

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

Ciclo XXII

Relazione 2° anno

Il preconditionamento epatico: meccanismi biomolecolari di induzione della tolleranza al danno da ischemia/riperfusion

Candidato: Caterina Dal Ponte

Tutor: Prof.ssa Rita Carini

SOMMARIO

INTRODUZIONE.....	3
SCOPO DEL LAVORO	4
MATERIALI, METODI E PROCEDURE SPERIMENTALI.....	5
Selezione dei pazienti e pianificazione dello studio	5
Esecuzione delle manovre chirurgiche e applicazione della procedura di preconditionamento.....	5
Prelevamento e conservazione delle biopsie epatiche	6
Preparazione dei campioni per l'analisi in western blotting.....	6
Analisi dello stato di fosforilazione di PKB/Akt e del livello di espressione di PTEN	7
Valutazione delle biopsie epatiche	7
Valutazione dei parametri clinici post operatori.....	7
Analisi statistica dei dati.....	8
RISULTATI.....	9
Procedure chirurgiche e tolleranza al preconditionamento ischemico.....	9
Valutazione dell'attivazione della fosfatidil-inositolo-3 chinasi conseguente al preconditionamento ischemico	10
Conseguenze dell'attivazione di PI3K mediante preconditionamento ischemico sulla tolleranza del fegato trapiantato al danno da ischemia/riperfusiones	11
DISCUSSIONE.....	19
BIBLIOGRAFIA	22
ATTIVITA' FORMATIVA.....	26
Partecipazione a seminari	26
CORSI FREQUENTATI	28
PARTECIPAZIONE A CONGRESSI.....	28
COMUNICAZIONI A CONGRESSI.....	29
PUBBLICAZIONI.....	29
Articoli.....	29
Abstracts	30

INTRODUZIONE

Il preconditionamento ischemico è stato descritto per la prima volta nel 1986 da Murry e coll. nel miocardio canino e consiste nel fatto che l'esposizione di tale tessuto ad un ciclo di ischemia-riperfusionazione di breve durata protegge dal danno prodotto da una successiva ischemia o ischemia-riperfusionazione prolungata (Murry, 1986; Yellon, 2000). I fenomeni di preconditionamento ischemico non sono limitati al solo miocardio ma una risposta dello stesso tipo può essere evocata in altri organi come cervello, intestino e fegato.

Il preconditionamento epatico è stato sperimentato inizialmente su modelli animali sia "in vivo" che "in vitro". Il metodo più utilizzato per indurre il preconditionamento "in vivo" consiste nell'interruzione del flusso ematico a livello dell'arteria epatica per 5-10 minuti seguita da una riperfusionazione di 10-15 minuti (Peralta 1997, 1999; Yoshizumi 1998; Teoh 2002), mentre "in vitro" una risposta simile si ottiene per incubazione delle cellule in ipossia per 10 minuti seguiti da 10 minuti di riossigenazione (Carini, 2001).

L'osservazione del preconditionamento ischemico ha aperto la stimolante possibilità di poter impiegare i sistemi naturali di protezione tissutale a fini terapeutici (Selzner, 2003). Le sperimentazioni cliniche sono iniziate applicando il preconditionamento agli interventi di resezione epatica, per poi proseguire di recente ai trapianti (Banga, 2005). Il danno da ischemia-riperfusionazione è infatti la causa principale di insufficienza epatica primaria o disfunzione epatica iniziale in pazienti che hanno ricevuto il trapianto di fegato (Serracino-Inglott, 2001; Varotti, 2005). Il preconditionamento ischemico ha mostrato di ridurre in maniera efficace il danno da riperfusionazione durante gli interventi di resezione epatica nell'uomo (Clavien, 2003; Petrowsky, 2006), e di migliorare l'esito del trapianto di fegato su modelli sperimentali animali (Carrasco-Chaumel, 2005; Franco-Gou, 2006).

L'applicazione del preconditionamento ischemico ai trapianti di fegato umani da donatore cadavere ha però dato risultati controversi: alcuni studi hanno riportato miglioramenti del rilascio post-operatorio di transaminasi, dei markers infiammatori e della sopravvivenza del trapianto, altre ricerche al contrario non sono state in grado di rilevare differenze apprezzabili tra il gruppo preconditionato e quello di controllo o addirittura hanno evidenziato un peggioramento del danno da riperfusionazione (Koneru, 2005, 2007; Azoulay, 2005; Cescon, 2006; Jassem, 2006; Amadour, 2007). Studi sperimentali hanno dimostrato che l'azione protettiva del preconditionamento ischemico del fegato è il risultato dell'attivazione di una complessa rete di segnali intracellulari che

modulano la reazione infiammatoria, la capacità degli epatociti di preservare le funzioni cellulari che richiedono il mantenimento dello stato energetico, l'omeostasi ionica, la risposta anti-necrotica e anti-apoptotica (Carini, 2003). Tra i segnali attivati dal preconditionamento ischemico sono di particolare interesse quelli che coinvolgono la fosfatidil- inositolo-3 chinasi (PI3K) e PKB-Akt, una serina-treonina proteina chinasi a valle di PI3K (Carini, 2004; Izuishi, 2006). Le PI3K sono una famiglia di proteine con la funzione di trasduttori dei segnali intracellulari e sono caratterizzate dalla capacità di generare fosfatidil- inositolo (3,4,5)-trifosfato (PIP3) che a sua volta funge da secondo messaggero attivando numerose chinasi implicate nella regolazione della proliferazione, nella sopravvivenza e nel metabolismo cellulare (Cantley, 2002). La rilevanza di PI3K nel prevenire il danno epatico è emersa in seguito all'osservazione dell'importanza dei segnali da essa mediati nel prevenire l'apoptosi degli epatociti e nel migliorare il danno epatico da riperfusione (Webster, 2001; Hatano, 2002; Muller, 2003). A conferma di ciò studi recenti hanno mostrato che il preconditionamento ischemico attiva i segnali mediati da PI3K nel fegato di roditori e che il blocco di queste chinasi abolisce l'azione protettiva del preconditionamento sia su epatociti isolati sia sull'intero fegato (Carini, 2004; Izuishi, 2006).

SCOPO DEL LAVORO

In questo secondo anno di Dottorato di Ricerca l'approfondimento delle conoscenze sul preconditionamento epatico si è in particolare focalizzato sull'analisi dell'attivazione/aumentata espressione nel fegato preconditionato umano dei mediatori del preconditionamento già identificati nei modelli sperimentali e della loro correlazione con dati clinici e sierologici. A questo scopo la presenza di alcuni dei segnali intracellulari che sono criticamente associati con lo sviluppo del preconditionamento ischemico nei modelli animali è stata valutata su biopsie epatiche ottenute da soggetti sottoposti a trapianto di fegato in presenza o assenza di un precedente trattamento di preconditionamento ischemico. In particolare si è voluto investigare se i segnali dipendenti dal mediatore essenziale del preconditionamento nei modelli animali PI3K possano essere responsabili delle risposte incoerenti al preconditionamento ischemico dei fegati umani trapiantati.

MATERIALI, METODI E PROCEDURE SPERIMENTALI

L'applicazione del preconditionamento ischemico è stata effettuata su fegati di donatori deceduti e quindi investigata nei riceventi del trapianto di fegato. Le procedure chirurgiche sono state effettuate presso il Centro Trapianti di Fegato e Multiorgano dell'Università di Bologna, i test clinici di funzionalità epatica presso il Reparto di Analisi Cliniche dell'Ospedale S.Orsola di Bologna, le analisi biochimiche presso il Laboratorio di Patologia Generale del Dipartimento di Scienze Mediche dell'Università del Piemonte Orientale.

Selezione dei pazienti e pianificazione dello studio

L'effetto del preconditionamento ischemico sui trapianti di fegato da donatore cadavere a cuore battente è stato analizzato su 40 pazienti che hanno ricevuto un trapianto di fegato da gennaio 2006 a novembre 2007 presso il Centro Trapianti di Fegato e Multiorgano dell'Università di Bologna.

Per lo studio sono stati selezionati soggetti di entrambi i sessi, di età maggiore di 18 anni, con indicazione al trapianto di fegato totale, e sono stati suddivisi con procedura randomizzata in due gruppi per ricevere un fegato sottoposto (gruppo IPC) o meno (controlli) a preconditionamento ischemico prima dell'espianto. Sono stati esclusi da questo studio pazienti già sottoposti a precedente trapianto con indicazione al ritrapianto e pazienti riceventi trapianto parziale di fegato. I chirurghi incaricati del prelievo del fegato hanno proceduto ad una randomizzazione 1:1 dei fegati da sottoporre (gruppo IPC+) o meno (gruppo IPC-) al preconditionamento ischemico tramite estrazione in cieco di buste chiuse generate da computer.

Esecuzione delle manovre chirurgiche e applicazione della procedura di preconditionamento

Tutti i fegati trapiantati sono stati ottenuti da donatori in condizioni di stabilità emodinamica durante la permanenza nel reparto di terapia intensiva (assenza di arresto cardiaco e/o episodi di ipotensione con pressione arteriosa sistolica inferiore a 70 mm Hg per più di 30 minuti). Sono stati esclusi i casi di contemporanea donazione intestinale, di pancreas o multiviscerale.

Dopo aver effettuato l'ispezione addominale per verificare la vitalità dell'organo da trapiantare sono stati somministrati endovena al donatore 500 IU/Kg di eparina. Il preconditionamento ischemico è

stato effettuato mediante il clampaggio del peduncolo epatico in toto (manovra di Pringle) per 10 minuti, seguito da 15 min di ri-perfusione calda, quindi l'organo è stato sottoposto al periodo di ischemia fredda mediante infusione della soluzione di preservazione Celsior fredda (Sangstat Europe, Lione, Francia) attraverso l'aorta (5 litri) e attraverso la vena porta (1 litro). I fegati sono stati espantati mediante tecnica convenzionale (Starzl, 1984). Tutte le procedure effettuate durante il trapianto sono state eseguite preservando la vena cava inferiore del ricevente e con ri-perfusione sequenziale portale e arteriosa. Questo studio è stato effettuato in accordo con la Dichiarazione di Helsinki del 1975 e previa approvazione del Comitato Etico locale.

Prelevamento e conservazione delle biopsie epatiche

In entrambi i gruppi sono state effettuate coppie di biopsie prelevate con ago sottile (cuneo profondo maggiore o uguale a 10 mm) e/o in modo escissionale del lobo epatico sinistro all'apertura della cavità peritoneale nel donatore e due ore dopo la rivascolarizzazione portale nel ricevente. I campioni di tessuto epatico sono stati divisi in due frammenti di cui uno è stato immediatamente congelato in n-metil butano pre raffreddato in azoto liquido e conservato a -80°C mentre l'altro è stato fissato in formalina e trattato per la colorazione con ematossilina-eosina.

Preparazione dei campioni per l'analisi in western blotting

Frammenti di 0.4-0.5 mg delle biopsie epatiche congelate sono stati omogenizzati in 2 ml di buffer di lisi in ghiaccio contenente: 2mmol/L di Hepes buffer a pH 7.4, 10% di glicerolo, 50 mmol/L di NaCl, 5 mmol/L di EDTA, 2mmol/L di EGTA, 1 mmol/L di ZnCl_2 , 50 mmol/L di ammonio molibdato, 1% NP-40, 1mmol/L di Na_3VO_4 , 0.2 mmol/L difenilmetilsulfonil fluoruro, 10 mmol/L fluoruro di sodio, 0.5 mmol/L ditiotreitolo, 1 $\mu\text{g/ml}$ di leupeptina, 1 $\mu\text{g/ml}$ di pepstatina, 1 $\mu\text{g/ml}$ di inibitore della tripsina e 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinina. Il surnatante ottenuto mediante una centrifugata a 14.000 RPM per 20 minuti è stato diluito con 0.5 ml di buffer di Laemmli e sono state prelevate aliquote per la determinazione della concentrazione proteica.

Il contenuto proteico dei campioni è stato determinato secondo il metodo di Lowry modificato secondo Peterson (Peterson, 1977).

Analisi dello stato di fosforilazione di PKB/Akt e del livello di espressione di PTEN

L'analisi dello stato di fosforilazione di PKB/Akt è stata effettuata sui lisati epatici diluiti nel buffer di Laemmli. Aliquote contenenti 40 µg di proteine sono state sottoposte ad elettroforesi su gel di SDS-poliacrilamide al 10% e quindi trasferite su membrane di nitrocellulosa. Per l'analisi dello stato di fosforilazione di PKB/Akt le membrane di nitrocellulosa sono state saturate con latte al 5% ed incubate prima con anticorpi verso Ser⁴⁷³ fosfo-Akt (1:500) e dopo lo stripping con anticorpi anti-Akt (1:500) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA); mentre per l'analisi del livello di espressione di PTEN, dopo aver effettuato la saturazione con latte al 5%, le membrane sono state incubate prima con anticorpi verso PTEN (1:1000) (Santa Cruz biotechnology, INC) e quindi con β-actina (1:500) (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Il legame di ciascun anticorpo primario è stato poi rivelato, dopo incubazione con l'anticorpo secondario coniugato con l'enzima HRP, mediante metodo Enhanced Chemi Luminescence (ECL) (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) utilizzando il rivelatore di immagini VersaDoc (Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA). Le immagini digitalizzate sono state analizzate con il software Quantity One 1-D ver. 4.5.0 (Bio-Rad laboratories Inc, Hercules, CA). Il risultato è stato espresso come rapporto tra la forma fosforilata e non fosforilata di PKB-Akt e come rapporto fra la quantità relativa di PTEN rispetto alla quantità relativa di actina.

Valutazione delle biopsie epatiche

Sezioni epatiche dello spessore di 5 µm colorate con ematossilina eosina sono state analizzate ai fini di valutare la presenza ed entità di steatosi macrovescicolare, necrosi epatocitaria, infiammazione portale e fibrosi (Zamboni, 2001).

Valutazione dei parametri clinici post operatori

Sono stati analizzati e comparati il profilo demografico e clinico ed i parametri post-operatori dei riceventi e dei donatori. I livelli sierici di asparatato amino-transferasi (AST), alanina-amino-transferasi (ALT), bilirubina totale e la attività protrombinica sono stati analizzati fino a 21 giorni dopo il trapianto. L'insufficienza primaria del fegato è stata definita come insufficienza epatica in assenza di problemi tecnici o immunologici, determinante morte del paziente o necessità di re-trapianto entro una settimana dal trapianto. La disfunzione epatica iniziale è stata definita da un

valore minimo di attività protrombinica inferiore al 30% del normale e/o bilirubina totale superiore a 15 mg/dl, in assenza di emolisi od ostruzione biliare.

Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica è stata effettuata mediante software SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL). Le differenze tra variabili continue sono state valutate con il test di Mann-Whitney per confronti tra gruppi e con il test di Wilcoxon per campioni appaiati.

Le differenze tra variabili categoriche sono state calcolate con il test χ^2 o con il test esatto di Fischer. Valori di p inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi.

RISULTATI

Procedure chirurgiche e tolleranza al preconditionamento ischemico

Venti donatori sono stati scelti con procedura randomizzata per ricevere il preconditionamento ischemico (IPC) prima dell'espianto del fegato, mentre nei rimanenti venti donatori è stato effettuato un espianto d'organo convenzionale (controlli). Durante lo studio un paziente del gruppo IPC è stato escluso perché gli estratti epatici hanno subito un processo di degradazione e non sono risultati idonei per ulteriori analisi. Le caratteristiche dei donatori sono riportate in Tabella 1. I due gruppi sono risultati paragonabili per tutti i parametri considerati. Nessuno dei fegati trapiantati ha presentato steatosi macrovescicolare maggiore del 30%. Il preconditionamento ischemico è stato ben tollerato e non ha causato peggioramento significativo dei parametri emodinamici del donatore, o alterazione della vitalità di altri organi addominali o toracici. In Tabella 2 sono riportati i profili dei riceventi e i parametri operatori del gruppo IPC e del gruppo di controllo. Dopo il trapianto le transaminasi (AST e ALT) e la bilirubina totale, pur risultando ridotte nei pazienti che hanno ricevuto un fegato preconditionato, non hanno evidenziato differenze significative tra i due gruppi. Nessuno dei pazienti del gruppo IPC e solo uno dei pazienti del gruppo di controllo (5%) è andato incontro a insufficienza primaria del fegato trapiantato ($p=1.0$). Due pazienti nel gruppo IPC (10.5%) e nessuno del gruppo di controllo ha avuto disfunzione epatica iniziale ($p=0.2$). Nel gruppo IPC un paziente (5.3%) è stato ritrapiantato per disfunzione epatica iniziale, mentre nel gruppo di controllo un paziente (5%) è stato ritrapiantato per insufficienza primaria del fegato. Il preconditionamento ischemico non ha inoltre modificato significativamente la permanenza media in terapia intensiva (Tabella 2). La durata media del follow-up effettuato sull'intera popolazione è stata 23 mesi, con un range compreso tra 0,9 e 26 mesi. Durante il follow-up sono deceduti tre pazienti (15.8%) che avevano ricevuto un fegato preconditionato e due pazienti (10%) di controllo ($p=0.6$). Il tasso di sopravvivenza dei pazienti e del fegato trapiantato ad 1 anno sono stati rispettivamente 95% e 89% nel gruppo IPC, e 90% e 90% nel gruppo di controllo ($p=0.5$ e $p=0.3$ rispettivamente).

Valutazione dell'attivazione della fosfatidil-inositolo-3 chinasi conseguente al preconditionamento ischemico

L'attivazione della via di segnalamento dipendente dalla fosfatidil-inositolo-3 chinasi (PI3K) indotta dal preconditionamento ischemico è stata valutata mediante western blotting di estratti ottenuti da frammenti di tessuto epatico prelevati immediatamente prima del preconditionamento (T_0) e due ore dopo la ri-perfusione (T_{2h}). In particolare è stata valutata la fosforilazione in Ser⁴⁷³ di PKB/Akt, proteina chinasi a valle di PI3K e l'espressione della fosfatidil-inositolo-trifosfato-fosfatasi PTEN, regolatore negativo dell'attività di PI3K (Tanguney, 2007).

La fosforilazione di PKB/Akt (Fig. 1 A/B) è risultata significativamente aumentata 2 ore dopo la ri-perfusione sia nei fegati preconditionati (media \pm DS 0.37 ± 0.23 vs 0.57 ± 0.34 ; $p=0.006$) che in quelli di controllo (media \pm DS 0.32 ± 0.25 vs 0.62 ± 0.37 ; $p=0.01$). Il calcolo del rapporto tra il valore individuale di fosforilazione a 2 ore e al tempo zero (T_{2h}/T_0) di PKB/Akt (Fig. 1C) però ha evidenziato un aumento significativo della media di tale rapporto nel gruppo IPC rispetto ai controlli (media \pm DS 1.75 ± 0.92 vs 4.37 ± 4.30 ; $p=0.018$).

Nei fegati trapiantati di controllo i livelli di PTEN (Fig 2A) non sono risultati significativamente diversi prima e 2 ore dopo la ri-perfusione (media \pm DS 0.30 ± 0.32 vs 0.26 ± 0.36). Al contrario, una diminuzione significativa di PTEN (Fig 2B) è risultata evidente due ore dopo la ri-perfusione nei fegati preconditionati (media \pm DS 0.26 ± 0.27 vs 0.17 ± 2.1 ; $p=0.03$). Inoltre, calcolando i rapporti T_{2h}/T_0 dei valori individuali di espressione di PTEN (Fig. 2C), abbiamo osservato che il preconditionamento ischemico riduce significativamente l'espressione epatica di PTEN (media \pm DS 0.94 ± 0.36 vs 0.65 ± 0.31 ; $p=0.011$). Questi dati hanno suggerito una relazione tra l'abbassamento di PTEN e l'attivazione dei segnali mediati da PI3K.

Nonostante il preconditionamento ischemico abbia aumentato significativamente la risposta di PI3K, abbiamo osservato un'ampia variabilità interindividuale del rapporto T_{2h}/T_0 della fosforilazione di PKB/Akt nei fegati preconditionati trapiantati (Fig. 3 A). Prendendo come cut off il 95° percentile del rapporto T_{2h}/T_0 di fosforilazione di PKB/Akt dei fegati di controllo (2.8) abbiamo osservato che 10 fegati preconditionati su 19 (53%) aveva il rapporto T_{2h}/T_0 di fosforilazione di PKB/Akt superiore al valore soglia dei controlli (IPC “*responsive*”), mentre nei restanti 9 i rapporti erano paragonabili a quelli dei fegati di controllo (IPC “*non-responsive*”) (Fig. 3 A). Inoltre la media dei rapporti T_{2h}/T_0 di fosforilazione di PKB/Akt nei fegati trapiantati IPC “*responsive*” (7.4 ± 3.9) è risultata significativamente maggiore ($p<0.001$) sia dei fegati trapiantati IPC “*non-responsive*” (0.97 ± 0.41), sia dei fegati di controllo (1.75 ± 0.92), mentre non si è

evidenziata alcuna differenza tra questi ultimi due gruppi (Fig. 3B). La media dei rapporti T_{2h}/T_0 di espressione di PTEN è risultata simile tra i fegati preconditionati IPC “*non-responsive*” e i fegati di controllo non preconditionati (0.83 ± 0.26 vs 0.94 ± 0.36 ; $p=0.37$). Al contrario, la media dei rapporti T_{2h}/T_0 di espressione di PTEN nei fegati IPC “*responsive*” (0.43 ± 0.28) è risultata significativamente più bassa sia dei fegati IPC “*non-responsive*” ($p=0.027$) sia dei fegati di controllo ($p=0.004$) (Fig. 3C).

Nell’insieme questi risultati hanno indicato che il preconditionamento ha stimolato i segnali intracellulari mediati da PI3K solo in metà dei fegati trapiantati da donatore cadavere.

Conseguenze dell’attivazione di PI3K mediante preconditionamento ischemico sulla tolleranza del fegato trapiantato al danno da ischemia/riperfusion

Il paragone delle caratteristiche del donatore, i profili del ricevente e le variabili operatorie tra i gruppi IPC “*responsive*” e “*non-responsive*” non ha evidenziato differenze significative tra i due gruppi, ad eccezione di un maggiore ($p=0.04$) uso di adrenalina per supportare i parametri emodinamici durante il trapianto in pazienti riceventi fegati IPC “*non-responsive*”. (Tabella 3).

I valori delle transaminasi ALT e AST 24 h e 48 h dopo la riperfusione tuttavia sono risultati significativamente più bassi nei pazienti trapiantati con fegati IPC “*responsive*” ($p\leq 0.02$) rispetto a quelli IPC “*non-responsive*” ($p<0.04$) (Fig. 4). Durante il follow-up la clearance della bilirubina è risultata migliore nei pazienti trapiantati con fegati IPC “*responsive*” e i valori hanno raggiunto la significatività statistica a partire dal 4° fino al 7° giorno (Fig. 4). L’attività protrombinica non ha mostrato differenze apprezzabili (Fig.4). La permanenza in terapia intensiva non ha mostrato differenze ($p=0.5$) significative tra il gruppo IPC responsive (media \pm DS 6.4 ± 5.7 ; range 2-22) e il gruppo non responsive (media \pm DS 9.8 ± 12.2 ; range 1-41). I due pazienti che hanno ricevuto fegati preconditionati e che hanno mostrato disfunzione epatica iniziale appartengono entrambi al gruppo IPC “*non-responsive*”, tale dato però non ha presentato significatività statistica ($p=0.2$).

PROFILO DEL DONATORE	<u>IPC</u>	<u>CONTROLLI</u>	p
SESSO (M/F)	7/12	12/8	0,1
ETA' (anni)	68 ± 10 (34-79)	66 ± 15 (34-85)	0,8
BMI	26 ± 3 (22-32)	25 ± 3 (20-31)	0,1
DIABETE	0 (0%)	2 (10%)	0,4
CAUSE DI MORTE			
> Emorragia cerebrale	16 (84%)	15 (75%)	0,5
> Trauma cranico	1 (5%)	4 (20%)	
> Altro	2 (11%)	1 (5%)	
USO DI NOREPINEFRINA	4 (21%)	6 (30%)	0,7
TERAPIA INTENSIVA (giorni)	3,2 ± 2,2 (1-9)	4,6 ± 3,6 (1-13)	0,3
AST (U/l)	32 ± 12 (9-55)	32 ± 19 (15-88)	0,4
ALT (U/l)	28 ± 19 (12-77)	37 ± 50 (9-238)	0,9
BILIRUBINA TOTALE (mg/dL)	0,7 ± 0,4 (0,2-1,8)	0,7 ± 0,6 (0,2-2,9)	0,5
Na ⁺ (mEq/L)	152 ± 9 (136-166)	146 ± 8 (134-163)	0,1
MACROSTEATOSI	12 (63%)	8 (40%)	0,1
MACROSTEATOSI >10%	7 (37%)	5 (25%)	0,4
NECROSI	0 (0%)	0 (0%)	
INFIAMMAZIONE PORTALE	10 (53%)	7 (35%)	0,2
FIBROSI PORTALE	11 (58%)	13 (65%)	0,6

TABELLA 1. Caratteristiche dei 39 donatori deceduti che hanno ricevuto o meno il precondizionamento ischemico.

I dati sono la media dei valori ± DS. I limiti del range sono riportati tra parentesi. BMI= body mass index. AST = aspartato transaminasi; ALT = alanina transaminasi. Na⁺ = livello sierico di sodio.

PROFILO DEL PAZIENTE		IPC (n=19)	CONTROLLI (n=20)	p
SESSO (M/F)		15/4	14/6	0,7
ETA' (anni)		52 ± 10 (23-65)	53 ± 9 (27-67)	0,8
INDICAZIONE AL TRAPIANTO				
> HCC su cirrosi		9 (47%)	6 (30%)	0,4
> Cirrosi virale postnecrotica		7 (37%)	6 (30%)	
> Cirrosi colestatica		2 (11%)	1 (5%)	
> Cirrosi alcolica		1 (5%)	3 (15%)	
> Altro		0 (0%)	4 (20%)	
MELD score		23 ± 10 (10-41)	23 ± 10 (8-46)	0,8
PARAMETRI OPERATORI				
DURATA INTERVENTO (min)		400 ± 82 (225-600)	406 ± 161 (255-915)	0,4
DURATA TOTALE ISCHEMIA (min)		357 ± 63 (259-485)	361 ± 70 (285-569)	0,9
DURATA ISCHEMIA CALDA (min)		39 ± 17 (20-76)	42 ± 14 (21-76)	0,4
EPISODI DI IPOTENSIONE *		0 (0%)	0 (0%)	
UTILIZZO DI ADRENALINA		6 (32%)	6 (30%)	0,9
TRASFUSIONI EMATICHE (L)		3,9 ± 2,7 (1,0-11,5)	3,4 ± 3,6 (0-1,4)	0,2
PARAMETRI DI FOLLOW UP				
AST (U/L)	Giorno 1	389 ± 220 (112-865)	885 ± 905 (87-2930)	0,1
	Giorno 3	406 ± 725 (59-3321)	405 ± 937 (41-3418)	0,6
	Giorno 7	47 ± 19 (24-89)	50 ± 22 (20-101)	0,7
ALT (U/L)	Giorno 1	412 ± 280 (81-1030)	679 ± 649 (58-2340)	0,4
	Giorno 3	593 ± 580 (82-2696)	848 ± 937 (41-3148)	0,6
	Giorno 7	191 ± 145 (40-744)	224 ± 187 (39-840)	0,4
BILIRUBINA (mg/dL)	Giorno 1	5,1 ± 3,1 (1,5-11,9)	5,3 ± 4,5 (0,7-16,4)	0,6
	Giorno 3	5,2 ± 3,1 (0,9-10,0)	4,7 ± 3,3 (0,6-11,6)	0,6
	Giorno 7	7,0 ± 5,2 (0,9-19,3)	6,1 ± 4,1 (0,7-14,4)	0,7
INR	Giorno 1	1,43 ± 0,08 (1,24-1,56)	1,43 ± 0,09 (1,26-1,59)	0,9
	Giorno 2	1,28 ± 0,15 (1,0-1,52)	1,27 ± 0,13 (1,03-1,48)	0,7
	Giorno 3	1,16 ± 0,08 (1,0-1,34)	1,24 ± 0,12 (1,09-1,59)	0,04
TERAPIA INTENSIVA (giorni)		8,0 ± 9,1 (1-41)	10,5 ± 17,6 (3-79)	0,9

TABELLA 2. Caratteristiche demografiche, cliniche e di follow up dei 39 pazienti che hanno ricevuto fegati sottoposti (IPC) o meno (Controlli) a preconditionamento ischemico prima dell'espianto.

I dati sono la media dei valori ± DS. I limiti del range sono riportati tra parentesi. *Gli episodi di ipotensione sono definiti come pressione arteriosa sistolica <70 mmHg per più di 30 min dopo l'inizio della riperfusione. MELD = Model for End Stage Liver Disease. AST = aspartato transaminasi; ALT = alanina transaminasi. L'attività protrombinica è espressa come INR.

PROFILO DEL PAZIENTE	IPC RESPONSIVE (n=10)	IPC NON-RESPONSIVE (n=9)	p
SESSO (M/F)	9/1	6/3	0,3
ETA' (anni)	54 ± 13 (23-65)	51 ± 6 (44-63)	0,1
INDICAZIONE AL TRAPIANTO			
> HCC su cirrosi	7 (70%)	2 (22%)	0,1
> Cirrosi virale postnecrotica	2 (20%)	5 (56%)	
> Cirrosi colestatica	1 (10%)	1 (11%)	
> Cirrosi alcolica		1 (11%)	
MELD score	21 ± 10 (10-39)	26 ± 10 (13-41)	0,3
PROFILO DEL DONATORE			
SESSO (M/F)	3/7	4/5	0,6
ETA' (anni)	72 ± 6 (60-79)	65 ± 12 (34-76)	0,3
BMI	26 ± 3 (22-32)	26 ± 3 (22-30)	1,0
CAUSE DI MORTE			
> Emorragia cerebrale	10 (100%)	7 (78%)	0,9
> Trauma cranico	0 (0%)	1 (11%)	
> Altro	0 (0%)	1 (11%)	
USO DI NOREPINEFRINA	4 (40%)	0 (0%)	0,08
TERAPIA INTENSIVA (giorni)	3,8 ± 2,7 (1-9)	2,6 ± 1,4 (1-6)	0,2
AST (U/l)	31 ± 15 (9-55)	32 ± 9 (22-48)	0,7
ALT (U/l)	21 ± 9 (13-37)	36 ± 25 (12-77)	0,1
BILIRUBINA TOTALE (mg/dL)	0,5 ± 0,2 (0,2-0,8)	0,8 ± 0,4 (0,5-1,8)	0,1
Na ⁺ (mEq/L)	151 ± 10 (136-166)	152 ± 8 (141-165)	0,6
MACROSTEATOSI	7 (70%)	5 (56%)	0,6
M ACROSTEATOSI >10%	4 (40%)	3(33%)	1,0
NECROSI	0 (0%)	0 (0%)	
INFIAMMAZIONE PORTALE	6 (60%)	4 (44%)	0,6
FIBROSI PORTALE	5 (50%)	6 (67%)	0,6
PARAMETRI OPERATORI			
DURATA INTERVENTO (min)	393 ± 85 (300-600)	409 ± 83 (225-520)	0,2
DURATA TOTALE ISCHEMIA (min)	345 ± 72 (259-485)	370 ± 53 (304-458)	0,2
DURATA ISCHEMIA CALDA (min)	37 ± 16 (20-70)	42 ± 18 (25-76)	0,5
EPISODI DI IPOTENSIONE *	0 (0%)	0 (0%)	
UTILIZZO DI ADRENALINA	1 (10%)	5 (62%)	0,04
TRASFUSIONI EMATICHE (L)	4,1 ± 3,2 (1,0-11,5)	38 ± 2,2 (1,5-7,5)	0,2

TABELLA 3. Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti che hanno ricevuto un fegato preconditionato separati in due gruppi in base alla risposta ai segnali mediati da PI3K indotti dal preconditionamento.

I dati sono la media dei valori ± DS. I limiti del range sono riportati tra parentesi. *Gli episodi di ipotensione sono definiti come pressione arteriosa sistolica <70 mmHg per più di 30 min dopo l'inizio della riperfusione. MELD = Model for End Stage Liver Disease. AST = aspartato transaminasi; ALT = alanina transaminasi. L'attività protrombinica è espressa come INR.

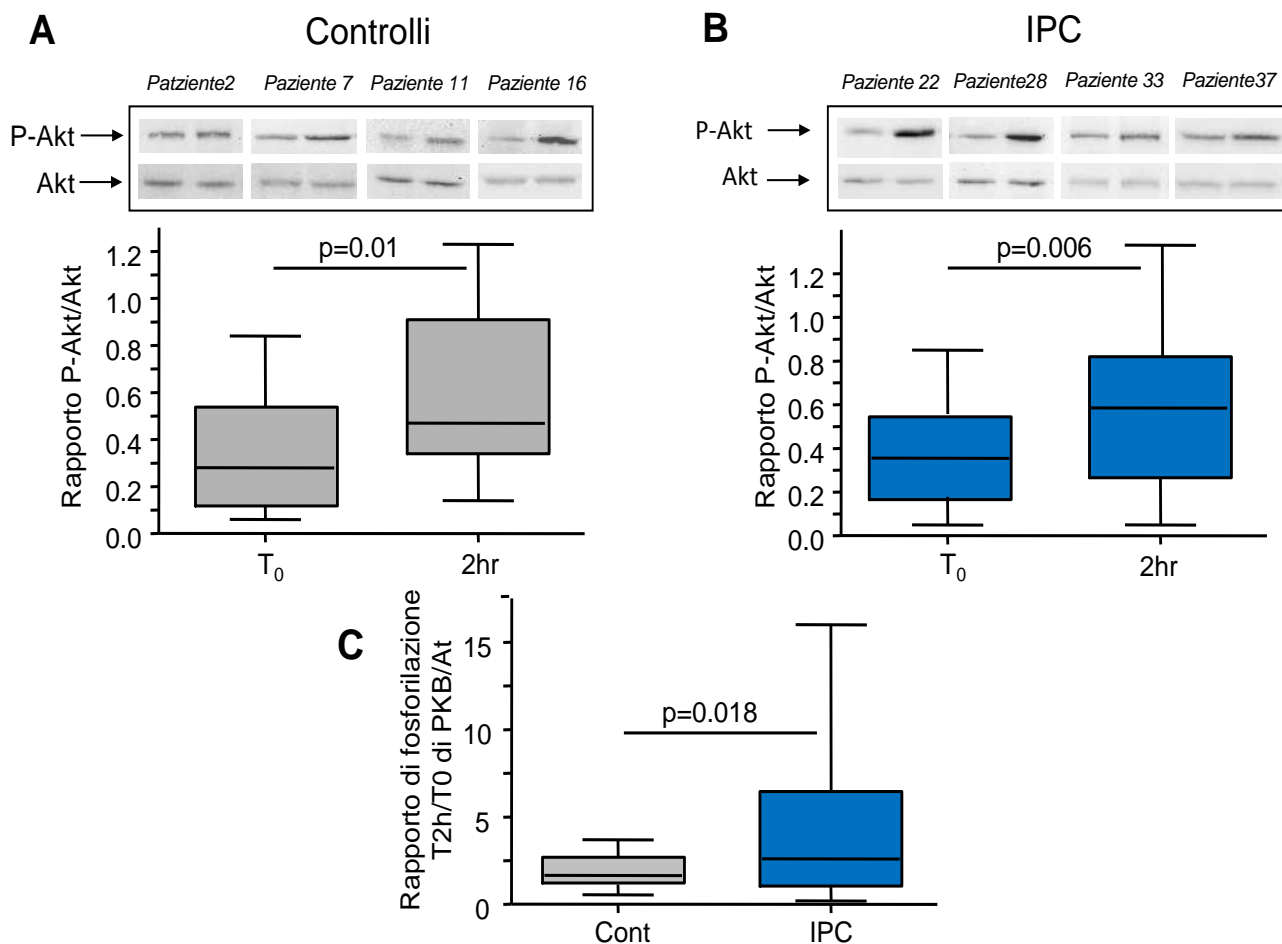


FIGURA 1: Fosforilazione di PKB/Akt nei fegati trapiantati sottoposti o meno al preconditionamento ischemico.

Pannelli A e B: La fosforilazione di PKB/Akt è stata valutata mediante western blotting su campioni di tessuto epatico prelevati mediante biopsia immediatamente prima dell'applicazione del preconditionamento (T_0) e 2 ore dopo la riperfusione (T_{2h}) su 19 fegati trapiantati preconditionati e 20 fegati trapiantati di controllo. I valori individuali di fosforilazione sono stati espressi come rapporti tra la forma fosforilata (P-Akt) e non fosforilata (Akt) di PKB-Akt. La significatività statistica è stata calcolata mediante T test.

Pannello C: L'indice di fosforilazione di PKB/Akt è stato calcolato mediante il rapporto tra i valori individuali di fosforilazione a T_{2h} e al T_0 (rapporto T_{2h}/T_0) dei due gruppi di pazienti.

In tutti i pannelli le scatole includono i valori compresi tra il 25° e il 75° percentile, mentre le barre orizzontali rappresentano la mediana. Le barre di errore verticale rappresentano un intervallo di confidenza tra il 5% e il 95%.

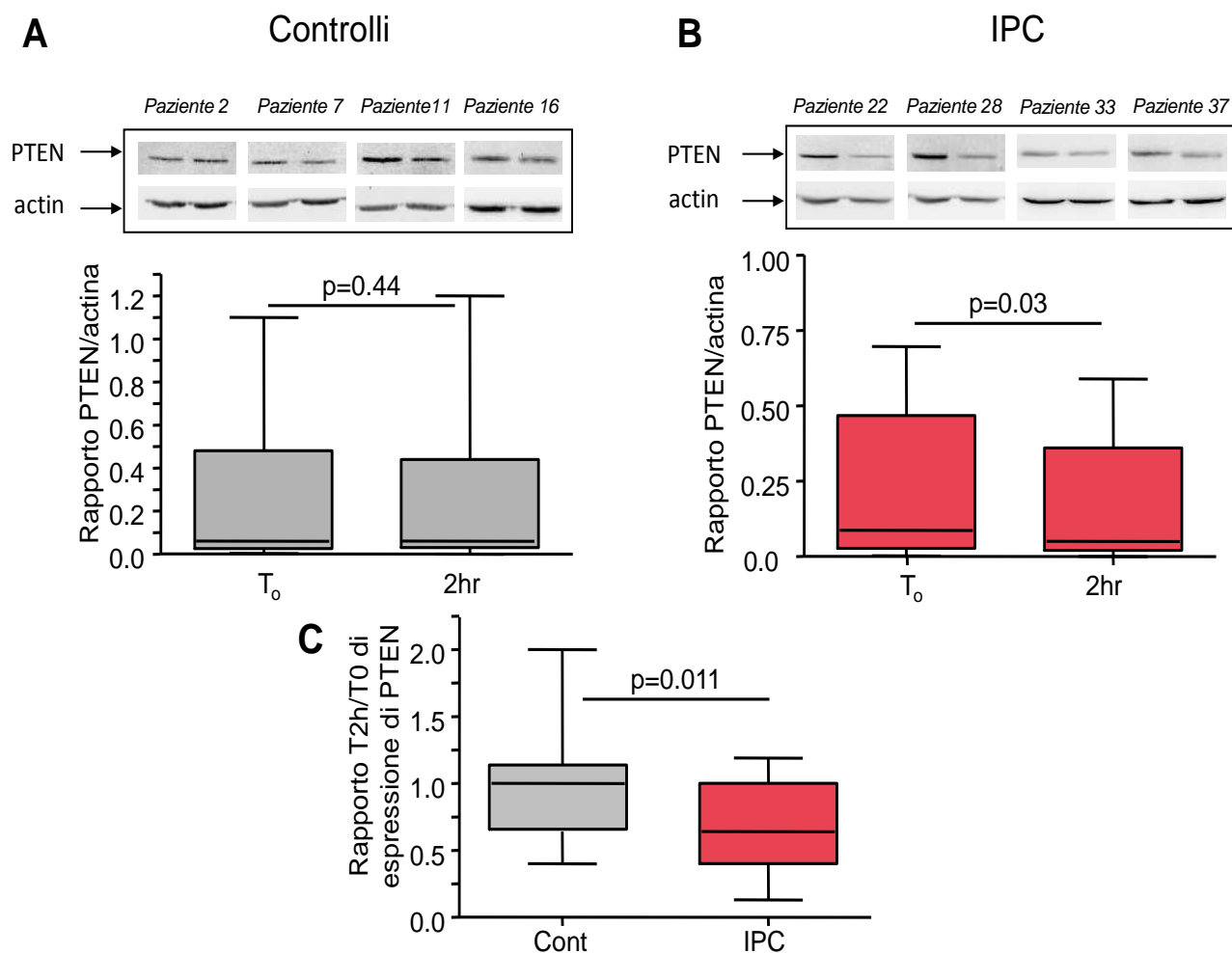


FIGURA 2: Espressione di PTEN nei fegati trapiantati sottoposti o meno al preconditionamento ischemico.

Pannelli A e B: L'espressione di PTEN è stata valutata mediante western blotting su campioni di tessuto epatico prelevati mediante biopsia immediatamente prima dell'applicazione del preconditionamento (T_0) e 2 ore dopo la riperfusione (T_{2h}) da 19 fegati trapiantati preconditionati e 20 fegati trapiantati di controllo. I valori individuali di espressione di PTEN sono stati espressi come rapporto tra la quantità relativa di PTEN rispetto alla quantità relativa di actina. La significatività statistica è stata calcolata mediante T test.

Pannello C: L'indice di espressione di PTEN è stato calcolato facendo il rapporto tra i valori individuali di espressione a T_{2h} e al T_0 (rapporto T_{2h}/T_0) dei due gruppi di pazienti.

In tutti i pannelli le scatole includono i valori compresi tra il 25° e il 75° percentile, mentre le barre orizzontali rappresentano la mediana. Le barre di errore verticale rappresentano un intervallo di confidenza tra il 5% e il 95%.

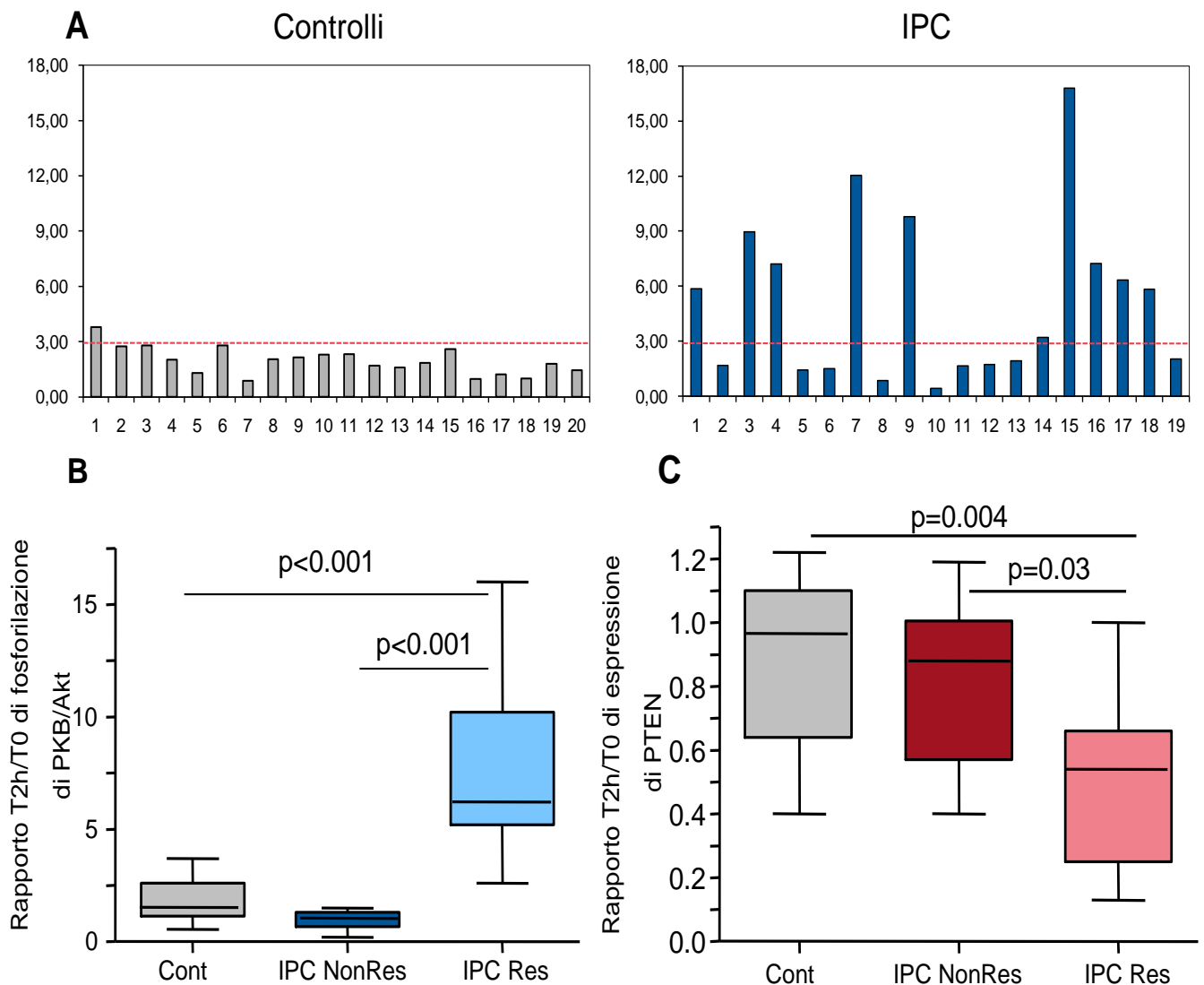


FIGURA 3: Variabilità interindividuale del rapporto T_{2h}/T₀ della fosforilazione di PKB/Akt nei fegati precondizionati trapiantati.

Pannello A: Valori individuali del rapporto T_{2h}/T₀ della fosforilazione di PKB/Akt nei fegati di controllo e precondizionati. La linea tratteggiata mostra il valore di cut off per i rapporti individuali di fosforilazione T_{2h}/T₀ di PKB/Akt dei fegati precondizionati, calcolato al 95° percentile dei valori del rapporto di fosforilazione T_{2h}/T₀ di PKB/Akt dei fegati di controllo.

Pannelli B e C: Rapporti T_{2h}/T₀ della fosforilazione di PKB/Akt e dell'espressione di PTEN in fegati trapiantati prelevati da donatori cadavere non trattati (Cont) o da donatori "responsive" (IPC Res; n=10) o "non-responsive" (IPC NonRes; n=9) al precondizionamento ischemico.

In tutti i pannelli le scatole includono i valori compresi tra il 25° e il 75° percentile, mentre le barre orizzontali rappresentano la mediana. Le barre di errore verticale rappresentano un intervallo di confidenza tra il 5% e il 95%.

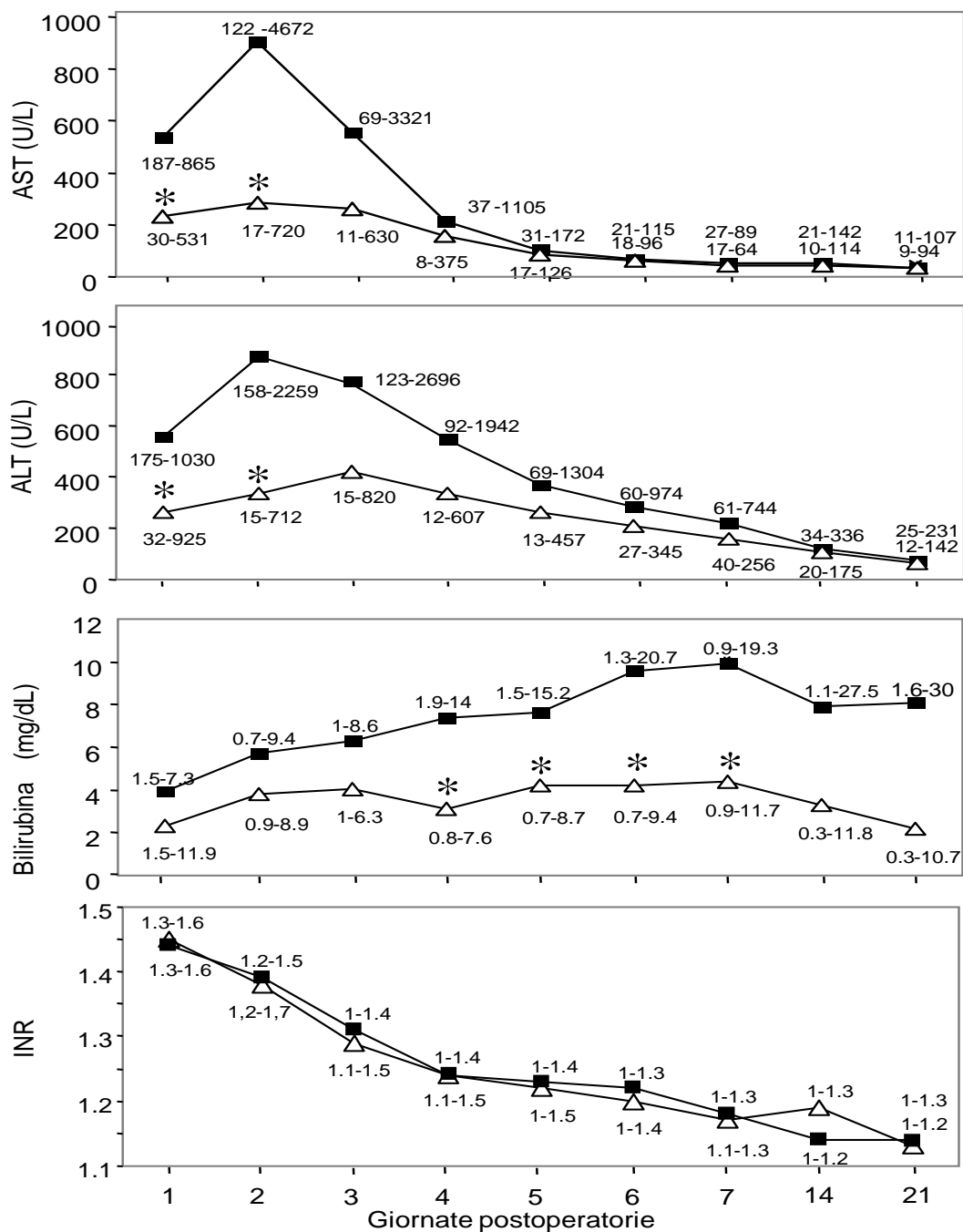


FIGURA 4: Variazioni postoperatorie delle transaminasi AST e ALT, della bilirubina totale e dell'attività protrombinica (INR) dopo 24 ore dall'inizio della riperfusione e durante i primi 21 giorni di follow up nei pazienti trapiantati che hanno ricevuto un fegato preconditionato IPC "responsive" (simboli vuoti; n=10) o IPC "non-responsive" (simboli pieni, n=9).

I punti rappresentano la mediana dei valori. I limiti del range sono riportati per ciascun punto. Gli asterischi indicano le differenze statisticamente significative (p<0.05) rispetto ai fegati IPC non-responsive.

DISCUSSIONE

L'analisi combinata dei dati finora disponibili riguardo l'efficacia del preconditionamento ischemico nel migliorare il danno da ischemia-riperfusionem conseguente al trapianto di fegato ha evidenziato che il preconditionamento applicato al fegato prima dell'espianato non migliora significativamente né il rilascio di transaminasi post operatorio né l'entità dell'infiltrato infiammatorio e dell'apoptosi degli epatociti (De Oliveira, 2007). Inoltre non sono stati riportati effetti rilevanti del preconditionamento sull'incidenza di insufficienza primaria del fegato o di disfunzione epatica iniziale e sulla permanenza media dei pazienti trapiantati in reparto di terapia intensiva (Gurusamy, 2008).

Anche i dati ottenuti dal nostro studio hanno mostrato come il preconditionamento non sia stato in grado di migliorare significativamente il livello delle transaminasi nei pazienti sottoposti a trapianto. Questo risultato appare in contrasto con uno studio precedente effettuato dal Centro Trapianti di Fegato e Multiorgano dell'Università di Bologna in cui si è evidenziato un abbassamento significativo del rilascio di transaminasi fino al terzo giorno di follow up post operatorio (Cescon, 2006)). Tale discrepanza potrebbe essere dovuta al fatto che nel nostro studio i livelli post operatori di AST e ALT rilevati nei pazienti del gruppo di controllo risultano sensibilmente più bassi di quelli del gruppo di controllo dello studio sopra citato (Cescon, 2006). Questo suggerisce che il grado di severità del danno da ischemia-riperfusionem nei fegati di controllo possa influenzare la rilevazione di differenze statisticamente significative delle transaminasi nei fegati preconditionati. Inoltre come già osservato da Cescon e collaboratori (Cescon, 2006), anche nel nostro studio il preconditionamento ischemico non influenza né l'andamento post-operatorio del livello di bilirubina e dell'attività protrombinica, né l'incidenza di insufficienza primaria del fegato o di disfunzione epatica iniziale.

In questo studio abbiamo valutato nel fegato umano trapiantato sottoposto o meno a preconditionamento l'attivazione e/o espressione di alcuni mediatori del preconditionamento ischemico in modelli animali (Carini, 2003). Studi recenti su modelli sperimentali di danno da ischemia-riperfusionem in diversi tessuti (Izuishi, 2006; Carini, 2004; Zhao, 2006; Hausenloy, 2006) hanno mostrato che l'attivazione della fosfatidil-inositolo-3 chinasi e del suo effettore PKB/Akt giocano un ruolo chiave nello sviluppo del preconditionamento ischemico. In accordo con quanto precedentemente osservato nel fegato di roditori (Carini, 2003; Izuishi, 2006), anche nel fegato umano il preconditionamento ischemico aumenta la fosforilazione di PKB/Akt due ore dopo la

riperfusion. Tale effetto è associato con l'abbassamento dell'espressione epatica di PTEN, noto per regolare negativamente l'attività di PI3K.

PTEN è una fosfatasi che blocca la trasduzione dei segnali PI3K dipendenti alle proteine chinasi a valle (tra cui PKB/Akt) mediante defosforilazione del fosfatidil-inositolo-trifosfato PI(3,4,5)P₃ (Tanguney, 2007)). PTEN è presente ubiquitariamente nelle cellule e il suo livello intracellulare riflette il suo grado di attività (Tanguney, 2007; Gericke, 2006). Un recente studio sul miocardio ha mostrato una diminuzione sia del livello che dell'attività di PTEN in parallelo con l'attivazione di PKB/Akt in seguito a preconditionamento (Cai, 2005). Queste ricerche hanno indicato come il preconditionamento ischemico moduli sia regolatori positivi che negativi dei segnali PI3K dipendenti.

L'analisi più dettagliata dell'attivazione di PKB/Akt nei fegati umani preconditionati ha rivelato un'importante variabilità inter-individuale suggerendo che in alcuni pazienti il preconditionamento non è stato in grado di promuovere la trasduzione dei segnali mediati da PI3K. Il nostro studio ha infatti evidenziato all'interno dei pazienti che hanno ricevuto un fegato preconditionato due distinti gruppi omogenei. Nel gruppo che abbiamo definito "*responsive*" i pazienti hanno presentato il rapporto T_{2h}/T_0 della fosforilazione di PKB/Akt significativamente più elevato rispetto a quello dei pazienti "*non-responsive*", in cui tale rapporto è risultato paragonabile al gruppo di controllo. Al momento le cause di tale variabilità non sono chiare. Le caratteristiche del donatore e i parametri intraoperatori sono risultati comparabili tra il gruppo di pazienti "*responsive*" e "*non-responsive*". E' però interessante sottolineare che abbiamo osservato un abbassamento significativo di PTEN solo nei fegati dei pazienti "*responsive*". PTEN è una fosfatasi costitutivamente attiva, che è regolata sia mediante trascrizione "de novo", sia mediante combinazione dei processi di degradazione, fosforilazione e ossidazione (Gericke, 2006). Esperimenti sul miocardio e sul cervello hanno mostrato che l'abbassamento di PTEN è richiesto per la trasduzione completa dei segnali PI3K dipendenti indotti dal preconditionamento ischemico (Tanguney, 2007; Cai, 2005; Omori, 2002). Inoltre gli inibitori farmacologici di PTEN prevengono il danno ischemico nel cervello di ratto (Lee, 2004; Wu, 2006). Quindi la mancata capacità di indurre una diminuzione dei livelli di PTEN può essere stata responsabile della ridotta stimolazione di PKB/Akt nei fegati "*non-responsive*". In un lavoro recente Vinciguerra e collaboratori hanno riportato che la steatosi diminuisce l'espressione di PTEN nel fegato umano (Vinciguerra, 2008). I nostri dati però non hanno evidenziato differenze nell'entità della steatosi tra il gruppo IPC "*responsive*" e "*non-responsive*". Al momento non si è potuto escludere che la mancata risposta al preconditionamento di alcuni fegati possa essere dovuta ai segnali a monte di PI3K. Nel nostro laboratorio abbiamo

recentemente dimostrato su epatociti di ratto isolati che il preconditionamento attiva PI3K attraverso la stimolazione dei recettori A2a dell'adenosina (Carini, 2004).

Qualunque sia la causa della variabilità dei segnali mediati da PI3K nel fegato preconditionato umano, è importante sottolineare che i pazienti che hanno ricevuto un fegato con una effettiva attivazione di PI3K hanno mostrato un rilascio significativamente inferiore di transaminasi 24 e 48 ore dopo la riperfusione e una migliore clearance della bilirubina nel follow-up. Inoltre in un numero minore di pazienti “*responsive*” rispetto ai non “*responsive*” è stata somministrata adrenalina durante il trapianto per supportare i parametri emodinamici. Di recente Amadour e collaboratori hanno mostrato che il preconditionamento ischemico riduce l'apoptosi degli epatociti e induce la trascrizione del fattore inducibile dall'ipossia 1α (HIF- 1α) nei fegati trapiantati umani (Amadour, 2007). E' interessante notare che fosforilando molte proteine pro-apoptotiche PKB/Akt gioca un ruolo importante nel prevenire l'apoptosi (Cantley, 2002). In aggiunta nel nostro laboratorio abbiamo recentemente dimostrato che PI3K è anche coinvolta nella stimolazione normossica dell'attivazione di HIF- 1α indotta mediante preconditionamento ipossico o mediante stimolazione con agonisti dei recettori A2a dell'adenosina negli epatociti e nei macrofagi umani (De Ponti, 2007; Alchera, 2008). Nel loro insieme queste osservazioni supportano l'importanza dei segnali mediati da PI3K nel prevenire il danno da riperfusione nei fegati umani.

In conclusione, il preconditionamento ischemico di fegati prelevati da donatore cadavere e trapiantati ha mostrato un'ampia variabilità inter-individuale dell'attivazione di PI3K, che può riflettere un'insufficiente capacità degli organi ottenuti da pazienti clinicamente morti di mettere in atto un efficiente processo preconditionante quando sottoposti ad uno stress ischemico transitorio. Tale variabilità potrebbe spiegare i risultati contraddittori nell'ambito della risposta clinica al preconditionamento dei fegati trapiantati. Questi risultati evidenziano inoltre l'urgenza di elaborare procedure alternative, possibilmente utilizzando agenti farmacologici, per indurre in maniera efficace e riproducibile gli effetti del preconditionamento in fegati prelevati da donatore cadavere.

BIBLIOGRAFIA

- Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R. Adenosine-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) induces late preconditioning in liver cells. *Hepatology* 2008;48:230-239.
- Amadour A, Grande L, Martí J, Deulofeu R, Miquel R, Solá A, Rodríguez-Laiz G, Ferrer J, Fondevila C, Charco R, Fuster J, Hotter G, García-Valdecasas JC. Ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial. *Am J Transplant.* 2007;7:2180-2189.
- Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P, Ichai P, Sebag M, Adam R, Scatton O, Min BY, Delvard V, Lemoine A, Bismuth H, Castaing D. Effects of 10 minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the graft's preservation and function: the ying and the yang. *Ann Surg.* 2005; 242:133-139.
- Banga RN, Homer-Vanniasikam S, Graham A, Al-Mukhtar A, White Sa, Prasad KR. Ischemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 2005; 92:528-538.
- Cai Z, Semenza G. PTEN activity is modulated during ischemia and reperfusion: involvement in the induction and decay of preconditioning. *Circ Res.* 2005;97:1351-1359.
- Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science.*2002;296:1655-1657.
- Carini R, De cesaris M, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, Paola D, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33: 131-139
- Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 2003;125:1480-91.
- Carini R, Grazia De Cesaris M, Splendore R, Baldanzi G, Nitti MP, Alchera E, Filigheddu N, Domenicotti C, Pronzato MA, Graziani A, Albano E. Role of phosphatidylinositol 3-kinase in the development of hepatocyte preconditioning. *Gastroenterology* 2004;127:914-923.
- Carrasco-Chaumel E, Roselló-Catafau J, Bartrons R, Franco-Gou R, Xaus C, Casillas A, Gelpí E, Rodés J, Peralta C. Adenosine monophosphate-activated protein kinase and nitric oxide in rat steatotic liver transplantation. *J Hepatol.* 2005;43:997-1006.

- Cescon M, Grazi GL, Grassi A, Ravaioli M, Vetrone G, Ercolani G, Varotti G, D'Errico A, Ballardini G, Pinna AD. Effect of ischemic preconditioning in whole liver transplantation from deceased donors. A pilot study. *Liver Transpl.* 2006;12:628-635.
- Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning *Ann Surg* 2003;238:843-850.
- De Oliveira ML, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning: Promises from the laboratory to patients. Sustained or disillusioned? *Am J Transplant* 2007;7:1-3.
- De Ponti C, Carini R, Alchera E, Nitti MP, Locati M, Albano E, Cairo G, Tacchini L. Adenosine A2A receptor-mediated, normoxic induction of HIF-1 through PKC and PI-3Kdependent pathways in macrophages. *J Leukoc Biol* 2007;82:392-402.
- Franco-Gou R, Roselló-Catafau J, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Rimola A, Calvo N, Bartrons R, Peralta C. How ischemic preconditioning protects small liver grafts. *J Pathol.* 2006;208:62-73.
- Gericke A, Munson M, Ross AH. Regulation of the PTEN phosphatase. *Gene* 2006;374:1-9.
- Gurusamy KS, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. Ischaemic preconditioning for liver transplantation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008 Jan 23;(1):CD006315.
- Hatano E, Brenner DA. Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha-and Fas mediated apoptosis through NF-kB activation. *Am. J. Physiol.* 2002; 282: G1357-G1368.
- Hausenloy DJ, Tsang A, Mocanu MM, Yellon DM. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol* 2006;288:H971-H976
- Izuishi K, Tsung A, Hossain MA, Fujiwara M, Wakabayashi H, Masaki T, Billiar TR, Maeta H. Ischemic preconditioning of the murine liver protects through the Akt kinase pathway. *Hepatology.* 2006;44:573-580.
- Jassem W, Fuggle SV, Cerundolo L, Heaton ND, Rela M. Ischemic preconditioning of cadaver donor livers protects allografts following transplantation. *Transplantation.* 2006; 81:169-174.
- Koneru B, Fisher A, He Y, Kenneth M, Skurnick J, Wilson DJ, De la Torre AN, Merchant A, Arora R, Samanta AK. Ischemic preconditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial of safety and efficacy. *Liver Transpl* 2005;11:196-202 Vol II.
- Koneru B, Shareef A, Dikdan G, Desai K, Klein KM, Peng B, Wachsberg RH, de la Torre AN, Debroy M, Fisher A, Wilson DJ, Samanta AK. The ischemic preconditioning paradox

- in deceased donor liver transplantation-evidence from a prospective randomized single blind clinical trial. *Am J Transplant*. 2007;7:2788-2796.
- Lee JH, Kim KY, Lee YK, Park SY, Kim CD, Lee WS, et al. Cilostazol prevents focal cerebral ischemic injury by enhancing casein kinase 2 phosphorylation and suppression of phosphatase tensin homologues deleted from chromosome 10 phosphorylation in rats. *J Pharm Exp Ther* 2004;308:896-903.
 - Muller C, Dunshede F, Koch E, Vollmar AM, Kiemer AK. Alpha-lipoic preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury of the rat liver via the PI3-kinase/Akt pathway. *Am J Physiol* 2003; 285:G769-G778.
 - Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124.
 - Omori N, Jin G, Li F, Zhang WR, Wang SJ, Hamakawa Y et al. Enhanced phosphorylation of PTEN in rat brain after transient middle cerebral occlusion. *Brain Res* 2002;954:317-322.
 - Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rossellò-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997;25:934.
 - Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Bulbena O, Rosellò-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by the activation of adenosine A₂ receptors. *Hepatology* 1999; 29:126-132.
 - Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry, which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977;83:346-356.
 - Petrowsky H, Mc Cormack L, Trujillo M, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. *Ann Surg* 2006; 244: 921-928
 - Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterol* 2003; 125: 917.
 - Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie R. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160-166.
 - Starzl TE, Hakala TR, Shaw BW Jr, Hardesty RL, Rosenthal TJ, Griffith BP, et al. A flexible procedure for multiple cadaveric organ procurement. *Surg Gynecol Obstet* 1984; 158: 223-230.

- Tanguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. *J Cell Sci* 2007;120:4071-4079.
- Teoh N, Dela Pena A, Farrel G. Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF- κ B, p38 kinase and cycle entry. *Hepatology* 2002; 36. 94.
- Varotti G, Grazi GL, Vetrone G, Ercolani G, Cescon M, Del Gaudio M, et al. Causes of early acute graft failure after liver transplantation: analysis of a 17-year single-centre experience. *Clin Transplant* 2005; 19: 492-500.
- Vinciguerra M, Veyrat-Durebex C, Moukil MA, Rubbia-Brant L, Rohener-Jeanrenaud F, Foti M. PTEN down-regulation by unsaturated fatty acids triggers hepatic steatosis via NF κ Bp65/ mTOR-dependent mechanisms. *Gastroenterol* 2008;134:268-280.
- Webster CR, Anwer MS. Phosphoinositide-3-kinase, but not mitogen-activated protein kinase, pathway is involved in hepatocyte growth factor-mediated protection against acid-induced apoptosis in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 33:608-615.
- Wu DN, Pei DS, Wang Q, Zhang GY. Down-regulation of PTEN by sodium orthovanadate inhibits ASK1 activation via PI3K/Akt during cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 2006;287:28258-28263.
- Yellon DM, Dana A. The preconditioning phenomenon. A tool for scientist or a clinical reality? *Circul Res* 2000; 87:543-550.
- Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima Y, Maeda T, Uchiyama H, Sugimachi K. Amelioration of liver injury by ischemic preconditioning. *Br J Surg* 85 (1998) 1636.
- Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Phosphoinositide-3-kinase/akt survival signal pathways are implicated in neuronal survival after stroke. *Mol Neurobiol.* 2006;34:249-270.
- Zamboni F, Franchello A, David E, Rocca G, Ricchiuti A, Lavezzo B, et al. Effect of macrovesicular steatosis and other donor and recipient characteristics on the outcome of liver transplantation. *Clin Transplant* 2001;15:53-57.

ATTIVITA' FORMATIVA

Partecipazione a seminari

Presso il Dipartimento di Scienze Mediche, Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro":

4 ottobre 2007 ***Meccanismi molecolari di fibrogenesi nella steatoepatite non alcolica.*** Prof. Fabio Marra, Dipartimento di Medicina Interna, Università di Firenze.

14 gennaio 2008 ***Biologia molecolare e genetica in ambito forense: principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche.*** Tenente Dott. Giorgio Portera, Ufficiale Biologo Carabinieri Reparto Investigazioni Scientifiche (RIS) Parma .

21 gennaio 2008 ***K+ channels in the heart: in and out of control.*** Dr. Susanne Radicke, University of Technology, Dresda.

23 gennaio 2008 ***Integrin trafficking and tumour cell invasiveness.*** Dr. Jim Norman, Integrin Cell Biology Lab, Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow, Scotland.

24 gennaio 2008 ***La Microscopia a Forza Atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni.*** Prof. Mario Raspanti, Università di Varese.

6 febbraio 2008 ***Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo.*** Dott. Gianluca DeBellis, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Tecnologie Biomediche, Segrate.

5 marzo 2008 ***Analytic vaccinology and human cytomegalovirus: human monoclonal antibodies as tools to identify novel antigens for protective vaccination.*** Dr. Annalisa Macagno, Institute for research in Biomedicine, Bellinzona, Svizzera.

6 marzo 2008 *Applications of gene expression profiling to cancer research*. Prof. Enzo Medico, Istituto di Ricerca e Cura del Cancro, Candiolo (Torino), Professore Associato di Istologia - Università di Torino.

7 marzo 2008 *Fatty liver preservation against ischemia-reperfusion injury*. Dr. Joan Rossello Catafau, Experimental Hepatology Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques, Barcellona.

13 marzo 2008 *To repress gene expression just take out vinegar: role of the class II histone deacetylase HDAC4*. Prof. Claudio Brancolini, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, MATI Center of Excellence, Università di Udine.

9 aprile 2008, *Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria*. Prof. Gaetano Cairo, Istituto di Patologia Generale, Università di Milano.

14 aprile 2008 *Interazioni tra tumore e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica: il ruolo della via metabolica del mevalonato*. Prof. Massimo Massaia, Università di Torino.

15 maggio 2008 *The mechanisms of cell infection with hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions*. Prof. Agata Budkowska, Institut Pasteur, Unitè Hèpacivirus, Parigi.

26 maggio 2008 *Copy number variations: non solo ritardo mentale*. Prof. Orsetta Zuffardi, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Pavia.

5 giugno 2008 *Cap-Analysis Gene Expression (CAGE) Analysis of transcriptional complexity and regulation*. Dr. Piero Carninci, RIKEN Genome Science Laboratory, Japan.

3 e 11 giugno 2008 *Il trasferimento tecnologico dall'università all'impresa*. Dr. Fabrizio Conicella, Dr. Kevin Romani e Dr. Alberto Baldi, Bioindustry Park Canavese.

13 giugno 2008 *Problem solving in patologia epatica*. Prof. Gavino Faà, Ordinario di anatomia Patologica, Università di Cagliari.

30 giugno 2008 *From megakaryocytes to platelets regulation, environment and pathology*. Dr. Alessandra Balduini, Fondazione IRCCS San Matteo, Dipartimento di Biochimica, Università di Pavia.

1 luglio 2008 *Recombinant protein expression*. Prof. Andrew Bradbury, Biosciences Division, Los Alamos National Laboratory, New Mexico.

2 luglio 2008 *Recombinant antibodies and other affinity reagents*. Prof. Andrew Bradbury, Biosciences Division, Los Alamos National Laboratory, New Mexico.

16 luglio 2008 *Display technologies: phage yeast bacteria and ribosoma*. Prof. Andrew Bradbury, Biosciences Division, Los Alamos National Laboratory, New Mexico.

18 luglio 2008 *Fluorescent proteins*. Prof. Andrew Bradbury, Biosciences Division, Los Alamos National Laboratory, New Mexico.

CORSI FREQUENTATI

Complications of portal hypertension. EASL Postgraduate Course. Milano, 23-24 aprile 2008.

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

Molecular, cellular, physiological and pathogenic responses to hypoxia. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. 15-20 gennaio 2008, Fairmont Hotel Vancouver, Vancouver, Canada.

43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 23-27 aprile 2008, Milano, Italy.

COMUNICAZIONI A CONGRESSI

Presentazione del poster *Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned hepatocytes*. Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R.

Molecular, cellular, physiological and pathogenic responses to hypoxia. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. 15-20 gennaio 2008, Fairmont Hotel Vancouver, Vancouver, Canada.

Presentazione del poster *Stimulation of adenosine A2a receptors induces postconditioning in isolated hepatocytes*. Dal Ponte C, Alchera E, Imarisio C, Albano E, Carini R.

43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 23-27 aprile 2008, Milano, Italy.

Presentazione del poster *Role of HIF-1 and carbonic anhydrase IX in the induction of the late protective effects of hepatocyte preconditioning*. Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R.

43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 23-27 aprile 2008, Milano, Italy.

PUBBLICAZIONI

Articoli

Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R. *Adenosine-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) induces late preconditioning in liver cells*. Hepatol 2008;48:230-239.

Abstracts

Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R. *Molecular mechanisms involved in the delayed resistance to hypoxic damage of preconditioned hepatocytes*. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology-2008 Abstract Book, n° 144.

Dal Ponte C, Alchera E, Imarisio C, Albano E, Carini R. *Stimulation of adenosine A2a receptors induces postconditioning in isolated hepatocytes*. Journal of Hepatology, Supplement n. 2, Vol. 48, 2008, n° 150.

Alchera E, Tacchini L, Imarisio C, Dal Ponte C, De Ponti C, Gammella E, Cairo G, Albano E, Carini R. *Role of HIF-1 and carbonic anhydrase IX in the induction of the late protective effects of hepatocyte preconditioning*. Journal of Hepatology, Supplement n. 2, Vol. 48, 2008, n° 147.