione, sebbene ulteriori studi dovrebbero essere effettuati per valutare l'efficacia del trapianto di mitocondri nel trapianto renale, questa strategia terapeutica potrebbe rappresentare una valida frontiera innovativa nel trapianto di rene.

6.2 Modulazione del microbioma intestinale

Un'altra strategia terapeutica innovativa per il trattamento di DGF potrebbe essere rappresentata dalla modulazione del microbioma intestinale. I linfociti T posseggono un importante ruolo nella patogenesi dell'AKI (cfr. 1.5) (274) e diversi studi hanno dimostrato che il microbioma intestinale può influenzare la loro attività (275).

Recentemente, Gharaie et al. ha documentato come, in un modello murino di danno renale da IRI, la modulazione del microbioma intestinale tramite somministrazione di amoxicillina ha migliorato il recupero della funzione renale e ridotto la fibrosi(276). Questi stessi risultati non sono stati osservati nel gruppo di controllo germ-free (GF), confermando come gli effetti protettivi debbano necessariamente essere legati al microbioma. Allo stesso modo, questi risultati non sono stati osservati nel gruppo knockout per CD8, mentre sono rimasti validi nel gruppo knockout per CD4, lasciando supporre che gli effetti protettivi dell'amoxicillina siano mediati, almeno in parte, dai linfociti T CD8+. Il trattamento con amoxicillina ha determinato modificazioni di molteplici popolazioni batteriche intestinali, riduzione dell'espressione di geni proinfiammatori e profibrotici, come IL-1 β , IL-17, TNF- α e TGF-1 β , riduzione dell'attività di neutrofili e macrofagi, nonché aumento dell'espressione di FOXP-3 e di inibitori del checkpoint immunitario, come PD-1.

Tuttavia, i meccanismi attraverso cui le modificazioni del microbioma indotte da amoxicillina agiscono sull'attività immunitaria e sul miglioramento del danno renale da IRI rimangono poco esplorate.

Gharaie et al. hanno anche osservato che la somministrazione preventiva di amoxicillina prima del danno renale acuto non ha determinato gli stessi effetti protettivi; ciò lascia supporre che i meccanismi attraverso cui la modulazione del microbioma intestinale regoli l'attività immunitaria in corso di danno renale da IRI siano ancora da comprendere a fondo.

Sebbene ulteriori studi preclinici siano necessari per comprendere maggiormente le sue basi biologiche e molecolari, la modulazione del microbioma intestinale potrebbe costituire una nuova frontiera promettente nel trapianto renale.

7. Conclusioni

Lo studio retrospettivo sulla popolazione dei pazienti trapiantati presso il Centro Trapianto Renale dell'A.O.U. Maggiore della Carità di Novara ha permesso di valutare la storia trapiantologica generale e confermare l'evidenza riportata nella letteratura scientifica in modo approfondito e dettagliato. Questo studio ha incluso un'ampia gamma di pazienti riceventi trapianto renale, offrendo così un'analisi completa e rappresentativa dell'attività del centro. Sono stati presi in esame numerosi parametri clinici, sia di tipo demografico, sia chirurgico, sia del follow-up, la cui interpretazione ha permesso di ricavare e contestualizzare le diverse dinamiche che influenzano il successo del trapianto. Tutti i fattori di rischio di DGF descritti nella letteratura scientifica sono stati attentamente analizzati ed associati all'evento DGF, valutandone l'effetto negativo o protettivo. Tra questi fattori, sono stati inclusi la qualità ed il tempo di ischemia fredda del graft, le condizioni preesistenti del donatore e del ricevente. Lo studio ha documentato come i risultati siano stati quasi sempre sovrapponibili a quelli riportati dall'evidenza scientifica, confermando la validità dei fattori di rischio noti e fornendo ulteriore supporto empirico alla letteratura esistente.

In particolare, l'analisi delle sopravvivenze ha confermato che la DGF rappresenta una complicanza trapiantologica significativa, associata alla riduzione della sopravvivenza a lungo termine, sia del paziente che del graft. Questo risultato sottolinea l'importanza di identificare e mitigare i fattori di rischio associati alla DGF per migliorare gli esiti del trapianto renale. Gli studi preclinici sperimentali presentati hanno fornito entrambi risultati promettenti, offrendo nuove prospettive per il miglioramento delle terapie nel trapianto renale.

La perfusione renale ipotermica ex vivo con l'ausilio di sorbente ha documentato una minore disfunzione mitocondriale ed una migliore funzionalità renale a breve termine. Questo approccio innovativo ha dimostrato di poter preservare meglio la funzione mitocondriale, riducendo così il rischio di danni cellulari e migliorando la qualità del graft durante il periodo critico di conservazione e trasporto. L'efficacia della perfusione renale ipotermica con sorbente rappresenta un risultato significativo verso il miglioramento degli esiti del trapianto renale, potenzialmente aumentando il numero di reni disponibili e la loro qualità.

Parallelamente, la somministrazione in vivo ed in vitro di vescicole extracellulari derivate da cellule progenitrici endoteliali (EPCs) ha documentato una serie di effetti benefici notevoli. Queste vescicole extracellulari hanno dimostrato di possedere proprietà inibitorie sulla risposta infiammatoria, che spesso caratterizza il trapianto renale. Inoltre, hanno dimostrato di avere effetti proangiogenetici, aspetto cruciale per il ripristino della perfusione del graft e

la rigenerazione del tessuto renale danneggiato. Gli effetti proliferativi ed antiapoptotici delle vescicole extracellulari derivate da EPCs sono stati altresì significativi. Questo aspetto è fondamentale per prevenire la perdita cellulare e sostenere il recupero funzionale del rene. Inoltre, la riduzione del rischio di progressione verso il danno renale cronico rappresenta un altro traguardo importante, poiché l'uso di queste vescicole potrebbe quindi offrire una nuova strategia terapeutica per prevenire la cronicizzazione del danno, migliorando la qualità della vita dei pazienti e riducendo la necessità di terapie sostitutive come la dialisi o trapianti successivi.

L'aspetto più innovativo e potenzialmente più rivoluzionario proposto dallo studio è quello di utilizzare una perfusione renale ibrida, combinando la perfusione ipotermica alla perfusione normotermica, in associazione all'uso di sorbente e alla terapia biologica con vescicole extracellulari (EVs). Questo approccio promettente consentirebbe di trovare il giusto equilibrio tra la riduzione del danno cellulare e il recupero rapido della funzionalità del graft, con il duplice risultato di ridurre significativamente il rischio di sviluppare DGF e di aumentare la sopravvivenza sia del paziente che del graft nel lungo termine.

La perfusione renale ibrida sfrutta i vantaggi di entrambe le tecniche di perfusione: infatti, l'ipotermia è efficace, nelle fasi iniziali, nel ridurre il metabolismo cellulare e nel minimizzare il danno ischemico durante la conservazione del graft; successivamente, la progressiva transizione alla perfusione normotermica determinerebbe il ripristino graduale della temperatura fisiologica dell'organo, da una parte consentendo una migliore valutazione della funzionalità renale pre-trapianto e dall'altra favorendo la riparazione del tessuto danneggiato. L'aggiunta del sorbente aiuta a rimuovere le tossine e i prodotti di scarto accumulati, migliorando ulteriormente l'ambiente interno del graft e sostenendone l'attività metabolica mitocondriale. Parallelamente, la terapia biologica con EVs derivate da EPCs comporta significativi benefici in senso antinfiammatorio, proangiogenetico, proliferativo ed antiapoptotico. Questo approccio combinato potrebbe non solo ottimizzare la funzionalità precoce del graft, ma anche prolungarne la durata nel tempo, riducendo così la necessità di ulteriori interventi medici e migliorando la qualità della vita dei pazienti trapiantati.

L'implementazione di questi studi risulta cruciale per portare avanti l'innovazione nel campo della trapiantologia renale e per offrire nuove speranze ai pazienti affetti da insufficienza renale terminale. Si auspica quindi che studi preclinici di conferma vengano condotti per validare i risultati promettenti ottenuti finora e che, successivamente, trial clinici randomizzati possano essere approvati per valutare l'efficacia e la sicurezza nell'uomo di questa nuova frontiera del trapianto renale.

8. Bibliografia

1. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LYC, et al. Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant. *New England Journal of Medicine*. 1999 Dec 2;341(23):1725–30.
2. Kaplan B, Schold J, Meier-Kriesche H. Overview of Large Database Analysis in Renal Transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2003 Sep;3(9):1052–6.
3. Rao PS, Merion RM, Ashby VB, Port FK, Wolfe RA, Kayler LK. Renal Transplantation in Elderly Patients Older Than 70 Years of Age: Results From the Scientific Registry of Transplant Recipients. *Transplantation*. 2007 Apr 27;83(8):1069–74.
4. Mehta J, Ndubueze O, Tatum D, Jeon H, Paramesh A, Killackey M, et al. Kidney Transplant Outcomes in Recipients Over the Age of 70. *Cureus*. 2023 Jan 20;
5. OJO AO, HANSON JA, MEIER-KRIESCHE HU, OKECHUKWU CN, WOLFE RA, LEICHTMAN AB, et al. Survival in Recipients of Marginal Cadaveric Donor Kidneys Compared with Other Recipients and Wait-Listed Transplant Candidates. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2001 Mar;12(3):589–97.
6. Loubeau PR, Loubeau JM, Jantzen R. The Economics of Kidney Transplantation versus Hemodialysis. *Progress in Transplantation*. 2001 Dec 5;11(4):291–7.
7. Coresh J. Update on the Burden of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017 Apr;28(4):1020–2.
8. Mudiayi D, Shojai S, Okpechi I, Christie EA, Wen K, Kamaleldin M, et al. Global Estimates of Capacity for Kidney Transplantation in World Countries and Regions. *Transplantation*. 2022 Jun 7;106(6):1113–22.
9. Boenink R, Kramer A, Tuinhout RE, Savoye E, Åsberg A, Idrizi A, et al. Trends in kidney transplantation rate across Europe: study from the ERA Registry. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2023 May 31;38(6):1528–39.
10. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *The Lancet*. 2004 Nov;364(9447):1814–27.
11. “Centro Nazionale Trapianti, Annual activity report 2022; <http://www.salute.gov.it>, 2022.”
12. “Centro Nazionale Trapianti, Valutazione di qualità dell’attività del trapianto di rene 2000-2019; <http://www.salute.gov.it>, 2021.”
13. Himmelfarb J, Ikizler TA. Hemodialysis. *New England Journal of Medicine*. 2010 Nov 4;363(19):1833–45.
14. Himmelfarb J. Hemodialysis Complications. *American Journal of Kidney Diseases*. 2005 Jun;45(6):1122–31.
15. Gonwa TA, Mai ML, Smith LBMD, Levy MF, Goldstein RM, Klintmalm GB. Immunosuppression for delayed or slow graft function in primary cadaveric renal transplantation: use of low dose tacrolimus therapy with post-operative administration of anti-CD25 monoclonal antibody. *Clin Transplant*. 2002 Apr 22;16(2):144–9.
16. Shaffer D, Langone A, Nylander WA, Goral S, Kizilisik AT, Helderma JH. A pilot protocol of a calcineurin-inhibitor free regimen for kidney transplant recipients of marginal donor kidneys or with delayed graft function. *Clin Transplant*. 2003 Jun 10;17(s9):31–4.
17. Shoskes DA, Cecka JM. DELETERIOUS EFFECTS OF DELAYED GRAFT FUNCTION IN CADAVERIC RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS INDEPENDENT OF ACUTE REJECTION^{1,2,3}. *Transplantation*. 1998 Dec;66(12):1697–701.
18. Ojo AO, Wolfe RA, Held PJ, Port FK, Schmouder RL. DELAYED GRAFT FUNCTION: RISK FACTORS AND IMPLICATIONS FOR RENAL ALLOGRAFT SURVIVAL¹. *Transplantation*. 1997 Apr;63(7):968–74.
19. Fontán MP, Rodríguez-Carmona A, Bouza P, Falcón TG, Moncalián J, Oliver J, et al. OUTCOME OF GRAFTS WITH LONG-LASTING DELAYED FUNCTION AFTER RENAL TRANSPLANTATION. *Transplantation*. 1996 Jul;62(1):42–7.
20. Freedland SJ, Shoskes DA. Economic impact of delayed graft function and suboptimal kidneys. *Transplant Rev*. 1999 Jan;13(1):23–30.
21. Karopadi AN, Mason G, Rettore E, Ronco C. Cost of peritoneal dialysis and haemodialysis across the world. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2013 Oct 1;28(10):2553–69.
22. Kim DW, Tsapepas D, King KL, Husain SA, Corvino FA, Dillon A, et al. Financial impact of delayed graft function in kidney transplantation. *Clin Transplant*. 2020 Oct 11;34(10).
23. Mannon RB. Delayed Graft Function: The AKI of Kidney Transplantation. *Nephron*. 2018;140(2):94–8.

24. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed Graft Function in the Kidney Transplant. *American Journal of Transplantation*. 2011 Nov;11(11):2279–96.
25. Cecka JM. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry. *Clin Transplant*. 1999;1–21.
26. Wilson CSSWBHDTRDFJ. The early economic costs of delayed graft function in DCD kidney transplantation. 17th Annual Congress of the British Transplantation Society, Glasgow. 2014;
27. Hariharan S, McBride MA, Bennett LE, Cohen EP. RISK FACTORS FOR RENAL ALLOGRAFT SURVIVAL FROM OLDER CADAVER DONORS¹. *Transplantation*. 1997 Dec;64(12):1748–54.
28. Ponticelli C, Reggiani F, Moroni G. Delayed Graft Function in Kidney Transplant: Risk Factors, Consequences and Prevention Strategies. *J Pers Med*. 2022 Sep 21;12(10):1557.
29. Yarlagadda SG, Coca SG, Garg AX, Doshi M, Poggio E, Marcus RJ, et al. Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008 Apr 3;23(9):2995–3003.
30. Shoskes DSAKS. Delayed graft function. Influence on outcome and strategies for prevention. *Urologic Clinics of North America*. 2001;721–32.
31. Fakhr Yasserli AM, Namdari F, Gooran S, Ahmadi A, Dehghani S, Asadi M, et al. Living versus deceased kidney transplantation: Comparison of complications. *Urologia Journal*. 2021 Aug 18;88(3):185–9.
32. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2003 Apr;3:114–25.
33. Hernandez A, Light JA, Barhyte DY, Mabudian M, Gage F. ABLATING THE ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN NON-HEART-BEATING DONOR KIDNEYS^{1,2}. *Transplantation*. 1999 Jan;67(2):200–6.
34. Narayanan R, Cardella CJ, Cattran DC, Cole EH, Tinckam KJ, Schiff J, et al. Delayed Graft Function and the Risk of Death With Graft Function in Living Donor Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Kidney Diseases*. 2010 Nov;56(5):961–70.
35. Tingle SJ, Figueiredo RS, Moir JA, Goodfellow M, Talbot D, Wilson CH. Machine perfusion preservation versus static cold storage for deceased donor kidney transplantation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019 Mar 15;
36. Yuan X, Theruvath AJ, Ge X, Floerchinger B, Jurisch A, García-Cardena G, et al. Machine perfusion or cold storage in organ transplantation: indication, mechanisms, and future perspectives. *Transplant International*. 2010 Jan 13;23(6):561–70.
37. Snoeijs MGJ, Wiermans B, Christiaans MH, Van Hooff JP, Timmerman BE, Schurink GWH, et al. Recipient Hemodynamics During Non-Heart-Beating Donor Kidney Transplantation Are Major Predictors of Primary Nonfunction. *American Journal of Transplantation*. 2007 May;7(5):1158–66.
38. Zukowski M, Bohatyrewicz R, Krawczyk AA. Influence of Selected Factors on Occurrence of Delayed Kidney Graft Function: A Multivariate Analysis. *Transplant Proc*. 2007 Nov;39(9):2704–6.
39. Debout A, Foucher Y, Trébern-Launay K, Legendre C, Kreis H, Mourad G, et al. Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation. *Kidney Int*. 2015 Feb;87(2):343–9.
40. Liu L, Yang D, Li X, Cheng K, Huang J. Effect of Long Cold Ischemia Time of Kidneys from Aged Donors on Prognosis of Kidney Transplantation. *Ann Transplant*. 2021 Feb 23;26.
41. Echterdiek F, Latus J, Döhler B, Schwenger V, Süsal C. Influence of Cold Ischemia Time on the Outcome of Kidney Transplants from Donors Aged 70 Years and Above—A Collaborative Transplant Study Report. *Transplantation*. 2021 Nov 21;105(11):2461–9.
42. Heilman RL, Smith ML, Kurian SM, Huskey J, Batra RK, Chakkera HA, et al. Transplanting Kidneys from Deceased Donors With Severe Acute Kidney Injury. *American Journal of Transplantation*. 2015 Aug;15(8):2143–51.
43. Narayanan R, Cardella CJ, Cattran DC, Cole EH, Tinckam KJ, Schiff J, et al. Delayed Graft Function and the Risk of Death With Graft Function in Living Donor Kidney Transplant Recipients. *American Journal of Kidney Diseases*. 2010 Nov;56(5):961–70.
44. marshall R, Ahsan N, Dhillon S, Holman M, Yang HC. Adverse effect of donor vasopressor support on immediate and one-year kidney allograft function. *Surgery*. 1996 Oct;120(4):663–6.
45. Audard V, Matignon M, Dahan K, Lang P, Grimbert P. Renal transplantation from extended criteria cadaveric donors: problems and perspectives overview. *Transplant International*. 2007 Sep 10;0(0):070915194042001-???
46. Metzger RA, Delmonico FL, Feng S, Port FK, Wynn JJ, Merion RM. Expanded criteria donors for kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2003 Apr;3:114–25.
47. Baid-Agrawal S, Frei UA. Living donor renal transplantation: recent developments and perspectives. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2007 Jan;3(1):31–41.

48. von Moos S, Akalin E, Mas V, Mueller TF. Assessment of Organ Quality in Kidney Transplantation by Molecular Analysis and Why It May Not Have Been Achieved, Yet. *Front Immunol.* 2020 May 12;11.
49. Eadon MT, Dagher PC, El-Achkar TM. Cellular and molecular interrogation of kidney biopsy specimens. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2022 Mar;31(2):160–7.
50. Weinstein JR, Anderson S. The Aging Kidney: Physiological Changes. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2010 Jul;17(4):302–7.
51. Denic A, Glasscock RJ, Rule AD. Structural and Functional Changes With the Aging Kidney. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2016 Jan;23(1):19–28.
52. Merion RM. Deceased-Donor Characteristics and the Survival Benefit of Kidney Transplantation. *JAMA.* 2005 Dec 7;294(21):2726.
53. Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW, et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation.* 2002 Nov;74(9):1281–6.
54. Querard AH, Le Borgne F, Dion A, Giral M, Mourad G, Garrigue V, et al. Propensity score–based comparison of the graft failure risk between kidney transplant recipients of standard and expanded criteria donor grafts: Toward increasing the pool of marginal donors. *American Journal of Transplantation.* 2018 May;18(5):1151–7.
55. Alfrey EJ, Boissy AR, Lerner SM. Dual-kidney transplants: long-term results. *Transplantation.* 2003 Apr;75(8):1232–6.
56. Andrés A, Morales JM, Herrero JC, Praga M, Morales E, Hernández E, et al. DOUBLE VERSUS SINGLE RENAL ALLOGRAFTS FROM AGED DONORS. *Transplantation.* 2000 May;69(10):2060–6.
57. Remuzzi G, Cravedi P, Perna A, Dimitrov BD, Turturro M, Locatelli G, et al. Long-Term Outcome of Renal Transplantation from Older Donors. *New England Journal of Medicine.* 2006 Jan 26;354(4):343–52.
58. Snanoudj R, Timsit MO, Rabant M, Tinel C, Lazareth H, Lamhaut L, et al. Dual Kidney Transplantation: Is It Worth It? *Transplantation.* 2017 Mar;101(3):488–97.
59. Ibrahim M, Greenhall GHB, Summers DM, Mumford L, Johnson R, Baker RJ, et al. Utilization and Outcomes of Single and Dual Kidney Transplants from Older Deceased Donors in the United Kingdom. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* 2020 Sep;15(9):1320–9.
60. Macedo E, Karl B, Lee E, Mehta RL. A randomized trial of albumin infusion to prevent intradialytic hypotension in hospitalized hypoalbuminemic patients. *Crit Care.* 2021 Dec 6;25(1):18.
61. Kanbay M, Ertuglu LA, Afsar B, Ozdogan E, Siritopol D, Covic A, et al. An update review of intradialytic hypotension: concept, risk factors, clinical implications and management. *Clin Kidney J.* 2020 Dec 28;13(6):981–93.
62. Mazer M, Perrone J. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: Pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Journal of Medical Toxicology.* 2008 Mar;4(1):2–6.
63. Mihatsch MKMMKYYNVRB. The side-effects of ciclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol.* 1998;
64. Raghavan R, Shawar S. Mechanisms of Drug-Induced Interstitial Nephritis. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2017 Mar;24(2):64–71.
65. Noris M, Remuzzi G. Thrombotic Microangiopathy After Kidney Transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2010 Jul;10(7):1517–23.
66. Hahn D, Hodson EM, Hamiwka LA, Lee VW, Chapman JR, Craig JC, et al. Target of rapamycin inhibitors (TOR-I; sirolimus and everolimus) for primary immunosuppression in kidney transplant recipients. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2019 Dec 16;
67. Pascual J, Berger SP, Chadban SJ, Citterio F, Kamar N, Hesselink DA, et al. Evidence-based practice: Guidance for using everolimus in combination with low-exposure calcineurin inhibitors as initial immunosuppression in kidney transplant patients. *Transplant Rev.* 2019 Oct;33(4):191–9.
68. Edelstein CL, Ling H, Schrier RW. The nature of renal cell injury. *Kidney Int.* 1997 May;51(5):1341–51.
69. Haugen E, Nath KA. The Involvement of Oxidative Stress in the Progression of Renal Injury. *Blood Purif.* 1999;17(2–3):58–65.
70. Piko N, Bevc S, Hojs R, Ekart R. The Role of Oxidative Stress in Kidney Injury. *Antioxidants.* 2023 Sep 16;12(9):1772.
71. Shoskes DA, Xie Y, Gonzalez-Cadavid NF. NITRIC OXIDE SYNTHASE ACTIVITY IN RENAL ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN THE RAT. *Transplantation.* 1997 Feb;63(4):495–500.

72. Ling H, Edelstein C, Gengaro P, Meng X, Lucia S, Knotek M, et al. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1999 Sep 1;277(3):F383–90.
73. Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS. In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *Journal of Clinical Investigation*. 1996 May 15;97(10):2377–83.
74. Bonventre J V, Sukhatme VP, Bamberger M, Ouellette AJ, Brown D. Localization of the protein product of the immediate early growth response gene, Egr-1, in the kidney after ischemia and reperfusion. *Cell Regul*. 1991 Mar;2(3):251–60.
75. Emami A, Schwartz JH, Borkan SC. Transient ischemia or heat stress induces a cytoprotectant protein in rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1991 Apr 1;260(4):F479–85.
76. Lemos FBC, Ijzermans JNM, Zondervan PE, Peeters AMA, van den Engel S, Mol WM, et al. Differential Expression of Heme Oxygenase-1 and Vascular Endothelial Growth Factor in Cadaveric and Living Donor Kidneys after Ischemia-Reperfusion. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003 Dec;14(12):3278–87.
77. Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V, et al. ACTIVATION OF MITOCHONDRIAL APOPTOTIC PATHWAYS IN HUMAN RENAL ALLOGRAFTS AFTER ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY. *Transplantation*. 2003 Jul;76(1):50–4.
78. DeVries ME, Hosiawa KA, Cameron CM, Bosinger SE, Persad D, Kelvin AA, et al. The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury. *Semin Immunol*. 2003 Feb;15(1):33–48.
79. Caban A BGOGSSADRCL. Factors determining changes in concentrations of pro-inflammatory markers in blood serum in the initial period after kidney transplantation from dead donor. . *Ann Transplant*. 2009;
80. DE PERROT M, SEKINE Y, FISCHER S, WADDELL TK, McRAE K, LIU M, et al. Interleukin-8 Release during Early Reperfusion Predicts Graft Function in Human Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jan 15;165(2):211–5.
81. Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-Reperfusion of Rat Myocardium Activates Nuclear Factor- κ B and Induces Neutrophil Infiltration Via Lipopolysaccharide-Induced CXC Chemokine. *Circulation*. 2001 May 8;103(18):2296–302.
82. Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med*. 2002 Jun;8(6):582–7.
83. Arumugam T V., Shiels IA, Woodruff TM, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. Protective Effect of a New C5a Receptor Antagonist against Ischemia–Reperfusion Injury in the Rat Small Intestine. *Journal of Surgical Research*. 2002 Apr;103(2):260–7.
84. Biglarnia AR, Huber-Lang M, Mohlin C, Ekdahl KN, Nilsson B. The multifaceted role of complement in kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol*. 2018 Dec 26;14(12):767–81.
85. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*. 1994 Jan;76(2):301–14.
86. Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell*. 1990 Jul;62(1):3–6.
87. Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, Bonventre J V. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994 Jan 18;91(2):812–6.
88. Kobayashi A, Imamura H, Isobe M, Matsuyama Y, Soeda J, Matsunaga K, et al. Mac-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in ischemia-reperfusion injury of rat liver. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2001 Aug 1;281(2):G577–85.
89. Bonventre J V., Colvin RB. Adhesion molecules in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 1996 May;5(3):254–61.
90. Alejandro V, Scandling JD, Sibley RK, Dafoe D, Alfrey E, Deen W, et al. Mechanisms of filtration failure during postischemic injury of the human kidney. A study of the reperfused renal allograft. *Journal of Clinical Investigation*. 1995 Feb 1;95(2):820–31.
91. Angelescu M, Kraus T, Wiesel M, Hergesell O, Haberkorn U, Klar E. Assessment of renal graft function by perioperative monitoring of cortical microcirculation in kidney transplantation. I. *Transplantation*. 2003 Apr;75(8):1190–6.
92. Finn WF, Hak LJ, Grossman SH. Protective effect of prostacyclin on postischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int*. 1987 Oct;32(4):479–87.
93. Wilhelm SM, Simonson MS, Robinson A V., Stowe NT, Schulak JA. Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion. *Kidney Int*. 1999 Mar;55(3):1011–8.

94. Schilling M HFFHSCBMW. Pathogenesis of delayed kidney graft function: role of endothelin-1, thromboxane B2, and leukotriene B4. *Transplant Proc.* 1996;28:304–5.
95. Inman SR, Plott WK, Pomilee RA, Antonelli JA, Lewis RM. Endothelin-receptor blockade mitigates the adverse effect of preretrieval warm ischemia on posttransplantation renal function in rats. *Transplantation.* 2003 May 27;75(10):1655–9.
96. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 2003 May;63(5):1714–24.
97. Yoshida T, Kurella M, Beato F, Min H, Ingelfinger JR, Stears RL, et al. Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney Int.* 2002 May;61(5):1646–54.
98. Stegall MD, Park WD, Kim DY, Covarrubias M, Khair A, Kremers WK. Changes in intragraft gene expression secondary to ischemia reperfusion after cardiac transplantation. *Transplantation.* 2002 Oct;74(7):924–30.
99. Hoffmann SC, Kampen RL, Amur S, Sharaf MA, Kleiner DE, Hunter K, et al. Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 2002 Oct;74(7):916–23.
100. St. Peter SD, Imber CJ, Jones DC, Fuggle S V., Watson CJ, Friend PJ, et al. Genetic determinants of delayed graft function after kidney transplantation. *Transplantation.* 2002 Sep;74(6):809–13.
101. Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int.* 2004 Aug;66(2):514–7.
102. Tang C, Cai J, Yin XM, Weinberg JM, Venkatachalam MA, Dong Z. Mitochondrial quality control in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol.* 2021 May 24;17(5):299–318.
103. Garonzik-Wang JM, Lonze BE, Ruck JM, Luo X, Massie AB, Melancon K, et al. Mitochondrial membrane potential and delayed graft function following kidney transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2019 Feb;19(2):585–90.
104. Simon N, Hertig A. Alteration of Fatty Acid Oxidation in Tubular Epithelial Cells: From Acute Kidney Injury to Renal Fibrogenesis. *Front Med (Lausanne).* 2015 Aug 5;2.
105. Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko YA, Han SH, Chinga F, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med.* 2015 Jan 1;21(1):37–46.
106. Jiang M, Bai M, Lei J, Xie Y, Xu S, Jia Z, et al. Mitochondrial dysfunction and the AKI-to-CKD transition. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2020 Dec 1;319(6):F1105–16.
107. Kim J, Seok YM, Jung KJ, Park KM. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2009 Aug;297(2):F461–70.
108. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol Rev.* 2014 Jul;94(3):909–50.
109. Liu S, Soong Y, Seshan S V., Szeto HH. Novel cardiolipin therapeutic protects endothelial mitochondria during renal ischemia and mitigates microvascular rarefaction, inflammation, and fibrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2014 May 1;306(9):F970–80.
110. Chen J, Wu Q, Xie Y, Si B, Yang P, Wang W, et al. TRAP1 ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction by protecting renal tubular epithelial cell mitochondria. *The FASEB Journal.* 2017 Oct 14;31(10):4503–14.
111. Tan X, Zhang L, Jiang Y, Yang Y, Zhang W, Li Y, et al. Postconditioning ameliorates mitochondrial DNA damage and deletion after renal ischemic injury. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2013 Nov 1;28(11):2754–65.
112. Sun Z, Zhang X, Ito K, Li Y, Montgomery RA, Tachibana S, et al. Amelioration of oxidative mitochondrial DNA damage and deletion after renal ischemic injury by the K_{ATP} channel opener diazoxide. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2008 Mar;294(3):F491–8.
113. Qin N, Cai T, Ke Q, Yuan Q, Luo J, Mao X, et al. UCP2-dependent improvement of mitochondrial dynamics protects against acute kidney injury. *J Pathol.* 2019 Mar 28;247(3):392–405.
114. Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Schumacker PT, Chandel NS. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Trigger Hypoxia-Inducible Factor-Dependent Extension of the Replicative Life Span during Hypoxia. *Mol Cell Biol.* 2007 Aug 1;27(16):5737–45.
115. Ludwig-Portugall I, Bartok E, Dhana E, Evers BDG, Primiano MJ, Hall JP, et al. An NLRP3-specific inflammasome inhibitor attenuates crystal-induced kidney fibrosis in mice. *Kidney Int.* 2016 Sep;90(3):525–39.
116. Ding W, Guo H, Xu C, Wang B, Zhang M, Ding F. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated NLRP3 inflammasome activation contributes to aldosterone-induced renal tubular cells injury. *Oncotarget.* 2016 Apr 5;7(14):17479–91.

117. Jain M, Rivera S, Monclus EA, Synenki L, Zirk A, Eisenbart J, et al. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Regulate Transforming Growth Factor- β Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Jan;288(2):770–7.
118. Dröse S, Brandt U. Molecular Mechanisms of Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. In 2012. p. 145–69.
119. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev*. 2007 Jan;87(1):99–163.
120. Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, Przyklenk K, Hüttemann M. Molecular Mechanisms of Ischemia–Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation. *Mol Neurobiol*. 2013 Feb 26;47(1):9–23.
121. Kadenbach B, Ramzan R, Moosdorf R, Vogt S. The role of mitochondrial membrane potential in ischemic heart failure. *Mitochondrion*. 2011 Sep;11(5):700–6.
122. Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Rohan Jeyarajah D. Hypothesis: Is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process? *Kidney Int*. 1999 Jun;55(6):2157–68.
123. Tapiawala SN, Tinckam KJ, Cardella CJ, Schiff J, Cattran DC, Cole EH, et al. Delayed Graft Function and the Risk for Death with a Functioning Graft. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010 Jan;21(1):153–61.
124. Swanson KJ, Bhattarai M, Parajuli S. Delayed graft function: current status and future directions. *Curr Opin Organ Transplant*. 2023 Feb;28(1):1–7.
125. Venkateswara Rao K. Mechanism, Pathophysiology, Diagnosis, and Management of Renal Transplant Rejection. *Medical Clinics of North America*. 1990 Jul;74(4):1039–57.
126. Qiao JH RXTACLBCFMC. Expression of cell adhesion molecules in human cardiac allograft rejection. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 1992 . 1992;11(5).
127. Hauser I, Riess R, Hausknecht B, Thuringer H, Sterzel R. Expression of cell adhesion molecules in primary renal disease and renal allograft rejection. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 1997 Jun 1;12(6):1122–31.
128. Nicholson ML, Wheatley TJ, Horsburgh T, Edwards CM, Veithc PS, Bell PRF. The relative influence of delayed graft function and acute rejection on renal transplant survival. *Transplant International*. 1996 Jul;9(4):415–9.
129. Swanson KJ, Bhattarai M, Parajuli S. Delayed graft function: current status and future directions. *Curr Opin Organ Transplant*. 2023 Feb;28(1):1–7.
130. Shoskes DA, Halloran PF. Delayed Graft Function in Renal Transplantation: Etiology, Management and Long-term Significance. *Journal of Urology*. 1996 Jun;155(6):1831–40.
131. Cooper JE. Evaluation and Treatment of Acute Rejection in Kidney Allografts. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2020 Mar;15(3):430–8.
132. van den Hoogen MW, Hoitsma AJ, Hilbrands LB. Anti-T-cell antibodies for the treatment of acute rejection after renal transplantation. *Expert Opin Biol Ther*. 2012 Aug 1;12(8):1031–42.
133. Acharya S, Lama S, Kanigicherla DA. Anti-thymocyte globulin for treatment of T-cell-mediated allograft rejection. *World J Transplant*. 2023 Dec 18;13(6):299–308.
134. Brunet M, Millán López O, López-Hoyos M. T-Cell Cytokines as Predictive Markers of the Risk of Allograft Rejection. *Ther Drug Monit*. 2016 Apr;38(Supplement 1):S21–8.
135. Li C, Yang CW. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2009 Sep 28;5(9):513–9.
136. Halawi A, El Kurdi AB, Vernon KA, Solhjou Z, Choi JY, Saad AJ, et al. Uncovering a novel role of focal adhesion and interferon-gamma in cellular rejection of kidney allografts at single cell resolution. *Front Immunol*. 2023 Mar 31;14.
137. Jiang H, Chess L. The Specific Regulation Of Immune Responses By CD8⁺ T Cells Restricted By The MHC Class Ib Molecule, Qa-1. *Annu Rev Immunol*. 2000 Apr;18(1):185–216.
138. Tejani A, Emmett L. Acute and chronic rejection. *Semin Nephrol*. 2001 Sep;21(5):asnep0210498.
139. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thauat O, Naesens M. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney Int*. 2022 Apr;101(4):692–710.
140. Marks R, Finke J. Biologics in the prevention and treatment of graft rejection. *Springer Semin Immunopathol*. 2006 Jun 9;27(4):457–76.
141. Harrington CR, Yang GY, Levitsky J. Advances in Rejection Management. *Clin Liver Dis*. 2021 Feb;25(1):53–72.
142. Olyaei AJ, Thi K, DeMattos AM, Bennett WM. Use of Basiliximab and Daclizumab in Kidney Transplantation. *Progress in Transplantation*. 2001 Mar 5;11(1):33–9.
143. Petty M. Antibody-Mediated Rejection in Solid Organ Transplant. *AACN Adv Crit Care*. 2016 Jul 1;27(3):316–23.

144. Tomasoni S, Remuzzi G, Benigni A. Allograft Rejection: Acute and Chronic Studies. In: Gene Therapy for Renal Diseases and Transplantation. Basel: KARGER; 2008. p. 122–34.
145. Lai X, Zheng X, Mathew JM, Gallon L, Leventhal JR, Zhang ZJ. Tackling Chronic Kidney Transplant Rejection: Challenges and Promises. *Front Immunol*. 2021 May 20;12.
146. Pascual J, Pérez-Sáez MJ, Mir M, Crespo M. Chronic renal allograft injury: early detection, accurate diagnosis and management. *Transplant Rev*. 2012 Oct;26(4):280–90.
147. Gaston RS, Cecka JM, Kasiske BL, Fieberg AM, Leduc R, Cosio FC, et al. Evidence for Antibody-Mediated Injury as a Major Determinant of Late Kidney Allograft Failure. *Transplantation*. 2010 Jul 15;90(1):68–74.
148. Gill RG, Lin CM. Linking innate immunity and chronic antibody-mediated allograft rejection. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019 Dec;24(6):694–8.
149. Kim MY, Brennan DC. Therapies for Chronic Allograft Rejection. *Front Pharmacol*. 2021 Apr 15;12.
150. Neuhaus P. mTOR inhibitors: An overview. *Liver Transplantation*. 2001 Jun;7(6):473–84.
151. Raffin C, Vo LT, Bluestone JA. Treg cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nat Rev Immunol*. 2020 Mar 6;20(3):158–72.
152. Hanidziar D, Koulmanda M. Inflammation and the balance of Treg and Th17 cells in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Aug;15(4):411–5.
153. Ferreira LMR, Muller YD, Bluestone JA, Tang Q. Next-generation regulatory T cell therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Oct 20;18(10):749–69.
154. Lim MA, Kohli J, Bloom RD. Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? *Transplant Rev*. 2017 Jan;31(1):10–7.
155. Thadhani R, Pascual M, Bonventre J V. Acute Renal Failure. *New England Journal of Medicine*. 1996 May 30;334(22):1448–60.
156. Acute renal failure. III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2000 Jul 1;279(1):F3–11.
157. Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014 Feb 1;29(suppl 1):i19–24.
158. Kim HJ, Vaziri ND. Contribution of impaired Nrf2-Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2010 Mar;298(3):F662–71.
159. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 2004 Nov;10(11):549–57.
160. Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang MI, Kobayashi A, Yamamoto M, et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004 Feb 17;101(7):2040–5.
161. Miyata T, Takizawa S, van Ypersele de Strihou C. Hypoxia. 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2011 Feb;300(2):C226–31.
162. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007 Feb 1;47(1):89–116.
163. Liu M, Grigoryev DN, Crow MT, Haas M, Yamamoto M, Reddy SP, et al. Transcription factor Nrf2 is protective during ischemic and nephrotoxic acute kidney injury in mice. *Kidney Int*. 2009 Aug;76(3):277–85.
164. Wakabayashi N, Slocum SL, Skoko JJ, Shin S, Kensler TW. When NRF2 Talks, Who's Listening? *Antioxid Redox Signal*. 2010 Dec;13(11):1649–63.
165. Jin W, Wang H, Yan W, Xu L, Wang X, Zhao X, et al. Disruption of Nrf2 Enhances Upregulation of Nuclear Factor- κ B Activity, Proinflammatory Cytokines, and Intercellular Adhesion Molecule-1 in the Brain after Traumatic Brain Injury. *Mediators Inflamm*. 2008 Jan 25;2008(1).
166. Mao L, Wang H, Qiao L, Wang X. Disruption of Nrf2 Enhances the Upregulation of Nuclear Factor- κ B Activity, Tumor Necrosis Factor- α , and Matrix Metalloproteinase-9 after Spinal Cord Injury in Mice. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:1–10.
167. Wu QQ, Wang Y, Senitko M, Meyer C, Wigley WC, Ferguson DA, et al. Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates ischemic AKI and increases expression of protective genes Nrf2, PPAR γ , and HO-1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2011 May;300(5):F1180–92.
168. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of Renal Progenitor-Like Tubular Cells that Participate in the Regeneration Processes of the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003 Dec;14(12):3138–46.

169. Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ, et al. Hematopoietic Stem Cells Contribute to the Regeneration of Renal Tubules after Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003 May;14(5):1188–99.
170. Yu SMW, Bonventre J V. Acute kidney injury and maladaptive tubular repair leading to renal fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2020 May;29(3):310–8.
171. Ferenbach DA, Bonventre J V. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol*. 2015 May 3;11(5):264–76.
172. Franceschi C, Garagnani P, Parini P, Giuliani C, Santoro A. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 Oct 25;14(10):576–90.
173. Wang WJ, Cai GY, Chen XM. Cellular senescence, senescence-associated secretory phenotype, and chronic kidney disease. *Oncotarget*. 2017 Sep 8;8(38):64520–33.
174. Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NL. CELLULAR AND MOLECULAR PREDICTORS OF CHRONIC RENAL DYSFUNCTION AFTER INITIAL ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY OF A SINGLE KIDNEY1. *Transplantation*. 1997 Jul;64(2):190–7.
175. Castellano G, Franzin R, Sallustio F, Stasi A, Banelli B, Romani M, et al. Complement component C5a induces aberrant epigenetic modifications in renal tubular epithelial cells accelerating senescence by Wnt4/ β catenin signaling after ischemia/reperfusion injury. *Aging*. 2019 Jul 8;11(13):4382–406.
176. Franzin R, Stasi A, Fiorentino M, Stallone G, Cantaluppi V, Gesualdo L, et al. Inflammaging and Complement System: A Link Between Acute Kidney Injury and Chronic Graft Damage. *Front Immunol*. 2020 May 7;11.
177. Curci C, Castellano G, Stasi A, Divella C, Loverre A, Gigante M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis in ischaemia/reperfusion injury are mediated by complement anaphylatoxins and Akt pathway. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2014 Apr 1;29(4):799–808.
178. Shaw I, Rider S, Mullins J, Hughes J, Péault B. Pericytes in the renal vasculature: roles in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2018 Aug 25;14(8):521–34.
179. Cui J, Wu X, Song Y, Chen Y, Wan J. Complement C3 exacerbates renal interstitial fibrosis by facilitating the M1 macrophage phenotype in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2019 Nov 1;317(5):F1171–82.
180. Bohlson SS, Oâ€™Conner SD, Hulsebus HJ, Ho MM, Fraser DA. Complement, C1q, and C1q-Related Molecules Regulate Macrophage Polarization. *Front Immunol*. 2014 Aug 21;5.
181. Delpech PO, Thuillier R, SaintYves T, Danion J, Le Pape S, van Amersfoort ES, et al. Inhibition of complement improves graft outcome in a pig model of kidney autotransplantation. *J Transl Med*. 2016 Dec 23;14(1):277.
182. Berger M, Lefaucheur C, Jordan SC. Update on C1 Esterase Inhibitor in Human Solid Organ Transplantation. *Transplantation*. 2019 Sep;103(9):1763–75.
183. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997 Nov 6;390(6655):45–51.
184. Izquierdo MC, Perez-Gomez M V, Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Ruiz-Andres O, Poveda J, et al. Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2012 Dec 1;27(suppl 4):iv6–10.
185. Thurston RD, Larmonier CB, Majewski PM, Ramalingam R, Midura-Kiela M, Laubitz D, et al. Tumor Necrosis Factor and Interferon- γ Down-regulate Klotho in Mice With Colitis. *Gastroenterology*. 2010 Apr;138(4):1384-1394.e2.
186. Castellano G, Intini A, Stasi A, Divella C, Gigante M, Pontrelli P, et al. Complement Modulation of Anti-Aging Factor Klotho in Ischemia/Reperfusion Injury and Delayed Graft Function. *American Journal of Transplantation*. 2016 Jan;16(1):325–33.
187. Peng Q, Li K, Smyth LA, Xing G, Wang N, Meader L, et al. C3a and C5a Promote Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012 Sep;23(9):1474–85.
188. Johnston O, O’Kelly P, Spencer S, Donohoe J, Walshe JJ, Little DM, et al. Reduced graft function (with or without dialysis) vs immediate graft function—a comparison of long-term renal allograft survival. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2006 Aug 1;21(8):2270–4.
189. Halloran PHLG. Delayed Graft Function: State of the Art, November 10–11, Summit Meeting, Scottsdale, Arizona, USA. *American Journal of Transplantation*. 2001;
190. Yokoyama I UKKTTYOATH. Effect of prolonged delayed graft function on long-term graft outcome in cadaveric kidney transplantation. *Clin Transplant*. 1994;
191. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008 Oct 8;24(3):1039–47.
192. Swanson KJ, Bhattarai M, Parajuli S. Delayed graft function: current status and future directions. *Curr Opin Organ Transplant*. 2023 Feb;28(1):1–7.

193. Troppmann C, Gruessner AC, Gillingham KJ, Sutherland DER, Matas AJ, Gruessner RWG. Impact of delayed function on long-term graft survival after solid organ transplantation. *Transplant Proc.* 1999 Feb;31(1-2):1290-2.
194. Belzer FO, Ashby BS, Gulyassy PF, Powell M. Successful Seventeen-Hour Preservation and Transplantation of Human-Cadaver Kidney. *New England Journal of Medicine.* 1968 Mar 14;278(11):608-10.
195. Collins GM, Bravo-Shugarman M, Terasaki PI. KIDNEY PRESERVATION FOR TRANSPORTATION. *The Lancet.* 1969 Dec;294(7632):1219-22.
196. O'Callaghan JM, Morgan RD, Knight SR, Morris PJ. Systematic review and meta-analysis of hypothermic machine perfusion *versus* static cold storage of kidney allografts on transplant outcomes. *British Journal of Surgery.* 2013 Jun 10;100(8):991-1001.
197. Gallinat A, Fox M, Lüer B, Efferz P, Paul A, Minor T. Role of Pulsatility in Hypothermic Reconditioning of Porcine Kidney Grafts by Machine Perfusion After Cold Storage. *Transplantation.* 2013 Sep;96(6):538-42.
198. Zhong ZLZFFZZYKDWYYQ. Hypothermic Machine Perfusion Improves Kidney Viability through Amelioration of Vasospasm and Edema of Podocytes and Renal Tubular Epithelial Cells. *American Journal of Transplantation.* 2015;
199. Knijff LWD, van Kooten C, Ploeg RJ. The Effect of Hypothermic Machine Perfusion to Ameliorate Ischemia-Reperfusion Injury in Donor Organs. *Front Immunol.* 2022 Apr 29;13.
200. Schold JD, Kaplan B, Howard RJ, Reed AI, Foley DP, Meier-Kriesche HU. Are We Frozen in Time? Analysis of the Utilization and Efficacy of Pulsatile Perfusion in Renal Transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2005 Jul;5(7):1681-8.
201. H. Wilson C, R. Brook N, Talbot D. Preservation Solutions for Solid Organ Transplantation. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2006 Oct 1;6(10):1081-90.
202. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 2014 Nov 20;515(7527):431-5.
203. Darius T, Nath J, Mourad M. Simply Adding Oxygen during Hypothermic Machine Perfusion to Combat the Negative Effects of Ischemia-Reperfusion Injury: Fundamentals and Current Evidence for Kidneys. *Biomedicines.* 2021 Aug 11;9(8):993.
204. Gill J, Dong J, Eng M, Landsberg D, Gill JS. Pulsatile Perfusion Reduces the Risk of Delayed Graft Function in Deceased Donor Kidney Transplants, Irrespective of Donor Type and Cold Ischemic Time. *Transplantation.* 2014 Mar 27;97(6):668-74.
205. Moers C, Smits JM, Maathuis MHJ, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, et al. Machine Perfusion or Cold Storage in Deceased-Donor Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine.* 2009 Jan;360(1):7-19.
206. Moers C, Smits JM, Maathuis MHJ, Treckmann J, van Gelder F, Napieralski BP, et al. Machine Perfusion or Cold Storage in Deceased-Donor Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine.* 2009 Jan;360(1):7-19.
207. Zhong Z, Lan J, Ye S, Liu Z, Fan L, Zhang Y, et al. Outcome Improvement for Hypothermic Machine Perfusion Versus Cold Storage for Kidneys From Cardiac Death Donors. *Artif Organs.* 2017 Jul 13;41(7):647-53.
208. Rudich SM, Kaplan B, Magee JC, Arenas JD, Punch JD, Kayler LK, et al. Renal transplantations performed using non-heart-beating organ donors: going back to the future?1. *Transplantation.* 2002 Dec;1715-20.
209. Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW, et al. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors1. *Transplantation.* 2002 Nov;74(9):1281-6.
210. Tedesco-Silva H, Mello Offerri JC, Ayres Carneiro V, Ivani de Paula M, Neto ED, Brambate Carvalhinho Lemos F, et al. Randomized Trial of Machine Perfusion Versus Cold Storage in Recipients of Deceased Donor Kidney Transplants With High Incidence of Delayed Graft Function. *Transplant Direct.* 2017 May;3(5):e155.
211. Groen H, Moers C, Smits JM, Treckmann J, Monbaliu D, Rahmel A, et al. Cost-Effectiveness of Hypothermic Machine Preservation Versus Static Cold Storage in Renal Transplantation. *American Journal of Transplantation.* 2012 Jul;12(7):1824-30.
212. Nicholson ML, Hosgood SA. Renal Transplantation After Ex Vivo Normothermic Perfusion: The First Clinical Study. *American Journal of Transplantation.* 2013 May;13(5):1246-52.
213. Brasile L, Stubenitsky BM, Booster MH, Lindell S, Araneda D, Buck C, et al. Overcoming severe renal ischemia: the role of ex vivo warm perfusion. *Transplantation.* 2002 Mar;73(6):897-901.

214. Valero R, Cabrer C, Oppenheimer F, Trias E, Sánchez-Ibáñ J, De Cabo FM, et al. Normothermic re-circulation reduces primary graft dysfunction of kidneys obtained from non-heart-beating donors. *Transplant International*. 2000 Jul 25;13(4):303–10.
215. Hosgood SA, Nicholson ML. Normothermic kidney preservation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Apr;16(2):169–73.
216. Metcalfe MS, Waller JR, Hosgood SA, Shaw M, Hassanein W, Nicholson ML. A paired study comparing the efficacy of renal preservation by normothermic autologous blood perfusion and hypothermic pulsatile perfusion. *Transplant Proc*. 2002 Aug;34(5):1473–4.
217. Ferdinand JR, Hosgood SA, Moore T, Ferro A, Ward CJ, Castro-Dopico T, et al. Cytokine absorption during human kidney perfusion reduces delayed graft function-associated inflammatory gene signature. *American Journal of Transplantation*. 2021 Jun;21(6):2188–99.
218. Diab M, Lehmann T, Bothe W, Akhyari P, Platzer S, Wendt D, et al. Cytokine Hemoabsorption During Cardiac Surgery Versus Standard Surgical Care for Infective Endocarditis (REMOVE): Results From a Multicenter Randomized Controlled Trial. *Circulation*. 2022 Mar 29;145(13):959–68.
219. Saldaña-Gastulo JJC, Llamas-Barbarán M del R, Coronel-Chucos LG, Hurtado-Roca Y. Cytokine hemoabsorption with CytoSorb® in patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Critical Care Science*. 2023;35(2).
220. Schädler D, Pausch C, Heise D, Meier-Hellmann A, Brederlau J, Weiler N, et al. The effect of a novel extracorporeal cytokine hemoabsorption device on IL-6 elimination in septic patients: A randomized controlled trial. *PLoS One*. 2017 Oct 30;12(10):e0187015.
221. Poli EC, Rimmelé T, Schneider AG. Hemoabsorption with CytoSorb®. *Intensive Care Med*. 2019 Feb 16;45(2):236–9.
222. Kellum JA, Song M, Venkataraman R. Hemoabsorption removes tumor necrosis factor, interleukin-6, and interleukin-10, reduces nuclear factor- κ B DNA binding, and improves short-term survival in lethal endotoxemia*. *Crit Care Med*. 2004 Mar;32(3):801–5.
223. Kellum JA, Venkataraman R, Powner D, Elder M, Hergenroeder G, Carter M. Feasibility study of cytokine removal by hemoabsorption in brain-dead humans*. *Crit Care Med*. 2008 Jan;36(1):268–72.
224. Ehram JP, Arni S, Weisskopf M, Nowack M, Inci I. Extracorporeal cytokine adsorption reduces systemic cytokine storm and improves graft function in lung transplantation. *JTCVS Open*. 2023 Sep;15:497–507.
225. McCully JD, del Nido PJ, Emani SM. Mitochondrial transplantation for organ rescue. *Mitochondrion*. 2022 May;64:27–33.
226. Kaza AK, Wamala I, Friehs I, Kuebler JD, Rathod RH, Berra I, et al. Myocardial rescue with autologous mitochondrial transplantation in a porcine model of ischemia/reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017 Apr;153(4):934–43.
227. Masuzawa A, Black KM, Pacak CA, Ericsson M, Barnett RJ, Drumm C, et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2013 Apr 1;304(7):H966–82.
228. Rossi A, Asthana A, Riganti C, Sedrakyan S, Byers LN, Robertson J, et al. Mitochondria Transplantation Mitigates Damage in an In Vitro Model of Renal Tubular Injury and in an Ex Vivo Model of DCD Renal Transplantation. *Ann Surg*. 2023 Dec;278(6):e1313–26.
229. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Dec 26;10(1):68.
230. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*. 2011 Dec 14;9(1):12.
231. Morigi M, Rota C, Remuzzi G. Mesenchymal Stem Cells in Kidney Repair. In 2016. p. 89–107.
232. Lv L, Feng Y, Tang T, Liu B. New insight into the role of extracellular vesicles in kidney disease. *J Cell Mol Med*. 2019 Feb 25;23(2):731–9.
233. Grange C, Bussolati B. Extracellular vesicles in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2022 Aug 31;18(8):499–513.
234. Bi B, Schmitt R, Israilova M, Nishio H, Cantley LG. Stromal Cells Protect against Acute Tubular Injury via an Endocrine Effect. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007 Sep;18(9):2486–96.
235. Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2007 May;292(5):F1626–35.
236. De Broe ME, Wieme RJ, Logghe GN, Roels F. Spontaneous shedding of plasma membrane fragments by human cells in vivo and in vitro. *Clinica Chimica Acta*. 1977 Dec;81(3):237–45.

237. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun 7;9(6):654–9.
238. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2440–8.
239. Quaglia M, Merlotti G, Colombatto A, Bruno S, Stasi A, Franzin R, et al. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Potential Therapeutic Approach for Acute Kidney Injury. *Front Immunol.* 2022 Mar 10;13.
240. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2011 May 1;26(5):1474–83.
241. Lindoso RS, Collino F, Bruno S, Araujo DS, Sant’Anna JF, Tetta C, et al. Extracellular Vesicles Released from Mesenchymal Stromal Cells Modulate miRNA in Renal Tubular Cells and Inhibit ATP Depletion Injury. *Stem Cells Dev.* 2014 Aug;23(15):1809–19.
242. Ju G qun, Cheng J, Zhong L, Wu S, Zou X yu, Zhang G yuan, et al. Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Facilitate Tubular Epithelial Cell Dedifferentiation and Growth via Hepatocyte Growth Factor Induction. *PLoS One.* 2015 Mar 20;10(3):e0121534.
243. Song N, Zhang T, Xu X, Lu Z, Yu X, Fang Y, et al. miR-21 Protects Against Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury by Preventing Epithelial Cell Apoptosis and Inhibiting Dendritic Cell Maturation. *Front Physiol.* 2018 Jun 26;9.
244. Yuan X, Wang X, Chen C, Zhou J, Han M. Bone mesenchymal stem cells ameliorate ischemia/reperfusion-induced damage in renal epithelial cells via microRNA-223. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Dec 15;8(1):146.
245. Panfoli I, Ravera S, Podestà M, Cossu C, Santucci L, Bartolucci M, et al. Exosomes from human mesenchymal stem cells conduct aerobic metabolism in term and preterm newborn infants. *The FASEB Journal.* 2016 Apr 11;30(4):1416–24.
246. Zhao M, Liu S, Wang C, Wang Y, Wan M, Liu F, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Mitochondrial Damage and Inflammation by Stabilizing Mitochondrial DNA. *ACS Nano.* 2021 Jan 26;15(1):1519–38.
247. Visvanathan A, Ahmed K, Even-Faitelson L, Lleres D, Bazett-Jones DP, Lamond AI. Modulation of Higher Order Chromatin Conformation in Mammalian Cell Nuclei Can Be Mediated by Polyamines and Divalent Cations. *PLoS One.* 2013 Jun 26;8(6):e67689.
248. Zhang G, Zou X, Huang Y, Wang F, Miao S, Liu G, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Protect Against Acute Kidney Injury Through Anti-Oxidation by Enhancing Nrf2/ARE Activation in Rats. *Kidney Blood Press Res.* 2016;41(2):119–28.
249. Zhang G, Zou X, Miao S, Chen J, Du T, Zhong L, et al. The Anti-Oxidative Role of Micro-Vesicles Derived from Human Wharton-Jelly Mesenchymal Stromal Cells through NOX2/gp91(phox) Suppression in Alleviating Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *PLoS One.* 2014 Mar 17;9(3):e92129.
250. Zou X, Gu D, Xing X, Cheng Z, Gong D, Zhang G, et al. Human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles alleviate renal ischemic reperfusion injury and enhance angiogenesis in rats. *Am J Transl Res.* 2016;8(10):4289–99.
251. Shokeir AA, Hussein AM, Barakat N, Abdelaziz A, Elgarba M, Awadalla A. Activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*Nrf2*) and *Nrf2*-dependent genes by ischaemic pre-conditioning and post-conditioning: new adaptive endogenous protective responses against renal ischaemia/reperfusion injury. *Acta Physiologica.* 2014 Feb 7;210(2):342–53.
252. Han Y, Ren J, Bai Y, Pei X, Han Y. Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019 Apr;109:59–68.
253. Su H, Lei CT, Zhang C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. *Front Immunol.* 2017 Apr 21;8.
254. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadrnagara K, Carstens JL, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med.* 2015 Sep 3;21(9):998–1009.
255. Zilberman-Itskovich S, Abu-Hamad R, Zarura R, Sova M, Hachmo Y, Stark M, et al. Human mesenchymal stromal cells ameliorate complement induced inflammatory cascade and improve renal functions in a rat model of ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. *PLoS One.* 2019 Sep 12;14(9):e0222354.

256. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 2010 Nov;78(9):838–48.
257. Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Müller-Newen G, Djuric Z, et al. Mesenchymal Stem Cells Prevent Progressive Experimental Renal Failure but Maldifferentiate into Glomerular Adipocytes. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2007 Jun;18(6):1754–64.
258. Chen T, You Y, Jiang H, Wang ZZ. Epithelial–mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. *J Cell Physiol.* 2017 Dec 10;232(12):3261–72.
259. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells. *Circ Res.* 2004 Aug 20;95(4):343–53.
260. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science (1979).* 1997 Feb 14;275(5302):964–6.
261. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2000 Mar 28;97(7):3422–7.
262. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest.* 2004 Jun 16;34(6):392–401.
263. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia.* 2006 May 1;20(5):847–56.
264. Loomans CJM, Wan H, de Crom R, van Haperen R, de Boer HC, Leenen PJM, et al. Angiogenic Murine Endothelial Progenitor Cells Are Derived From a Myeloid Bone Marrow Fraction and Can Be Identified by Endothelial NO Synthase Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Aug;26(8):1760–7.
265. Ratajczak J, Kucia M, Mierzejewska K, Marlicz W, Pietrzowski Z, Wojakowski W, et al. Paracrine Proangiopoietic Effects of Human Umbilical Cord Blood-Derived Purified CD133⁺ Cells—Implications for Stem Cell Therapies in Regenerative Medicine. *Stem Cells Dev.* 2013 Feb;22(3):422–30.
266. Abdelgawad ME, Desterke C, Uzan G, Naserian S. Single-cell transcriptomic profiling and characterization of endothelial progenitor cells: new approach for finding novel markers. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Dec 24;12(1):145.
267. Yong T, Zhang X, Bie N, Zhang H, Zhang X, Li F, et al. Tumor exosome-based nanoparticles are efficient drug carriers for chemotherapy. *Nat Commun.* 2019 Aug 23;10(1):3838.
268. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Müller-Newen G, Yu D, et al. Transplanted Mesenchymal Stem Cells Accelerate Glomerular Healing in Experimental Glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2006 Aug;17(8):2202–12.
269. Rampino T, Gregorini M, Bedino G, Piotti G, Gabanti E, Ibatci A, et al. Mesenchymal stromal cells improve renal injury in anti-Thy 1 nephritis by modulating inflammatory cytokines and scatter factors. *Clin Sci.* 2011 Jan 1;120(1):25–36.
270. Cantaluppi V, Medica D, Mannari C, Stiacchini G, Figliolini F, Dellepiane S, et al. Endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles protect from complement-mediated mesangial injury in experimental anti-Thy1.1 glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2015 Mar;30(3):410–22.
271. Cribbs SK, Sutcliffe DJ, Taylor WR, Rojas M, Easley KA, Tang L, et al. Circulating endothelial progenitor cells inversely associate with organ dysfunction in sepsis. *Intensive Care Med.* 2012 Mar 14;38(3):429–36.
272. Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia–reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* 2012 Aug;82(4):412–27.
273. Cantaluppi V, Biancone L, Figliolini F, Beltramo S, Medica D, Deregibus MC, et al. Microvesicles Derived from Endothelial Progenitor Cells Enhance Neovascularization of Human Pancreatic Islets. *Cell Transplant.* 2012 Jun 1;21(6):1305–20.
274. Gharaie Fathabad S, Kurzhagen JT, Sadasivam M, Noel S, Bush E, Hamad ARA, et al. T Lymphocytes in Acute Kidney Injury and Repair. *Semin Nephrol.* 2020 Mar;40(2):114–25.
275. Noel S, Mohammad F, White J, Lee K, Gharaie S, Rabb H. Gut Microbiota-Immune System Interactions during Acute Kidney Injury. *Kidney360.* 2021 Mar;2(3):528–31.
276. Gharaie S, Lee K, Newman-Rivera AM, Xu J, Patel SK, Gooya M, et al. Microbiome modulation after severe acute kidney injury accelerates functional recovery and decreases kidney fibrosis. *Kidney Int.* 2023 Sep;104(3):470–91.