

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA
IN
BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN MEDICINA
VETERINARIA
XXII CICLO

ANNO ACC. 2006/2007-2008/2009

TESI

**STUDIO DEL MECCANISMO MOLECOLARE DI
AZIONE DEL MONOSSIDO DI CARBONIO NEL
RIPRISTINO DELLA FUNZIONALITA' RENALE
POST-TRAPIANTO**

Candidata: DOTT.SSA CHIARA ATTANASIO

**DOCENTE GUIDA: Chiar.ma
Prof. Norma Staiano**

**COORDINATORE: Chiar.mo
Prof. Giuseppe Paino**

INDICE

1. PREMESSA	4
2. INTRODUZIONE	5
2.1. Il monossido di carbonio nella medicina dei trapianti	5
2.2. Meccanismi cellulari alla base dell'effetto terapeutico del monossido di carbonio	6
2.3. Sistema emeossigenasi-1/monossido di carbonio e sistema ossido nitrico sintetasi/ossido nitrico	8
2.4. Funzionalità ritardata nel trapianto di rene: espressione dell'emeossigenasi-1 in corso di riperfusione	15
2.5. Danno da ischemia/riperfusione e funzionalità ritardata nel trapianto di rene	16
2.6. Disregolazione genica e trapianto di rene	28
2.7. Potenziale immunogeno dell'organo trapiantato	29
2.8. Ripresa funzionale ritardata e resa finale del trapianto	30
3. SCOPO E ARTICOLAZIONE DEL LAVORO DI TESI	34
4. MATERIALI E METODI	36
4.1. Animali e trattamenti farmacologici	36
4.2. Prelievo dei reni dal donatore	38
4.3. Trapianto dei reni nei riceventi	39
4.4. Monitoraggio post-operatorio degli animali trapiantati	40
4.5. Esposizione dei riceventi al monossido di carbonio	41
4.6. Valutazione della funzionalità renale	41

4.7.	Analisi immunoistologiche	43
4.8.	Sintesi del cRNA e profilo di espressione genica	44
4.9.	Real-time PCR	45
4.10.	Analisi statistica	46
5.	RISULTATI	47
5.1.	La durata dell'ischemia calda determina una funzionalità ritardata sia nell'allograft che nell'autograft	47
5.2.	La ripresa funzionale ritardata nel trapianto di reni sottoposti ad ischemia calda e fredda	49
5.3.	La somministrazione intra-operatoria di monossido di carbonio riduce la funzionalità ritardata in graft renali compromessi	50
5.4.	Il monossido di carbonio migliora l'architettura del tessuto renale in seguito al danno da ischemia-riperfusion	52
5.5.	L'espressione dei geni della risposta allo stress è aumentata nei campioni biopsici prelevati dai reni trapiantati	55
6.	DISCUSSIONE	70
7.	BIBLIOGRAFIA	77
8.	RINGRAZIAMENTI	85
9.	ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI	86

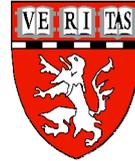
1. PREMESSA



Centro di Biotecnologie
Ospedale Cardarelli



Università degli Studi
di Napoli Federico II



Harvard Medical School
Transplant Institute

Una parte della sperimentazione animale descritta nel lavoro di tesi è stata svolta presso il “Centro di Biotecnologie” dell’A.O.R.N. “A.Cardarelli” di Napoli, con cui il Dipartimento di Strutture Funzioni e Tecnologie Biologiche dell’Università degli Studi di Napoli Federico II ha in corso una Convenzione di ricerca.

Una parte dei risultati riportati in questo lavoro di tesi sono stati ottenuti durante l’attività di ricerca svolta presso l’ “Harvard Medical School Transplant Center” di Boston, MA, USA, nel laboratorio di ricerca diretto dal Prof. L.E. Otterbein, nel periodo Gennaio-Dicembre 2007.

2. INTRODUZIONE

2.1. Il monossido di carbonio nella medicina dei trapianti

Numerosi studi condotti su modelli animali e cellulari dimostrano che l'induzione dell'enzima emeossigenasi-1 (HO-1), così come l'impiego dei prodotti monossido di carbonio (CO) e biliverdina, determina un miglioramento della resa degli organi per trapianto attraverso la riduzione dei fenomeni ossidativi, infiammatori ed apoptotici, e mediante il controllo della risposta immunitaria (1).

In condizioni fisiologiche, l'enzima HO-1 catalizza la reazione di degradazione dell'eme in CO, biliverdina e Fe^{2+} (2) (Figura1).

L'effetto protettivo del CO è stato inizialmente dimostrato in un modello di danno polmonare e, successivamente, in un modello di xenotrapianto di cuore di topo trapiantato in un ratto immunodeficiente. Nel caso di animali in cui il gene dell'HO-1 è represso, o l'attività enzimatica dello stesso inibita, il rigetto è immediato (3-4). Questi studi hanno dimostrato, per la prima volta, che un organo può contribuire alla propria sopravvivenza attraverso l'espressione di un gene, in questo caso HO-1, necessario a prevenire il rigetto. Sorprendentemente, nel caso in cui sia il donatore che il ricevente siano trattati con CO, il cuore sopravvive indefinitamente anche nel caso in cui non esprima HO-1, a dimostrazione del

fatto che il CO può sostituirla in toto l'effetto sopprimendo la risposta infiammatoria.

Ad oggi, l'effetto del CO è stato saggiato, in roditori da laboratorio, in numerosi modelli di trapianto, quali cuore, polmoni, reni, piccolo intestino ed isole pancreatiche, nonché in sistemi di danno da ischemia-riperfusion (*ischemia/riperfusion injury, IRI*) e di rigetto di allotrapianto acuto e cronico (5).

È stato, inoltre, dimostrato che in alcuni casi la preservazione dell'organo in una soluzione saturata con CO riduce il danno ischemico e migliora la funzionalità post-trapianto, consentendo il prolungamento dei tempi di preservazione ed annullando la necessità della somministrazione del gas al paziente, donatore o ricevente che sia (6). Restano ancora, tuttavia, da stabilire la durata e la frequenza dell'esposizione al CO, la quantità ottimale da somministrare ed il ruolo effettivo svolto dal trattamento del donatore, dell'organo e/o del ricevente.

2.2. Meccanismi cellulari alla base dell'effetto terapeutico del monossido di carbonio

Le basi cellulari dell'azione del CO non sono state ancora del tutto chiarite. I monociti ed i macrofagi, stimolati con lipopolisaccaride batterico (LPS) producono diverse citochine pro-infiammatorie, quale il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), e citochine anti-infiammatorie, quali la

interleuchina 1 (IL-1). Nel caso in cui in tali tipi cellulari venga potenziata l'espressione di HO-1, o essi siano esposti al CO prima di venire in contatto con il LPS, si assiste ad una marcata inibizione della risposta pro-infiammatoria a favore di quella anti-infiammatoria (7). Il CO, infatti, contribuisce a contrastare l'infiammazione attraverso diversi meccanismi: previene l'instaurarsi di fenomeni trombotici inibendo l'attivazione e l'aggregazione delle piastrine, mentre a livello polmonare svolge un ruolo chiave nella protezione dal danno da ischemia-riperfusionem riducendo l'espressione dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1) (8).

In cellule endoteliali, fibroblasti e cellule β -pancreatiche, il CO induce una riduzione dei processi apoptotici (9).

In uno studio recente, Chung e collaboratori (2009) hanno rilevato che l'esposizione degli animali al CO potenzia l'eliminazione dei batteri da parte dell'organismo e protegge dallo "shock settico" (10). Altri gruppi di ricerca hanno dimostrato, invece, un effetto battericida da parte delle molecole che rilasciano CO (*CO Releasing Molecules, CORMs*) che, a differenza del gas, agiscono direttamente sui batteri (11). Chin e collaboratori (2007) hanno dimostrato che il CO incrementa il potenziale battericida dei macrofagi, aumentando la produzione di radicali liberi e stimolando la fagocitosi (Figura 2), probabilmente attraverso un incremento della generazione di ossido nitrico (NO) e delle specie reattive dell'ossigeno (*oxygen reactive*

species, ROS), ottenuto mediante stimolazione delle sintetasi mitocondriali (12). Il CO in forma gassosa sembrerebbe, pertanto, non interferire direttamente con il potenziale battericida dei macrofagi. Più recentemente è stato osservato che i CORMs rilascerebbero CO direttamente nei mitocondri dei batteri, alterandone i processi respiratori attraverso il blocco della catena di trasporto degli elettroni (11).

È stato, infine, dimostrato che il CO, sia in vitro che in vivo, reprime la risposta infiammatoria controllando la proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce ed il conseguente aumento di spessore della neointima vascolare, condizione necessaria per l'instaurarsi della condizione aterosclerotica (13).

2.3. Sistema emeossigenasi-1/monossido di carbonio e sistema ossido nitrico sintetasi/ossido nitrico

Un meccanismo d'azione del CO coinvolge la generazione di ossido nitrico (NO), utilizzato per il trattamento dell'ipertensione polmonare neonatale (14). È possibile che l'NO induca l'espressione di HO-1 e, di conseguenza, il rilascio di CO, lasciando aperta la possibilità che il suo effetto terapeutico sia CO-mediato o, comunque, vincolato al CO (12).

Il CO, inoltre, incrementa l'espressione e l'attivazione delle ossido nitrico sintetasi (NOS), sia inducibile (iNOS) che endoteliale (eNOS), aumentando la generazione di NO in modo tessuto-specifico: il CO aumenta

iNOS, ma non eNOS, in un modello di epatite acuta, esercitando un'azione opposta in un modello di ipertensione polmonare in cui una breve esposizione al CO è sufficiente a determinare un rimodellamento delle arteriole polmonari ispessite, con conseguente ripristino di un'architettura simile a quella originaria (15) (Figura 3).

L'aumentata proliferazione delle cellule endoteliali richiede l'attivazione e l'incremento della fosforilazione dell'eNOS. Sembra chiaro che questi enzimi/sistemi di generazione di gas siano interconnessi e che, nel loro insieme, orchestrino un ciclo in cui il potenziamento o l'inibizione dell'attività enzimatica dipendono, verosimilmente, dalle necessità della cellula (Figura 4).

L'elevata diffusibilità del CO consente al gas di accedere ad un numero maggiore di tipi cellulari rispetto a quanto accade per l'NO che, essendo altamente reattivo, ha un'emivita breve e non è in grado di esercitare alcun effetto a distanza dalla fonte che lo ha generato. In Tabella 1 vengono messe a confronto le proprietà fisiche ed il potenziale terapeutico dei due gas (16).

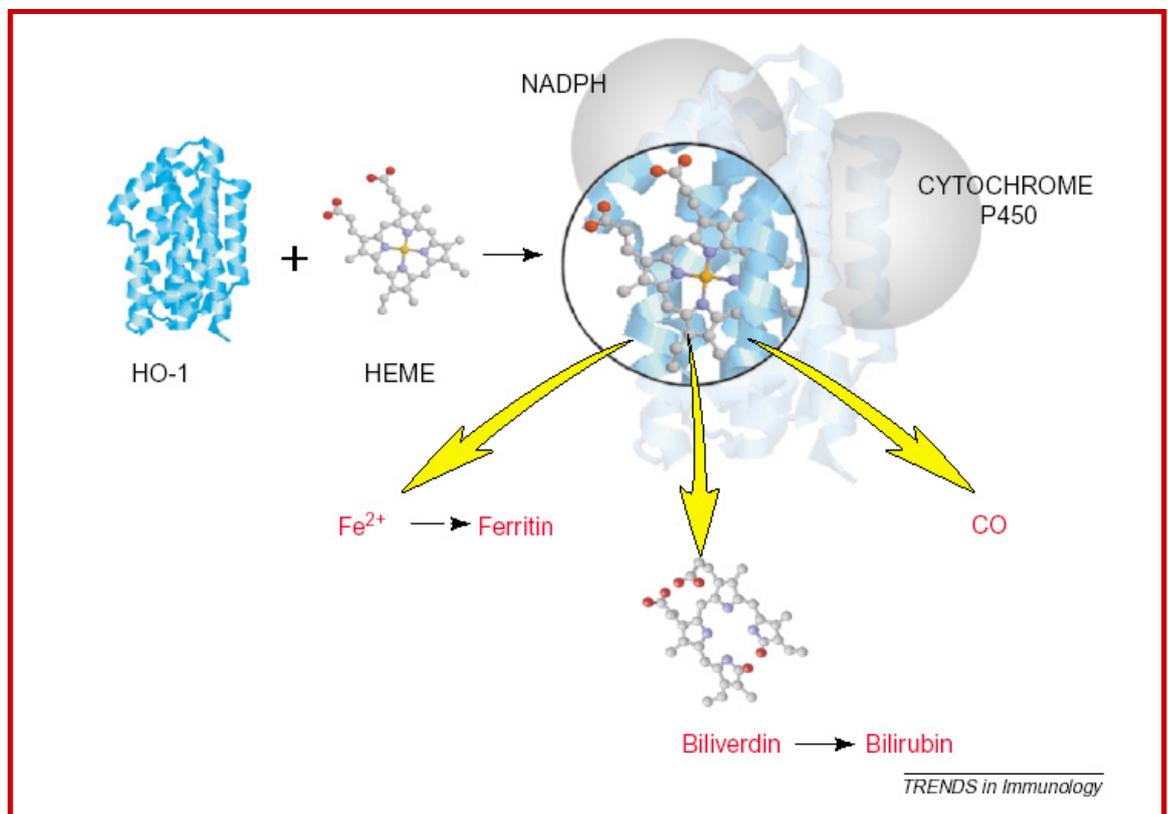


Figura 1. L'enzima eme-ossigenasi-1 catalizza la degradazione dell'eme nei suoi prodotti monossido di carbonio (CO), biliverdina e Fe²⁺. Il CO è rilasciato in forma gassosa, la biliverdina viene convertita a bilirubina, ad opera dell'enzima biliverdina reductasi, mentre il Fe²⁺, legato dalla ferritina, viene veicolato in circolo (da *Trends in Immunology* 24, 450, 2003; ref. n. 19).

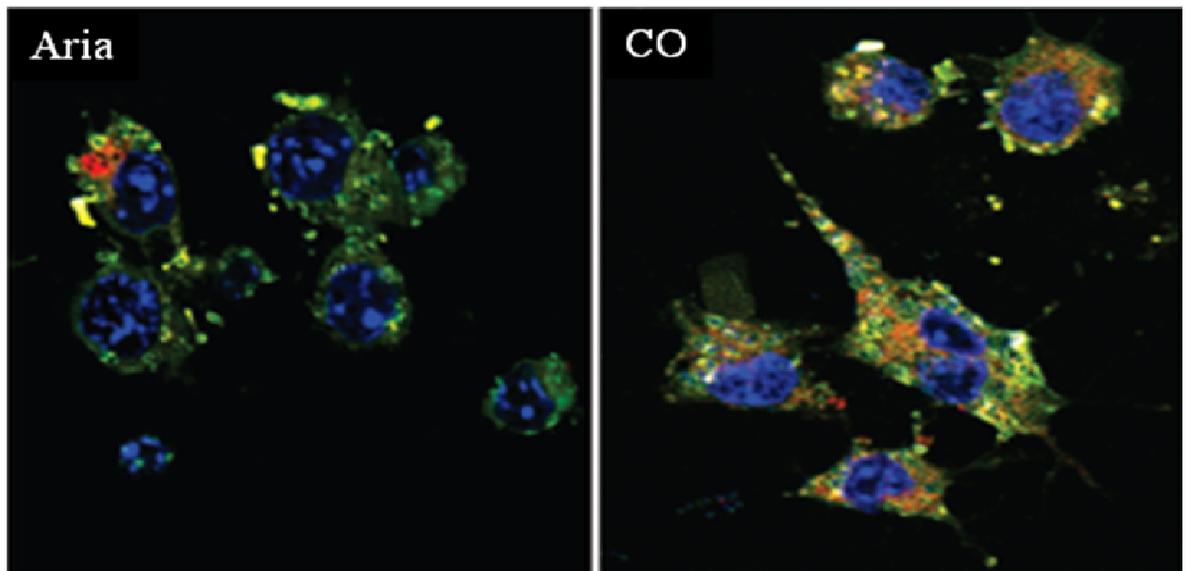


Figura 2. Il monossido di carbonio incrementa la fagocitosi ed il potenziale battericida nei macrofagi. I fagociti trattati con CO (250 ppm) contengono un maggior numero di batteri rispetto ai fagociti di controllo. La marcatura con fluorocromi consente di evidenziare in blu i nuclei, in verde i lisosomi ed in rosso i batteri (*da Respiratory Care 54, 928, 2009; ref. n. 16*).

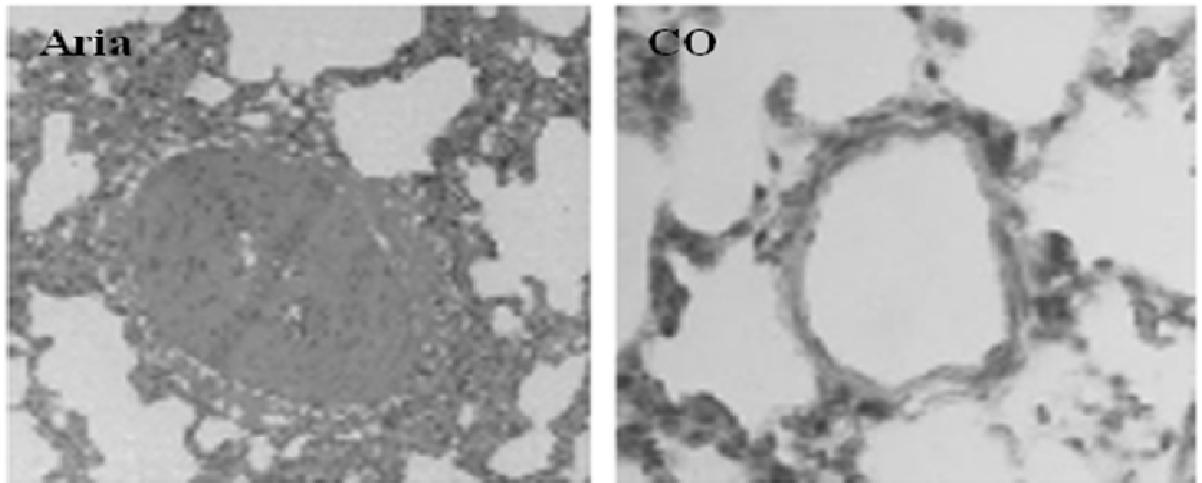


Figura 3. Arteriole polmonari di ratto non trattate e trattate con monossido di carbonio, 6 settimane dopo la somministrazione di monocrotalina, induttore dell'ipertensione polmonare. Il trattamento con CO, della durata di 1 ora, è stato intrapreso al giorno 29, in corrispondenza del picco ipertensivo, ed è stato protratto fino al giorno 42 consentendo il ripristino dell'architettura originaria. L'immagine è rappresentativa di 6 sezioni per polmone ottenute da 4 ratti per gruppo (da *J Exp Med* 203, 2110, 2006; ref. n. 15).

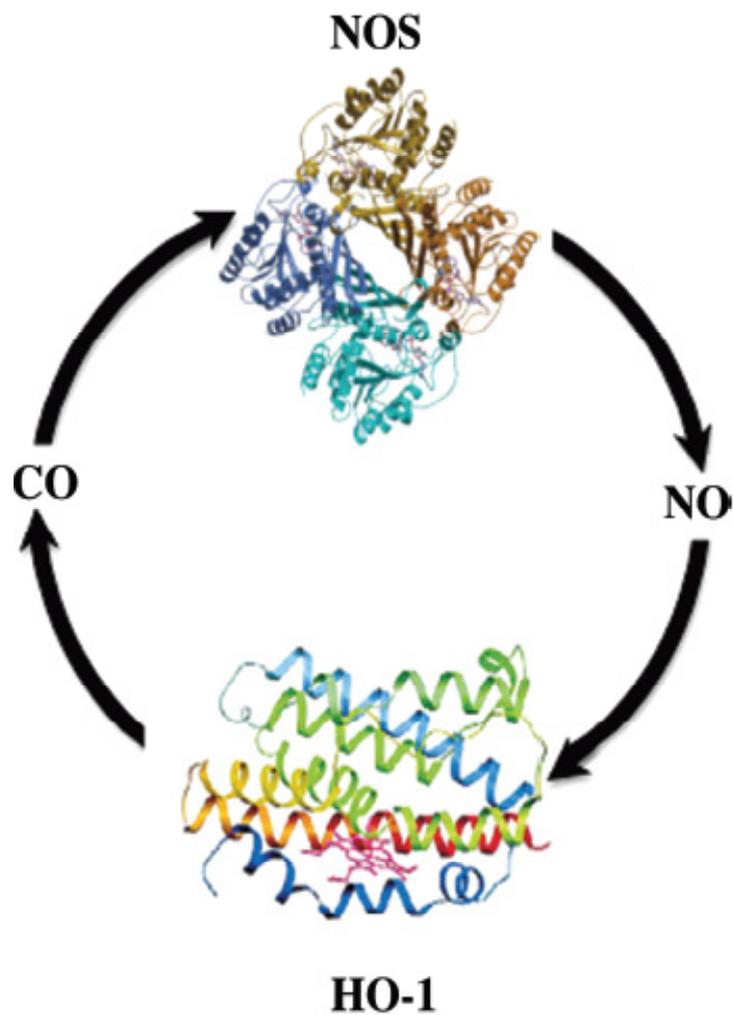


Figura 4. Ciclo dei gas NO e CO. Gli enzimi ossido nitrico sintetasi (NOS) ed emeossigenasi-1 (HO-1) generano, rispettivamente, NO e CO che, a loro volta, si rendono responsabili del potenziamento o dell'inibizione dell'attività enzimatica, in dipendenza dalle necessità della cellula (*da Respiratory Care 54, 930; 2009; ref. n. 16*).

Tabella 1. Monossido di carbonio e ossido nitrico: caratteristiche fisiche e potenziale terapeutico (da *Respiratory Care* 54, 930;2009; ref. n. 16).

Proprietà fisiche	Monossido di Carbonio	Ossido Nitrico
Peso molecolare	28,01	30,06
Punto di ebollizione (°C)	-191,5	-151,8
Punto di fusione (°C)	-205	-163,6
Solubilità in acqua (mg/L)	30	67
Densità (kg/m ³ vapore)	788,6	3,027
Peso specifico (g/L)	1,25	1,037
Reattività	Inerte, eccetto legame con emoproteine	Altamente reattivo, emivita molto breve
Metabolismo	Nessuno	Rapida conversione in nitrito/nitrato
Efficacia preclinica		
Ipertensione polmonare	250 ppm per 1 ora esercitano un'efficacia a lungo termine	20-80 ppm esercitano una rapida efficacia
Sepsi/sindrome respiratoria acuta	250 ppm per 4 ore promuovono la clearance batterica e riducono l'infiammazione	0,2-20 ppm per 4 ore riducono l'ipertensione polmonare ma non hanno effetto sull'infiammazione
Ischemia miocardica	250-1000 ppm per 24 ore prevengono il danno da ischemia/riperfusion	80 ppm per 60 minuti prevengono il danno da ischemia/riperfusion

2.4. Funzionalità ritardata nel trapianto di rene: espressione della emeossigenasi-1 in corso di riperfusione

Il danno da ischemia/riperfusione (IRI) è caratterizzato da una cascata di eventi, riconducibili a fattori immunologici e non, risultante in un danno tissutale di ampia portata (17).

La medicina dei trapianti non può prescindere dall' IRI: all'atto del prelievo dal donatore l'organo subirà un periodo di "ischemia calda" (*warm ischemia time, WIT*), al quale farà seguito un periodo di "ischemia fredda" (*cold ischemia, CIT*). Per "tempo di ischemia calda" si intende l'arco di tempo che intercorre tra l'arresto dell'irrorazione, al fine di poter svolgere la procedura di prelievo dell'organo, ed il termine dell'intervento stesso.

L'aggettivo "calda" si riferisce al fatto che si tratta di una condizione ischemica diversa da quella propria della preservazione pre-trapianto dell'organo, "ischemia fredda", nel corso della quale il "*graft*" (innesto, denominazione riferita all'organo in fase di preservazione) viene mantenuto a temperatura di refrigerazione per un arco di tempo variabile tra il prelievo dal donatore e l'impianto nel ricevente.

Nonostante l'impiego di una temperatura adeguata e di soluzioni di preservazione volte a ridurre al minimo il metabolismo cellulare riducendo il potenziale danno d'organo, all'atto della riperfusione, il ripristino del flusso ematico nel ricevente scatena la liberazione di sostanze ad azione ossidante ed infiammatoria che attivano la risposta immunitaria.

Dopo pochi minuti dall'attivazione dell'endotelio, coinvolgente selectine e chemochine, le cellule immunocompetenti del ricevente infiltrano l'organo trapiantato causando un danno tubulare nel rene, epatocitario nel fegato, beta-cellulare nel pancreas (18).

In diversi modelli sperimentali di trapianto d'organo l'espressione dell'enzima HO-1 risulta aumentata, sia in corso di rigetto, acuto e cronico, che in corso di IRI (19), tuttavia, in campo clinico, pochi studi sono stati rivolti all'approfondimento di tale aspetto (20-21).

Öllinger e collaboratori (2007) hanno recentemente correlato l'espressione della proteina HO-1 alla ripresa funzionale dell'organo, mediante l'analisi di campioni biopsici prelevati in corso di ischemia fredda e nella fase iniziale della riperfusione, rivelando un possibile ruolo predittivo del livello di espressione di HO-1 nei confronti della sindrome clinica da ripresa funzionale ritardata (*delayed graft function, DGF*) (22).

2.5. Danno da ischemia/riperfusione e funzionalità ritardata nel trapianto di rene

Nei pazienti che ricevono un trapianto di rene non di rado si manifesta un certo grado di disfunzione iniziale che conduce alla DGF. Raramente si verificano casi in cui la funzione d'organo nel ricevente non riprende nemmeno in un secondo momento, dando vita ad una “*primary non-*

function”, mancata funzionalità primaria, alla quale segue, necessariamente, l’espianto.

La DGF rappresenta una forma acuta di decadimento funzionale risultante, da un punto di vista clinico, in oliguria post-trapianto, ed identificata, per definizione, come necessità di ricorso alla dialisi entro i primi sette giorni dall’intervento. Il miglioramento della gestione del paziente, sia esso donatore o ricevente, così come i progressi in campo diagnostico e terapeutico, non sembrano aver ridotto l’incidenza di tale condizione patologica o averne limitato le conseguenze a breve e lungo termine. La frequenza della DGF nei reni prelevati da donatore cadavere, cioè da donatore in stato di morte cerebrale, si caratterizza per una variabilità estrema, oscillando tra il 2% ed il 50%, in relazione all’area geografica (23-24). Una tale disomogeneità deriva, principalmente, dalla diversità dei criteri di selezione dei donatori, se a cuore non battente o in stato di morte cerebrale. L’ *“Organ Procurement and Transplantation Network database”*(USA) riporta che il 50% dei pazienti portatori di DGF recupera la funzionalità renale entro dieci giorni dal trapianto, il 33% dopo 10-20 giorni ed il 10-15% successivamente. L’incidenza della mancata funzionalità primaria corrisponde al 2-15%, mentre il risultato migliore si ottiene nei trapianti da donatore vivente, in cui l’incidenza media della DGF si attesta intorno al 5% (25).

Tra i principali fattori di rischio, oltre alle condizioni cliniche del ricevente al momento del trapianto, si annoverano la durata dell'ischemia fredda, le modalità di preservazione dell'organo e l'eventuale condizione di diabete o ipertensione del donatore. Una grande importanza riveste, inoltre, l'età del donatore: il rischio di DGF risulta raddoppiato nei riceventi di reni provenienti da donatori di età superiore ai 55 anni (26).

L'ischemia, limitando il flusso ematico, determina una carenza di ossigeno e nutrienti, inducendo, tra l'altro, l'accumulo dei prodotti di scarto del metabolismo. A livello cellulare le principali alterazioni, da un punto di vista biochimico, sono rappresentate dall'inibizione del metabolismo ossidativo, dalla deplezione di ATP, dall'incremento dei processi di glicolisi anaerobia e dall'inibizione della pompa Na/K-ATPasi. L'ATP viene rapidamente degradato ad ipoxantina che, in assenza di ossigeno, non può essere ulteriormente metabolizzata (27). Il rapido instaurarsi dei processi di glicolisi anaerobia determina l'accumulo di acido lattico, responsabile dell'abbassamento del pH, ed una condizione di instabilità lisosomiale con conseguente attivazione di enzimi litici. Inoltre, risultando inibito il legame tra i metalli di transizione, come il ferro, e le loro proteine "carriers", si verifica un aumento della concentrazione intracellulare di ferro libero, potente catalizzatore di reazioni ossidative che portano alla liberazione di radicali liberi e ROS (Figura 5). La generazione di tali prodotti induce la produzione di ulteriori radicali, tra cui NO che reagisce con il radicale

superossido formando perossinitrito, un potente ossidante capace di modificare le proteine attraverso la formazione di 3-nitrotirosina (28). NO, inoltre, esercita un'azione di indebolimento del citoscheletro determinando il distacco delle cellule del tubulo prossimale con conseguente ostruzione tubulare (29) (Figura 6). Malgrado l'aumentata produzione di NO, ad opera di iNOS, abbia la potenzialità di ridurre il danno renale per il suo effetto vasodilatatore, diversi studi ne suggeriscono un ruolo negativo riconducibile all'attivazione dei ROS (30).

La condizione ischemica porta, tuttavia, all'attivazione di meccanismi citoprotettivi compensatori, il più importante dei quali corrisponde al rallentamento del metabolismo cellulare, oltre alla trascrizione di geni codificanti per molecole ad azione protettiva o, comunque, correlate alla rigenerazione cellulare (31-32).

In reni prelevati da donatore cadavere, l'espressione di geni codificanti per fattori di rilievo nell'ambito della risposta adattativa dell'organo, quali HO-1, il fattore vascolare di crescita endoteliale e Bcl2, risulta ridotta rispetto ai livelli fisiologici, probabilmente a causa di un carente adattamento alla condizione ischemica e al danno dovuto alla riperfusione, da cui un potenziale danno della funzione d'organo a breve termine (33).

Il ripristino del flusso ematico in reni danneggiati dall'ischemia prolungata alla quale sono sottoposti in corso di preservazione è responsabile

dell'innescò di una cascata di eventi, che svolge un ruolo chiave nello sviluppo della DGF.

L'insieme dei meccanismi che si attivano in questo contesto prende genericamente il nome di risposta infiammatoria. La riperfusione determina il ripristino di una temperatura appropriata alle funzioni cellulari, un adeguato apporto di ossigeno ed il ripristino del metabolismo aerobio e della produzione di ATP. Tali processi sono affiancati, tuttavia, dalla generazione di ROS in elevata concentrazione (Figura 7).

L'anione superossido ed il perossido di idrogeno reagiscono a formare il radicale idrossilico che, caratterizzato da elevata reattività e spiccato effetto citotossico, dà inizio alla perossidazione dei lipidi della membrana cellulare (28).

In condizioni normali, le sostanze antiossidanti presenti a livello renale bilanciano l'effetto dei ROS, mentre ciò non accade in corso di riperfusione del tessuto ischemico, in cui il potenziale protettivo viene rapidamente esaurito in seguito alla generazione di elevate quantità di ROS, risultando nell'induzione della morte cellulare per apoptosi (34).

Durante la riperfusione anche l'organismo ospite concorre al potenziamento del danno dovuto ai ROS. Le citochine infiammatorie e le chemochine rilasciate nel corso della generazione degli stessi radicali e della perossidazione lipidica, insieme all'aumentata espressione delle molecole di adesione della membrana cellulare, richiamano neutrofili e monociti,

responsabili a loro volta del rilascio di un'ulteriore quantità di ROS che andrà a potenziare l'insulto renale.

Le chemochine, prodotte sia in corso di ischemia che di riperfusione, sono potenti fattori chemiotattici per i neutrofilo, per cui i neutrofilo rappresentano le prime cellule che vengono reclutate ed i mediatori primari del danno (35).

Entro un'ora dal trapianto risulta evidente l'induzione delle α -chemochine (CXC/ELR) che danno inizio all'infiltrazione dei neutrofilo (36).

Diversi studi riferiscono dell' "*up-regolazione*" dell' interleuchina 8 (IL-8), anch'essa potente fattore chemiotattico per i neutrofilo, in seguito a trapianto di polmone e di rene nell'uomo ed in modelli animali di ischemia-riperfusione polmonare nel coniglio e cardiaca nel cane (37). Il ruolo di tali mediatori nei tessuti danneggiati risulta confermato dal fatto che il trattamento con anticorpi diretti verso l'IL-8, o altre α -chemochine, riduce l'infiltrazione dei neutrofilo ed il danno successivo alla realizzazione sperimentale dell'IRI o del trapianto (38).

Tre ore dopo il trapianto si assiste all'instaurarsi di una seconda fase dell'espressione delle chemochine, che coinvolge la proteina 10 inducibile dall'interferone γ ed il fattore chemiotattico per i macrofagi 1 (MCP-1). In questa fase si assiste ad un'ulteriore infiltrazione da parte dei neutrofilo e all'iniziale richiamo di monociti, linfociti T e cellule "*natural killers*" (35).

Anche fattori chemiotattici appartenenti alla cascata del sistema

complemento, in particolare il C5a, contribuiscono all'infiltrazione dei neutrofili e al determinismo del danno tissutale (39). Il rene, del resto, rappresenta una fonte significativa dei fattori del sistema complemento stesso. Studi recenti hanno suggerito che la sintesi locale di tali fattori svolge un ruolo rilevante sul danno tissutale localizzato in corso di trapianto di rene (40). In un modello murino, il blocco del recettore del C5a ad opera di antagonisti specifici annulla l' "up-regolazione" delle chemochine e riduce la mancata funzionalità renale indotta dall'IRI (41).

La localizzazione dei leucociti presso la sede del danno è essenzialmente mediata da recettori di adesione (34). Successivamente alla marginazione e al contatto tra i leucociti e l'endotelio attivato, si stabilisce un'interazione tra i recettori leucocitari ed i recettori di adesione delle cellule endoteliali, risultante nella fissazione dei leucociti all'endotelio, e nel passaggio, per diapedesi, attraverso la parete vasale. Questo processo è mediato dalle molecole intracellulari di adesione 1 (*intracellular adhesion molecule 1, ICAM-1*), dalle molecole di adesione delle cellule vascolari 1 (*vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1*) e dai loro ligandi, le integrine 1 e 2 espresse sui leucociti (42). Studi condotti su tessuto epatico, miocardico e renale hanno mostrato un potenziamento dell'espressione di ICAM 1 in corso di IRI e la prevenzione del danno, con conseguente protezione dell'organo, da parte di anticorpi diretti verso queste molecole (43-44). Studi preliminari in cui sono stati impiegati anticorpi diretti contro

ICAM 1, in pazienti ad alto rischio trapiantati di rene, hanno evidenziato un miglioramento nella prevenzione della DGF. Questo dato, tuttavia, non è stato confermato dai risultati di un ampio trial clinico condotto in Europa, probabilmente a causa dell'impiego di una dose di anticorpo insufficiente o in seguito ad altri fenomeni che abbiano interferito con la sua azione (45-46).

Nel corso della riperfusione renale i leucociti aderenti ai capillari svolgono un'azione traumatica, determinando il rilascio di enzimi proteolitici e di ulteriori citochine, con conseguente congestione dei *vasa recta*, alterazione della perfusione peritubulare ed aumento della permeabilità capillare (47). L'aumentata adesione determina, inoltre, la liberazione di ROS e l'infiltrazione tissutale da parte dei leucociti attivati, risultante nello sviluppo di una complessa sinergia tra ROS, chemochine, citochine, fattori del sistema complemento, recettori di adesione e leucociti. Il prodotto finale di queste interazioni è un processo infiammatorio a carico dell'epitelio renale, in particolare a livello del tubulo prossimale. È evidente che l'instaurarsi di tali meccanismi altera la funzione renale ben oltre il danno riconducibile all'ischemia stessa.

Successivamente alla riperfusione i reni ischemici mostrano un diverso livello di danno cellulare e funzionale, che contribuisce ad aumentare le resistenze vascolari. In particolare, l'incremento della resistenza delle arteriole afferenti altera notevolmente la capacità di filtrazione glomerulare, a causa di una riduzione del gradiente di pressione

trans-capillare dei glomeruli che determina l'alterazione della micro-perfusione renale (48). All'aumento delle resistenze vascolari contribuiscono anche il danno a carico del tubulo prossimale, risultante in un rigurgito trans-tubulare dell'ultra-filtrato, e l'alterato riassorbimento del sodio (49). La pressione esercitata dai tubuli congestionati, ostruiti dai detriti cellulari, concorre all'instaurarsi della nefropatia vasomotoria, insieme all'effetto di sostanze vasoattive rilasciate nel corso della reazione infiammatoria conseguente all'ischemia renale (50). Il danno a livello dell'endotelio vascolare determina vasocostrizione, a causa di un aumento del trombossano e di una riduzione della prostaciclina (51) (Figura 7). Nella rete capillare peritubulare di reni sottoposti ad ischemia si assiste ad un incremento dell'espressione dell'endotelina, così come, in pazienti affetti da DGF si rileva un aumento dei livelli sierici della stessa proteina (52-53).

In tale condizione di vasospasmo l'NO contribuisce al mantenimento del rilassamento vascolare e dell'ossigenazione della midollare renale, svolgendo un ruolo di rilievo nel superamento della vasocostrizione post-ischemica (54).

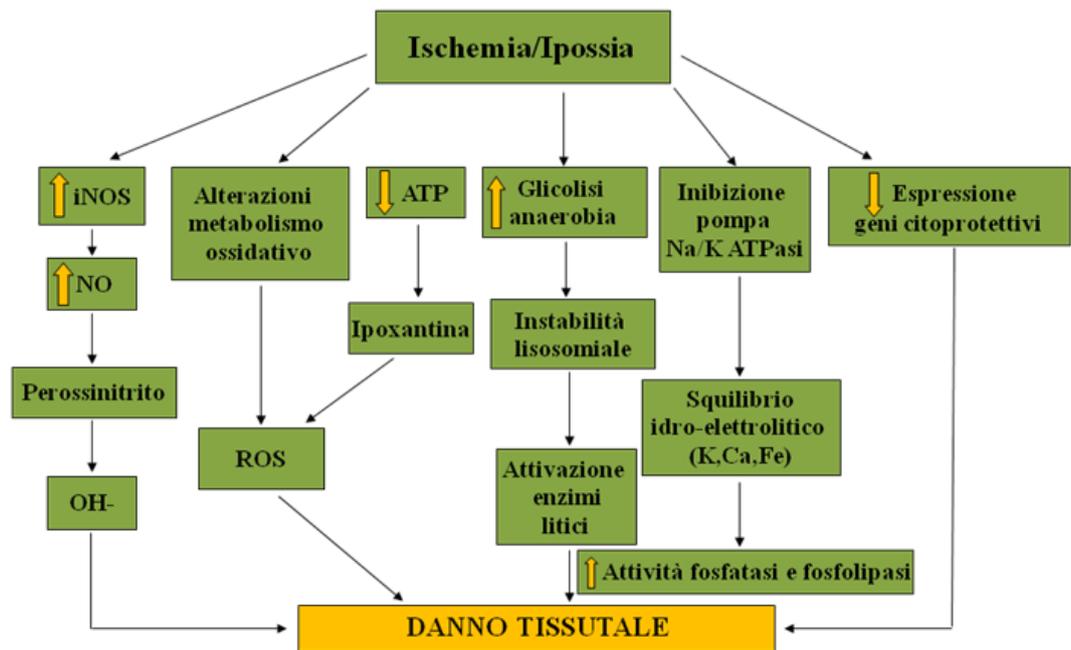


Figura 5. Rappresentazione schematica della cascata di eventi che caratterizza il danno ischemico (da *Lancet* 3, 1816, 2004; ref. n. 18).

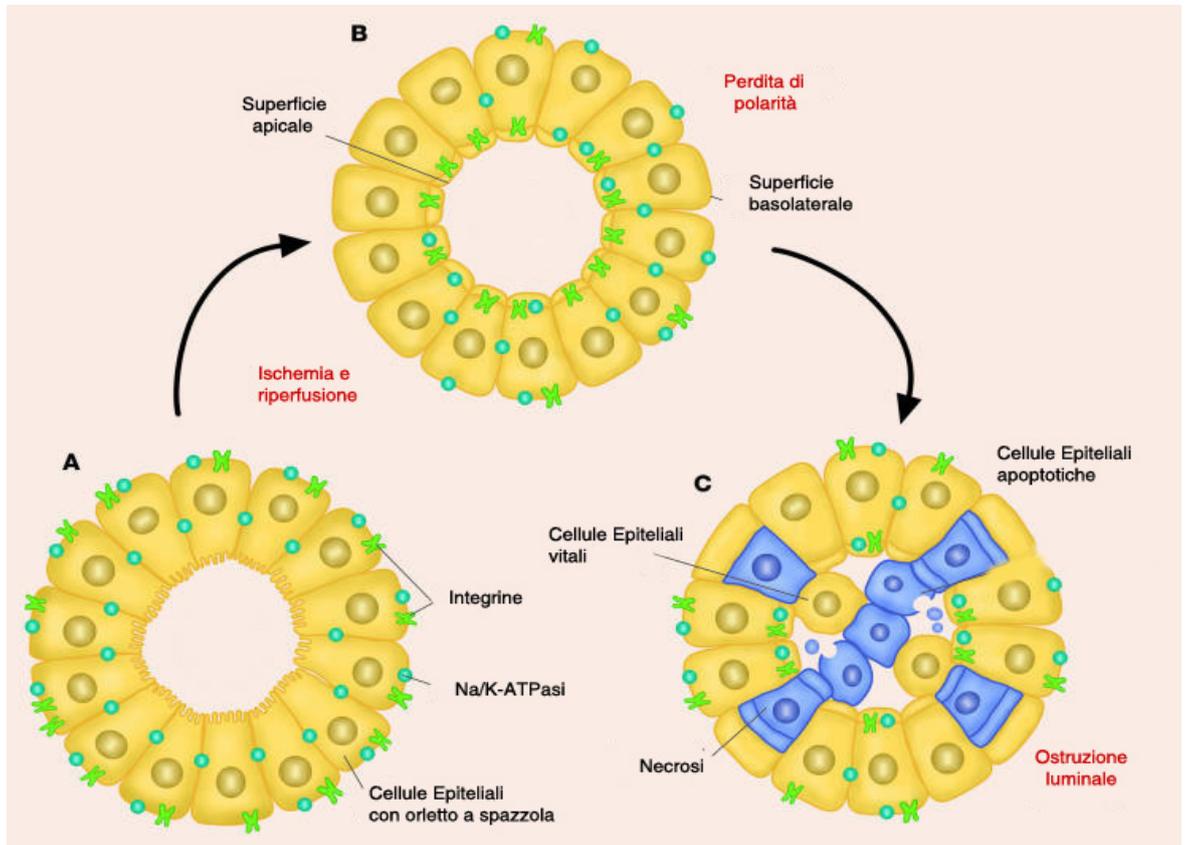


Figura 6. Rappresentazioni morfologiche del danno tubulare in corso di ischemia renale (da www.docstoc.com, professional documents sharing system).

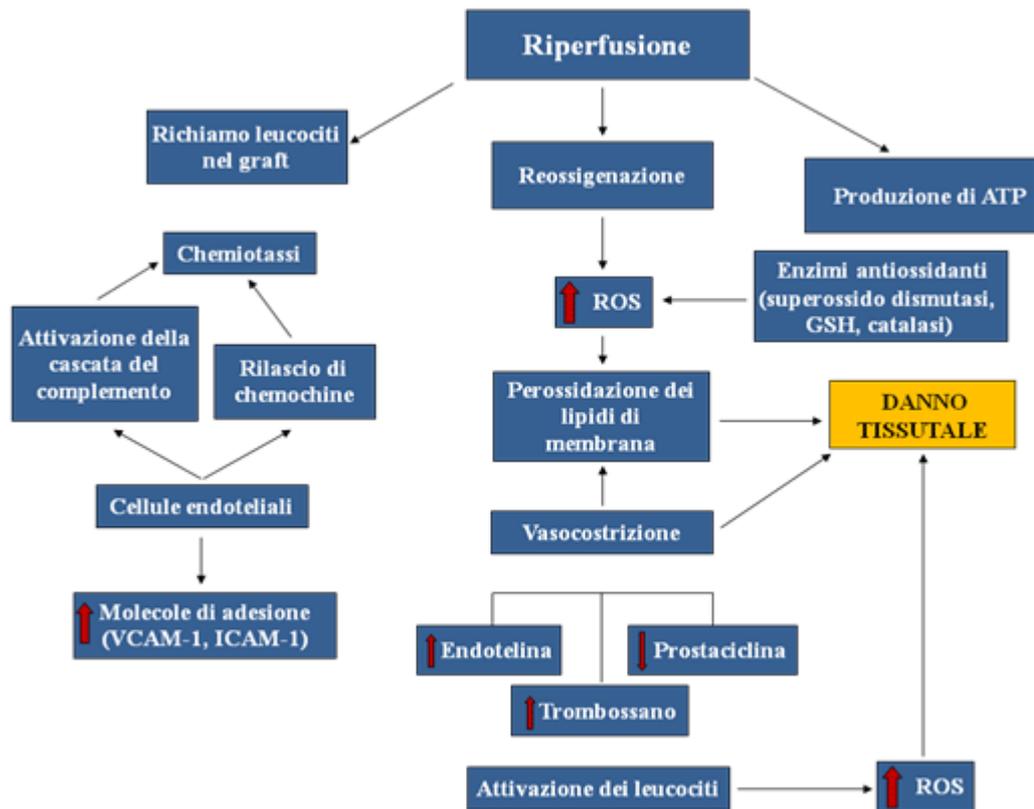


Figura 7. Rappresentazione schematica della reazione tissutale all'atto della riperfusione (da *Lancet* 3, 1816, 2004; ref. n. 23).

2.6 Disregolazione genica e trapianto di rene

I recenti progressi nel campo della genomica funzionale hanno prodotto nuovi strumenti per la comprensione dell'analisi dei geni coinvolti in meccanismi biologici complessi, tra cui la risposta renale al danno da IRI merita certamente un posto rilevante (55). Sulla base dell'ipotesi che il grado di disregolazione genica determini l'entità del danno a carico dell'organo trapiantato, l'analisi dei microarrays, applicata alle alterazioni dell'espressione dei geni coinvolti durante le fasi precoci della riperfusione, rappresenta uno strumento molto promettente. Questo approccio è stato recentemente impiegato in un modello murino di IRI (55). Il profilo di espressione di diversi geni renali risulta notevolmente alterato in dipendenza del tempo intercorso tra il termine dell'ischemia e l'effettuazione del prelievo biotico (3-12-24 ore). Sembra, pertanto, che il rischio di IRI e DGF sia correlato a fattori genetici.

Stegall e collaboratori (2002), in uno studio recente condotto sul trapianto di rene nell'uomo, hanno mostrato che i riceventi di reni provenienti da donatori con polimorfismo del gene che codifica per l'enzima glutatione-S-transferasi sono meno esposti alla DGF (56). Questo enzima fa parte di un gruppo di molecole che viene indotto in corso di riperfusione, allo scopo di contrastare l'effetto dei ROS (57).

L'identificazione di un gene che possa avere un'azione protettiva dall'IRI e la possibilità di rilevare i polimorfismi al momento della

tipizzazione del tessuto potrebbe fornire utili informazioni relative al rischio biologico di DGF di un determinato organo. Attualmente non è stata riportata, invece, alcuna associazione tra polimorfismi enzimatici nei riceventi e sviluppo della DGF.

2.7. Potenziale immunogeno dell'organo trapiantato

La condizione di ischemia a carico del rene concorre ad aumentare il rischio di rigetto, sia acuto che cronico, mediante i meccanismi dell'immunità innata che si attivano in risposta al danno e che agiscono sullo sviluppo e sulla regressione dei processi immunitari adattativi suscitati dal tessuto “*non-self*” (58).

In seguito all'ischemia si verifica un incremento dell'espressione degli antigeni del Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC) di classe I e II (59). Tale evento consente l'attivazione di una potente risposta immunitaria, mediata sia dal diretto riconoscimento di diversi antigeni MHC espressi sulla superficie dell'organo, che dal riconoscimento indiretto di peptidi derivati da queste molecole da parte del sistema immunitario del ricevente (60). Il grado di espressione degli antigeni MHC potrebbe essere correlato all'immunogenicità ed alla sua relazione con i meccanismi descritti (61).

Il danno ischemico aumenta l'espressione di molecole di adesione, presenti nel “*graft*”, elevandone il potenziale immunogeno ed incrementando il rischio di rigetto (62-63). Il rigetto acuto risulta più

frequente in pazienti che hanno manifestato la DGF, rispetto a quelli in cui la ripresa della funzione d'organo non abbia subito rallentamenti (64).

L'incremento dei valori sierici di creatinina, così come l'oliguria, non può essere considerato un “*marker*” diagnostico affidabile come, invece, i protocolli impiegati in alcuni centri in cui si procede al prelievo di un campione bioptico ogni 7-10 giorni (65).

2.8. Ripresa funzionale ritardata e resa finale del trapianto

L'epitelio dei tubuli renali si caratterizza per la capacità di recuperare completamente danni morfo-funzionali anche notevoli (66) (Figura 8). Il “*turn-over*” o la rigenerazione delle cellule epiteliali distrutte si accompagna a complesse modificazioni dell'espressione genica dei fattori di crescita, quali il fattore di crescita insulino-simile, il fattore di crescita epidermico ed il fattore di crescita epatocitario (67). Questi fattori stimolano il potenziale rigenerativo delle cellule tubulari rimaste intatte ed il recupero di quelle danneggiate, impedendo, in queste ultime, una progressione verso il danno irreversibile. In un modello di ratto è stato evidenziato che cellule, fisiologicamente appartenenti al comparto delle cellule staminali, vanno incontro a divisione durante la fase del recupero post-ischemico (68). Tali cellule, caratterizzate da un fenotipo immaturo, proliferano attivamente per poi differenziarsi in corso di rigenerazione tubulare in cellule epiteliali tubulari renali. Il danno da IRI nel rene potrebbe, quindi, indurre le cellule

staminali midollari a migrare verso il sito danneggiato dove si differenzierebbero e promuoverebbero il recupero morfo-funzionale (69).

Attraverso meccanismi mediati dalle cellule staminali locali, insieme a quelle di provenienza midollare, la disfunzione acuta post-trapianto dell'organo viene completamente, o parzialmente, compensata. Sembra, tuttavia, che le aree danneggiate dall'IRI, oltre alla promozione del differenziamento delle cellule staminali in parenchima renale funzionale, consentano anche il differenziamento di precursori cellulari in fibroblasti (70).

Nel corso del processo di recupero funzionale, inoltre, popolazioni di cellule renali potrebbero acquisire una tendenza programmata alla proliferazione e alla sintesi di matrice extra-cellulare, ma anche contribuire alla fibrosi cronica con conseguente riduzione del numero di nefroni funzionanti (71-72).

Nel loro insieme questi dati sperimentali supportano l'ipotesi che i riceventi di trapianto di rene che manifestano DGF sono più esposti ad un'evoluzione negativa a lungo termine, rispetto ai pazienti in cui la ripresa funzionale dell'organo segue il normale decorso. Il “*Renal Data System*” (USA), che raccoglie dati da circa 37.000 pazienti trapiantati di rene, rivela che la DGF è un fattore predittivo di perdita della funzione d'organo entro 5 anni dal trapianto; la sopravvivenza del “*graft*” risulta ulteriormente ridotta se alla DGF si accompagna una condizione di rigetto acuto (23). A tale

proposito resta aperta la problematica relativa alla correlazione tra DGF e rigetto. I reni con DGF presentano una maggiore incidenza di rigetto acuto, ma non sempre in questi reni si procede al prelievo di campioni bioptici, il che determina una sottostima del fenomeno rigetto.

Lo “*United Network for Organ Sharing Registry*” (USA) riporta, tuttavia, che pazienti con una storia di DGF, ma con una buona funzionalità renale a 6 mesi dal trapianto, mostrano una sopravvivenza del “*graft*” a lungo termine sovrapponibile ai riceventi che non manifestano ritardo funzionale. La durata della DGF, la diversa gestione farmacologica del paziente e la variabilità delle metodiche di monitoraggio del rigetto possono, parzialmente, motivare la discrepanza dei dati disponibili in relazione alla correlazione tra la DGF e la precoce perdita di funzionalità del “*graft*”.

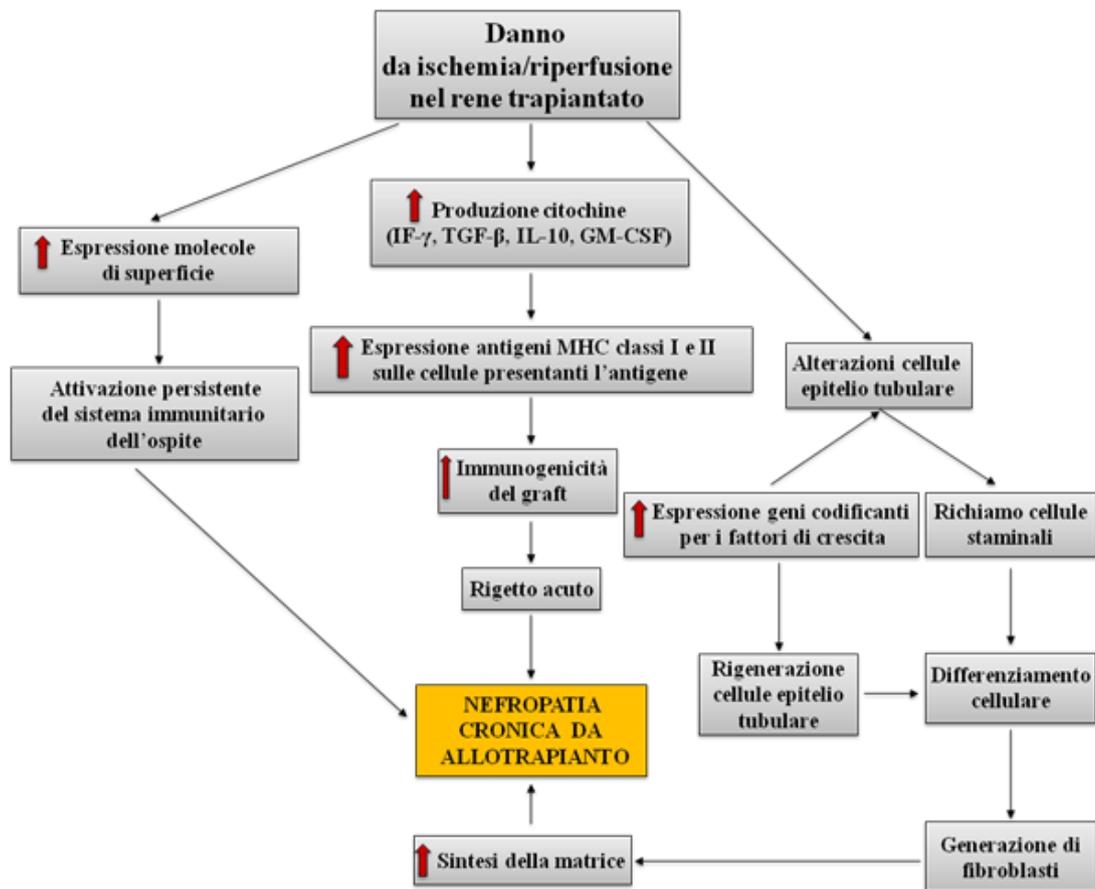


Figura 8. Rappresentazione schematica dei processi coinvolti nel danno renale da ischemia-riperfusione (IRI). Tali meccanismi attivano l'immunogenicità dell'organo trapiantato, favorendo l'insorgenza del rigetto acuto, e si integrano con i processi di riparazione tissutale, contribuendo allo sviluppo di una condizione di nefropatia cronica (TGFβ, fattore di crescita trasformante β; GM-CSF, fattore stimolante colonie per granulociti e macrofagi) (da Perico et al., *Lancet* 3, 1816, 2004; ref. n. 18).

3. SCOPO E ARTICOLAZIONE DEL LAVORO DI TESI

Il danno da ischemia/riperfusionazione come causa di un ripristino ritardato della funzionalità degli organi trapiantati (*delayed graft function, DGF*) rappresenta tutt'oggi una problematica non risolta, anche per la mancanza di sistemi e modelli sperimentali ben caratterizzati.

In questo lavoro di tesi abbiamo sviluppato e caratterizzato un modello suino di DGF in seguito ad allotrapianto di rene ed abbiamo valutato l'effetto citoprotettivo dell'inalazione di monossido di carbonio (CO).

La motivazione della scelta del modello suino, rispetto ai roditori, risiede nella nota similitudine dell'architettura del tessuto renale di questo animale a quello umano.

In particolare, è stato utilizzato un modello standardizzato di ischemia renale, mediante il quale abbiamo dimostrato che il tempo di ischemia calda nel donatore riveste un ruolo fondamentale nel determinismo della DGF, ruolo evidenziato dal temporaneo aumento dei valori sierici di creatinina e BUN (*blood urea nitrogen*) che restano elevati per 4-6 giorni dopo il trapianto prima di tornare ai valori basali.

La somministrazione di CO per 1 ora ai riceventi in sede intraoperatoria migliora notevolmente i tempi di recupero della funzionalità renale, come dimostrato dai parametri ematochimici del profilo renale, dall'istopatologia e dal profilo di espressione genica. In particolare,

l'esposizione al CO riduce la necrosi tubulare acuta ed incrementa i processi di riparazione, come evidenziato dall'aumento dell'espressione della "*retinol binding protein 4*" (*RB 4*) e dai livelli di fosforilazione dell'istone H3.

È stata, inoltre, effettuata l'analisi del profilo genico mediante le metodiche dei "*microarrays*" e della "*polymerase chain reaction*" (*PCR*) su campioni biotici prelevati a 4 ed a 24 ore dalla riperfusione. Tali esperimenti hanno consentito di evidenziare un aumento dell'espressione di geni, quali quelli che codificano per la "*heat shock protein*" 70 (*HSP 70*) e per l'osteopontina coinvolti nella risposta allo stress acuto e nel danno da ischemia/riperfusione (*IRI*). È stato anche evidenziato che il trattamento con CO determina il blocco dell'espressione di geni pro-infiammatori quale quello che codifica per la proteina chemiotattica per i monociti (*MCP-1*), mentre incrementa l'espressione del gene corrispondente alla *HSP 90*, tipicamente coinvolta nella risposta allo stress.

Questo lavoro propone, per la prima volta, un modello sperimentale di *DGF* su animali di grossa taglia rivolto allo sviluppo di strategie terapeutiche indirizzate alla prevenzione/riduzione della *DGF* nell'uomo.

4.MATERIALI E METODI

4.1. Animali e trattamenti farmacologici

Suini di sesso femminile, di razza Yorkshire, del peso di 20-25 kg (Parsons Farm) sono stati stabulati per una settimana prima della sperimentazione con acqua e cibo disponibili *ad libitum*.

Gli animali sono stati ospitati in box singoli di acciaio inossidabile con pavimento in metallo rivestito con materiale plastico, di dimensioni tali da consentire l'esercizio fisico.

Le condizioni ambientali sono state mantenute entro i limiti di temperatura ed umidità stabiliti dalle linee guida dell' *Association for Assessment of Laboratory Animal Care (AALAC)*.

Ciascun locale di stabulazione è stato provvisto di un "timer" atto ad assicurare un ciclo alternato luce/buio di 12 più 12 ore.

Tutti gli animali sono stati premedicati con Telazol, successivamente intubati e ventilati con una miscela contenente un flusso inspiratorio di ossigeno pari al 20% ed una percentuale di isofluorano pari al 2%, con un volume tidale di 300 ml ed una frequenza di 8-10 atti respiratori al minuto.

Il protocollo anestesiológico è riportato in Tabella 2, insieme ai protocolli di mantenimento intra/post-operatorio.

Tabella 2. Protocolli farmacologici impiegati nei modelli di autotrapianto ed allotrapianto renale utilizzati nel lavoro di tesi. Tutte le sostanze in tabella, ad eccezione della cefazolina e del tacrolimus sono state impiegate sia nei donatori che nei riceventi.

Farmaco/Principio attivo	Dose	Via di somministrazione	Frequenza	Durata
Telazol (Tiletamina + Zolazepam)	3-5mg/kg	intramuscolo	singola	singola
Buprenex (Butorfanolo)	0.03mg/kg	intramuscolo	singola	singola
Ossigeno/Isoflurano	0.75-3% (1.5-2L/min)	endotracheale, attraverso ventilatore	continua	intraoperatoria
Soluzione fisiologica 0.9%	5ml/kg	endovena	singola	30 min prima del termine della chirurgia
Eparina	250U/kg	endovena	singola	singola
Prograf (Tacrolimus)	0.5mg/kg	intramuscolo	1x/giorno	0-6 giorni
Cefazolina	35 mg/kg	orale	BID	3 giorni

4.2. Prelievo dei reni dal donatore

A ciascun animale è stata praticata un'incisione addominale paramediana. Successivamente si è provveduto ad isolare l'aorta, distale e sopraceliaca, la vena cava, distale e prossimale, entrambi i reni ed i rispettivi ureteri.

Tutti i vasi lombari afferenti all'aorta sono stati sottoposti a legatura al fine di evitare qualsiasi possibilità di perfusione retrograda nel corso del “*clamp*” aortico. Agli animali è stata somministrata eparina per via endovenosa alla dose di 5000 unità mentre il flusso aortico è stato interrotto, sia prossimalmente che distalmente, per un arco di tempo pari a 45, 60, 90 o 120 minuti, al fine di creare una condizione di ischemia calda in entrambi i reni.

È stata, inoltre, saggiata l'interruzione del flusso per tempi più brevi (15 e 30 minuti) che, presentando un impatto eccessivamente moderato sulla funzionalità renale, sono stati esclusi dal protocollo sperimentale.

Si è poi proceduto all'inserimento di una cannula nell'aorta distale e all'infusione di 300 ml di soluzione University Wisconsin (U.W.) a 4°C per 3-5 minuti. I reni sono stati successivamente prelevati e lavati con 100 ml di soluzione UW infusa attraverso l'arteria renale, mentre i vasi sono stati preparati, in sede di “*back-table*”, per il successivo trapianto.

I reni, infine, sono stati sistemati in un sacchetto d'organo sterile contenente soluzione UW a 4°C e trasferiti in un contenitore sterile per

organi, preservato in ghiaccio per 24 ore.

4.3. Trapianto dei reni nei riceventi

I riceventi, due per ciascuna seduta, sono stati anestetizzati secondo il medesimo protocollo impiegato per i donatori. Ciascun ricevente è stato trattato preventivamente, un giorno prima dell'intervento, con tacrolimus somministrato per via orale, alla dose di 0.5-0.8 mg/kg. L'intervento chirurgico ha previsto un'incisione addominale paramediana, seguita dalla dislocazione del piccolo intestino e dalla rimozione del rene destro. Si è proceduto, quindi, ad isolare la vena cava intrarenale e l'aorta.

In seguito, il rene del donatore, destro o sinistro destinato in maniera casuale, è stato prelevato dal contenitore refrigerato e posizionato in sede ortotopica. Immediatamente si è proceduto alla realizzazione delle anastomosi vascolari, la vena renale è stata anastomizzata alla vena cava inferiore mentre l'arteria è stata anastomizzata all'aorta; in entrambi i casi si è trattato di anastomosi termino-laterali. Ripperfuso il rene, si è proceduto all'esecuzione di una uretero-neo-cisto-stomia esterna, ovvero di un'anastomosi dell'uretere direttamente sulla vescica, attraverso la realizzazione di un'incisione a livello della mucosa. A questo punto, si è provveduto ad effettuare la nefrectomia sinistra e la sistemazione in sede retro-peritoneale del rene trapiantato.

L'intervento si è concluso con la sutura della fascia addominale e della cute, impiegando rispettivamente fili di sutura vicryl 0 e 2/0.

Subito dopo si è proceduto alla cannulazione della vena giugulare interna, onde rendere possibile il prelievo giornaliero dei campioni ematici, previsto dal protocollo sperimentale, nei giorni successivi al trapianto. Gli animali sono stati, infine, risvegliati dall'anestesia.

Sono stati prelevati campioni ematici 15 minuti prima dell'impianto ed ogni 15 minuti dopo di esso, fino al raggiungimento dello stato di coscienza da parte degli animali.

In questa fase sono stati applicati cerotti medicati con farmaci analgesici ed antibiotici. Gli animali sono stati stabulati nei box di provenienza e monitorati quotidianamente.

4.4. Monitoraggio post-operatorio degli animali trapiantati

Sono stati effettuati prelievi ematici giornalieri volti alla valutazione dei valori di creatinina e BUN e dei livelli di tacrolimus (Protrac II, DiaSorin, Stillwater MN). Per gli animali sacrificati 4 e 24 ore dopo il trapianto, i reni sono stati rimossi e sottoposti a prelievi bioptici, finalizzati allo studio del profilo di espressione dei geni e alle analisi istopatologiche rivolte alla valutazione della struttura dell'organo, dell'entità dell'infiltrato infiammatorio e dei fenomeni di apoptosi e necrosi.

4.5. Esposizione dei riceventi al monossido di carbonio

Il CO è stato somministrato ai riceventi attraverso un apposito apparecchio, alla dose di 3 mg/kg per 1 ora, a partire dal momento in cui è stato praticato il taglio della cute. I livelli di carbossiemoglobina (COHb) nel sangue venoso sono stati monitorati costantemente nel corso dell'intervento attraverso l'impiego di un emogas-analizzatore (Radiometer, USA). In Figura 9 è riportata una rappresentazione schematica della procedura sperimentale.

4.6. Valutazione della funzionalità renale

I campioni di siero prelevati a tempi definiti, previsti dal protocollo sperimentale, sono stati esaminati per la valutazione dei livelli di tacrolimus, di creatinina e di azoto ureico (Cobas Mira Analyzer, Global Medical Instruments, Ramsey MN).

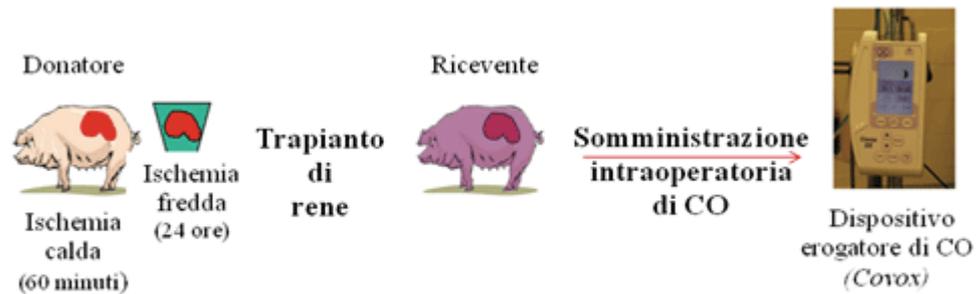


Figura 9. Rappresentazione schematica della metodologia sperimentale.

I reni, prima di essere prelevati dal donatore, sono stati sottoposti a 60 minuti di ischemia calda. Tra il prelievo dal donatore ed il trapianto nel ricevente gli organi sono stati preservati a 4°C per 24 ore.

Il monossido di carbonio è stato somministrato ad uno dei due animali riceventi alla dose di 3mg/kg per 1 ora nel corso dell'intervento chirurgico attraverso l'impiego di un apposito "Carbon Monoxide Delivery Device" (Covox).

4.7. Analisi immunoistologiche

I campioni bioptici sono stati prelevati 4 e 24 ore dopo la ri-perfusione. Sezioni di 3 mm di spessore sono state fissate in zinco per 36 ore. I tessuti sono stati disidratati, lavati ed inclusi in paraffina.

La valutazione del fenomeno apoptotico è stata effettuata su sezioni fissate in paraformaldeide al 2% per 10 minuti attraverso l'impiego del kit *ApopTag Peroxidase In Situ* (Chemicon International, Cat# S7100).

Per l'immunoistochimica, le sezioni incluse in paraffina sono state fissate in paraformaldeide al 2%; gli antigeni sono stati rivelati attraverso l'impiego di un tampone citrato 10 mM a pH 6 portato ad 85°C per 10 minuti. L'attività delle perossidasi endogene è stata bloccata con perossido di idrogeno all'1% per 10 minuti e con albumina bovina (BSA) al 3% in tampone fosfato salino (PBS) per 30 minuti. Le sezioni di tessuto sono state, poi, incubate con l'anticorpo primario a 4°C "overnight". Gli anticorpi primari usati sono stati i seguenti: anticorpo monoclonale diretto contro la selectina P (Cell Signaling, cat# 9307), anticorpo monoclonale diretto contro il fosfo-istone 3 (Cell Signaling, cat# 9701).

I vetrini sono stati lavati con PBS. Successivamente al contatto con l'anticorpo primario, le sezioni di tessuto sono state incubate con un anticorpo secondario biotinilato (goat anti-rabbit, Vector Labs) per 1 ora a temperatura ambiente. L'intensità del segnale è stata potenziata incubando le sezioni con un complesso *avidin-biotin-horse-radish peroxidase* (Elit

standard, cat# PK-6100, Vector Labs) a temperatura ambiente per 30 minuti. Il segnale immunostochimico è stato rilevato attraverso l'impiego del kit ImmPACT DAB substrate (Vector Labs, cat# SK-4105). Sezioni "random" sono state colorate con ematossilina/eosina per l'analisi morfometrica e la valutazione dell'infiltrato leucocitario, costituito principalmente da neutrofili. Mediante l'utilizzo di un microscopio ottico Zeiss, provvisto di un sistema di acquisizione di immagini, sono stati riprodotti 8-10 campi per ciascuna sezione.

4.8. Sintesi del cRNA e profilo di espressione genica

L'RNA totale è stato estratto con il mini-kit RNeasy (Quiagen, Valenica, CA), secondo le istruzioni della ditta produttrice. La preparazione dell'RNA complementare, l'ibridizzazione su GeneChip® per il saggio del genoma suino (Affymetrix, Santa Clara, CA) e la relativa scansione sono state svolte secondo le indicazioni del protocollo fornito dalla ditta produttrice (<https://.affymetrix.com>). Le immagini sono state analizzate con il programma GeneChip (Affymetrix, versione 5.0). Le immagini Affymetrix scanner sono state pre-processate mediante il software Affymetrix Gene Chip Operating. I geni sono stati valutati sulla base della funzione biologica della proteina codificata, come determinato dalle ricerche bibliografiche, dalle "gene cards" del *Weizmann Institute of Science* (<http://bioinfo.weizmann.ac.il/bioinfo.html>) e dallo schema di classificazione

per funzioni biologiche “*OntoExpress*” pubblicato nel 2003 da Draghici e collaboratori (80).

4.9. Real-time PCR

L’RNA totale è stato estratto da omogenati di tessuto con il mini-kit RNeasy (Quiagen, Valenica, CA). Per la sintesi del cDNA, 2 µg di RNA totale sono stati trascritti con SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, CA) e primers random (Invitrogen, CA).

La real time PCR è stata svolta in duplicato con il Sybr Green PCR Master Mix (BioRad, Hercules, CA) ed i seguenti primers:

MMP7: F-5’ ACAGGCTCAGGGCTATCTCA; R-5’
GCTGGCTTGGGAATAGTGAA

SPP1: F-5’ GAGCAAACAGACGATGTGGA; R-5’
GAAATCGGTGACCAGCTCAT

Hsp47: F-5’ CGTGGGTGTCACTATGATGC; R-5’
GGTCTTCAGCTGCTCTTTGG

Hsp90: F-5’ AGGCGGAAGAAAGGAAGAC; R5’
AGTGATGTCATCGGGGTTTC

Beta-Actin: F-5’ ACTGGCATTGTCATGGACTC; R-5’
GCACAGCTTCTCCTTGATGT.

Le analisi sono state condotte nelle seguenti condizioni sperimentali :
95°C per 15 secondi, 56°C per 40 secondi.

4.10. Analisi statistica

La significatività statistica dei risultati è stata determinata attraverso l'analisi della varianza (ANOVA) con una soglia di significatività pari a $p < 0.05$.

5. RISULTATI

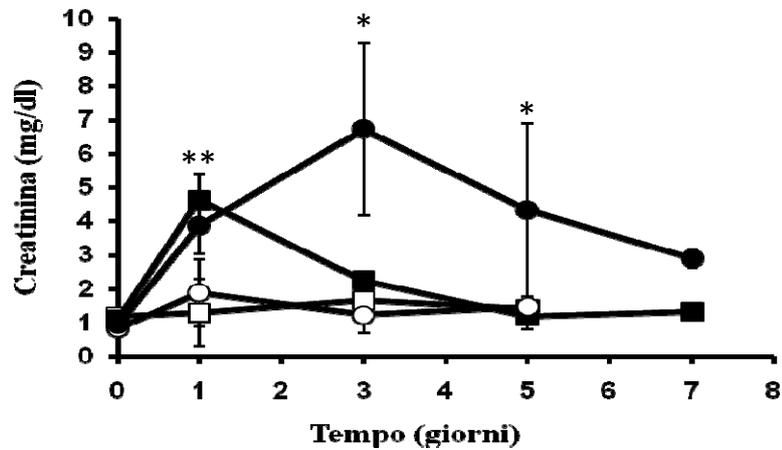
5.1. La durata dell'ischemia calda determina una funzionalità ritardata sia nell'allotrapianto che nell'autotrapianto

I primi esperimenti sono stati programmati al fine di valutare l'ipotesi che il tempo di ischemia calda potesse indurre la funzionalità ritardata indipendentemente dalle differenze di istocompatibilità. Abbiamo, pertanto, messo a confronto un modello di autotrapianto con uno di allotrapianto, in aggiunta o meno ad un tempo di ischemia calda. A questo scopo, prima di procedere al prelievo dei reni, ai donatori del gruppo trattato con ischemia calda, è stata praticata l'interruzione del flusso aortico per 45 minuti in modo da determinare una condizione che fosse identica in entrambi gli organi. Dopo il prelievo i reni sono stati perfusi con soluzione di preservazione UW a 4°C e trapiantati nei riceventi.

I risultati ottenuti hanno mostrato un significativo incremento dei valori di creatinina e BUN in entrambi i modelli quando i reni sono stati sottoposti all'ischemia calda, al contrario di quanto rilevato per i reni che non hanno subito tale insulto. È risultato evidente che il WIT provoca un'alterazione della funzionalità renale sia nell'autotrapianto che nell'allotrapianto, con differenze nei tempi di recupero: nel caso dell'autotrapianto, infatti, il rientro dei valori di creatinina e BUN nei limiti fisiologici è risultato più rapido di quello registrato nell'allotrapianto (3 giorni contro i 7 giorni) (Figura 10).

Il trattamento con il farmaco immunosoppressore tacrolimus ci ha consentito di ricondurre la ridotta funzionalità dell'organo al danno da ischemia-riperfusionem piuttosto che al rigetto acuto.

A



B

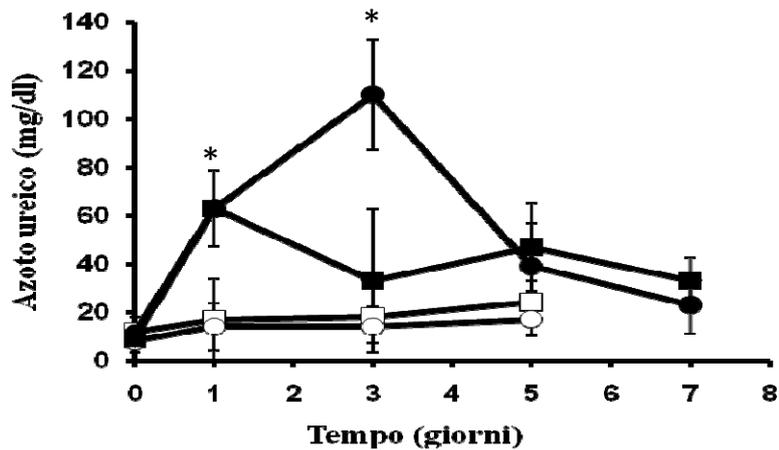


Figura 10. Caratterizzazione della DGF nell'allotripianto e nell'autotripianto di rene. Valori sierici di creatinina (A) e azoto ureico (BUN) (B) in animali riceventi di autotripianto o allotripianto renale \pm 45 minuti di ischemia calda. I dati rappresentano la media \pm SD di 3-4 animali/gruppo. ○ allotripianto senza WIT; ● allotripianto con 45 minuti WIT; □ autotripianto senza WIT; ■ autotripianto con 45 min WIT. * $p < 0.03$ vs allotripianto senza WIT ed autotripianto \pm WIT. ** $p < 0.05$ vs autotripianto senza WIT.

5.2. La funzionalità ritardata nel trapianto di reni sottoposti ad ischemia calda e fredda

Uno degli obiettivi del presente lavoro è stato lo sviluppo di un modello animale di DGF che si avvicinasse il più possibile a quanto si verifica nell'uomo, nel quale i reni vengono sottoposti ad un tempo di ischemia calda, seguito da un tempo di ischemia fredda, necessario al trasferimento dell'organo dalla sede del prelievo dal donatore alla sede del trapianto nel ricevente. A tale scopo abbiamo aggiunto al nostro modello sperimentale un periodo di ischemia fredda.

Abbiamo, inoltre, variato il WIT da 45 fino a 120 minuti, per valutare la severità del danno in funzione del tempo. Dopo l'ischemia calda e la perfusione con la soluzione UW, i reni sono stati mantenuti a 4°C per 24 ore. WIT di 45, 60 o 90 minuti, seguiti da 24 ore di ischemia fredda, hanno prodotto un aumento della creatinina e dell'azoto ureico che hanno raggiunto il picco a 3 giorni dal trapianto, per rientrare nei limiti basali entro 5-7 giorni (Figura 11).

L'aumento di tali parametri non ha subito modifiche quando abbiamo sottoposto i reni, già "danneggiati" da 45 minuti di WIT, all'ulteriore insulto dell'ischemia fredda secondo il protocollo 45 minuti di WIT + 24 ore di CIT.

Mentre 45-90 minuti di WIT hanno indotto il medesimo aumento dei valori di creatinina e azoto ureico, un WIT di 120 minuti si è rivelato causa di un severo danno all'organo, accompagnato da un incremento costante dei

due parametri considerati e da una mortalità del 100% entro il giorno 8 post-trapianto.

Sulla base di questi dati, abbiamo scelto di svolgere tutti gli esperimenti successivi seguendo il protocollo: 60 minuti di WIT + 24 ore di CIT. In tutti i riceventi sono stati monitorati i valori emodinamici ed i parametri fisiologici intra-operatori, risultati costantemente stabili nel corso della durata dell'intervento chirurgico (Tabella 3). A tutti i riceventi è stato somministrato il farmaco immunosoppressore tacrolimus, cominciando il giorno precedente all'intervento con una dose orale e continuando nei giorni successivi fino al termine dell'esperimento, con una somministrazione intravenosa continua attraverso l'impiego di una pompa ad infusione (Tabella 2). La stessa via di infusione è stata impiegata per i prelievi volti alla determinazione di creatinina e BUN.

5.3. La somministrazione intra-operatoria di CO riduce la DGF in “graft” renali compromessi

Nel modello prescelto per la valutazione dell'effetto del CO, 60 minuti di WIT + 24 ore di CIT, il CO è stato somministrato ai riceventi alla dose di 3 mg/kg per 1 ora, nel corso dell'intervento chirurgico, attraverso l'impiego di un nuovo dispositivo che consente un'erogazione costante di una determinata dose di gas nel tempo stabilito.

L'esposizione è stata effettuata attraverso il tracheotubo connesso al ventilatore automatico. L'effettiva somministrazione di CO è stata validata misurando i valori ematici di carbossiemoglobina (COHb) che sono risultati dipendenti dalla concentrazione di ossigeno inspirato (FiO₂).

Il più elevato valore di COHb è stato raggiunto somministrando CO in una condizione di normossia (ossigeno al 20%), mentre è stato rilevato un decremento proporzionale all'aumentare della percentuale di ossigeno inspirata (Figura 12 A).

La somministrazione per via orale di tacrolimus ha prodotto una concentrazione ematica del farmaco di 7 ± 3 ng/ml, contro i 20 ng/ml dell'infusione intravenosa continua. Tale concentrazione è risultata costante per tutta la durata dell'esperimento, sia nel gruppo di controllo che nel gruppo trattato con CO (Figura 12 B).

L'impiego del modello 60 minuti di WIT + 24 ore di CIT ha consentito di osservare una condizione di DGF negli animali del gruppo controllo, i cui valori sierici di creatinina e BUN hanno subito un miglioramento intorno al giorno 6-7 post-trapianto. La somministrazione di CO ai riceventi del gruppo trattato non ha mostrato effetti precoci sul danno da ischemia-riperfusion, come dimostrato dai valori rilevati al giorno 1-2 post-trapianto, mentre già al giorno 3 questi animali hanno iniziato a mostrare segni di miglioramento nella funzionalità renale, rientrando nei limiti della norma entro il giorno 5 post-trapianto (Figura 13 A-B).

Il manifestarsi della DGF era, tuttavia, prevedibile anche in riferimento al fatto che all'organo trapiantato e/o al donatore non è stato somministrato CO. L'allotrapianto non ha interferito sul livello di COHb nel ricevente, in cui è stato raggiunto un picco di $10 \pm 1.3\%$ dopo 1 ora di esposizione al CO (Figura 13 C).

5.4. Il monossido di carbonio migliora la struttura del tessuto renale in seguito al danno da ischemia-riperfusion

La compromissione della funzione renale determinata attraverso i “*markers*” sierici ci ha indotti ad accertare, successivamente, le alterazioni istopatologiche in campioni biotici di tessuto renale prelevati 24 ore dopo la riperfusione.

I reni prelevati dai riceventi trattati e non con CO, al termine degli esperimenti, sono stati fissati e sottoposti ad analisi immunoistochimica mediante l'impiego di marcatori molecolari di apoptosi, proliferazione ed infiammazione (Figura 14).

Per la valutazione dei fenomeni di morte cellulare programmata (apoptosi) abbiamo utilizzato la metodica immunoistochimica del “*Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP Nick End Labeling*” (TUNEL) che rivela la presenza di cellule apoptotiche *in situ* che presentano frammentazione del DNA. Tale saggio impiega l'enzima deossinucleotidil

transferasi terminale (TdT) per trasferire un nucleotide trifosfato (dUTP) marcato con digossigenina all'estremità 3'OH del DNA frammentato.

I nucleotidi marcati vengono fatti reagire con anticorpi antidigossigenina coniugati a fluoresceina. Il segnale emesso dagli anticorpi marcati è rilevabile al microscopio a fluorescenza ed è caratterizzato da un'intensità proporzionale alla concentrazione delle estremità 3'OH di DNA localizzate nei corpi apoptotici.

L'analisi morfologica effettuata attraverso colorazione con ematossilina/eosina ed il saggio TUNEL mostrano che il danno da ischemia/riperfusionem ha indotto un marcato incremento della necrosi tubulare acuta (NTA) rispetto al rene nativo, primariamente localizzata alle cellule epiteliali ed endoteliali dopo 24 ore dal trapianto (Figura 14 A-E). Il trattamento con CO riduce significativamente la positività sia alla NTA che al TUNEL (Figure 14 C-F). Sulla base dell'ipotesi che il CO svolga un ruolo nell'accelerare il recupero della funzionalità renale, recupero comunque ritardato di 2-3 giorni, risulta verosimile un effetto di tale sostanza sulla riparazione del rene compromesso.

La morte cellulare ed il danno tissutale risultante dall'IRI determinano l'induzione di processi di riparazione e proliferazione ma anche l'attivazione di cellule progenitrici (73). Abbiamo, pertanto, valutato, in presenza ed in assenza di CO, i livelli di espressione dell'istone 3 fosforilato (PH3), marcatore della proliferazione cellulare (74). In confronto al tessuto renale

nativo, nei campioni bioptici prelevati a 24 ore dalla riperfusione, è stato rilevato l'aumento dell'espressione di tale proteina (Figura 14 G-H), potenziata negli animali trattati con CO (Figura 14 I). L'IRI induce, inoltre, una risposta infiammatoria acuta ed il CO svolge un ruolo rilevante in tale ambito, per cui abbiamo valutato gli effetti del trattamento con CO sull'espressione di un marcatore di infiammazione dell'endotelio, il fattore tissutale (*tissue factor*, *TF*), nei campioni bioptici prelevati 24 ore dopo la riperfusione (75). Tale fattore, che non è espresso dalle cellule endoteliali in condizioni fisiologiche, viene anche denominato "tromboplastina" poiché, inducendo l'attivazione del fattore VII, svolge un ruolo nella cascata della coagulazione (76). Il danno da ischemia/riperfusione induce un aumento dell'espressione dei fattori tissutali nei vasi di piccolo calibro che risulta, invece, significativamente ridotta negli animali trattati con CO (Figura 14 J-L). Anche il ruolo dei neutrofili in risposta all'IRI risulta ridimensionato dal trattamento con il CO (Figura 14 A-C).

Quale ulteriore marcatore di infiammazione, abbiamo valutato l'espressione della selectina P, una molecola di adesione presente sulla membrana cellulare delle cellule endoteliali, coinvolta nell'aggregazione delle piastrine e nell'adesione dei leucociti (polimorfonucleati, PMN) (77).

In risposta all'IRI abbiamo osservato un'aumentata espressione di tale proteina a livello glomerulare in confronto al rene nativo (Figura 15 A-C),

visibilmente ridotta (>50%, $p < 0.03$) negli animali trattati con CO (Figura 15 D-E).

5.5. L'espressione dei geni della risposta allo stress è aumentata nei campioni bioptici prelevati dai reni trapiantati

Al fine di valutare il profilo di espressione genica nei reni trapiantati, e descrivere gli effetti del CO in rapporto ai riceventi del gruppo controllo, abbiamo analizzato, con tecnologia Affymetrix, le biopsie prelevate 4 ore dopo il trapianto.

Il confronto tra il tessuto nativo ed il tessuto prelevato a 4 ore dalla reperfusion \pm CO ha mostrato marcate differenze nell'espressione dei geni della fase acuta della risposta allo stress. Sono state valutate famiglie di geni ad azione antiossidante, pro-infiammatoria e riparativa (Figura 16). Dopo 4 ore dal trapianto, abbiamo osservato un significativo incremento nelle famiglie di geni nei tessuti del gruppo controllo, comprendenti i geni che codificano per le *heat shock proteins (HSP)* e quelli che codificano per i fattori coinvolti nella proliferazione, nella riparazione e nell'infiammazione. (Figura 16).

L'espressione di molti di questi geni è risultata modulata dal CO; il database completo è disponibile presso "*Gene Expression Omnibus*", una banca dati di genomica funzionale, pubblicata a cura del "*National Center for Biotechnology Information*" (NCBI).

Mediante l'utilizzo dei dati di screening forniti dai microarrays abbiamo selezionato alcuni geni la cui espressione risultava modulata dal CO, sia in modo positivo che negativo, al fine di validare gli stessi risultati mediante le metodiche della RT-PCR e della Western blot (Figure 17 e 18).

In particolare abbiamo confermato che l'IRI attiva le HSP 70 e 90, le interleuchine 1 e 1 β ed il *chemokine ligand 4 (CCL4)*. Il CO blocca selettivamente la trascrizione dei geni implicati nei processi infiammatori e nel determinismo del danno ed incrementa l'espressione dei geni protettivi, quali la HSP 90, l'osteopontina (SSP1) e la *retinol binding protein 4 (RBP-4)*, coinvolte nella riparazione e nel rimodellamento tissutale (Figura 17).

Abbiamo, inoltre, misurato l'espressione della HSP 90 a 24 ore dalla riperfusione, mediante Western blot, osservando un incremento dell'espressione della proteina che risulta sovrapponibile nel gruppo controllo e nel gruppo trattato.

L'analisi dell'espressione della HSP 70, del fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), della caderina E e del p21 hanno mostrato effetti diversi negli animali del gruppo controllo rispetto a quello dei trattati con CO in cui si registra un aumento dell'espressione di p21, VEGF ed HSP 70 ed, al contrario, nessuna interferenza con l'espressione della caderina E, "marker" di riparazione epiteliale (78) (Figura 18). Abbiamo, inoltre valutato l'espressione della cistatina C, proteina impiegata quale marcatore della funzionalità renale, che risulta ridotta nei campioni biotipici prelevati

dagli animali trattati con CO confermando l'effetto protettivo del trattamento. Il grado di fosforilazione della proteina ERK 1/2, preso in considerazione quale marcatore della proliferazione cellulare, non risulta particolarmente modificato nel gruppo trattato verso il gruppo controllo (Figura 18).

E' interessante sottolineare il diverso effetto del CO osservato sia a livello trascrizionale che traslazionale, così come il possibile effetto modulatore del CO sia sul mRNA che sulle proteine. Geni quali p21, VEGF ed HSP hanno tutti un effetto citoprotettivo, per cui i risultati ottenuti spiegano il più rapido recupero della funzionalità dell'organo nel modello di allotrapianto renale (60 minuti di WIT + 24 ore di CIT) impiegato nel corso del nostro studio.

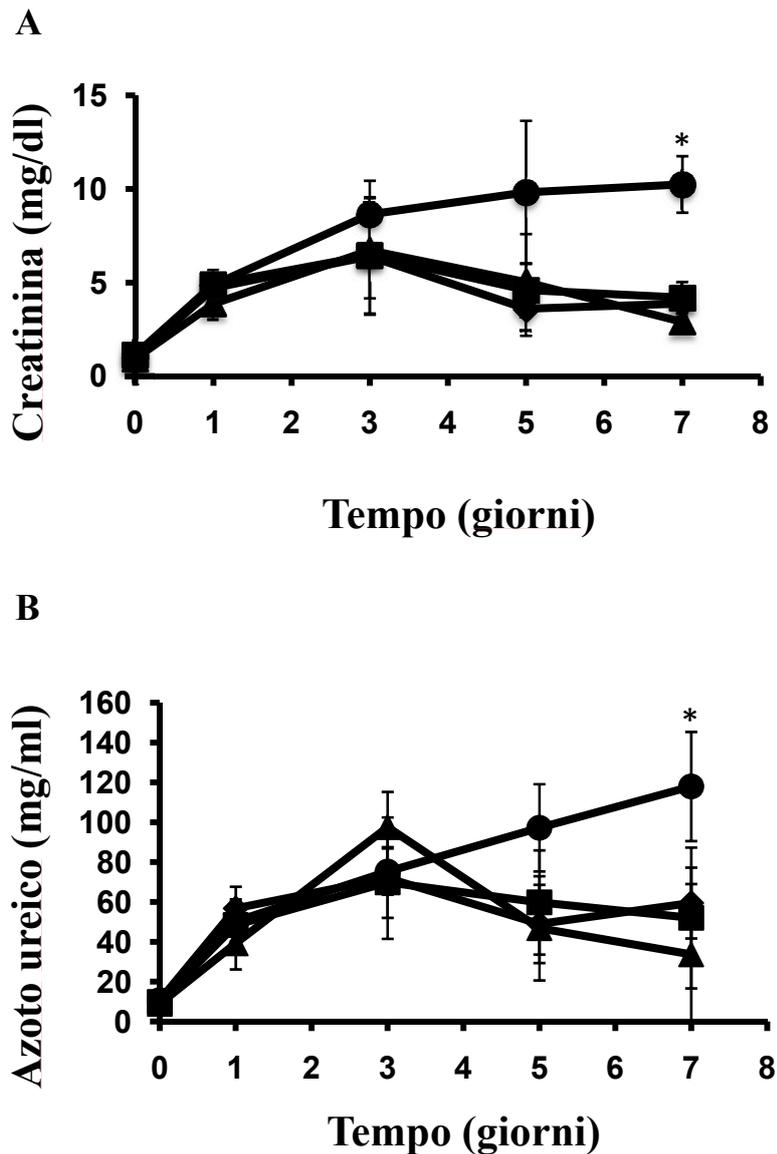
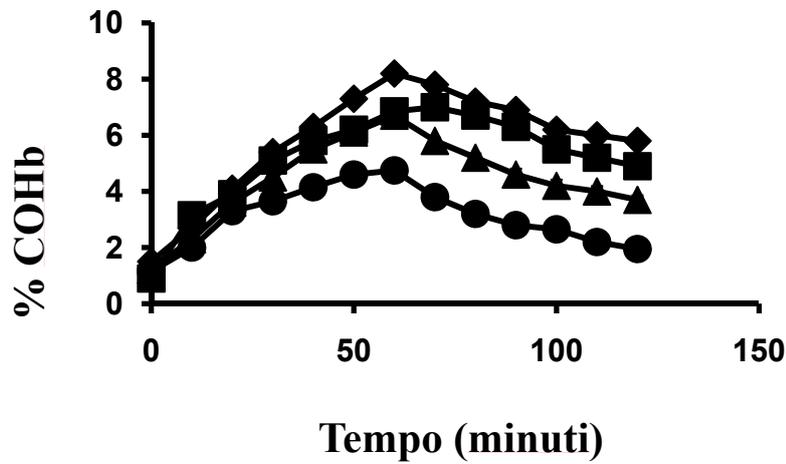


Figura 11. Cinetica della DGF. Valori sierici di creatinina (A) e BUN (B) in animali riceventi di allotrapianto in cui gli organi sono stati sottoposti a diversi tempi di ischemia calda prima del trapianto. ● 120 minuti di WIT; ■ 90 minuti di WIT; ◆ 60 minuti di WIT; ▲ 45 minuti di WIT. I dati riportati sono la media \pm SD di 4 animali per gruppo. * $p < 0.035$ vs 90, 45 e 30 minuti di WIT.

Tabella 3. Parametri fisiologici intraoperatori rilevati negli animali donatori nel corso della procedura chirurgica di prelievo di reni sottoposti a diversi tempi di ischemia calda (45, 60, 90 e 120 minuti).

	Basale	45 minuti	60 minuti	90 minuti	120 minuti
Frequenza respiratoria/ minuto	10.8±1.3	11.0±0.8	11.0±0.8	11.0±0.8	11±0.8
Temperatura (°F)	98.7±1.0	97.7±0.6	96.6±0.5	96.6±0.7	96.6±0.5
Frequenza cardiaca/ minuto	115±30.7	106.3±18.2	141.8±37.1	153±46.4	141.8±37
Pulsossimetri a (SpO2)	99.3±0.5	98.3±1.0	98.8±1.5	99.0±0.8	98.8±1.5
Pressione ematica non invasiva	87±7/35± 8	73±14/28±12	86±6/43±4	83±20/46±25	86±5/43± 4
Volume tidalico (ml)	300	300	300	300	300

A



B

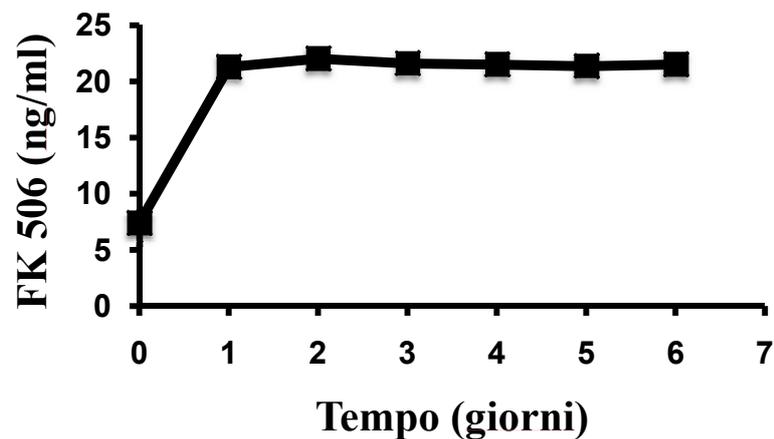
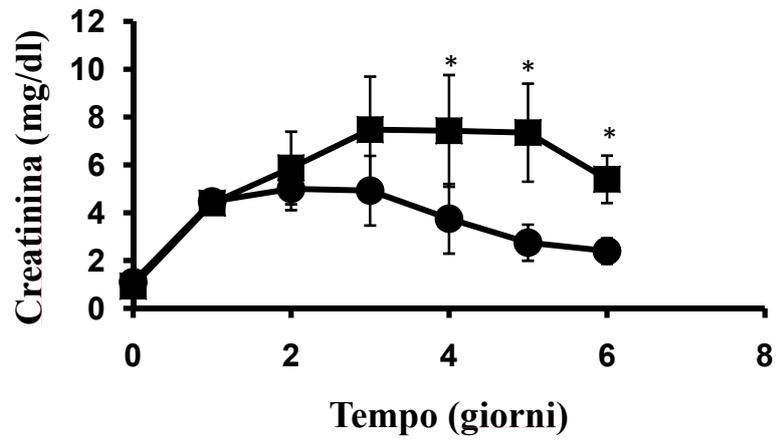
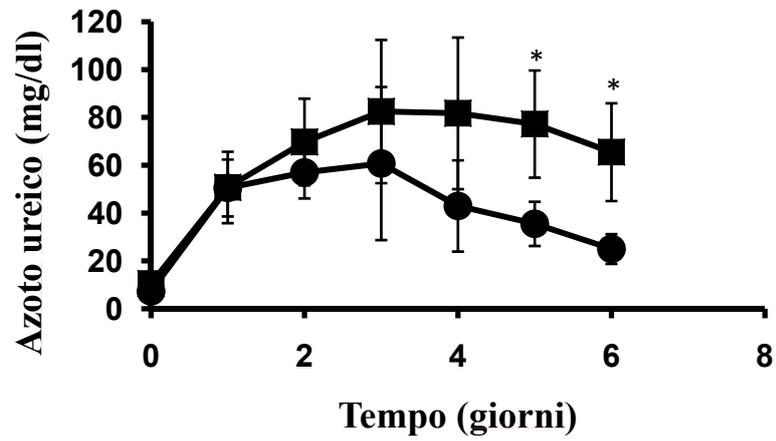


Figura 12 (A) Farmacocinetica del CO in animali esposti a 3 mg/kg CO per 1 ora. I livelli di carbossiemoglobina (COHb) aumentano in dipendenza dei livelli di FiO₂. All'aumentare della FiO₂ la COHb si riduce. ◆ 20% O₂, ■ 40% O₂, ▲ 60% O₂, ●100% O₂.(B) **Farmacocinetica del tacrolimus (FK506)**. Livelli sierici di tacrolimus in animali che hanno ricevuto il farmaco in infusione continua per tutta la durata dell'esperimento.

A



B



C

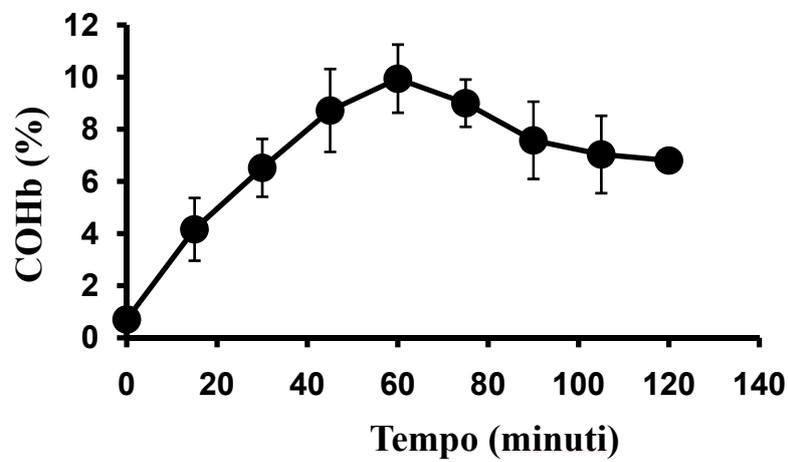


Figura 13. Effetto dell'inalazione di CO sulla DGF (A-B). Negli animali sottoposti a somministrazione intraoperatoria di CO (3 mg/kg per 1 ora), la funzionalità renale migliora ripristinando valori ematochimici vicini alla norma entro il giorno 5, diversamente da quanto accade negli animali non trattati. ■ gruppo controllo; ● gruppo trattato con CO. Dati rappresentativi della media \pm SD di 6 animali/gruppo * $p < 0.05$ vs controllo.

Monitoraggio dei valori di COHb in seguito alla somministrazione di CO (C). Nel modello sperimentale di allotrapianto di reni sottoposti a 60 minuti di WIT + 24 ore di CIT il livello ematico di COHb, negli animali trattati per un'ora con CO alla dose di 3mg/kg in condizioni di normossia (miscela al 20% O₂), raggiunge un valore massimo pari al 10%.

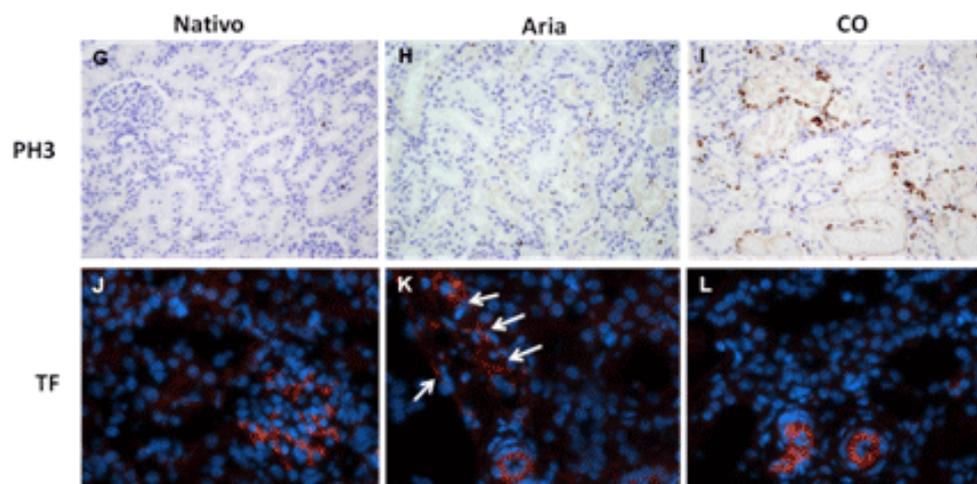
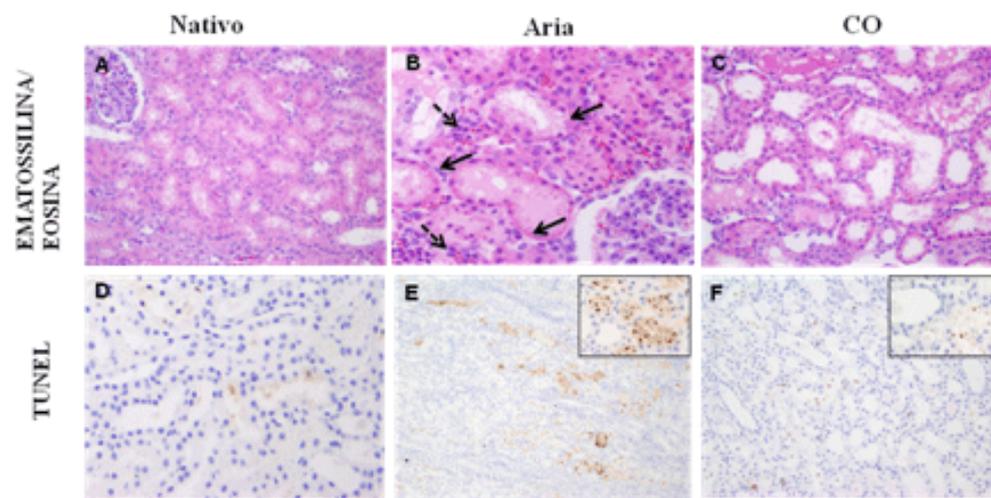


Figura 14. Caratterizzazione immunoistochimica di biopsie renali prelevate a 24 ore dal trapianto (modello 60 min WIT + 24 ore CIT). (A-C) Biopsie renali colorate con ematossilina/eosina per la valutazione dell'architettura tissutale e l'identificazione dei polimorfonucleati (PMN). Le frecce indicano l'area di edema e necrosi dovuta all'infiltrazione dei PMN. (D-F) Valutazione dei fenomeni di morte cellulare mediante colorazione TUNEL. (G-I e J-L) Espressione del fosfo-istone H3 (PH-3) quale "marker" di proliferazione e del fattore tissutale (TF) quale "marker" di infiammazione delle cellule endoteliali in campioni bioptici prelevati 24 ore dopo la riperfusione. Le frecce indicano i plessi capillari positivi per l'attivazione delle cellule endoteliali. Tutte le immagini sono rappresentative di 4-6 campi/rene, di 4 animali/gruppo IRI ± CO e di 2 campioni da tessuto nativo.

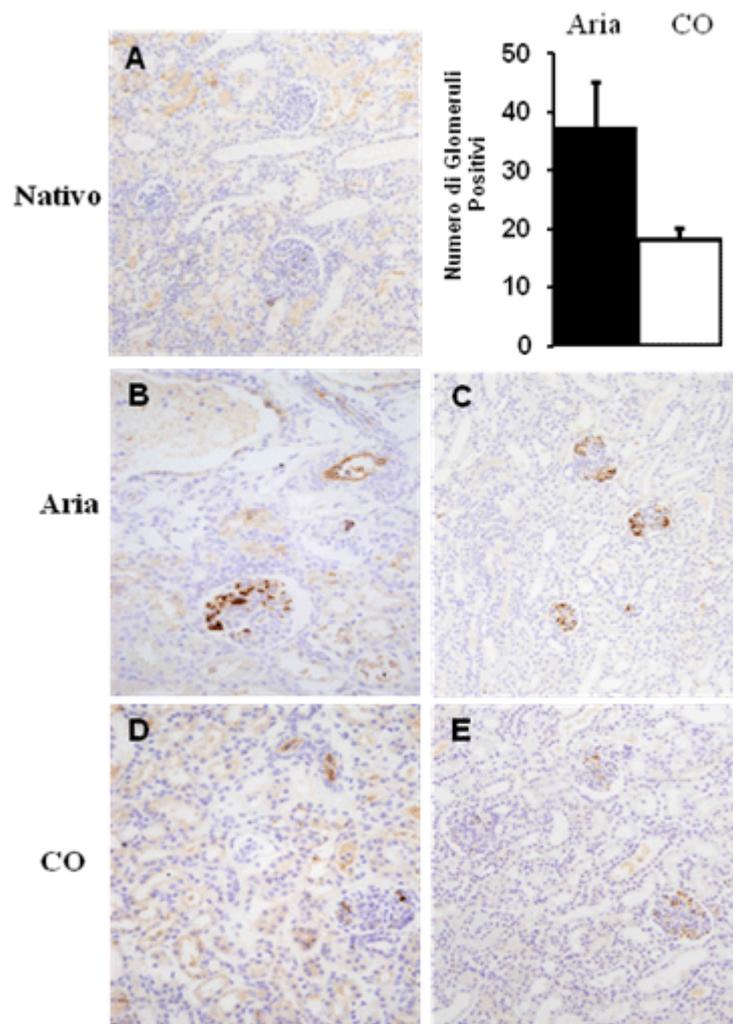


Figura 15. Valutazione dell'espressione della selectina P in biopsie prelevate a 24 ore dal trapianto (modello 60 min WIT + 24 ore CIT). Il CO blocca l'espressione della selectina P localizzata primariamente a livello delle cellule endoteliali del glomerulo. I glomeruli positivi alla colorazione sono stati contati in cieco in 8-10 campi da 4-6 sezioni per ciascuna biopsia. I dati rappresentano una media \pm SD di n=4 animali/gruppo IRI \pm CO; n=2 campioni da tessuto nativo. $p < 0.02$ gruppo controllo verso nativo.

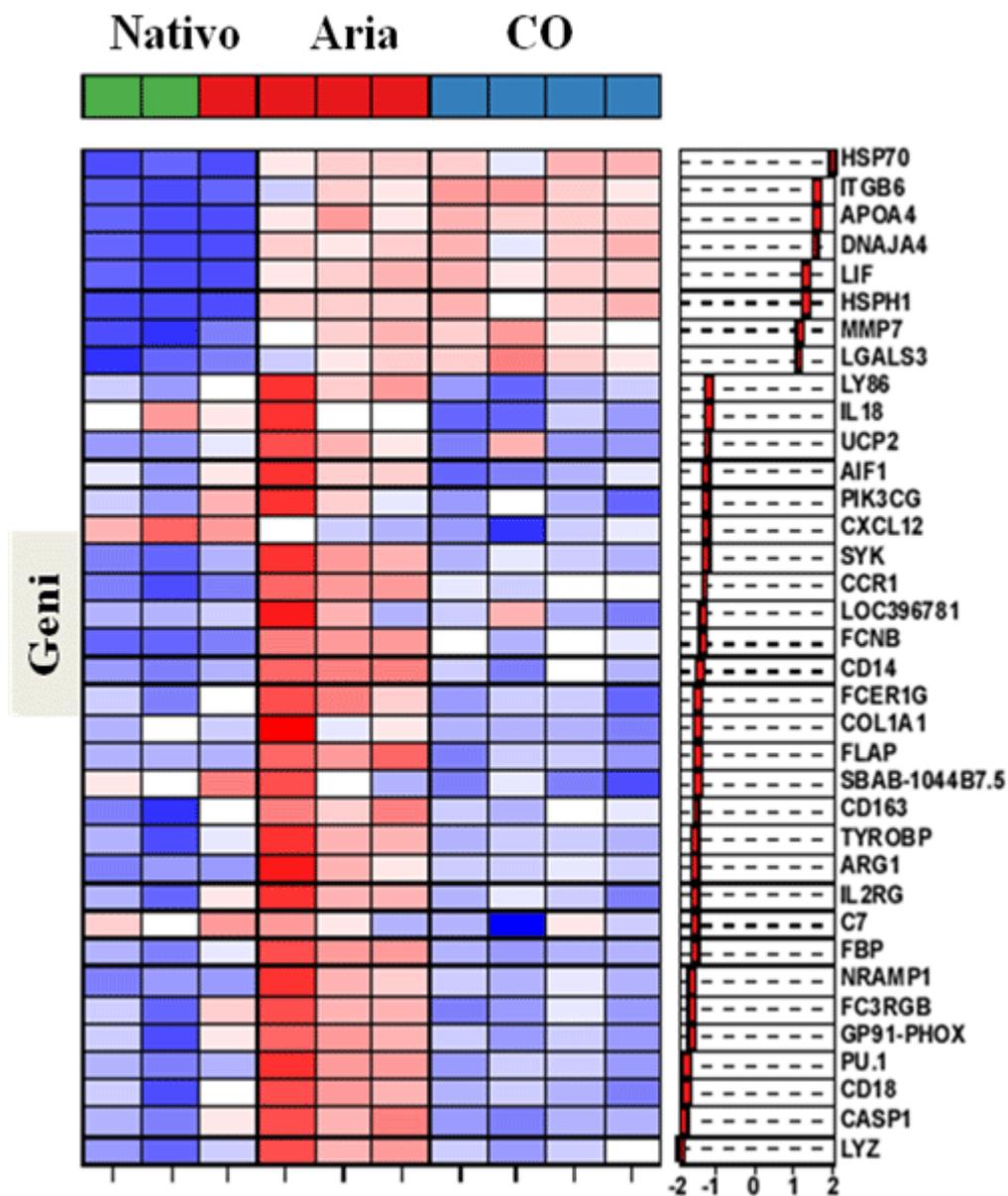


Figura 16. Profilo di espressione genica in campioni biopsici renali prelevati 4 ore dopo la riperfusione. Profilo rappresentativo dei geni che hanno subito maggiori variazioni in rapporto al tessuto nativo a 4 ore dalla riperfusione e dopo 60 minuti di WIT + 24 ore di CIT ± CO; n=4 animali/gruppo IRI ± CO; n=2 campioni di tessuto nativo.

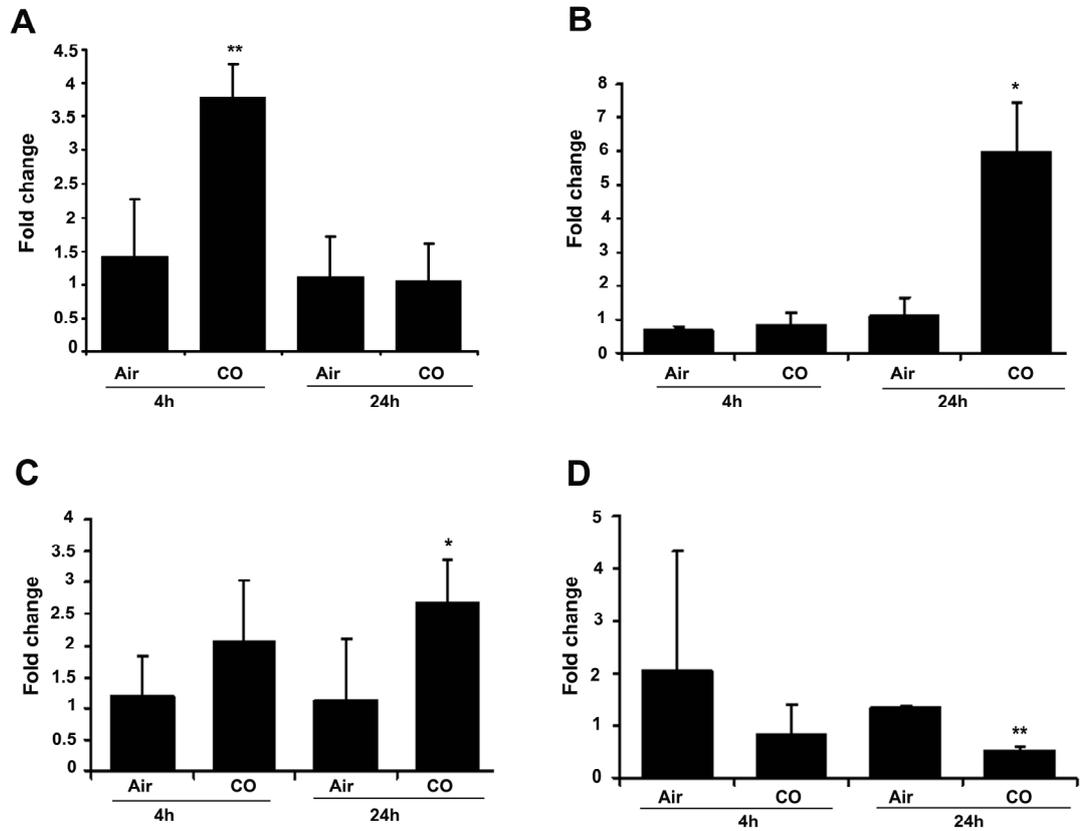
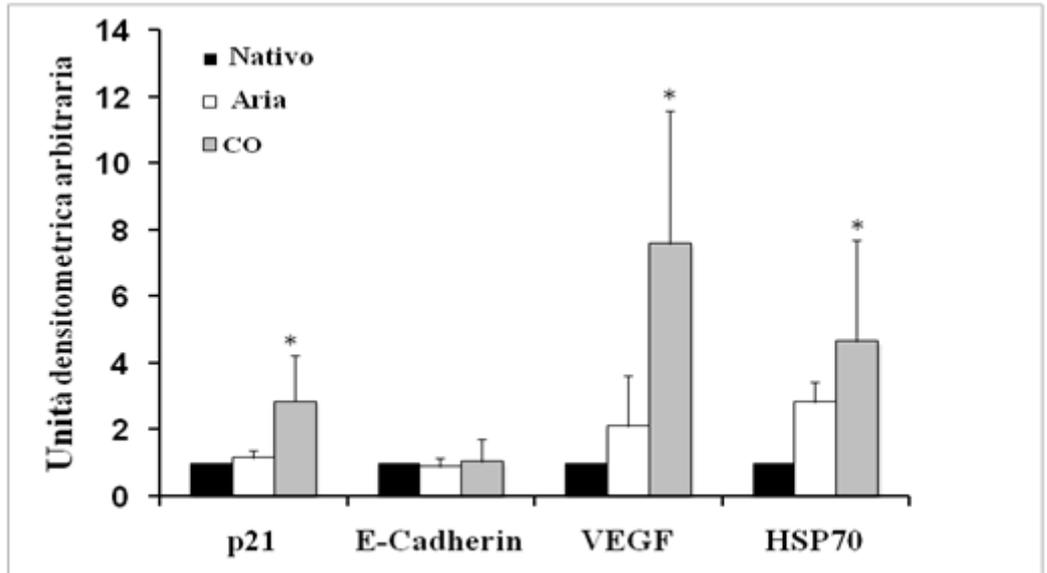


Figura 17. RT-PCR di conferma di geni selezionati dagli arrays delle biopsie renali (A-D) Espressione di HSP90 (A), RB4 (B), osteopontina (C) ed MCP-1 (D) in biopsie prelevate a 4 e a 24 ore \pm CO. I risultati corrispondono ad una media \pm SD di n=4 animali/gruppo IRI \pm CO; n=2 campioni da tessuto nativo, *p<0.001 vs , *p<0.01 vs controllo; **p<0.05 vs controllo.

A



B

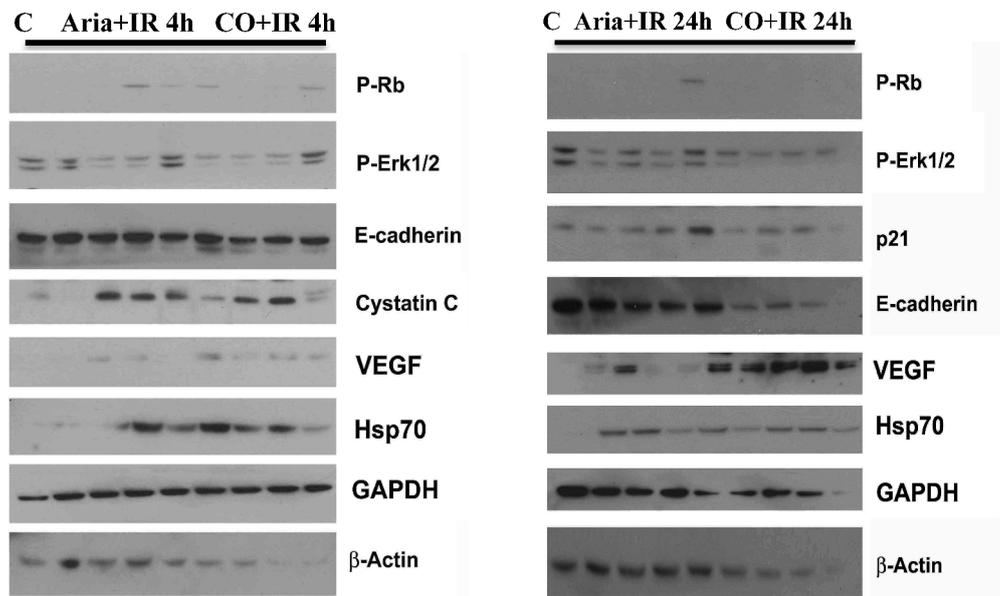


Figura 18. Il CO modula l'espressione proteica in biopsie renali prelevate 24 ore dopo la ri-perfusione. Quantificazione densitometrica (A) dei Western blot (B) effettuati per la valutazione dell'espressione delle proteine p21, E-caderina, VEGF ed HSP 70, normalizzate rispetto alla proteina GAPDH. Il pannello inferiore mostra anche l'espressione della Cistatina C, proteina impiegata come marcatore della funzionalità renale, il grado di fosforilazione di ERK 1/2, preso in considerazione quale marcatore della proliferazione cellulare e l'espressione della proteina β -actina quale ulteriore controllo positivo oltre alla proteina GAPDH. I risultati rappresentano una media \pm SD di n=4 animali/gruppo IRI \pm CO; n=2 campioni da tessuto nativo, *p<0.05 vs controllo.

6. DISCUSSIONE

Il successo del trapianto di rene, da un punto di vista clinico, è strettamente vincolato alla capacità dell'organo di sopravvivere ad un tempo prolungato di ischemia fredda in soluzione di preservazione, nonostante le condizioni del rene all'atto del prelievo dal donatore interferiscano significativamente con il risultato finale. Sfortunatamente, la DGF, intesa come necessità di ricorso all'emodialisi nella prima settimana dopo il trapianto di rene, resta una problematica clinicamente rilevante che si verifica nel 25-50% dei trapianti di rene da donatore cadavere (18).

L'incidenza di tale condizione è largamente dipendente dalla tipologia del donatore. La capacità di un rapido ripristino funzionale del rene trapiantato è diversa a seconda che il donatore rientri nei criteri di selezione "standard", in quelli "allargati", o che sia un donatore a cuore non battente (79). La DGF si manifesta, infatti, in più del 50% dei reni prelevati da donatori appartenenti a questa ultima categoria, risorsa preziosa per contrastare la scarsa disponibilità degli organi per trapianto. L'elevata incidenza della DGF nei reni provenienti da donatori a cuore non battente resta alla base della resistenza, comune ai clinici, ai chirurghi ed agli stessi pazienti, verso l'impiego di tali organi.

La straordinaria similitudine tra l'architettura del tessuto suino e quella del tessuto umano ha motivato l'impiego di un modello sperimentale

che potesse rappresentare uno strumento utile a valutare la limitazione/prevenzione della DGF, con conseguente potenziale possibilità di ampliamento del “pool dei donatori”.

La più comune causa di DGF è il danno da ischemia/riperfusion (IRI) che conduce alla necrosi tubulare acuta (NTA) post-trapianto. Si ipotizza che gli effetti a lungo termine del danno tissutale indotto dall'ischemia, e dalla successiva riperfusione, e lo sviluppo della DGF siano alla base di una maggiore incidenza di forme di rigetto cronico e del declino della funzionalità renale (18).

Malgrado i progressi realizzati nelle terapie post-trapianto l'incidenza della ripresa funzionale ritardata è rimasta invariata, comportando la necessità di nuove opzioni terapeutiche.

In questo lavoro abbiamo messo a punto un modello sperimentale di DGF nell'allograpianto di rene in animali di grossa taglia e l'utilizzo di tale modello ha consentito di evidenziare il potenziale terapeutico del CO. La somministrazione di CO per via inalatoria, a basso dosaggio, agli animali riceventi svolge un potente effetto benefico nel miglioramento della funzionalità di un rene severamente compromesso.

Inizialmente, abbiamo confrontato il modello di autotrapianto con quello di allograpianto, in assenza ed in presenza di 45 minuti di ischemia calda, al fine di valutare gli effetti dell'arresto del flusso ematico sull'induzione della DGF, indipendentemente dalle problematiche correlate

alle differenze di istocompatibilità. Tali esperimenti hanno consentito di rilevare, a parità di WIT, una differente cinetica relativamente all'instaurarsi e al perdurare della DGF valutata attraverso i valori sierici di creatinina e BUN, parametri di funzionalità renale misurabili con una metodica non invasiva.

Sia nell'autotrapianto che nell'allograpianto di reni sottoposti a 45 minuti di WIT è stato registrato un rientro di creatinina e BUN nei limiti della norma entro 3 giorni dall'intervento nel caso dell'autotrapianto verso i 7 giorni registrati nei riceventi di allograpianto. Il trapianto degli organi prelevati secondo la normale procedura non ha, invece, mostrato particolari alterazioni dell'andamento dei due parametri ematochimici considerati.

Successivamente abbiamo effettuato una valutazione della sensibilità a diversi tempi di ischemia calda dei reni destinati al trapianto. I dati ottenuti sottoponendo i reni dei donatori a diversi WIT, di durata variabile tra 30 e 120 minuti, hanno reso possibile la scelta di un modello che potesse indurre una compromissione della funzione d'organo sufficientemente severa da consentire la valutazione dell'efficacia del trattamento con CO restando, tuttavia, nei limiti della reversibilità. Tale caratteristica è stata rilevata nel caso dei modelli di ischemia calda di durata compresa tra 30 e 90 minuti, contrariamente a quanto mostrato dal modello in cui l'interruzione della perfusione renale è stata prolungata fino a 120 minuti.

In base alla valutazione della severità del danno d'organo in funzione del tempo è stato scelto il modello caratterizzato da 60 minuti di WIT + 24 ore di CIT, in cui i valori sierici di creatinina e BUN sono rientrati entro limiti prossimi alla norma intorno al giorno 6-7 post-trapianto. Il CO somministrato ai riceventi del gruppo trattato ha determinato un miglioramento della funzione renale dopo 3 giorni dal trapianto con un miglioramento evidente dei valori di creatinina e BUN entro 5 giorni dal trapianto.

Il mancato effetto del trattamento con CO nell'immediato post-trapianto è probabilmente riconducibile al fatto che sia il donatore che il "*graft*" non sono stati trattati con CO.

Relativamente alla modalità di impiego del CO, infatti, resta ancora da stabilire se sia preferibile trattare il donatore, il "*graft*" o il ricevente.

I risultati del presente studio suggeriscono che il trattamento del donatore migliorerebbe la precoce carenza funzionale dipendente dall'IRI a seguito dei tempi di ischemia calda e fredda.

Non abbiamo effettuato il trattamento del donatore poiché ha prevalso la volontà di mettere a punto un modello che simulasse la condizione più rilevante da un punto di vista clinico. La gestione del donatore ed il trattamento esposto sono ostacolati da problematiche logistiche, quali il disegno di uno studio applicabile a tutte le istituzioni, l'addestramento del personale dedicato e la destinazione degli organi.

Allo stesso modo, non è stato effettuato il trattamento del “*graft*”, poiché saturare le soluzioni di preservazione, mantenendo un adeguato livello di CO, risulta una procedura poco maneggevole per la volatilità del gas in soluzione.

Il presente studio ha permesso di rilevare che una sola ora di esposizione al CO risulta sufficiente a proteggere il ricevente anche nei giorni successivi all'intervento, attivando, probabilmente, processi di espressione genica e specifiche molecole capaci di indurre un effetto di lunga durata a livello tissutale. Tale effetto potrebbe essere riconducibile all'attivazione di cellule progenitrici presenti nel tessuto stesso.

Nel caso di un organo ischemico il trattamento dei riceventi consente una maggiore efficacia dei processi di riparazione tissutale, mentre quello del donatore potrebbe prevenire il danno ischemico, annullando la necessità del processo di riparazione stesso.

La ripresa funzionale post-trapianto è, inoltre, correlata alla NTA caratterizzata dalla morte delle cellule dell'epitelio prossimale. Attualmente non è stato ancora chiarito il meccanismo molecolare che induce la morte delle cellule epiteliali in seguito al trapianto. Resta ancora da stabilire se si tratti di un diretto effetto dell'IRI sulle cellule epiteliali oppure sia dovuto ad un effetto indiretto, riconducibile alla distruzione dell'endotelio a seguito dell'alterata perfusione del tessuto. Questa eventualità rivelerebbe un ulteriore meccanismo che andrebbe a sommarsi all'IRI nel protrarsi del

periodo di DGF osservato. I danni a carico dell'endotelio che si verificano nel corso del processo infiammatorio che caratterizza la DGF rivestono, infatti, un ruolo determinante nel definire l'evoluzione della disfunzione dell'organo. L'induzione della trombosi e l'attivazione dei leucociti, riconducibile alle differenze del complesso maggiore di istocompatibilità tra donatore e riceventi, è probabilmente una componente ulteriore dell'aumento della cinetica della DGF.

I dati ottenuti dallo studio del profilo genico, valutati in una fase precoce a 4 ore dalla ri-perfusione, insieme a quelli relativi all'espressione proteica valutata a 24 ore post-trapianto, mostrano una modulazione dell'espressione genica, dall'infiammazione al danno tissutale fino alla morte cellulare, poi orientata verso la rigenerazione e la riparazione, responsabili del recupero della funzionalità renale.

Il susseguirsi di tali eventi si svolge con un'intensità che è funzione del WIT, fino ad un punto in cui il protrarsi della condizione ischemica rende impraticabile il recupero da parte del rene stesso determinando, in ultima analisi, l'instaurarsi di uno scompenso renale acuto irreversibile.

Nel nostro modello caratterizzato da 120 minuti di ischemia calda seguiti da 24 ore di ischemia fredda, la funzione post-trapianto dell'organo risulta talmente compromessa da indurre l'incremento progressivo dei livelli sierici di creatinina e BUN ed un tasso di mortalità del 100% entro 8 giorni dal trapianto. Diversamente da quanto accade nell'uomo, in cui la perfusione

del tessuto si riduce gradualmente e non è mai completamente sospesa, nel nostro modello si è proceduto al “*clamp*” del peduncolo renale in toto, determinando un’ischemia totale ed un insulto di portata molto superiore.

Tale caratteristica ci induce a considerare il modello impiegato nel presente studio come un valido strumento per la valutazione dell’efficacia di possibili strategie terapeutiche volte a ridurre il tempo necessario al ripristino della funzionalità renale dopo il trapianto. La somministrazione di CO, inoltre, ai soli riceventi, è in grado di ridurre la DGF e ripristinare più rapidamente la normale funzionalità dei reni, anche quando severamente compromessi.

Ulteriori studi sono in corso per l’applicazione terapeutica del CO nel trapianto di rene nell’uomo.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Öllinger R, Wang H, Yamashita K, Wegiel B, Thomas M, Margreiter R, Bach FH. Therapeutic Applications of Bilirubin and Biliverdin in Transplantation. *Antioxidant & Redox Signaling* 2007, 9:2175-85.
2. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanism and clinical applications. *FASEB. J.* 1988, 2:2557-68.
3. Otterbein LE, Mantell LL, Choi AM. Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol* 1999, 276:688-94.
4. Sato K, Balla J, Otterbein LE, Smith RN, Brouard S, Lin Y. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol* 2001, 166:4185-94.
5. Ryter SW, Otterbein LE. Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* 2004, 26:270-80.
6. Kohmoto J, Nakao A, Sugimoto R, Wang Y, Zhan J, Ueda H, et al. Carbon monoxide-saturated preservation solution protects lung grafts from ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008, 136:1067-75.
7. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 2000, 6:422-28.
8. Matsumoto H, Ishikawa K, Itabe H, Maruyama Y. Carbon monoxide and bilirubin from heme oxygenase-1 suppresses reactive oxygen species generation and plasminogen activator inhibitor-1 induction. *Mol Cell Biochem* 2006, 291:21-8.
9. Lee SS, Gao W, Mazzola S, Thomas MN, Csizmadia E, Otterbein LE, et al. Heme oxygenase-1, carbon monoxide, and bilirubin induce tolerance in recipients toward islet allografts by modulating T regulatory cells. *FASEB J* 2007, 21:3450-7.

10. Chung SW, Hall SR, Perrella MA. Role of heme oxygenase-1 in microbial host defence. *Cell Microbiol* 2009, 11:199-207.
11. Desmard M, Davidge KS, Bouvet O, Morin D, Roux D, Foresti R, et al. A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) exerts bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* and improves survival in an animal model of bacteraemia. *FASEB J* 2009, 23:1023-31.
12. Chin BY, Jiang G, Wegiel B, Wang HJ, Macdonald T, Zhang XC, et al. Hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, 104:5109-14.
13. Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, Liu F, Song R, Usheva A, et al. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med* 2003, 9:183-90.
14. Sarady JK, Zuckerbraun BS, Bilban M, Wagner O, Usheva A, Liu F, et al. Carbon monoxide protection against endotoxic shock involves reciprocal effects on iNOS in the lung and liver. *FASEB J* 2004, 18:854-6.
15. Zuckerbraun BS, Chin BY, Wegiel B, Billiar TR, Czimadia E, Rao J, et al. Carbon monoxide reverses established pulmonary hypertension. *J Exp Med* 2006, 203:2109-19.
16. Otterbein LE. The Evolution of Carbon Monoxide Into Medicine. *Respiratory Care* 2009, 54:925-32.
17. Boros P, Bromberg JS. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant* 2006, 6:652-8.
18. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, et al. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004, 364:1814-27
19. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 2003, 24:449-55.
20. Baan C, Peeters A, Lemos F et al. Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts. *Am J Transplant* 2004, 4:811-8.

21. Kobayashi T, Sato Y, Yamamoto S et al. Augmentation of heme oxygenase-1 expression in the graft immediately after implantation in adult living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2005, 79:977-80.
22. Öllinger R, Kogler P, Biebl M, Sieb M, Sucher R, Troppmair J, Mark W, Weiss H, Margreiter R. Protein levels of heme oxygenase-1 during reperfusion in human kidney transplants with delayed graft function. *Clin Transplant* 2008, 22:418–23.
23. Ojo AO, Wolfe RA, Held P, Port FK, Schmouder RL. Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997, 63:968–74.
24. The Organ Procurement and Transplantation Network <http://www.OPTN.org>
25. Senel FM, Karakayali H, Moray G, Haberal M. Delayed graft function: predictive factors and impact on outcome in living related kidney transplantations. *Ren Fail* 1998, 20:589–95.
26. Halloran PF, Hunsicker LG. Delayed graft function: state of the art. *Am J Transplant* 2001, 1:115–20.
27. Edelstein CL, Ling H, Schrier RW. The nature of cell injury. *Kidney Int* 1997; 51:1341–51.
28. Haugen E, Nath KA. The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury. *Blood Purif* 1999, 17:58–65.
29. Shoskes DA, Xie Y, Gonzales-Cadavid NF. Nitric oxide synthase activity in renal ischemia-reperfusion injury in the rat: implications for renal transplantation. *Transplantation* 1997, 63:495–500.
30. Ling H, Edelstein C, Gengaro P, et al. Attenuation of renal ischemia reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol* 1999, 277:383–90.
31. Emami A, Schwartz JH, Borkan SC. Transient ischemia or heat stress induces a cytoprotectant protein in the rat kidney. *Am J Physiol* 1991, 260:479–85.

32. Bonventre JV, Sukhatme VP, Bamberger M, Ouellette M. Localization of the protein product of the immediate early growth response gene, Egr-1, in the kidney after ischemia and reperfusion. *Cell Regulation* 1991, 2:251–60.
33. Lemos FBC, Ijzermans JNM, Zondervan PE, et al. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14:3278–87.
34. Castaneda PM, Swiatecka-Urban A, Mitsnefers MM, et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human, renal allografts after ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2003, 76:50–54.
35. DeVries ME, Hosiawa KA, Cameron CM, et al. The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury. *Sem Immunol* 2003, 15:33–48.
36. Miura M, Fu X, Zhang QW, Remick DG, Fairchild RL. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal/ischemia reperfusion injury. *Am J Pathol* 2001, 159:2137–45.
37. De Perrot M, Sekine Y, Fischer S, et al. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 165:211–15.
38. Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 1993, 365:654–57.
39. Arumugam TV, 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. *J Surg Res* 2002, 103:260–67.
40. Pratt JR, Basheer SA, Sacks SH. Local synthesis of complement component C3 regulates acute renal transplant rejection. *Nat Med* 2002, 8:582–87.
41. De Vries B, Kohl J, Leclercq WKG, et al. Complement factor C5a mediates renal ischemia-reperfusion injury independent from neutrophils. *J Immunol* 2003, 170:3883–89.

42. Osborn L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell* 1990, 62:3–6.
43. Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H. Intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Leuk Biol* 1995, 57:368–74.
44. Kelly KJ, Williams WJr, Colvin RB, Bonventre JV. Antibody to intracellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:812–16.
45. Haug CE, Colvin RB, Delmonico FL, et al. A phase I trial of immunosuppression with anti-ICAM-1 (CD54) mAb in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993, 55:766–72.
46. Salmela K, Wramner L, Ekberg H, et al. A randomized multicenter trial of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody (enlimomab) for the prevention of acute rejection and delayed onset of graft function in cadaveric renal transplantation. *Transplantation* 1999, 67:729–36.
47. Bonventre JV, Colvin RB. Adhesion molecules in renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996, 5:254–61.
48. Alejandro V, Scandling JD, Sibley RK, et al. Mechanisms of filtration failure during postischemic injury of the human kidney. A study of the reperfused renal allograft. *J Clin Invest* 1995, 95:820–31.
49. Angelescu M, Kraus T, Wiesel M, Hergesell O, Haberkon U, Klar E. Assessment of renal graft function by perioperative monitoring of cortical microcirculation in kidney transplantation. *Transplantation* 2003, 75:1190–96.
50. Tanner GA, Sloan KL, Sophasan S. Effects of renal artery occlusion on kidney function in the rat. *Kidney Int* 1973, 4:377–89.
51. Finn WF, Hak LJ, Grossman SH. Protective effect of prostacyclin on postischemic acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 1987, 32:479–87.
52. Wilhelm SM, Simonson MS, Robinson AV, Stowe NT, Schulak JA. Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion. *Kidney Int* 1999, 55:1011–18.

53. Schilling M, Holzinger F, Friess H, Seiler C, Bucher MW. Pathogenesis of delayed kidney graft function: role of endothelin-1, thromboxane B2, and leukotriene B4. *Transplant Proc* 1996; 28:304-05.
54. Brezis M, Heyman SN, Dinour D, Epstein FH, Rosen S. Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidneys. *J Clin Invest* 1991, 88:390–95.
55. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore L, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* 2003, 63:1714–24.
56. Stegall M, Park WD, Kim DY, Covarrubias M, Khair A, Kremers WK. Changes in intragraft gene expression secondary to ischemia reperfusion after cardiac transplantation. *Transplantation* 2002, 74:924–30.
57. Davies SJ, Reichardt-Pascal SY, Vaughan D, Russell GI. Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995, 3:348–54.
58. Lu CY, Penfield JG, Kielar ML, Vazquez MA, Jeyarajah DR. Hypothesis: is renal allograft rejection initiated by the response to injury sustained during the transplant process? *Kidney Int* 1999, 55:2157–168
59. Shoskes DA, Halloran PF. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol* 1996, 155:1831–40.
60. Sayegh MH. Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int* 1999, 65:1967–79.
61. Benson EM, Colvin RB, Russell PS. Induction of IA antigens in murine renal transplants. *J Immunol* 1985, 135:7–9.
62. Takeda M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997, 99:2682–90.
63. Chandraker A, Takada M, Nadeau KC, Peach R, Tilney NL, Sayegh MH. CD28-b7 blockade in organ dysfunction secondary to cold ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 1997, 52:1678–84.

64. Howard RJ, Pfaff WW, Brunson ME, et al. Delayed graft function is associated with an increased incidence of occult rejection and results in poorer graft survival. *Transplant Proc* 1993, 25:884.
65. McLaren AJ, Jassem W, Gray DW, Fuggle SV, Welsh KI, Morris PJ. Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation. *Clin Transplant* 1999, 13:266–72.
66. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med* 1996, 334:1448–60.
67. Nigam S, Lieberthal W. Acute renal failure III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol* 2000, 279:3–11.
68. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14:3138–46.
69. Lin F, Cordes K, Li L, et al. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14:1188–99.
70. Stanley E, Berg K, Einstein D, et al. Biology and action of colony stimulating factor-1. *Mol Reprod Dev* 1997, 46:4–10.
71. Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NT. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 1997, 64:190–97.
72. Brenner BM, Cohen RA, Milford EL. In renal transplantation, one size may not fit all. *J Am Soc Nephrol* 1992, 3:162–69.
73. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Stem Cell* 2008, 2:284-91.
74. Hans F and Dimitrov S. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene* 2001, 20:3021-27.
75. Bilban M, Bach FH, Otterbein SL, et al. Carbon monoxide orchestrates a protective response through PPARgamma. *Immunity* 2006, 24:601-610.

76. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature medicine* 2000, 6:422-428.
77. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008 19:333–45.
78. White LR, Blanchette JB, Ren L, Awn A, Trpkov K, Muruve DA. The characterization of alpha5-integrin expression on tubular epithelium during renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, 292:567-76.
79. Jushinskis J, Trushkov S, Bicans J, et al. Risk factors for the development of delayed graft function in deceased donor renal transplants. *Transplant Proc* 2009, 41:746-748.
80. Draghici S, Khatri P, Martins RP, Ostermeier GC, Krawetz SA. Global functional profiling of gene expression. *Genomics* 2003, 81:98-104.

8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la prof. N. Staiano per avermi trasmesso entusiasmo e passione nel portare avanti l'attività di ricerca e avermi dato l'opportunità di collaborare con strutture altamente qualificate nel settore della ricerca quali il "Centro di Biotecnologie" dell' A.O.R.N. "A. Cardarelli" di Napoli ed il prestigioso "Harvard Medical School Transplant Center" di Boston (USA).

Ringrazio il Dr. F. Calise, direttore scientifico del "Centro di Biotecnologie", il Dr. S. Cozzolino, il Dr. A. Mancini, la Dr.ssa A. Bracco per la loro disponibilità, le risorse e le competenze che hanno messo a mia disposizione e che hanno consentito la realizzazione del progetto di tesi.

Ringrazio il prof. L. Otterbein per avermi ospitato nei suoi laboratori presso l' "Harvard Medical School Transplant Center" e per avermi addestrata all'impiego delle più avanzate tecnologie impiegate nella medicina dei trapianti.

Ringrazio il prof. G. Paino e il prof. V. Esposito per la loro disponibilità ed i loro suggerimenti utili allo svolgimento delle attività didattiche e di ricerca durante il triennio del corso di dottorato.

Desidero, infine, porgere un ringraziamento a tutti i colleghi di lavoro con i quali ho interagito durante il periodo di svolgimento della tesi e con cui ho condiviso ansie, dubbi e soddisfazioni per i risultati della ricerca.

9. Elenco delle pubblicazioni

DW Hanto, T Maki, E Csizmadia, MH Yoon, B Konduru, RN Smith, M Thomas, **C Attanasio**, B Wegiel, LE Otterbein. Carbon Monoxide Reduces Delayed Graft Function of Kidney Allografts in Swine. *American Journal of Transplantation*, submitted 2009.

C. Attanasio. Islet transplantation: experimental models and pre-clinical setting. Presented at “The donor’s surgeon. A master course in organ procurement and experimental procedures”, 14-16 October 2009, Napoli.

DW Hanto, T Maki, M Thomas, B Wegiel, **C Attanasio**, D Gallo, E Csizmadia, F Rocuts, A Berssenbrugge, M Cooreman, C Sazbo, LE Otterbein. Carbon Monoxide Reduces Delayed Graft Function of a Kidney Allograft in Swine by Reducing Cell Death and Enhancing Repair. *Acta of “American Transplant Congress 2009”*, 30 May-3 June 2009, Boston, MA, USA, p. 448.

C Attanasio, E Alimenti, B Andria, S Castaldo, M Corona, D Di Napoli, S Scala, A Tammaro, R Della Morte, F Calise. Effetto della biliverdina sulle cellule β -pancreatiche in vitro ed in vivo. *Atti delle “Giornate Scientifiche Interpolo”*, Polo delle Scienze e delle Tecnologie per la Vita, 10-12 Dicembre 2008, Napoli, abstract n. 275.

C Attanasio, H Wang, B Wegiel, E Alimenti, B Andria, S Castaldo, S Scala, A Tammaro, R Della Morte, F Calise. Biliverdin protects pancreatic β -cells from transplant-induced cell death. *Atti del “LXII ° Convegno Nazionale Società Italiana delle Scienze Veterinarie (SISVet)”*, 24-27 Settembre 2008, San Benedetto del Tronto, p. 46.

Attanasio C, Castaldo S, Di Napoli D, Andria B, Alimenti E, Corona M, Pantaleo A, Corsi L, De Martinis C, Calise F. Realizzazione ed impiego di un modello suino di fegato isolato e perfuso. *Atti del Convegno AISAL-SIVAL “Modelli chirurgici nella ricerca biomedica”*, 8-9 Settembre 2008, Milano.

Corona M, Di Napoli D, Castaldo S, De Martinis C, Corsi L, **Attanasio C**, Pantaleo A, Pepino P, De Marinis P, Apolito A, Musumeci A, Cozzolino S. L’utilizzo del maiale come modello animale in chirurgia cardio-vascolare. *Atti del Convegno AISAL-SIVAL “Modelli chirurgici nella ricerca biomedica”*, 8-9 Settembre 2008, Milano.

V Scuderi, A Giuliani, B Andria, E Alimenti, A Tammaro, S Scala, **C Attanasio**, M Corona, D Di Napoli, S Castaldo, A Pantaleo, F Calise. A swine liver transplantation model of ischemia/reperfusion injury: protective effects of the heme oxygenase-1 products. *Acta of the "43rd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL)"*, 23 – 27 Aprile 2008, Milano, abstract n. 372.

B Andria, A Bracco, E Alimenti, **C Attanasio**, A Tammaro, S Scala, RAFM Chamuleau, F Calise. The mini BioArtificialLiver: a cellular biosensor in the drug development process. *Acta of the "1st Industrial Biotechnology International Conference (IBIC)"*, 8-11 Giugno 2008, Napoli, p. 387.

Poyck PP, Hoekstra R, van Wijk AC, **Attanasio C**, Calise F, Chamuleau RA, van Gulik TM. Functional and morphological comparison of three primary liver cell types cultured in the AMC bioartificial liver. *Liver Transpl.* 13 (4), 589-98, 2007.

Conti A, Scala S, D'Agostino P, Alimenti E, Morelli D, Andria B, Tammaro A, **Attanasio C**, Ragione FD, Scuderi V, Fabbrini F, D'Esposito M, Di Florio E, Nitsch L, Calise, Faiella A. Wide gene expression profiling of ischemia-reperfusion injury in human liver transplantation. *Liver Transpl.* 13 (1), 99-113, 2007.

F Calise, A Musumeci, A Bracco, E Mezza, S Staibano, A Coppola, B Andria, V Scuderi, E Alimenti, A Pantaleo, **C Attanasio**, D Di Napoli, D Morelli, M Corona, ML Lavitrano, L Otterbein, FH Bach. Protection against ischemia reperfusion injury of an isolated perfused swine liver with biliverdin, carbon monoxide and both. *Acta of the "5th International Congress on Heme Oxygenases"*, 5-9 Settembre 2007, Krakow, Poland, p. 73.